

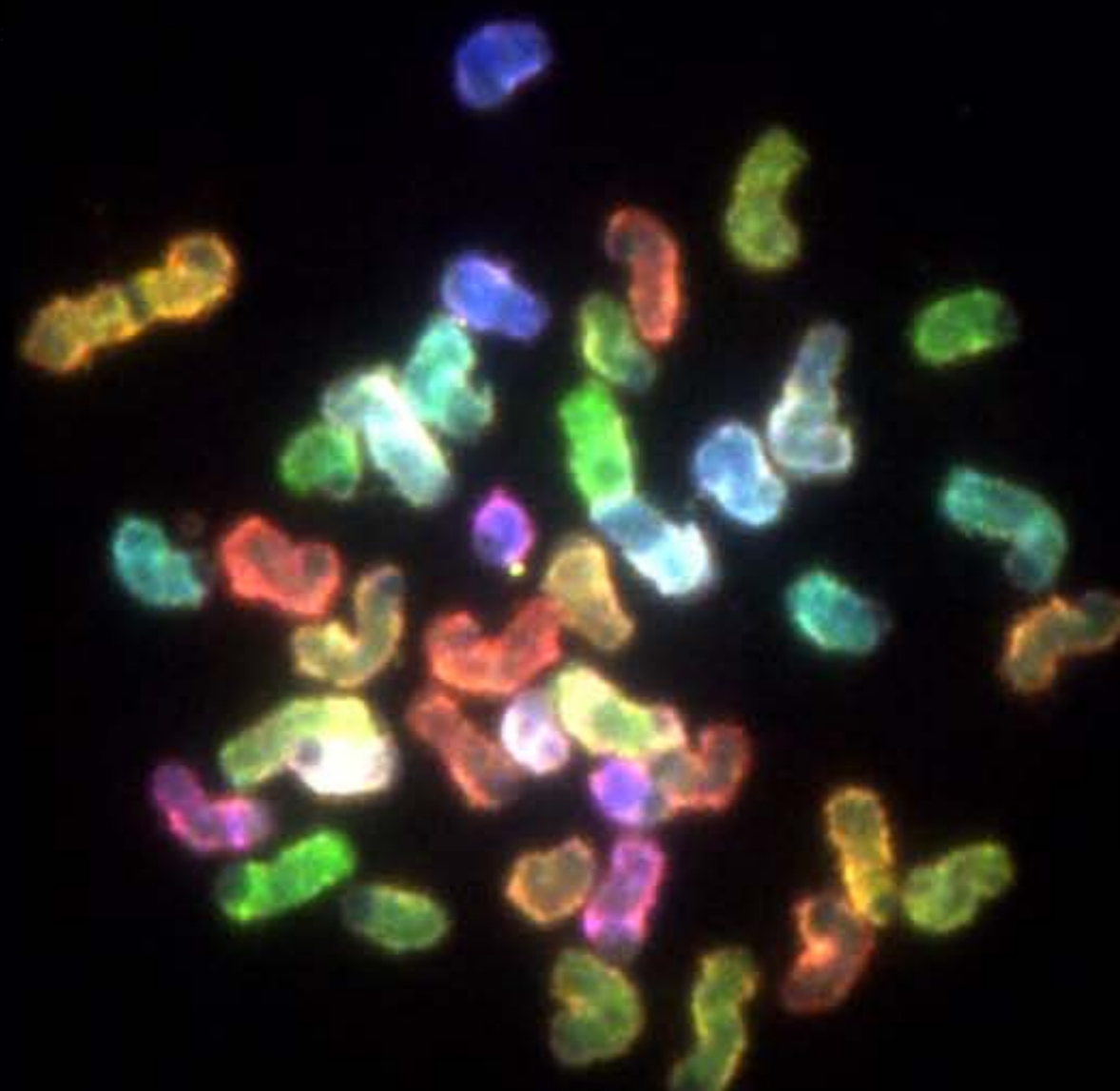
Marta Martín Flix

Universitat Autònoma de Barcelona



TESI DOCTORAL

***Inestabilitat cromosòmica i radiosensibilitat
en cèl·lules defectives en ATM i DNA-PKcs***



Marta Martín Flix
Novembre, 2008

Inestabilitat cromosòmica i radiosensibilitat en cèl·lules defectives en ATM i DNA-PKcs

Memòria presentada per

Marta Martín Flix

Per optar al grau de

Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi realitzada sota la direcció de

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Dra. Laura Tusell Padrós

A l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina i a la
Unitat de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Anna Genescà Garrigosa

Dra. Laura Tusell Padrós

Marta Martín Flix

Universitat Autònoma de Barcelona
Cerdanyola del Vallès, Novembre 2008

*A la meva família
Als meus pares
Al meu germà
Incondicionals, valents i honestos*

Res gran s'ha conquerit mai sense entusiasme
Ralph W. Emerson



-Senyor Gatet (...), em podria indicar la direcció que he de seguir des d'aquí?

-Això depèn –li va contestar el Gat- d'on vulguis arribar.

-No m'importa on... –va començar a dir l'Alicia.

-En aquest cas, tampoc importa la direcció que prenguis –li va dir el Gat.

- ... sempre i quan arribi a **algun lloc** –va acabar de dir l'Alicia.

-Això és fàcil d'aconseguir –li va dir el Gat-. Només has de seguir caminant!

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. Trencaments de doble cadena	1
2. Resposta al dany en el DNA	1
3. Detecció del dany en el DNA i amplificació de la resposta.....	4
4. Vies de reparació dels trencaments.....	6
<i>Via de reparació homòloga (HR)</i>	6
<i>Via de reparació no homòloga (NHEJ)</i>	8
<i>Elecció de la via de reparació</i>	12
5. Funcions específiques d'ATM i DNA-PKcs en els diferents mecanismes implicats en la DDR.....	14
5.1. DDR i control del cicle cel·lular.....	14
<i>Funcions d'ATM en el control del cicle cel·lular</i>	14
<i>Funcions de DNA-PKcs en el control del cicle cel·lular</i>	14
5.2. DDR i apoptosi.....	16
<i>Funcions d'ATM en la inducció de l'apoptosi</i>	16
<i>Funcions de DNA-PKcs en la inducció de l'apoptosi</i>	17
5.3. DDR i reparació de DSBs.....	17
<i>Funcions d'ATM en la reparació de DSBs</i>	17
<i>Funcions de DNA-PKcs en la reparació de DSBs</i>	18
6. Interaccions entre ATM i DNA-PKcs en els diferents mecanismes de la DDR.....	20
7. Funcions específiques d'ATM i DNA-PKcs en la V(D)J i en el metabolisme telomeric.....	22
7.1. Recombinació V(D)J.....	22
<i>Funcions d'ATM en la recombinació V(D)J</i>	23
<i>Funcions de DNA-PKcs en la recombinació V(D)J</i>	23
7.2. Integritat telomèrica.....	24
<i>Funcions d'ATM en el manteniment de la integritat telomèrica</i>	25
<i>Funcions de DNA-PKcs en el manteniment de la integritat telomèrica</i>	25
8. Inestabilitat cromosòmica.....	26
<i>Síndrome d'inestabilitat cromosòmica per mutació o deficiència en ATM</i>	28
<i>Síndrome d'inestabilitat cromosòmica per mutació o deficiència en DNA-PKcs</i>	28
Objectius.....	29
RESULTATS.....	30
CAPÍTOL I: Resultats relatius a DNA-PKcs	
<i>Postreplicative joining of DNA double strand breaks can cause genomic instability</i> <i>in DNA-PKcs deficient mouse embryonic fibroblasts</i>	31

CAPÍTOL II: Resultats relatius a ATM	
<i>Radiation induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open</i>	40
<i>Breaks invisible to the DNA damage repair machinery accumulate in ataxia-telangiectasia cells</i>	48
ANNEX DE RESULTATS	74
RESUM DELS RESULTATS	76
DISCUSSIÓ	77
És important la contribució de la disfunció telomèrica a la radiosensibilitat de les cèl·lules deficientes en ATM i DNA-PKcs?.....	77
Quina és la contribució dels defectes en el control del cicle cel·lular a la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica de les cèl·lules deficientes en ATM i DNA-PKcs?.....	81
Existeixen diferències significatives en la cinètica de reunió de DSBs entre les cèl·lules deficientes en les dues PIKKs?.....	84
Naturalesa de la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica en les cèl·lules deficientes en ATM.....	86
Naturalesa de la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica en les cèl·lules deficientes en DNA-PKcs.....	92
Conclusions	95
MATERIAL I MÈTODES	97
1. CULTIUS CEL·LULARS.....	97
1.1. Cèl·lules limfoblastoids AT i normals.....	97
Metodologia de cultiu.....	97
Metodologia de subcultiu.....	98
1.2. Fibroblasts embrionaris DNA-PKcs ^{+/+} i DNA-PKcs ^{-/-}	99
Metodologia de cultiu.....	99
Creuament dels animals.....	99
Obtenció i disgregació dels embrions.....	99
Metodologia de subcultiu.....	100
2. IRRADIACIÓ.....	100
3. OBTENCIÓ DE METAFASES.....	102
4. CONTROL DE LES DIVISIONS CEL·LULARS POST-IRRADIACIÓ.....	103
5. FISH (<i>fluorescence in situ hybridization</i>) TELOMÈRICA I CENTROMÈRICA.....	104

6.	mFISH (<i>multifluor o multiplex fluorescence in situ hybridization</i>).....	106
6.1.	mFISH.....	106
6.2.	SKY (<i>spectral karyotyping</i>).....	107
7.	ANÀLISI DE METAFASES.....	108
8.	IMMUNODETCCIÓ FLUORESCENT DE PROTEÏNES.....	111
9.	FUSIÓ DE CROMÀTIDES GERMANES.....	112
10.	BINUCLEATS.....	113
11.	CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR.....	113
12.	AFIGE (<i>asymetrical field inversion gel electroforesis</i>).....	113
13.	TRAP (<i>telomeric-repeat amplification protocol</i>).....	114
14.	LÀMINA RESUM DISENY EXPERIMENTAL ATM.....	119
15.	LÀMINA RESUM DISENY EXPERIMENTAL DNA-PKcs.....	120
	BIBLIOGRAFIA.....	121
	AGRAIMENTS.....	132

INTRODUCCIÓ



El Conill Blanc es va posar les ulleres i va preguntar:
- Per on vol sa Majestat que comenci?
- Comença pel començament –li va dir el Rei amb tota gravetat-; continua amb la continuació i finalitza amb el final. I després atura't.

1. Trencaments de doble cadena

Una de les lesions més importants que pot patir el DNA és el trencament dels enllaços fosfodièster que formen part del seu esquelet de sucre i fosfat, lesió que pot originar un trencament de cadena simple (SSB: *single strand break*). Si dos SSBs en cadenes oposades es troben a una distància inferior a 14 bases (Vispé i Satoh, 2000), l'aparellament que mantenen la resta de les bases nitrogenades no sol ser suficient per a mantenir les dues cadenes unides, donant lloc a un trencament de la doble cadena (DSB: *double strand break*). Són molts els agents que poden induir dany al material genètic i pertorbar la seva continuïtat. Tot i que molts d'ells tenen un origen exogen, també existeixen processos cel·lulars fisiològics que donen lloc a DSBs de manera habitual (**Taula 1**), i s'estima que en cèl·lules de mamífer es produeixen entre 10 i 100 DSBs per nucli i dia (Vilenchick i Knudson, 2003; Burma *et al*, 2006). Donat que els DSBs són potencialment letals, és de vital importància que la cèl·lula disposi de mecanismes eficients per a detectar-los i reparar-los ràpidament i així conservar, tant com sigui possible, la seqüència genètica original.

2. Resposta al dany en el DNA

Quan el DNA pateix alguna lesió, s'activa la maquinària de resposta al dany. Les cèl·lules disposen de xarxes de senyalització formades per diferents proteïnes que reconeixen el dany en el DNA i, activen altres proteïnes que acabaran aturant el cicle cel·lular. Durant aquesta aturada s'inicia tota una cascada de senyalitzacions que té com a finalitat la mobilització i el reclutament de proteïnes de reparació als punts de trencament. Quan la reparació no és possible o el dany és massiu, la cèl·lula desencadena una altra cascada de senyals que la conduiran a l'apoptosi o a la senescència cel·lular. En canvi, si el dany pot ésser resolt satisfactòriament, la cèl·lula reprendrà el seu cicle. Aquesta cascada de senyalitzacions i de vies inter-relacionades s'anomena via o maquinària de resposta al dany en el DNA (DDR: *DNA damage response*).

De manera molt esquemàtica podem descriure aquesta via de forma jeràrquica: a dalt de tot hi ha els factors **detectors** del dany, que activen i recluten als factors **transmissors i amplificadors** d'aquest senyal que, al seu torn, activaran i reclutaran les proteïnes **efectores** (**Figura 1**).

Agents / Procés Cel·lular		Mecanisme d'acció
ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>): radicals lliures d'oxigen		Les rutes metabòliques oxidatives de l'organisme generen radicals lliures ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 1O_2) que poden trencar els enllaços fosfodièster. S'estima que es generen 10^4 lesions oxidatives en una cèl·lula humana cada dia (Beckman i Ames, 1997)
Reorganitzacions genòmiques	V(D)J	Recombinació als gens TCR (<i>T-cell receptors</i>) de les cèl·lules T i als gens de les immunoglobulines de les cèl·lules B
	<i>Class-switch</i>	Recombinació d'una regió constant de la cadena pesada de les immunoglobulines a les cèl·lules B
Recombinació Meiótica	Intercanvi de material genètic entre cromosomes homòlegs en les cèl·lules germinals	
Bloqueig de la força de replicació	En avançar la força de replicació, el dany en una base o la generació d'un SSB pot donar lloc a un DSB	
Escurçament telomèric per divisió cel·lular	En cada divisió cel·lular els telòmers s'escurcen. Quan l'escurçament és extrem, els telòmers perden l'estructura del llaç <i>t</i> i la cèl·lula els identifica com a DSBs	
Radiacions (o agents radiomimètics)	UV	Generació de dímers de bases pirimidínicques, productes alquil i <i>crosslinks</i> que bloquegen la replicació del DNA
	Ionitzants (Raigs X i γ)	Generen DSBs de manera directa (les partícules ionitzants poden trencar el DNA per acció mecànica) o de manera indirecta (en generar radicals lliures).
Agents químics o quimioterapèutics (ciclofosfamida, cisplatí, etc.)		Els basats en l'acció de les topoisomerases I i II poden inhibir la replicació normal del DNA o bé segrestar el complex nucleoproteic (DNA i proteïnes) després de la inducció del DSB. Altres agents generen productes alquil i <i>crosslinks</i> que bloquegen la replicació del DNA.
Origen Exogen		
Origen Endogen		

Taula 1. Classificació i mecanisme d'acció de diferents agents que poden causar dany en el DNA en funció del seu origen.

Al cor d'aquesta via hi rauen els factors **transmissors**, que són proteïnes cinases pertanyents a la família de les PIKKs (*phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*). Les principals PIKKs implicades en la reparació del DNA són ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad3-related*) i DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), i cadascuna d'aquestes cinases respon a estímuls diferents. ATR s'activa en presència de SSBs i respon al dany en el DNA causat per radiacions UV i agents que generen *crosslinks*. ATM i DNA-PKcs, en canvi, responen bàsicament als DSBs generats per radiacions ionitzants i agents radiomimètics, tot i que DNA-PKcs també desenvolupa un paper molt important en la reparació de DSBs d'origen endogen.

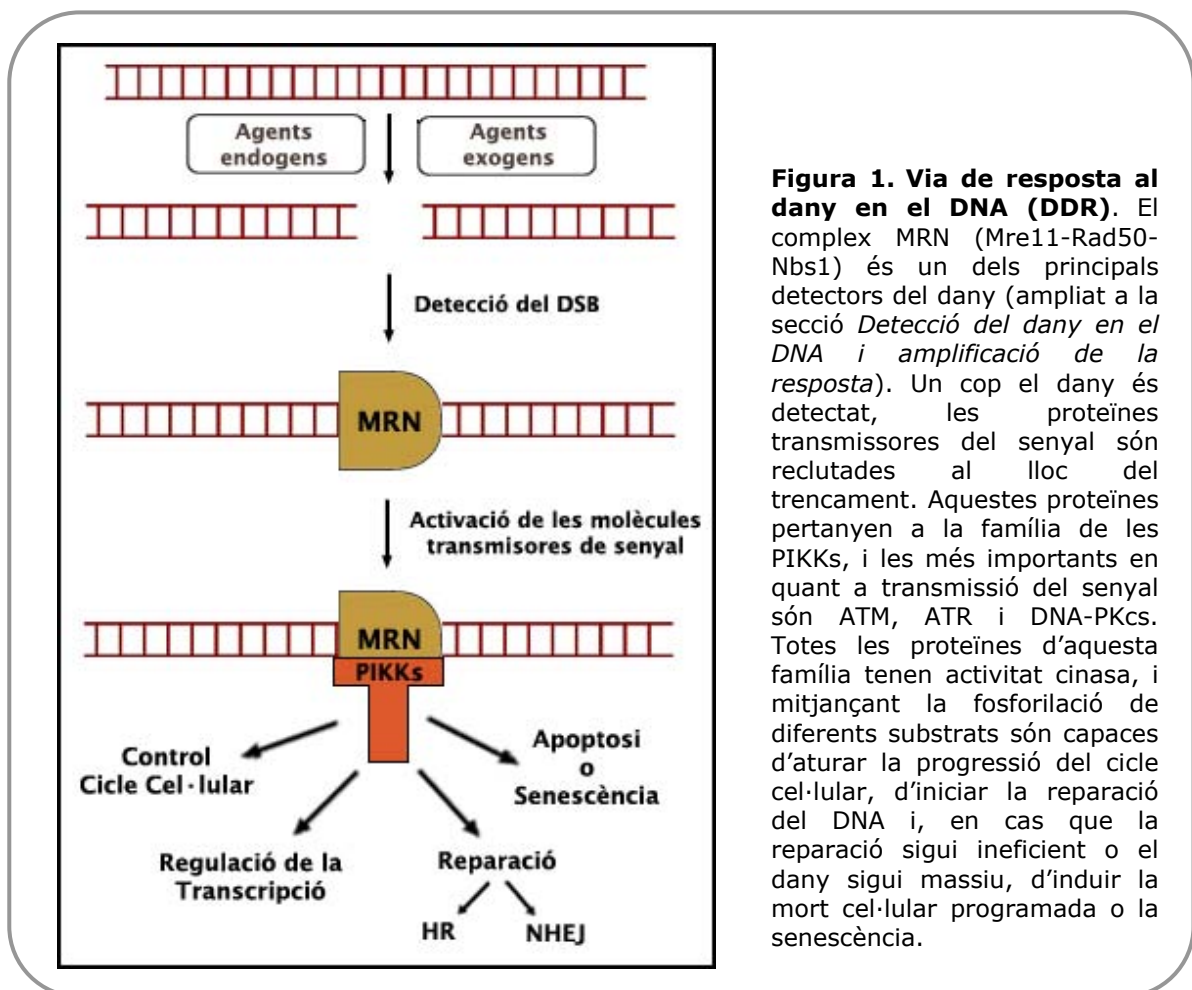


Figura 1. Via de resposta al dany en el DNA (DDR). El complex MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) és un dels principals detectors del dany (ampliat a la secció *Detecció del dany en el DNA i amplificació de la resposta*). Un cop el dany és detectat, les proteïnes transmissores del senyal són reclutades al lloc del trencament. Aquestes proteïnes pertanyen a la família de les PIKKs, i les més importants en quant a transmissió del senyal són ATM, ATR i DNA-PKcs. Totes les proteïnes d'aquesta família tenen activitat cinasa, i mitjançant la fosforilació de diferents substrats són capaces d'aturar la progressió del cicle cel·lular, d'iniciar la reparació del DNA i, en cas que la reparació sigui ineficient o el dany sigui massiu, d'induir la mort cel·lular programada o la senescència.

Un cop iniciada la transmissió del senyal del dany en el DNA, les PIKKs activaran i inhibiran els factors **efectors** per tal que s'aturi el cicle cel·lular, s'activin les vies de reparació del DNA, s'iniciï la transcripció dels factors necessaris i, en alguns casos, s'indueixi l'activació de les vies que conduiran a l'apoptosi o a la senescència cel·lular. S'ha de tenir en compte però, que aquest esquema està molt simplificat, ja que en realitat la via de resposta al dany no es limita a funcionar com una simple jerarquia on les proteïnes mantenen una posició fixa. Més aviat s'ha de pensar en un procés dinàmic on la senyalització del dany, la seva reparació i l'aturada

del cicle treballen alhora. Així, les proteïnes detectores, transmissores i efectores interactuen entre elles en ambdues direccions, ascendent i descendent, i poden desenvolupar diferents accions en el control del cicle i en la reparació en funció de la posició en la que es troben en cada moment.

3. Detecció del dany en el DNA i amplificació de la resposta

Detecció del dany

S'accepta de manera generalitzada que, en eucariotes superiors, el factor que activa ATM en resposta als DSBs radio-induïts és el complex MRN, format per Mre11, Rad50 i Nbs1 (Uziel *et al*, 2003; Lee i Paull, 2004) (**Figura 2**).

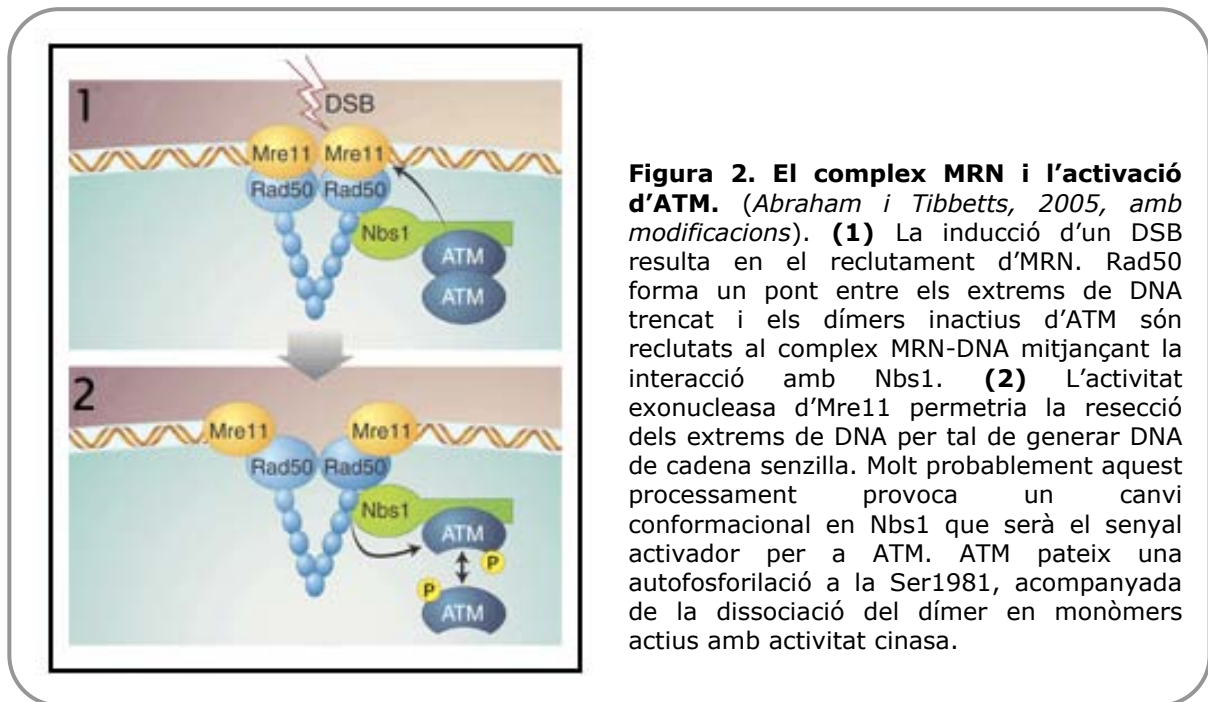


Figura 2. El complex MRN i l'activació d'ATM. (Abraham i Tibbetts, 2005, amb modificacions). **(1)** La inducció d'un DSB resulta en el reclutament d'MRN. Rad50 forma un pont entre els extrems de DNA trencat i els dímers inactius d'ATM són reclutats al complex MRN-DNA mitjançant la interacció amb Nbs1. **(2)** L'activitat exonucleasa d'Mre11 permetria la resecció dels extrems de DNA per tal de generar DNA de cadena senzilla. Molt probablement aquest processament provoca un canvi conformacional en Nbs1 que serà el senyal activador per a ATM. ATM pateix una autofosforilació a la Ser1981, acompanyada de la dissociació del dímer en monòmers actius amb activitat cinasa.

L'any 2003, Uziel i col·laboradors demostraren la relació entre ATM i el complex MRN: mentre que MRN s'uneix als DSBs independentment d'ATM (Mirzoeva i Petrini, 2001), la unió d'ATM als DSBs i la seva activació és depenent del complex MRN (Uziel *et al*, 2003). En consonància amb això, les cèl·lules defectives en Nbs1 (NBS; *Nijmegen Breakage Syndrome*) i Mre11 (ATLD; *ataxia-telangiectasia-like disease*) presenten una activació d'ATM deficient enfront de la radiació tot i posseir una cinasa funcional. ATM és reclutada al lloc del dany mitjançant la interacció amb l'extrem C-terminal d'Nbs1 (Berkovich *et al*, 2007; Stracker *et al*, 2007). Paral·lelament a aquest reclutament, Nbs1 interacciona amb Mre11 i Rad50, garantint la permanència de la cinasa al lloc del dany (**Figura 2.1**) (You *et al*, 2005). Com s'activa però ATM? L'any 2003 Bakkenist i Kastan van demostrar que la molècula d'ATM es troba en la cèl·lula en forma de dímers o multímers inactius. Després de la irradiació, es produeix la

fosforilació intermolecular d'ATM a la serina 1981 (domini FAT) i l'activació del domini cinasa d'ATM, que resulta en l'alliberació de monòmers actius. En el mateix treball es va demostrar que aquesta fosforilació és detectable immediatament després d'irradiar les cèl·lules a 0,1Gy i esdevé màxima 15 minuts després. S'espera que una dosi de 0,1Gy generi aproximadament 4 DSBs/cèl·lula, demostrant la rapidesa i sensibilitat d'aquest mecanisme (Bakkenist i Kastan, 2003). En aquest procés és especialment important l'activitat nucleasa del component Mre11 (**Figura 2.2**). Així, MRN detecta el dany en el DNA, s'hi uneix i desenrotlla els extrems trencats. Després, mitjançant Nbs1, recluta ATM al DSB. La presentació per part d'MRN de DNA processat de cadena simple gràcies a l'activitat nucleasa d'Mre11 és essencial per a l'activació d'ATM (Lee i Paull, 2005; Abraham i Tibbetts, 2005).

Amplificació del senyal de resposta al dany

Un cop reclutada al DSB, ATM esdevé activa i inicia la fosforilació de múltiples substrats involucrats en les vies de reparació, control del cicle cel·lular i apoptosi (Kurz i Lees-Miller 2004; Matsuoka *et al*, 2007). Una de les activacions més ràpides induïdes per ATM és la de la histona H2AX, mitjançant la seva fosforilació en la Ser139, generant γ H2AX (**Figura 3.1**) (Rogakou *et al*, 1998; Rogakou *et al*, 1999). La fosforilació de la H2AX és un esdeveniment molt conservat en l'evolució, ja que té lloc enfront de múltiples agents, pot ésser realitzat per altres cinases -com DNA-PKcs- i té lloc tant a llevat com a eucariotes superiors (Bassing *et al*, 2002; Stiff *et al*, 2004; Burma i Chen, 2004). La histona fosforilada senyalitza el DSB, però per a reclutar i retenir els factors de reparació al lloc del dany de forma eficient aquesta senyalització és amplificada, de manera que la γ H2AX s'estén des del punt del trencament fins a varies megabases més enllà (Rogakou *et al*, 1998; Paull *et al*, 2000; Celeste *et al*, 2003; Stiff *et al*, 2004). En el model més recent per a explicar l'amplificació d'aquest senyal hi juga un paper molt important -en estreta relació amb la γ H2AX- el factor MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*). MDC1 s'uneix a la histona fosforilada i des d'aquesta posició és capaç de reclutar més molècules d'ATM, que, al seu torn, podran fosforilar més molècules d'H2AX (**Figura 3.2**). El reclutament *en onada* d'ATM per part d'MDC1 escamparia la γ H2AX al llarg de les regions cromatíniques flanquejants del DSB (**Figura 3.3**) (Stucki *et al*, 2005; Lou *et al*, 2006; Stucki i Jackson, 2006). Aquesta plataforma permetria el posterior reclutament d'altres factors al lloc del DSB com ara 53BP1 (*p53 binding protein*), BRCA1 (*breast cancer 1*), CHK2 (*checkpoint kinase 2*) i SMC1 (*structural maintenance of chromosomes 1*), tots ells implicats en la via de senyalització del dany, de control del cicle i de reparació del DNA.

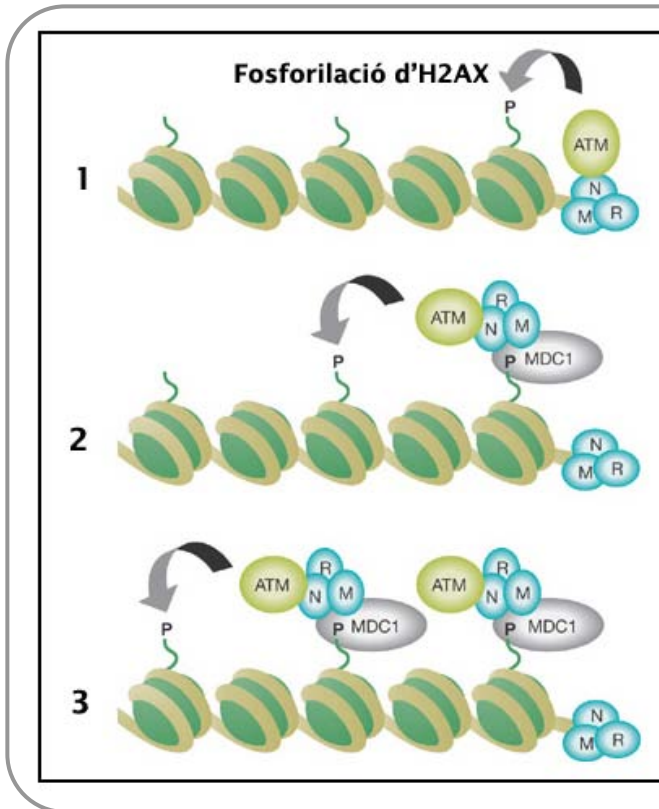


Figura 3.
Model d'amplificació del senyal en resposta al dany
(West i Attikum, 2006). **(1)** MRN s'uneix al DSB i hi recluta ATM, que fosforila H2AX. **(2,3)** MDC1 s'uneix a aquesta histona fosforilada, des d'on recluta més ATM. Aquest reclutament afavorirà la fosforilació d'H2AX situada en posicions cromatíniques més distals al DSB, afavorint l'amplificació del senyal.

4. Vies de reparació dels DSBs

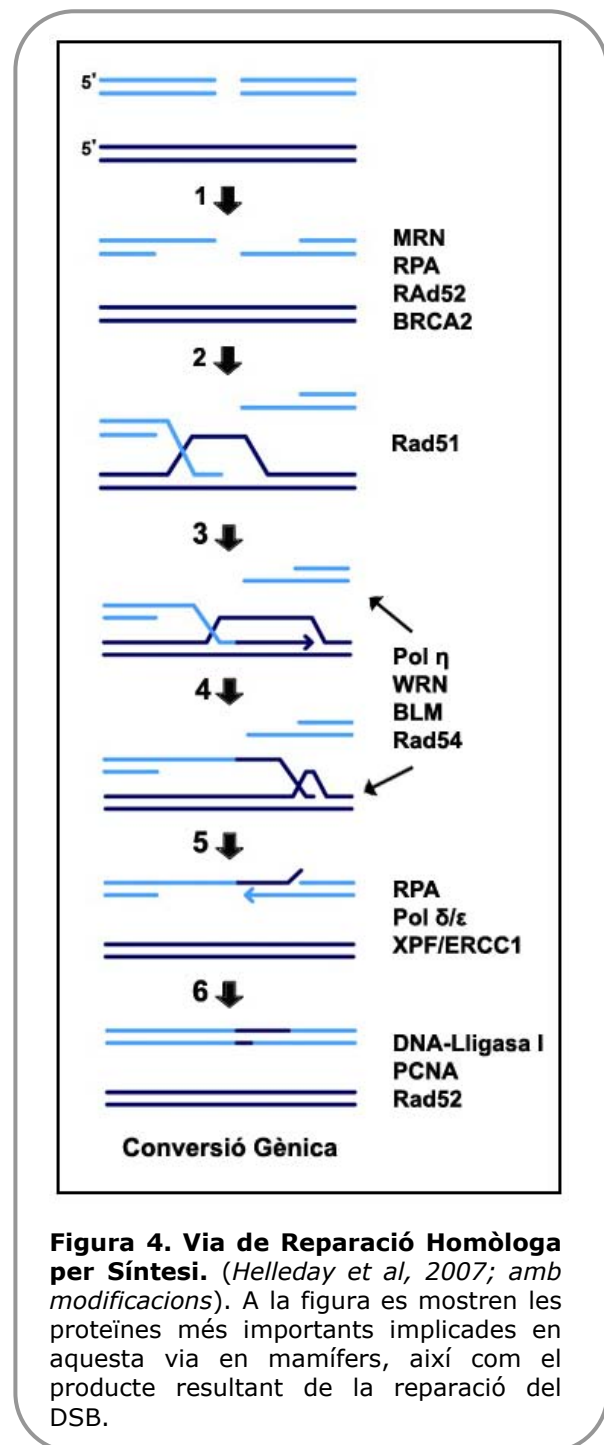
Un cop el DSB ha estat detectat i correctament senyalitzat, ha d'ésser eficientment reparat. En mamífers existeixen dues vies principals per reparar els DSBs: la via de reparació homòloga (HR o HRR: *Homologous Repair, Homology directed Repair o Homologous Recombination Repair pathway*) i la via de reparació no homòloga o de reunió no homòloga d'extrems (NHEJ: *Non-Homologous End Joining*). La diferència més gran entre les dues vies és la utilització o no d'una cadena motlle per la reparació del DNA lesionat. La HR utilitza com a motlle grans regions d'homologia de la cromàtide germana (habitualment) o del cromosoma homòleg (esporàdicament). La NHEJ, en canvi pot reunir dos extrems trencats prescindint de qualsevol homologia. A continuació s'explica el mecanisme d'acció de la HR i la NHEJ i es descriuen les proteïnes més importants que participen en cadascuna d'aquestes vies.

HR: Via de reparació homòloga o via de reparació (homòloga) per síntesi —

De manera habitual, la via de reparació homòloga es basa en l'ús de la cromàtide germana com a motlle per replicar el DNA i reparar el DSB generat. Hi ha múltiples proteïnes implicades en la via de HR; nucleases per degradar el DNA del punt de trencament, helicases per desenrotllar la doble cadena de DNA, polimerases, per sintetitzar *de novo* els extrems adjacents al trencament i lligases per reunir-los. La reparació homòloga sempre s'inicia amb la resecció d'un dels extrems del DSB en sentit 5'→3'. A partir d'aquí existeixen múltiples sub-vies de reparació per síntesi, com per exemple l'aparellament de cadena senzilla (*single*

strand annealing), el model de la doble unió de Holliday (*double-Holliday junction model for DSB repair*) o l'aparellament de cadena associat a síntesi (*synthesis-dependent strand annealing*). Per a una revisió exhaustiva de totes aquestes sub-vies es recomana un article recent de Helleday *et al*, 2007 (<http://web.mit.edu/engelward-lab/animations/>). En aquesta tesi i com a exemple de reparació homòloga ens limitarem a explicar la darrera sub-via: l'aparellament de cadena associat a síntesi.

Quan es produeix un trencament en una doble cadena de DNA, el primer pas és la resecció d'una de les cadenes en el sentit 5'→3' (**Figura 4.1**) generant dos extrems de cadena simple (*overhang*) (**Figura 4.1**). La resecció pot ser realitzada pel complex MRN (Mre11, Rad50 i Nbs1), ja que Mre11 presenta activitat exonucleasa, i els *overhangs* generats són immediatament embolcallats per diferents proteïnes com la RPA (*Replication protein A*) i la Rad52. La RPA protegeix el DNA d'una excessiva degradació per part de les nucleases i també impedeix el plegament de les cadenes simples sobre elles mateixes, configuració que impediria l'accés a la zona del DSB de polimerases i altres proteïnes implicades en la reparació del DNA. La proteïna Rad52 desplaça a la RPA de la cadena simple i, alhora, recluta a la recombinasa Rad51, una de les proteïnes clau de la via d'HR. La proteïna BRCA2 (*breast cancer 2*) també té un paper important en facilitar el desplaçament de la RPA de la cadena senzilla per facilitar l'entrada de Rad51. La Rad51 unida al DNA de cadena simple forma un complex nucleoproteic que catalitza la invasió de la doble hèlix de la cromàtide germana i facilita la recerca d'homologia (**Figura 4.2**).



Degut a aquesta invasió, la cadena no aparellada del dúplex motlle es desplaça, generant una estructura anomenada llaç D (*D-loop*) (Figura 4.2, cadena blau fosc). A més a més del llaç D, la invasió de la cadena motlle i l'aparellament de cromàtides genera una estructura en forma de creu entre les dues cadenes, anomenada unió de Holliday (*Holliday junction*) (**Figura 4.2**). Un cop s'ha format l'heterodúplex, comença la síntesi de DNA. Vàries polimerases participen en la síntesi del nou DNA des de l'extrem 3', tot i que una de les més importants en humans és la polimerasa η (eta), ja que pot polimeritzar en els llaços D. A mida que la síntesi de nou DNA va avançant, la unió de Holliday va lliscant sobre les cadenes de DNA en sentit 3' (**Figura 4.3**). Hi ha moltes proteïnes que s'associen a les unions de Holliday *in vivo*, però encara no és clar com es coordinen entre elles ni l'abast exacte de les seves funcions. Les proteïnes Rad54, WRN (amb funció helicasa i exonucleasa) i BLM (amb funció helicasa) faciliten la migració d'aquesta estructura, tot i que encara roman per establir com es decideix la direcció de la migració. Quan la síntesi de DNA és completa una de les maneres més senzilles d'alliberar l'extrem sintetitzat *de novo* és fer lliscar la unió de Holliday fins a l'extrem 3' lliure (**Figura 4.4**). Un cop alliberat, el DNA de cadena simple recentment sintetitzat és immediatament embolcallat per la RPA. Si l'extensió per part de la polimerasa ha estat excessiva, pot ser que hi hagi una petita solapa de DNA sobrant a l'extrem 3' sintetitzat *de novo*. Aquest DNA sobrant interferiria en el lligament amb l'altre extrem de DNA, raó per la qual pot ésser processat per les endonucleases XPF/ERCC1 (**Figura 4.5**). Ara la cadena simple acabada de sintetitzar serveix de motlle a la seva cadena complementària, que omple els espais buits mitjançant l'acció de les polimerases δ/ϵ (**Figura 4.5**). Finalment tots aquests extrems són reunits per la DNA-Lligasa I, ajudada per altres proteïnes com ara la PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), la Rad52 i possiblement p53 (**Figura 4.6**).

És obvi que la HR promou una reparació que podríem definir com a fidel: en utilitzar un motlle de DNA no hi ha pèrdua de material genètic (delecions) tot i la resecció prèvia. De tota manera, independentment de la resolució de la unió de Holliday, la reparació homòloga dona lloc a conversió gènica (intercanvi no recíproc de seqüències) al punt del trencament (**Figura 4.6**) (Johnson i Jasin, 2000; Jonnalagadda *et al*, 2005).

NHEJ: via de reparació no homòloga o no dependent de síntesi —————

La via de reparació no homòloga (NHEJ) és la via preferent de reparació dels DSBs en eucariotes superiors, i es caracteritza per no necessitar cap DNA motlle. Teòricament doncs, aquesta via de reparació pot reunir dos extrems de DNA en qualsevol moment del cicle cel·lular. Quan un DSB és reparat per la NHEJ, els extrems trencats se superposen i es lliguen, patint un mínim o cap processament previ, com veurem a continuació. Aquesta característica fa que se la consideri una via propensa a l'error, ja que (1) pot reunir extrems il·legítims i (2) en cas de processament del DSB, es poden introduir delecions o canvis nucleotídics en el punt

d'unió. D'altra banda la NHEJ és una via de reparació ràpida (Mao *et al*, 2008), i si els extrems trencats no s'allunyen gaire, poden ser reparats en 10 minuts (Déry i Mason, 2007). Vàries proteïnes estan implicades en la via de NHEJ, i la seva acció i coordinació demostra la complexitat d'un procés aparentment simple (*Per a revisió*: Weterings i Chen, 2008).

Primer de tot, les proteïnes Ku70 i Ku80 s'uneixen, formant un heterodímer que presenta una alta afinitat pels extrems de DNA. El dímer Ku70/80 té forma circular, i aquesta estructura li permet embolcallar cadascun dels extrems de DNA trencat, tal i com faria un anell (Walker *et al*, 2001). Un cop units al DNA, els dos heterodímers de Ku interactuen l'un amb l'altre, mantenint en proximitat els dos extrems de DNA (Jin i Weaver, 1997) i afavorint així la reunió legítima d'extrems trencats (**Figura 5.1**). La unió de Ku i el DNA forma un complex sinàptic que actua com una plataforma pel reclutament de moltes de les proteïnes implicades en la via de NHEJ. A més, l'heterodímer Ku presenta activitat helicasa, que li permet desembolicar la doble cadena de DNA en la zona del trencament, i així fer-la accessible a l'acció de les proteïnes de reparació. La DNA-PKcs presenta una gran afinitat per aquest complex i pels extrems de DNA (Hammarsten *et al*, 2000; Mårtensson i Hammarsten, 2002), i és reclutada al lloc del DSB per Ku70/80 de manera gairebé immediata. Un cop la DNA-PKcs arriba al DSB, l'heterodímer Ku pot girar sobre la doble cadena i allunyar-se de l'extrem trencat, generant espai suficient per la unió de la DNA-PKcs (**Figura 5.2**). Dues molècules de DNA-PKcs s'uneixen al DNA, una a cada extrem, i interaccionen entre elles generant un pont que manté els dos extrems del DNA propers (**Figura 5.3**) (Spagnolo *et al*, 2006; Rivera-Calzada *et al*, 2005 i 2007). La DNA-PKcs és una proteïna molt gran (465 kDaltons), de manera que la formació del complex Ku-DNA-DNA-PKcs bloqueja l'accés d'altres proteïnes al DNA -com ara nucleases- que podrien afavorir la degradació prematura del DSB. Així doncs, a més de la funció sinàptica, la DNA-PKcs té una activitat protectora, regulant l'accés de diferents proteïnes al DNA trencat. Un cop correctament alineats, els extrems del DNA hauran de ser processats i lligats pels factors adequats. Per tal de fer possible l'accés d'aquests factors i donada la seva activitat cinasa, la DNA-PKcs és capaç d'autofosforilar-se en diferents residus. Concretament l'autofosforilació a la Thr2609 li indueix un canvi conformacional necessari per permetre a altres factors l'accés al DNA (Chan *et al*, 2002), sent aquest un pas indispensable per a que es doni una eficient reparació dels DSBs.

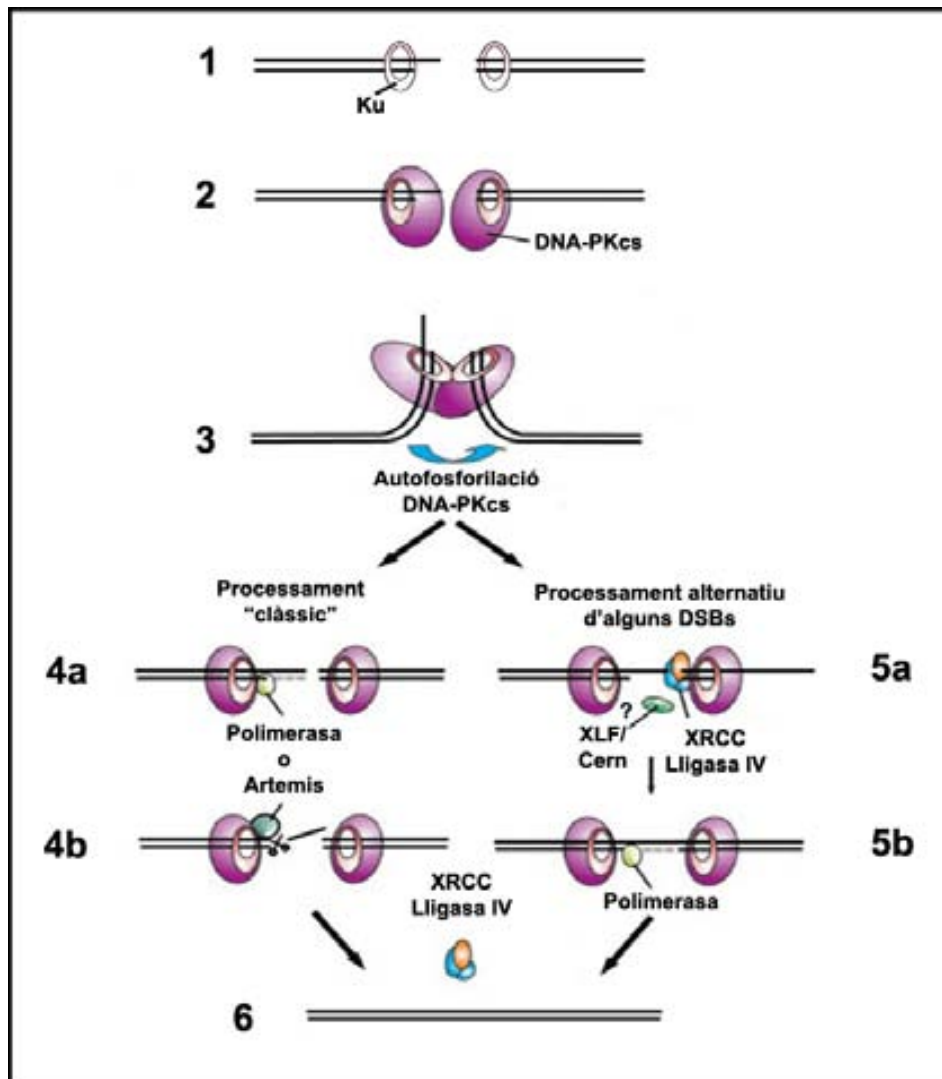


Figura 5. Via de Reparació No Homòloga. (Weterings i Chen, 2008; amb modificacions). Ku i DNA-PKcs s'uneixen al DSB i mantenen els extrems de DNA pròxims (**1** i **2**). Després de l'autofosforilació de DNA-PKcs (**3**), el DSB és accessible a altres proteïnes de reparació. En el **processament clàssic**, Artemis i diferents polimerases processen el DSB fins a obtenir extrems roms (**4a** i **4b**). Durant el **processament alternatiu**, Cernunnos (o XLF) pot lligar extrems de cadena simple mentre les polimerases afegeixen a la cadena complementària els nucleòtids que falten (**5a** i **5b**). Finalment el complex XRCC4/Lligasa IV catalitza la unió dels extrems, restablint la integritat de la doble cadena de DNA (**6**).

La forma més simple de DSB seria el que consta de dos extrems roms. Un DSB d'aquestes característiques no necessitaria cap processament previ i podria ser lligat immediatament. La majoria de vegades però, els extrems generats no són roms, sinó que el DSB presenta extrems 3' ó 5' de cadena simple. El **processament clàssic** d'aquest tipus de DSBs en la via de NHEJ es basa en la generació de substrats "l·ligables" prèviament a la seva reunió; és a dir dos extrems de DNA roms amb un -OH a l'extrem 3' i un -fosfat a l'extrem 5'. Hi ha dues maneres de generar extrems roms: omplir els extrems trencats fins a generar-los o bé reseccionar els extrems trencats fins a obtenir la terminació desitjada. En el **processament clàssic per addició**, XRCC4 és reclutada al DSB pel complex DNA-Ku i, al seu torn, recluta DNA polimerases (probablement polimerases de tipus beta [*beta-like*] com la Pol μ i la Pol λ i

altres com la TdT) i polinucleòtid cinases. Les polinucleòtid cinases tenen acció cinasa (poden transferir grups fosfat des d'una molècula d'ATP a grups 5'-OH) i acció fosfatasa (poden eliminar grups fosfat dels extrems 3'-fosfat). La conseqüència d'aquestes activitats és la conversió d'extrems trencats no lligables en extrems lligables 5'-fosfat/3'-OH que ja estan a punt per ser reunits (**Figura 5.4a**). En el **processament clàssic per resecció** és molt important l'acció de la proteïna Artemis. Artemis va ser descrita a l'any 2001 (Moshous *et al*, 2001) i és una nucleasa que pot reseccionar extrems de cadena simple en la via de NHEJ, tot i que també desenvolupa una funció molt important en la recombinació V(D)J (Ma *et al*, 2002). Per sí sola, Artemis només presenta activitat exonucleasa 5'→3', però adquireix activitat endonucleasa quan s'associa a la DNA-PKcs. Artemis resecciona els extrems de cadena senzilla que pugui presentar el DSB, generant dos extrems roms i lligables (**Figura 5.4b**).

Alguns DSBs sense extrems roms podrien ser lligats per la NHEJ seguint un **processament alternatiu**. En aquest tipus de processament hi tindria un paper rellevant una proteïna recentment descoberta per dos grups alhora i anomenada Cernunnos (Buck *et al*, 2006) o XLF (*XRCC4-like factor*) (Ahnesorg *et al*, 2006). XLF presenta homologia seqüencial i estructural amb XRCC4 i, com aquesta, sembla tenir una funció específica en el lligament d'extrems trencats. Varis autors han proposat un model on XLF seria capaç d'unir un extrem rom amb un extrem 3' de cadena simple si presentessin una petita homologia (**Figura 5.5a**). Aquesta funció podria prevenir la resecció d'extrems de cadena simple, afavorint la preservació de les seqüències de DNA. Finalment una polimerasa s'encarregaria d'omplir els espais necessaris fins a restablir íntegrament la continuïtat de la doble cadena (**Figura 5.5b**). El pas final i comú en la via de NHEJ -independentment del processament previ del DSB- és la reunió dels extrems de DNA. La Lligasa IV també és reclutada al lloc del DSB per la XRCC4, amb qui forma el complex XRCC4/Lligasa IV, la funció del qual és catalitzar la unió dels dos extrems trencats (**Figura 5.6**). La importància d'aquest darrer complex en la reparació dels DSBs queda demostrada pel fet que la deficiència en qualsevol de les dues proteïnes resulta en mortalitat embrionària en ratolins, i les cèl·lules deficientes en qualsevol dels dos enzims són extremadament sensibles a les radiacions ionitzants (van Gent *et al*, 2001). S'accepta que aquest complex és reclutat al DSB i activat pel complex DNA-Ku, (Nick McElhinny *et al*, 2000), tot i que XRCC4 també és un substrat de la DNA-PKcs *in vitro*.

Després de ser reparat per la NHEJ, el DNA pot presentar alteracions en la seva seqüència, com ara delecions que poden afectar la integritat i funció d'alguns gens. Les conseqüències d'aquestes alteracions en el DNA també poden ser l'activació d'oncogens o la inactivació de gens supressors de tumors. La magnitud d'aquestes delecions dependrà del dany inicial i de l'extensió de la resecció que s'hagi dut a terme per obtenir extrems lligables. D'altra banda, si

els extrems reunits no són legítims, el resultat de la reparació per aquesta via pot donar lloc a reorganitzacions cromosòmiques com per exemple cromosomes dicèntrics o translocacions.

Elecció de la via de reparació

Les diferències més gran entre les vies d'HR i NHEJ són la utilització o no d'una cadena motlle per a la reparació del DNA lesionat (1), i la fidelitat dels productes resultants respecte a la seva seqüència original(2). La NHEJ pot reunir dos extrems trencats prescindint de qualsevol motlle i, en molts casos durant el processament de DSBs per aquesta via, es generen delecions o insercions. En canvi, la HR utilitza com a motlle grans regions d'homologia - preferentment de la cromàtide germana (Johnson i Jasin, 2001)- que poden abastar 100 parells de bases, resultant en la reconstitució de la seqüència original. Tot i que la NHEJ és doncs, per definició, una via propensa a l'error, un treball recent on es mesura i compara la cinètica de reparació d'ambdues vies conclou que la NHEJ és tres cops més eficient que la HR (Mao *et al*, 2008). No només això, sinó que la NHEJ que uneix extrems de DNA compatibles és la més eficient, seguida de la NHEJ que realitza unions il·legítimes. En el treball, realitzat sobre cèl·lules humanes en fase de creixement exponencial, el procés d'HR triga 7h en ser completat, mentre que la reparació per NHEJ és completa en 30 minuts. Els autors conclouen que la NHEJ és una via més ràpida i eficient que la HR (Mao *et al*, 2008).

Tanmateix encara s'ha de resoldre quin mecanisme determina que un DSB sigui reparat per la NHEJ o la HR, o fins a quin punt les dues vies interaccionen. Hi ha varis factors que semblen influir a l'hora que un DSB sigui reparat per una o altra via:

Tipus cel·lular: Al contrari que en llevats, en mamífers i plantes la via de NHEJ és preferent. Potser aquesta elecció ve donada per la composició del genoma: en els genomes llargs i repetitius d'animals i plantes, una HR *massa* eficient podria comportar reorganitzacions potencialment letals, sent la NHEJ un avia més segura. La contrapartida d'aquesta elecció és l'acumulació al genoma de delecions i insercions que poden contribuir a l'envelliment i a l'inici de la tumorigènesis.

Fase del cicle cel·lular: La dependència de motlle de la HR farà que la utilització d'aquesta via estigui molt determinada per la fase del cicle. Ja que la cromàtide germana és el motlle preferit tant en llevats com en mamífers (Johnson i Jasin, 2001; Shrivastav *et al*, 2008), la HR actua preferentment al final de la fase S i a G2. Les cèl·lules deficientes en HR són molt radiosensibles durant S/G2 i, en canvi, només són lleugerament radiosensibles durant la fase G1/G0 (Saleh-Gohari i Helleday, 2004). També s'ha demostrat que l'expressió de Rad51 i Rad52 (pertanyents a la via d'HR) incrementa durant la fase S (Chen *et al*, 1997). Per la seva banda, la NHEJ és activa i funcional durant tot el cicle (Chen *et al*; 2005), tot i que és la via de reparació més utilitzada en G1, on els cromosomes consten d'una sola cromàtide. En

aquest sentit s'ha descrit que les cèl·lules deficientes en DNA-PKcs són més radiosensibles durant la fase G1 del cicle que durant la fase S. A més a més, l'activitat cinasa de DNA-PKcs és alta a G1 i baixa a S, quan també disminueix la seva fosforilació (Lee *et al*, 1997; Chen *et al*, 2005).

Interacció entre les dues vies: l'elecció d'una via o l'altra en funció de la fase del cicle en la que es troba la cèl·lula no és mecanísticament tan senzilla i s'han descrit molts matisos. Alguns autors plantegen un **model competitiu** entre ambdues vies. Per exemple, s'ha demostrat que la HR espontània és més elevada en cèl·lules defectives en DNA-PKcs (Fukushima *et al*, 2001; Allen *et al*, 2002; Burma i Chen, 2004). En aquest sentit Allen i col·laboradors (2003) van descriure un increment en la reparació de DSBs per la via de HR en absència de DNA-PKcs, demostrant que, en aquestes circumstàncies, els trencaments són dirigits a la via d'HR. Tanmateix, quan DNA-PKcs és present a la cèl·lula però en forma inactiva, la reparació per la via d'HR es veu disminuïda. Els mateixos autors plantegen un model en el qual, la DNA-PKcs inactiva -i per tant incapaç d'autofosforilar-se- no pot abandonar el DSB o patir el canvi conformacional necessari perquè hi accedeixin factors de reparació de qualsevol via, disminuint així l'eficiència general de la reparació.

Altres autors suggereixen un **model de col·laboració i sincronització** entre HR i NHEJ (**Figura 6**). Freqüentment, proteïnes d'ambdues vies són localitzades conjuntament als llocs de trencament del DNA, com ara Ku (NHEJ), Rad50 (HR) i Mre11 (HR en eucariotes), i existeixen evidències de que ambdues vies poden cooperar en les fases S i G2 del cicle (Takata *et al*, 1998). El treball de Kim i col·laboradors (2005) demostra que, després de la inducció de múltiples DSBs, Mre11, Ku, DNA-PKcs i la Lligasa IV són reclutades de manera immediata als punts de trencament, tant a G1 com a S/G2. Aquests factors colocalitzen als DSBs, suggerint que els components de la NHEJ són actius en les dues fases del cicle cel·lular. Rad51 i RPA també són reclutats als DSBs, però de manera més lenta, i la seva expressió a G1 és més baixa que a S/G2. Altres treballs ja havien descrit un reclutament més ràpid dels factors de la NHEJ inclús a S/G2 (Delacote *et al*, 2002; Frank-Vaillant i Marcand, 2002). Ku i DNA-PKcs desapareixen dels DSBs 8 hores després de la inducció del dany, mentre que Rad51, Mre11 i γ H2AX hi persisteixen 24 hores després. Els autors suggereixen un model en el què les dues vies de reparació no competeixen, sinó que la NHEJ actua com una via de reparació immediata i primerenca, mentre la HR té una funció més tardana, orientada a la reparació de lesions més persistents o que entra en acció a mida que els trencaments es van processant i s'exposa DNA de cadena simple.

En resum, una complicada cascada de senyals acaba afavorint l'acció preferent d'una o altra via en funció de l'origen cel·lular, del moment del cicle cel·lular, i també del tipus de dany que

ha patit el DNA, tot i que encara hi ha molts camps d'investigació oberts al voltant d'aquesta qüestió.

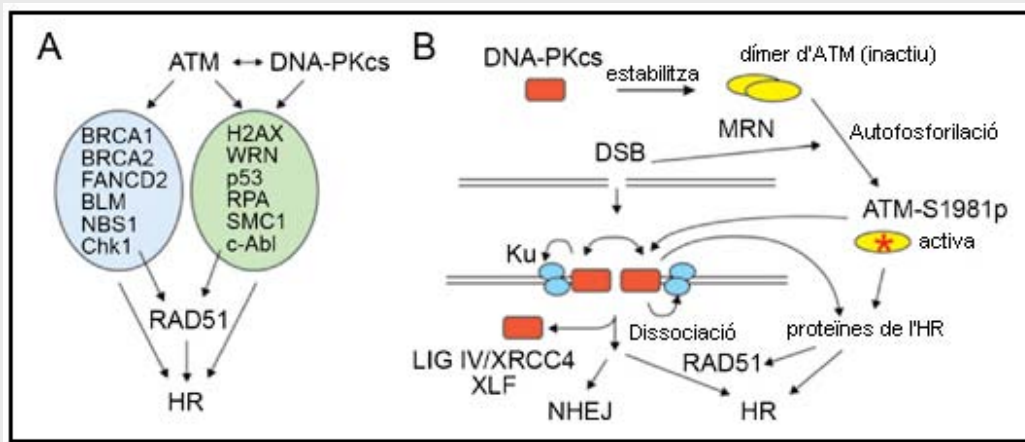


Figura 6 . Model per a la co-regulació de les vies d'HR i NHEJ per part de la DNA-PKcs i d'ATM. (Shrivastav et al, 2008; amb modificacions). **(A)** Llistat de les principals proteïnes activades per ATM i per DNA-PKcs. L'activació d'aquestes proteïnes desemboca en una HR activa, on algunes d'elles hi estan directament implicades. ATM, a més a més, fosforila la DNA-PKcs. **(B)** DNA-PKcs pot estabilitzar ATM, que serà reclutada al DSB per MRN, on patirà una autofosforilació i es dissociarà en monòmers actius amb activitat cinasa. DNA-PKcs és fosforilada per ella mateixa i també per ATM, de manera que pateix un canvi conformacional que permet l'accés d'altres factors de reparació de la via de NHEJ i d'HR al DSB.

5. Funcions específiques d'ATM i DNA-PKcs en els diferents mecanismes implicats en la DDR

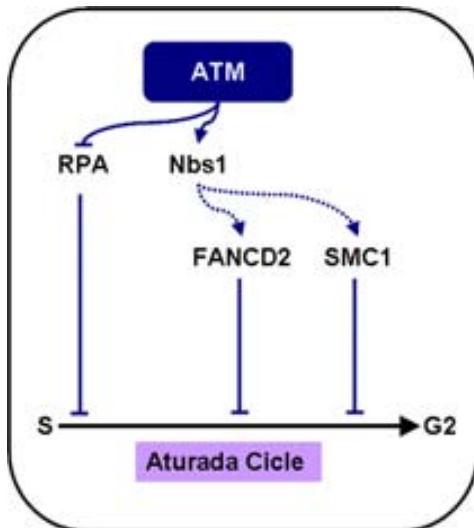
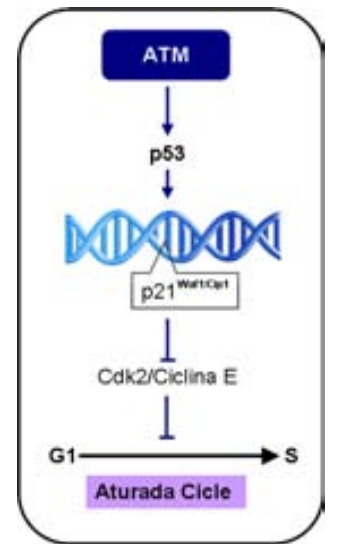
Fins ara s'han descrit en detall aquells mecanismes d'actuació de la DDR que permeten detectar i reparar el dany en el DNA. ATM i DNA-PKcs han aparegut com a proteïnes transmissores del senyal (ATM) i associades a la reparació (DNA-PKcs), però aquestes cinases desenvolupen altres funcions relacionades amb la DDR. A continuació detallarem varies d'aquestes funcions per tal d'assolir una visió general dels àmbits d'actuació de les dues cinases. Aquesta visió ens permetrà comprendre l'abast del fenotip de les cèl·lules i individus portadors de mutacions per aquestes proteïnes

5.1. DDR i control del cycle cel·lular

Funcions d'ATM en el control del cycle cel·lular

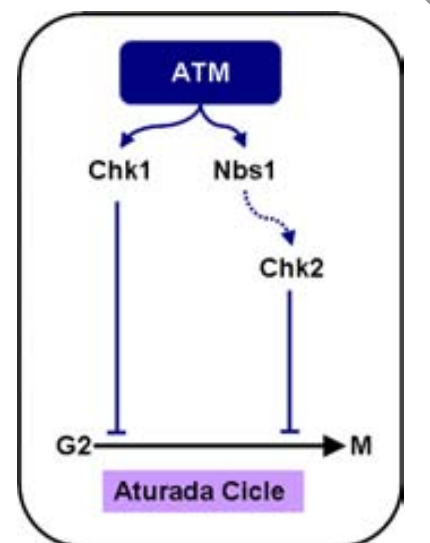
En resposta al dany en el DNA, ATM desenvolupa una funció essencial en el control del cycle cel·lular i apareix com la *gran* reguladora, ja que indueix l'aturada a G1/S, S i G2/M. Així com l'aturada del cycle a G1 i a S ajuda a prevenir la replicació d'un genoma defectuós, l'aturada a G2 s'inicia per permetre la reparació del DNA prèviament a la mitosi, i així evitar la transmissió de material genètic danyat.

Aturada a G1/S: L'aturada a G1/S dona temps a la cèl·lula perquè repari el DNA abans de la replicació. D'altra banda, una aturada perllongada a G1 per manca de reparació evitarà la proliferació de cèl·lules danyades. Un pas essencial per a l'aturada del cicle a G1/S és l'activació de p53 per part d'ATM. Un cop fosforilada, p53 es dissocia del seu inhibidor, mdm2 i pot experimentar altres modificacions per tal d'activar diferents gens responsables de l'aturada del cicle, com ara p21^{Waf1/Cip1}. La p21 activada inhibirà el complex cdk2/ciclina E, que permet el pas de la fase G1 a la fase S.



Aturada a S: Per tal d'induir l'aturada a la fase S ATM fosforila directament RPA (inactivant-la) i Nbs1 (activant-la). L'activació d'Nbs1 facilita la fosforilació indirecta per part d'ATM de d'SMC1 (que també és un factor de reparació del DNA) i de FANCD2 (*fanconi anemia complementation group 2*), ambdues implicades en l'aturada del cicle a la fase S. L'acció d'ATM sobre RPA, SMC1 i FANCD2 aconsegueix bloquejar de manera efectiva la replicació del DNA, en aturar l'expansió de les forques de replicació.

Aturada a G2/M: ATM atura la cèl·lula en aquesta fase mitjançant la fosforilació directa de Chk1 (*checkpoint kinase 1*) i la fosforilació indirecta de Chk2, facilitada per Nbs1. L'aturada del cicle a G2/M només és directament dependent d'ATM quan les cèl·lules estan a G2 en el moment de la irradiació. En cas contrari, aquesta aturada és dependent d'altres mecanismes (Xu *et al*, 2002; Krempler *et al*, 2007).



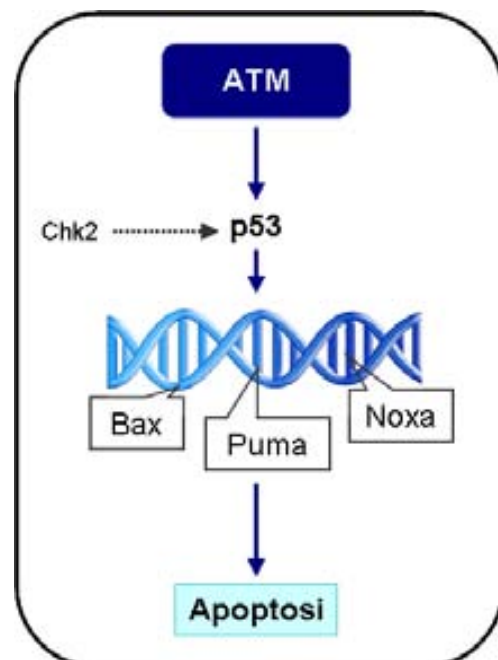
Funcions de DNA-PKcs en el control del cycle cel·lular

Donada la implicació de les PIKKs en els mecanismes de control del cycle cel·lular, es va suposar que DNA-PKcs també podria tenir un paper important en la regulació del cycle cel·lular. Tot i que DNA-PKcs és capaç de fosforilar p53 *in vitro* (Wang i Eckhart, 1992; Lees-Miller *et al*, 1992), s'ha demostrat que la fosforilació de p53 per induir l'aturada del cycle cel·lular *in vivo* és deguda a ATM i ATR (Jhappan *et al*, 2000; Shiloh *et al*, 2004). D'altra banda l'aturada del cycle cel·lular a G1 i la fosforilació de p53 no es troba alterada en cèl·lules deficientes en DNA-PKcs. Per tant, aquesta cinasa no sembla implicada en la inducció de l'aturada del cycle a G1 en resposta a la radiació. De la mateixa manera no s'ha demostrat cap implicació de DNA-PKcs en el control del cycle a la fase G2/M. Tanmateix, DNA-PKcs pot tenir un paper rellevant en l'aturada del cycle a la fase S mitjançant la fosforilació d'RPA. RPA és una proteïna implicada en la replicació, reparació i recombinació del DNA (veure secció 4. *Vies de reparació dels DSBs; Reparació per la via d'HR*). Aquesta fosforilació d'RPA per part de la DNA-PKcs podria senyalitzar la presència de DSBs al DNA replicant per tal d'induir una aturada del cycle a S (Shao *et al*, 1999) i afavorir així la reparació del DNA (Wang *et al*, 2001).

5.2. DDR i apoptosi

Funcions d'ATM en la inducció de l'apoptosi

En cas que el dany en el DNA sigui massiu, la cèl·lula pot activar els mecanismes d'apoptosi que conduiran a la seva mort per tal d'evitar la proliferació d'una cèl·lula tan severament danyada. La principal proteïna diana d'ATM en aquesta via és p53, tot i que també hi estan implicades cAbl, IκB i Nbs1. p53 és fosforilada a les serines 15, 20 i 46 per ATM, però també per Chk2 (Hirao *et al*, 2000). Un cop activada, p53 s'uneix a seqüències específiques de gens pro-apoptòtics, activant la seva transcripció. Alguns d'aquests gens són *Bax*, *Puma* o *Noxa* (Arakawa, 2005).



Funcions de DNA-PKcs en la inducció de l'apoptosi

A mida que s'avança en la investigació de les funcions de DNA-PKcs, es fa més evident la seva important implicació en la inducció de l'apoptosi. L'apoptosi radioinduïda en timòcits de ratolí es troba significativament suprimida en absència de DNA-PKcs (Wang *et al*, 2000). Diversos resultats similars suggereixen que la fosforilació de p53 per part de la DNA-PKcs no indueix l'aturada del cycle cel·lular a G1 com fa ATM, sinó que activa, de manera selectiva, la via de l'apoptosi. La senyalització de la via de l'apoptosi per part de DNA-PKcs no es limita a una resposta a les radiacions, sinó que també s'ha observat en cèl·lules amb escurçament telomèric excessiu. L'escurçament telomèric en ratolins deficients en *Terc* (*Terc*: RNA de la telomerasa) condueix a una apoptosi massiva de les cèl·lules germinals, mentre que els dobles KO (*knock outs*) per a *Terc* i DNA-PKcs no mostren un increment de l'apoptosi en aquestes cèl·lules (Espejel *et al*, 2002; Burma i Chen, 2004). Finalment, estudis recents suggereixen que, en un paral·lelisme amb p53, DNA-PKcs podria fosforilar H2AX no en resposta al dany com ATM, sinó per tal d'induir l'apoptosi en la cèl·lula afectada (Mukherjee *et al*, 2006).

5.3. DDR i reparació de DSBs

Funcions d'ATM en la reparació de DSBs

ATM activa diferents proteïnes directament relacionades amb la senyalització i la reparació del dany en el DNA (**Figura 7**). Tal com hem descrit anteriorment (veure la secció 3. *Detecció del dany en el DNA i amplificació de la resposta*), un dels primers substrats d'ATM és la **H2AX**. Un cop fosforilada, la γ H2AX s'estén fins a 2 megabases al voltant del DSB, creant una plataforma per al reclutament i retenció d'altres factors de reparació (Rogakou *et al*, 1998; Paull *et al*, 2000; Celeste *et al*, 2003; Stiff *et al*, 2004). Algunes de les proteïnes implicades en la via de reparació homòloga del DNA activades de manera directa o indirecta per ATM són BRCA1, Rad51 i MRN.

► **BRCA1** és directament fosforilada per ATM i, un cop activada, es localitza a complexos de replicació i de reparació en estreta interacció amb el complex MRN. BRCA1 és necessària per a la fosforilació d'altres substrats d'ATM en resposta a les radiacions, com ara p53, c-jun, Nbs1, SMC1, Chk1 i Chk2 (**Figura 7**). BRCA1 sembla actuar doncs com una proteïna reclutadora que fa accessibles per a ATM molts dels seus substrats no associats a la cromatina.

► ATM també és responsable de l'activació de **Rad51**, una de les proteïnes més importants de la via de reparació homòloga. ATM activa Rad51 de forma indirecta i seguint dues vies (**Figura 7**). Per una banda Rad51 és activada mitjançant la prèvia fosforilació de cAbl per

part d'ATM. D'altra banda BRCA1, que ha estat fosforilada per ATM, interactua amb BRCA2 que, al seu torn, acaba activant a Rad51.

► Tot i que la unió d'MRN al DNA és independent d'ATM, **MRN** també és un substrat d'ATM, ja que s'ha descrit que la cinasa fosforila directament Nbs1 i Mre11, dos dels components d'aquest complex. Mentre la fosforilació d'Mre11 té conseqüències encara desconegudes (Lavin, 2004), la fosforilació d'Nbs1 li permet a ATM activar de forma eficient altres factors implicats en la inducció de l'apoptosi, el control del cicle i la reparació, com ara Chk2, FANCD2 i SMC1 (Stracker *et al*, 2007) (**Figura 7**).

► **Artemis** és una proteïna de reparació pertanyent a la via de reparació no homòloga, on actua en estreta relació amb la DNA-PKcs. Tanmateix sembla que Artemis és preferentment activada per ATM en resposta a la radiació ionitzant (Riballo *et al*, 2004) (**Figura 7**), i per aquesta raó s'ha suggerit que ATM i Artemis col·laboren estretament en la reparació d'un tipus de trencaments radio-induïts de naturalesa encara desconeguda (Riballo *et al*, 2004).

Funcions de DNA-PKcs en la reparació de DSBs

► Donada la seva naturalesa cinasa, a DNA-PKcs se li suposa la capacitat de fosforilar i activar altres components de la NHEJ; per exemple DNA-PKcs pot fosforilar **Ku**, **Lligasa IV** i **XRCC4** *in vitro* (**Figura 7**), però la seva fosforilació *in vivo* encara no ha estat demostrada i les conseqüències d'aquesta fosforilació semblen relativament prescindibles per a l'acció d'aquests factors en la via de reparació (Lee *et al*, 2004; Burma i Chen, 2004; Douglas *et al*, 2005).

► Sí s'ha demostrat en canvi l'estreta relació entre DNA-PKcs i **Artemis** (**Figura 7**). Aquestes dues proteïnes col·laboren juntes en la reparació de DSBs radio-induïts i els generats durant la V(D)J (Rooney *et al*, 2002; Moshous *et al*, 2001; Ma *et al*, 2002). DNA-PKcs fosforila Artemis, i s'especula si aquesta fosforilació proveeix a Artemis d'activitat endonucleasa o només afavoreix el manteniment d'Artemis en un lloc proper al DSB que facilitaria la seva reparació (Ma *et al*, 2002; Rooney *et al*, 2002; Rooney *et al*, 2003). Recentment s'ha descrit una mutació parcial de DNA-PKcs en humans que afecta a la Leu3062 i que comporta l'absència d'activitat nucleasa en Artemis (van Gent; comunicació personal).

► Un dels substrats principals de DNA-PKcs és ella mateixa (**Figura 7**). S'han descrit 7 llocs potencials de fosforilació en **DNA-PKcs**, 3 dels quals són residus conservats TQ. Aquests tres llocs (Thr2609, Thr2638 i Thr2647) són fosforilats en resposta a la radiació, i la mutació d'algun d'ells es tradueix en diferents graus de radiosensibilitat. L'autofosforilació de DNA-PKcs a la Thr2609 és indispensable perquè es doni una reparació eficient en la via de NHEJ.

Aquesta fosforilació molt probablement indueix un canvi conformacional en la DNA-PKcs que permet l'accés de la resta de factors de reparació implicats en aquesta via als extrems trencats de DNA.

►Finalment, DNA-PKcs, com ATM, també pot fosforilar la histona **H2AX** en resposta a les radiacions (**Figura 7**). Ja que la senyalització del dany per part de la γ H2AX és una resposta altament conservada, no és estrany que ATM i DNA-PKcs tinguin funcions redundants en aquest aspecte. Sembla ser que, en cèl·lules defectives en ATM però, la inducció de *foci* de γ H2AX és lleugerament més lenta, raó per la qual s'ha suggerit que ATM pot tenir un paper dominant en aquesta fosforilació, com a mínim en els primers moments després de la irradiació (Stiff *et al*, 2004), mentre que DNA-PKcs podria ser la principal responsable de la fosforilació de la histona en resposta a la inducció de l'apoptosi (Mukherjee *et al*, 2006).

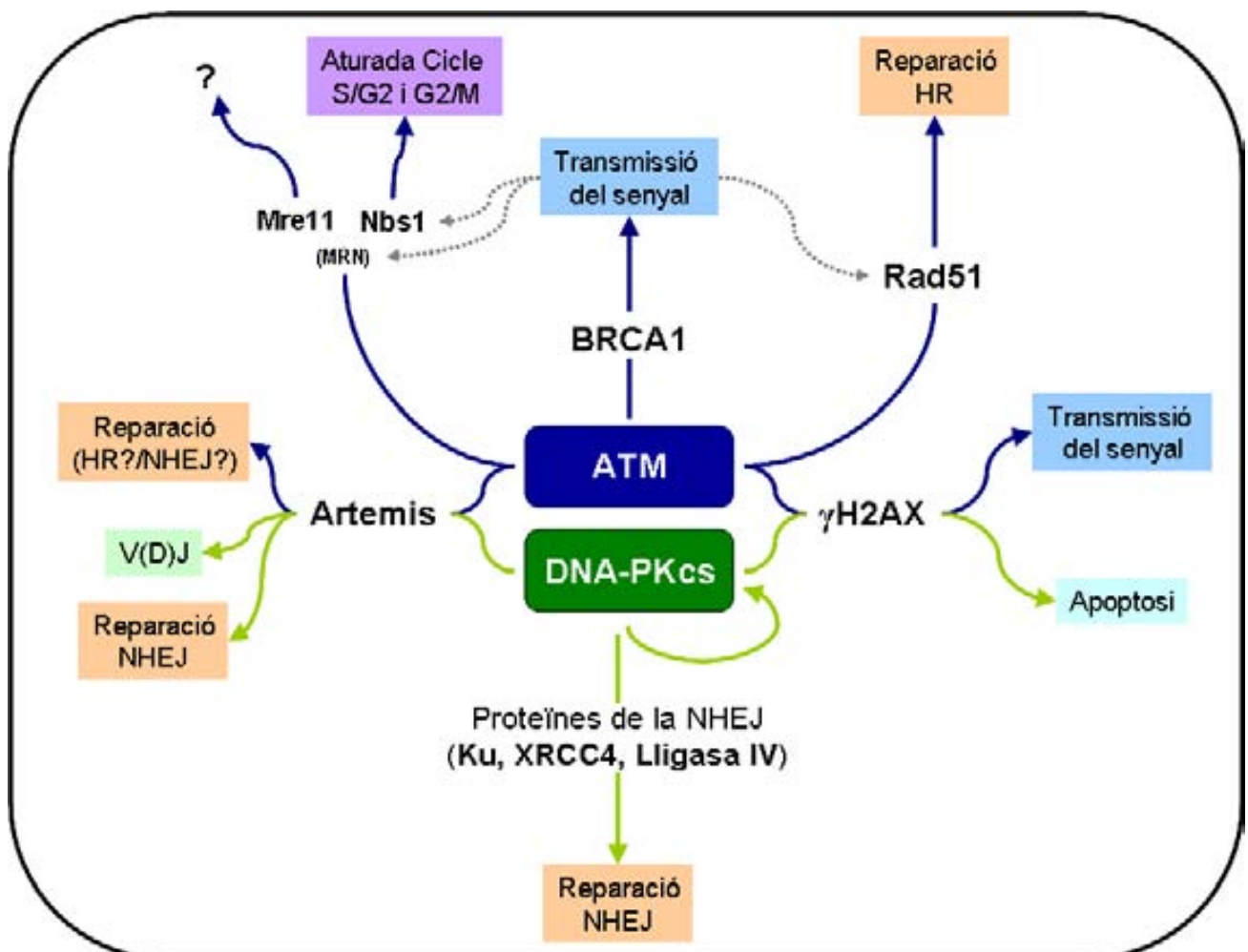
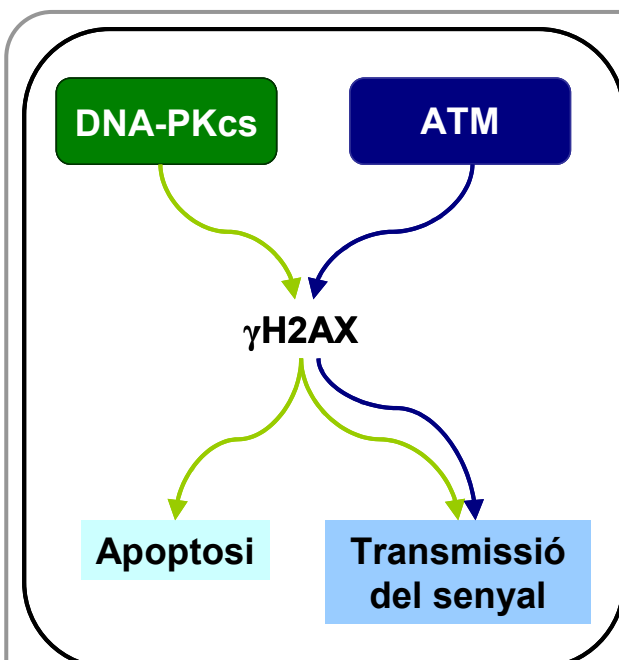
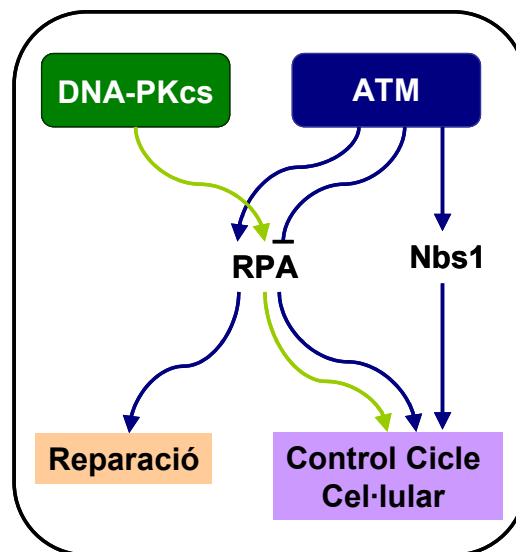


Figura 7. Funcions d'ATM i DNA-PKcs en la DDR. L'esquema mostra els principals substrats d'ATM i DNA-PKcs implicats en la DDR. Alguns substrats són exclusius de cada cinasa mentre que altres poden ser activats per ambdues proteïnes. D'altra banda, l'activació dels substrats per part d'una o altra proteïna pot conduir a la participació dels mateixos en diferents vies, demostrant la complementarietat de funcions d'ambdues cinases.

6. Interaccions entre ATM i DNA-PKcs en els diferents mecanismes de la DDR

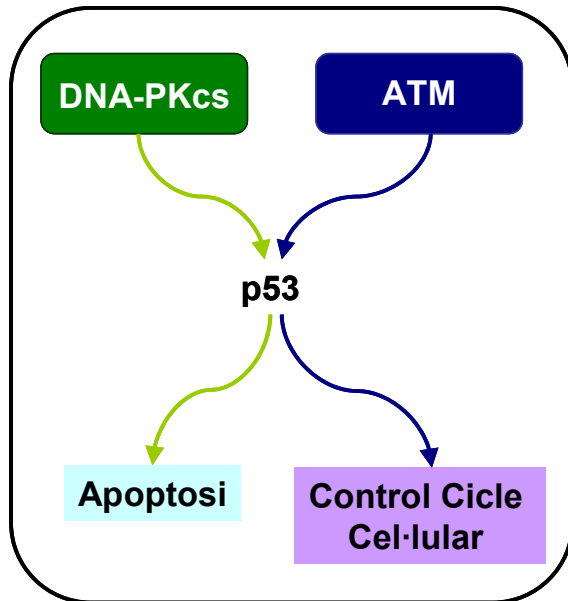
Un cop detallades les vies d'actuació i els substrats d'ambdues cinases es fa palès un important grau de complementarietat en les seves funcions. ATM i DNA-PKcs apareixen com actors d'una mateixa obra que, interpretant papers moltes vegades complementaris però diferents, comparteixen un escenari i objectius comuns. ATM senyalitza el dany i és la principal responsable d'aturar el cicle, mentre DNA-PKcs actua en una de les vies de reparació activades. Vàries proteïnes implicades en aquesta reparació són fosforilades per ambdues cinases (H2AX, RPA, Artemis).

Després de ser activada per ATM, **RPA** juga un paper important en la via de **reparació** homòloga i en l'**aturada del cicle** a la fase S. D'altra banda RPA pot ser fosforilada per DNA-PKcs, i aquesta fosforilació també podria induir l'**aturada del cicle** a la fase S. Finalment hem de recordar que ATM també pot controlar l'aturada de la cèl·lula a S mitjançant la fosforilació d'**Nbs1**.



ATM és la principal cinasa implicada en la fosforilació d'**H2AX** en **resposta al**

dany induït per les radiacions (Burma *et al*, 2001), però també DNA-PKcs pot realitzar aquesta funció en cèl·lules humanes irradiades (Stiff *et al*, 2004; Fernandez-Capetillo *et al*, 2004) i, de fet, les cèl·lules deficientes en ATM formen *foci* de γ H2AX en resposta a les radiacions (Rogakou *et al*, 1998). La histona H2AX també és fosforilada durant l'apoptosi, quan el DNA cel·lular es fragmenta en oligonucleosomes. Estudis recents han demostrat que DNA-PKcs i no ATM és la cinasa responsable de fosforilar l'H2AX per induir l'**apoptosi** (Mukherjee *et al*, 2006).

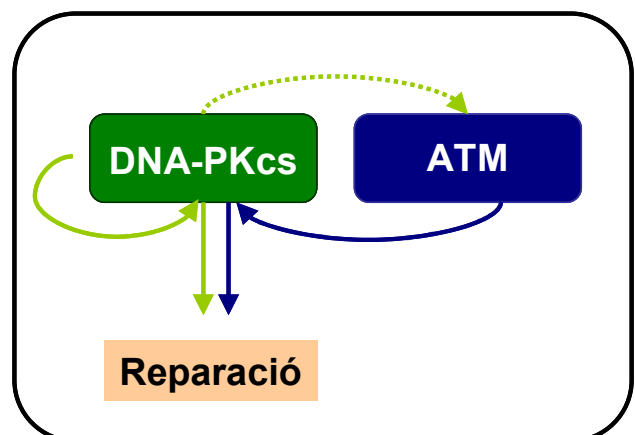


Aquesta complementarietat de funcions (l'activació d'un mateix substrat indueix

mecanismes diferents), concorda amb l'observada en altres experiments que demostren que mentre ATM és la principal cinasa implicada en l'activació de **p53** per a regular el **cicle cel·lular**, DNA-PKcs està involucrada en l'activació de p53 per a la inducció de l'**apoptosi** (Wang *et al*, 2000; Espejel *et al*, 2002; Veure DNA-PKcs i Apoptosi). Així doncs, moltes de les accions induïdes per ATM i DNA-PKcs són redundants i complementàries alhora, i el conjunt global demostra que la cèl·lula disposa de diverses vies per assolir un mateix objectiu, assegurant així una eficient resposta al dany en el DNA.

Un exemple més de la relació entre aquestes dues cinases és la capacitat d'ATM de fosforilar i activar **DNA-PKcs**. Concretament, ATM fosforila a la DNA-PKcs a la Thr2609 (que també és un lloc d'autofosforilació de la pròpia DNA-PKcs) i aquesta fosforilació arbitrada per ATM és crítica per l'eficient **reparació** de DSBs per part de DNA-PKcs (Chen *et al*, 2007). És possible que la fosforilació de la Thr2609 de DNA-PKcs per part d'ATM sigui un requeriment previ per induir l'activitat endonucleasa d'Artemis (Chen *et al*, 2007), tot i que no es pot descartar que Artemis pugui ser fosforilada per les dues cinases de manera independent. Finalment, s'ha apuntat la possibilitat que

la manca o deficiència severa en DNA-PKcs causi una disminució de la quantitat de l'mRNA d'ATM i de la pròpia proteïna ATM, suggerint que la DNA-PKcs pot tenir una funció en la regulació de la transcripció d'ATM (Peng *et al*, 2005).



7. Funcions específiques d'ATM i DNA-PKcs en la V(D)J i en el metabolisme telomeric

A part de la seva actuació en els mecanismes de la DDR que acabem de descriure, ATM i DNA-PKcs també desenvolupen funcions específiques en la V(D)J i en el metabolisme telomèric. Aquests dos mecanismes no pertanyen a la DDR, però les alteracions en el seu funcionament a causa de la manca d'alguna de les dues cinases genera limfòcits portadors de delecions i cromosomes amb extrems desprotegits respectivament. Aquests DSBs són doncs conseqüència de la manca d'ATM o de DNA-PKcs i, al seu torn, poden induir l'activació de qualsevol dels mecanismes de la DDR abans descrits. A continuació descriurem breument aquests dos mecanismes i el rol que ATM i DNA-PKcs hi desenvolupen.

7.1. Recombinació V(D)J

La recombinació V(D)J és un procés essencial que té com a objectiu generar immunoglobulines actives i receptors de cèl·lules T actius en limfòcits B i T proliferants. Per aconseguir-ho, en limfòcits T i B es recombinen segments de gens per a receptors d'antigen (**Figura 8**). Aquests segments dels gens es classifiquen en regions variables (V), de diversitat (D) i d'unió (*joining*) (J). La NHEJ s'encarrega de reparar els DSBs que es generen durant la recombinació V(D)J. Si aquest tipus de recombinació falla, el desenvolupament dels limfòcits B i T es bloqueja, generant una severa immunodeficiència.

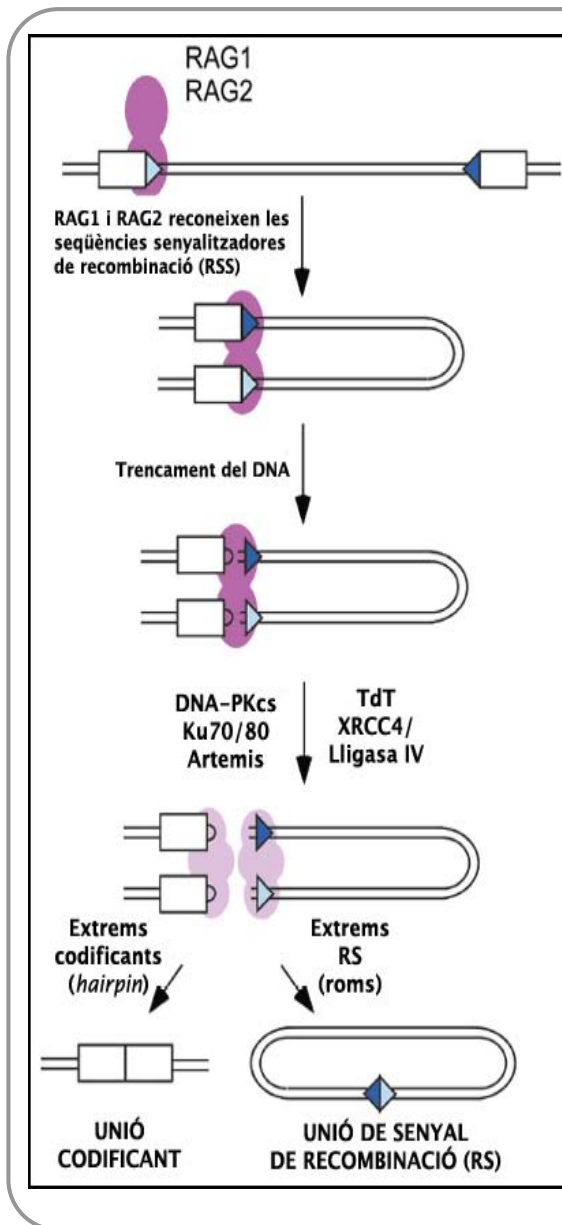


Figura 8. Recombinació V(D)J i proteïnes de la NHEJ (Krangel, 2003; amb modificacions). RAG1 i RAG2 indueixen DSBs a les seqüències senyalitzadores de recombinació (RSS), generant dos extrems de senyal de recombinació (RS) i dos extrems codificants. En ser roms, els extrems RS poden ser reunits pels factors de la NHEJ sense cap processament previ, generant una unió de senyal de recombinació (RS). El DNA dels extrems codificants forma un *hairpin* que els segella. Per ser obert, aquest llaç de DNA precisa de l'acció específica d'Artemis i DNA-PKcs. Un cop obert el DNA, els extrems codificants són processats i lligats, també per la via de NHEJ.

Funcions d'ATM en la recombinació V(D)J

Els individus amb mutacions al gen *Atm* (*ataxia-telangectasia mutated*) presenten esterilitat i immunodeficiència degut a la implicació d'ATM en les recombinacions meiótica, *class-switch* i V(D)J. Un treball recent de Bredemeyer i col·laboradors (2006) suggereix que ATM pot tenir un paper molt important estabilitzant els DSBs generats durant la V(D)J i mantenint-los propers als complexos de reparació. A més, es creu que el paper d'ATM en el control del cicle cel·lular també és molt important durant aquest tipus de recombinació. En absència d'ATM, els limfòcits portadors de DSBs generats durant la V(D)J podrien entrar en fase S degut al defecte en el control del cicle. Això implicaria (1) una disminució en la producció de limfòcits competents i (2) un increment en el nombre de delecions i translocacions en aquestes cèl·lules (Franco *et al*, 2006; Callén *et al*, 2007). En aquest sentit s'ha descrit àmpliament que els individus amb mutacions al gen *Atm* tenen una susceptibilitat més elevada de patir càncer, sobretot limfomes i leucèmies, i molts d'aquests càncers presenten translocacions que involucren els *loci* dels receptors d'antígens de les immunoglobulines (Lavin i Shiloh, 1997; Taylor *et al*, 2005).

Funcions de DNA-PKcs en la recombinació V(D)J

Els models de ratolí deficientes en proteïnes de la NHEJ (Ku70, Ku80, XRCC4, Lligasa 4, DNA-PKcs i Artemis) presenten diferents graus d'immunodeficiència, deguda a defectes més o menys severes en el procés de recombinació V(D)J. Els ratolins deficientes en DNA-PKcs, tot i poder formar unions RS (unions de senyal de recombinació) amb relativa normalitat, presenten una severa afectació en la formació d'unions codificants (Taccioli *et al*, 1998). En els timòcits d'aquests ratolins s'acumulen els extrems codificants segellats en forma de llaç, indicant que DNA-PKcs intervé de manera determinant en el processament d'aquest tipus d'extrems (Roth *et al*, 1992). El mecanisme pel qual DNA-PKcs processa els extrems en llaç generats a la recombinació V(D)J pot ser directe o pot dependre d'Artemis. Els ratolins deficientes en Artemis també presenten defectes en la recombinació V(D)J i, similarmet als ratolins defectius en DNA-PKcs, poden formar unions RS amb relativa normalitat mentre que la formació d'unions codificants es troba severament afectada. Donat que DNA-PKcs forma un complex amb Artemis i la fosforila *in vitro*, al 2002 es va proposar un model pel qual DNA-PKcs, en fosforilar Artemis, li confereix la capacitat endonucleasa necessària per a obrir el *hairpin* que forma el DNA en els extrems codificants (Ma *et al*, 2002; Rooney *et al*, 2002). Treballs posteriors demostren que la fosforilació de DNA-PKcs a la Thr2609 és necessària per facilitar l'activitat endonucleasa d'Artemis (Goodarzi *et al*, 2006), confirmant l'existència d'un vincle funcional entre les dues proteïnes. En resum es demostra que la implicació de la DNA-PKcs en la recombinació V(D)J és important, i que la seva funció en aquest tipus de recombinació està estretament lligada al seu paper en la reparació de DSBs.

7.2. Integritat telomèrica

Els telòmers són complexos nucleoproteics situats als extrems dels cromosomes i que els protegeixen de la degradació per part de les nucleases i de fusionar-se els uns amb els altres. La presència de telòmers excessivament curts o disfuncionals a la cèl·lula també pot activar la DDR, demostrant que una correcta homeòstasi telomèrica és un altre factor determinant en la prevenció de la inestabilitat cromosòmica. El component nucleotídic dels telòmers consisteix en seqüències altament repetitives i conservades riques en guanina (TTAGGG)_n, orientades en sentit 5'→3' i que acaben en un extrem de cadena senzilla ric en G que consta d'aproximadament 150 nucleòtids. Aquest extrem es pot plegar sobre ell mateix i acabar aparellant-se amb la cadena complementària del dúplex. Aquesta estructura s'anomena *t-loop* (llaç telomèric) i aconsegueix "amagar" -i per tant protegir- l'extrem dels cromosomes de manera eficient (Griffith *et al*, 1999) (*Per a revisió*: Bailey i Murnane, 2006; Hug i Lingner, 2006) (**Figura 9**).

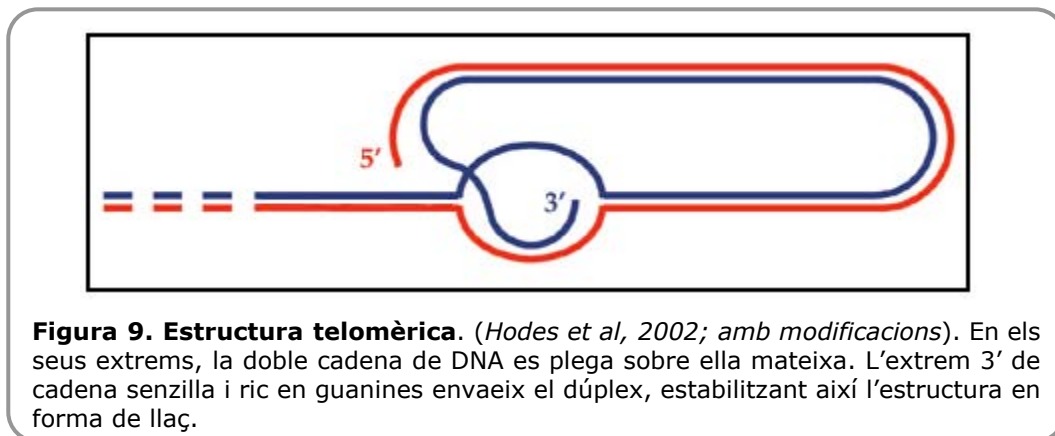


Figura 9. Estructura telomèrica. (Hodes *et al*, 2002; amb modificacions). En els seus extrems, la doble cadena de DNA es plega sobre ella mateixa. L'extrem 3' de cadena senzilla i ric en guanines envaeix el dúplex, estabilitzant així l'estructura en forma de llaç.

En el manteniment de la longitud telomèrica i la integritat de la seva arquitectura també hi estan implicades una multitud de proteïnes. Sis d'aquestes proteïnes formen un complex essencial als telòmers humans: TRF1, TRF2 (*TTAGGG repeat factor 1 and 2*), POT1 (*protection of telomeres 1*), TIN2 (*TRF1-interacting nuclear protein 2*), TPP1 i Rap1 (*human repressor activator protein 1*). Aquest complex protegeix el telòmer i s'anomena telosoma o *Shelterin*. D'altra banda, als telòmers també s'hi troben associades proteïnes de reparació com ara ATM, MRN, Ku i DNA-PKcs. Aquestes proteïnes són reclutades per TRF1 i TRF2, amb les quals formen complexos específics i col·laboren en el manteniment del telòmer (*Per a revisió*: Blasco, 2005). Durant el final de la fase S i a la fase G2 es localitzen *foci* de proteïnes de reparació als extrems del DNA, suggerint que en aquestes fases els telòmers són reconeguts com a DSBs (Takai *et al*, 2003; Verdún *et al*, 2005). Durant la replicació, el DNA es desenrotlla i molt probablement els telòmers perden transitòriament la seva estructura de llaç. No és estrany doncs, que aquestes proteïnes de reparació especialitzades en detectar trencaments, també reconeguin els telòmers com a extrems de DNA que presenten una similitud evident amb un DSB. De fet, després de la replicació els telòmers requereixen de

processament nucleotídic per poder tornar a formar el *t-loop*, i és probablement durant aquest processament quan hi intervenen els factors de reparació associats al telòmer (Verdún *et al*, 2005). Els telòmers curts o disfuncionals poden fusionar-se entre ells o a un DSB (Smogorzweska *et al*, 2002; Latre *et al*, 2003), mitjançant la via de NHEJ (Smogorzewska *et al*, 2002; Bailey *et al*, 2004). Aquestes fusions poden generar un dicèntric, susceptible d'entrar en cicles de trencament-fusió-pont (*BFB cycles: breakage-fusion-bridge*) i, per tant, potencialment capaç d'iniciar una escalada d'instabilitat cromosòmica en la cèl·lula.

Funcions d'ATM en el manteniment de la integritat telomèrica —————

S'ha descrit una acceleració en l'escurçament telomèric en limfòcits de sang perifèrica de pacients AT (Metcalf *et al*, 1996) i en ratolins KO per *Atm* i telomerasa (Wong *et al*, 2003; Qi *et al*, 2003), suggerint (1) que ATM desenvolupa alguna funció en el manteniment o control de la longitud telomèrica i (2) la possible contribució d'un escurçament telomèric accelerat al fenotip d'AT. Altres autors descriuen una longitud telomèrica normal en cèl·lules AT immortalitzades (Sprung *et al*, 1997) i discrepen sobre el paper d'ATM en l'elongació telomèrica (Feldser *et al*, 2006). Així doncs, la naturalesa de la funció d'ATM al telòmer no és del tot clara. S'han detectat *foci* d'ATM fosforilada a nivell telomèric en les fases S i G2. Aquesta activació no indueix però una activació de la resposta al dany ni de l'apoptosi (Verdún *et al*, 2005). En canvi, quan ATM es localitza en telòmers disfuncionals sí indueix l'activació de la resposta al dany. Per exemple, si TRF2 és absent, els telòmers perden gran part de l'extrem 3', esdevenen disfuncionals i pateixen fusions. S'han detectat *foci* d'ATM fosforilada en telòmers desprotegits de cèl·lules deficientes en TRF2 (Takai *et al*, 2003), i en aquest cas l'activació d'ATM als telòmers disfuncionals sí indueix l'aturada del cicle i l'inici de l'apoptosi cel·lular (Karlseder *et al*, 1999). Aquesta activació i el consegüent inici de la senyalització del dany previndria la progressió d'una cèl·lula amb telòmers excessivament curts i, per tant, cromosòmicament inestable. Aquesta hipòtesi es veu recolzada per experiments que demostren que les cèl·lules AT amb telòmers desprotegits tenen una capacitat més reduïda d'iniciar una resposta al dany (Takai *et al*, 2003; Karlseder *et al*, 1999) tot i que hi ha evidències que suggereixen que una segona cinasa (molt probablement ATR o DNA-PKcs) pot transmetre aquest senyal en absència d'ATM (Takai *et al*, 2003; Wong *et al*, 2003; Denchi i De Lange, 2007).

Funcions de DNA-PKcs en el manteniment de la integritat telomèrica —————

La manca de qualsevol dels components del complex DNA-PK genera fusions telomèriques espontànies sense escurçament telomèric aparent (Bailey *et al*, 1999; Samper *et al*, 2000; Gilley *et al*, 2001; Goytisolo *et al*, 2001), demostrant que el complex DNA-PK està implicat en el manteniment de l'estructura telomèrica i que la seva manca indueix la desprotecció del

telòmer. A més a més, els ratolins dobles KO per a *DNA-PKcs* i per a *Terc* presenten una taxa d'escurçament telomèric més elevada (Espejel *et al*, 2002), suggerint que DNA-PKcs també juga un paper en la regulació de la longitud telomèrica, i aquest paper podria ser molt important en cèl·lules somàtiques, on la telomerasa no és activa. DNA-PKcs també s'ha vist implicada en la regulació de l'apoptosi en cèl·lules amb telòmers excessivament curts (Espejel *et al*, 2002), tot i que existeixen experiments recents que posen en dubte aquesta relació (Maser *et al*, 2007). En general s'ha demostrat la presència i l'important paper que juga la DNA-PKcs als telòmers, encara que el mecanisme pel qual el telòmer esdevé disfuncional en absència de DNA-PKcs no es coneix amb exactitud.

8. Inestabilitat cromosòmica

La importància de l'estabilitat del genoma és reconeguda des dels primers estudis en biologia molecular, i la seva pèrdua implica una tendència a incrementar la taxa de mutacions, que s'acumulen al genoma de la cèl·lula. El càncer resulta de l'acumulació de mutacions en els gens que controlen la progressió o la mort cel·lular (Lengauer *et al*, 1998) així com en gens relacionats amb la protecció de la integritat del genoma. Tanmateix, la presència de mutacions *per se*, no implica l'aparició de malignitat. La gran majoria de càncers i tumors presenten algun tipus d' inestabilitat genòmica i, encara que no s'ha demostrat formalment, s'accepta de manera generalitzada que és necessària la presència d'algun tipus d'inestabilitat genètica a la cèl·lula com a agent etiològic de les múltiples mutacions que rauen en la base de la carcinogènesis (Lengauer *et al*, 1998). Un dels tipus principals i més prevalent d'inestabilitat genòmica és la inestabilitat cromosòmica (CIN; *Chromosomal INstability*) (Lengauer *et al*, 1998), que es pot definir com un estat de continua formació de mutacions cromosòmiques, a una taxa superior que en cèl·lules normals (Gisselsson, 2001). És a dir, la inestabilitat és per definició un estat dinàmic; *una qüestió de taxa* (Lengauer *et al*, 1998) i la complexitat o heterogeneïtat citogenètica *en un moment donat* de la vida de la cèl·lula no poden ser utilitzades com a evidència de CIN. A nivell cromosòmic la CIN es manifesta amb guanys i pèrdues cromosòmiques que comporten un increment en l'índex de pèrdua d'heterozigositat, freqüentment associat a alteracions genètiques en oncògens i en gens supressors de tumors (Gisselsson, 2001; Nowak *et al*, 2002), mecanismes tots àmpliament relacionats amb l'inici de la carcinogènesis (Nowak *et al*, 2002; Charames i Bapat, 2003).

És essencial doncs que la cèl·lula disposi de mecanismes efectius per aturar la progressió del cicle i reparar el DNA; en cas contrari l'acumulació d'aberracions cromosòmiques pot alterar l'estabilitat genòmica de la cèl·lula. El funcionament defectuós de qualsevol mecanisme de la DDR -així com de la V(D)J o del metabolisme telomèric- pot tenir com a conseqüència la persistència de DSBs no reparats i/o la formació de reunions il·legítimes. La reunió il·legítima

de DSBs pot donar lloc a diferents aberracions com, per exemple, els cromosomes dicèntrics. Si un dicèntric pateix una torsió entre els seus dos centròmers, tindrà problemes per segregat. En col·locar-se a la placa, els dos centròmers d'una mateixa cromàtide seran tibats cap a pols oposats. La torsió impedirà una correcta segregació i el dicèntric s'estirarà, creant un pont anafàsic. És probable que aquest pont es trenqui a mida que avança la mitosi, generant nous extrems cromosòmics recombinogènics. A les cèl·lules filles aquests fragments podran ser reparats i existeix la possibilitat que puguin tornar a generar estructures dicèntriques, iniciant una cascada d'instabilitat cromosòmica (McClintock, 1941; Acilan *et al*, 2007). S'ha caracteritzat una alta freqüència de cicles BFB en molts tumors caracteritzats per presentar fenòmens d'amplificació genòmica i de pèrdua d'heterozigositat, com per exemple el càncer de cap i coll (Gisselsson *et al*, 2000). Aquests cicles BFB també es poden generar a partir d'altres estructures aberrants que, des del punt de vista mecànic, es comporten igual que un dicèntric, com ara isodicèntrics resultants de la fusió de cromàtides germanes trencades, fusions telomèriques i fusions dicèntriques telòmer-DSB. Una altra alteració deguda a la reunió il·legítima de DSBs són les translocacions, aberracions descrites com alteracions cromosòmiques estables des del punt de vista estructural, ja que segreguen amb normalitat. Tanmateix, una translocació pot alterar la dosi gènica o les pròpies seqüències gèniques, afectant la integritat i funció d'alguns gens essencials per a l'estabilitat cel·lular o de promotors o repressors de gens, activant algun oncogen o inactivant algun gen supressor de tumors. El diagnòstic de moltes neoplàsies hematològiques està associat a la presència d'unes determinades translocacions, com per exemple la t(9;22) en determinats tipus de leucèmies (Mitelman i Heim 1992). Tot i no classificar-se com a reunions il·legítimes, les delecions terminals derivades del trencament d'un cromosoma i la pèrdua associada de material cromosòmic poden tenir les mateixes conseqüències per la cèl·lula i han estat descrites en varis tipus de tumors sòlids, com el de cap i coll i en carcinomes de mama.

Les cèl·lules defectives per ATM i per DNA-PKcs presenten defectes en la reparació del DNA i són especialment radiosensibles, demostrant el paper essencial que juguen ambdues cinases en la protecció de la integritat del genoma. Per aquesta raó la manca o mutació d'ATM o DNA-PKcs genera l'aparició de síndromes d'instabilitat cromosòmica, els quals seran descrits a continuació. Els individus afectes d'aquestes síndromes són molt més susceptibles que els individus sans de patir diferents tipus de càncers i tant les cèl·lules sanes com les cèl·lules transformades d'aquests pacients acumulen aberracions cromosòmiques, suggerint que la instabilitat cromosòmica inherent a aquestes cèl·lules rau en la base d'aquests càncers.

Síndrome d'instabilitat cromosòmica per mutació o deficiència en ATM (OMIM: 208900)

El gen *Atm* es troba al cromosoma 11q22-23 en humans, i va ser descrit l'any 1988 (Gatti *et al*, 1988). Aquest gen codifica per la proteïna cinasa ATM, de 350 kDa i que pertany a la família de les PIKKs. ATM conté un domini cinasa localitzat molt proper al seu extrem C-terminal, i la mutació en aquest domini dóna lloc a la síndrome atàxia-telangiectasia (AT). Gran part de les mutacions (85%) donen lloc a una proteïna truncada, molt inestable i la majoria dels pacients hereten dues mutacions diferents. AT és un desordre autosòmic recessiu de baixa prevalença (1 en cada 40.000 naixements) que es manifesta amb atàxia, telangiectasies oculars i dèrmiques, degeneració cerebel·lar progressiva, immunodeficiència, radiosensibilitat, instabilitat cromosòmica i predisposició a patir diferents formes de càncer, sobretot limfomes. Els limfomes dels pacients AT són tant de cèl·lules B com T, incloent limfoma de Hodgkin i no-Hodgkin i leucèmies (Hecht i Hecht, 1990; Taylor *et al*, 1996). S'ha estimat que els heterozigots constitueixen aproximadament l'1-2% de la població (Shiloh, 2003). Les cèl·lules obtingudes d'aquests heterozigots manifesten una radiosensibilitat intermèdia, i s'han descrit unes taxes de mortalitat més elevades i a edats més joves a causa de càncer i isquèmies cardíques entre aquests individus. Tot i que els resultats encara són controvertits, també s'ha associat a les dones heterozigotes i parentes de malalts AT una major incidència de càncer de mama (Cavaciuti, *et al*, 2005; Prokopcova *et al*, 2007). La causa d'aquesta síndrome d'instabilitat cromosòmica està associada a la funció essencial que té ATM en la transmissió i amplificació del senyal del dany en el DNA i en l'aturada de la progressió del cicle en front d'aquest dany. La seva absència es manifesta doncs amb disfuncions a nivell de reparació del DNA, d'inducció d'apoptosi, de control del cicle cel·lular i de recombinació V(D)J, *class-switch* i meiótica. Després d'haver estat sotmeses a radiació, les cèl·lules defectives en ATM presenten una elevada radiosensibilitat que es tradueix en defectes en l'aturada del cicle cel·lular, síntesis radioresistent de DNA i generació d'aberracions cromosòmiques.

Síndrome d'instabilitat cromosòmica per mutació o deficiència en DNA-PKcs (OMIM: 600899)

El gen que codifica per la DNA-PKcs s'anomena *Prkdc* (*protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide*), es troba al cromosoma 8q11 en humans i va ser descrit l'any 1995 (Siple *et al*, 1995; Hartley *et al*, 1995). *Prkdc* codifica per la DNA-PKcs, una proteïna cinasa serina/treonina nuclear de 470 kDa que pertany a la família de les PIKKs. Els ratolins deficients en aquesta proteïna presenten el fenotip anomenat *scid* (*severe combined immunodeficiency*), caracteritzat per una immunodeficiència severa deguda a la impossibilitat de dur a terme la recombinació V(D)J de forma eficient (Taccioli *et al*, 1998). També presenten hipersensibilitat a les radiacions ionitzants i a químics radiomimètics, així com

predisposició a patir càncers, sobretot limfomes de tipus T, i infeccions (Taccioli *et al*, 1998; Espejel *et al*, 2004). No es coneix cap síndrome humà associat a la manca total de DNA-PKcs, però recentment s'ha caracteritzat un individu portador d'una mutació parcial que manifesta totes les característiques del fenotip *scid* (Dik van Gent, comunicació personal). La inestabilitat cromosòmica de les cèl·lules defectives en DNA-PKcs s'associa al paper que la cinasa desenvolupa a la principal via de reparació de trencaments de DNA de que disposen els organismes eucariotes: la via de reparació no homòloga. La DNA-PKcs respon a trencaments radio-induïts, però també a múltiples trencaments amb origen fisiològic, com els que es donen durant la V(D)J, essencials per a generar limfòcits viables. Després d'haver estat irradiades, aquestes cèl·lules presenten una elevada radiosensibilitat que es manifesta en una important acumulació d'aberracions cromosòmiques.

L'ablació d'ATM juntament amb DNA-PKcs és letal durant l'estadi embrionari en ratolí (Gurley i Kemp, 2001), emfatitzant el seu important rol en el manteniment de l'estabilitat genòmica. L'elevada radiosensibilitat que presenten les cèl·lules defectives en qualsevol de les dues cinases les converteix en un mitjà de treball valuós en l'estudi de l'origen de la inestabilitat cromosòmica. En els treballs presentats en aquesta tesi s'ha utilitzat la radiació com a eina per generar trencaments en el DNA que, al seu torn, activaran la DDR. Mitjançant tècniques citogenètiques i moleculars s'han analitzat els factors que poden contribuir a la inestabilitat cromosòmica -inherent i radio-induïda- que presenten dos tipus cel·lulars defectius en ATM i DNA-PKcs. Tot i la complementarietat en les seves funcions, la manca d'una o altra cinasa resulta en manifestacions fenotípiques molt diferents en front de la radiació.

Aprofundirem en aquestes manifestacions per tal d'intentar establir els factors causants de la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica en cada tipus cel·lular, així com per relacionar-los amb les funcions específiques de cada cinasa. En base a aquestes consideracions, es va establir el següent objectiu principal: **aprofundir en les causes de la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica que presenten les cèl·lules defectives en les cinases ATM i DNA-PKcs**. Per tal d'assolir-lo, es van fixar els següents objectius secundaris per cada tipus cel·lular: **(1)** caracteritzar *l'espectre d'aberracions cromosòmiques radioinduïdes*; **(2)** determinar **l'evolució i resolució** d'aquestes aberracions al llarg del temps; **(3)** determinar la *cinètica de reparació dels DSBs* després de la irradiació i **(4)** determinar la possible *implicació del metabolisme telomèric* en la radiosensibilitat que presenten aquestes cèl·lules.

RESULTATS



Precisament jo tinc moltes aventures per explicar, sobretot des d'aquest matí – va dir l'Alícia-. En canvi ahir jo era una persona ben diferent i no tenia masses aventures per explicar.

- Com pot ser que **ahir** fossis diferent? –va voler saber la Tortuga?
- No, no! Les aventures primer! –va exclamar el Grif-

Les explicacions després... Solen ser tan avorrides!

CAPÍTOL I

Els resultats es presenten en forma d'articles científics i s'agrupen en 2 capítols.

El **CAPÍTOL I** consta d'un article publicat amb els resultats obtinguts de les cèl·lules deficientes en DNA-PKcs. El **CAPÍTOL II** consta de dos articles amb els resultats obtinguts de les cèl·lules deficientes en ATM. Un dels articles està publicat i l'altre està pendent de publicació.

Postreplicative Joining of DNA Double-Strand Breaks Causes Genomic Instability in DNA-PKcs-Deficient Mouse Embryonic Fibroblasts

Marta Martín,¹ Anna Genescà,¹ Laura Latre,¹ Isabel Jaco,² Guillermo E. Taccioli,³ Josep Egozcue,¹ María A. Blasco,² George Iliakis,⁴ and Laura Tusell¹

¹Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, Institute of Biotechnology and Biomedicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ²Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Centre, Madrid, Spain; ³Department of Microbiology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts; and ⁴Institute of Medical Radiation Biology, University Duisburg-Essen Medical School, Essen, Germany

Abstract

Combined cytogenetic and biochemical approaches were used to investigate the contributions of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) in the maintenance of genomic stability in nonirradiated and irradiated primary mouse embryo fibroblasts (MEF). We show that telomere dysfunction contributes only marginally to genomic instability associated with DNA-PKcs deficiency in the absence of radiation. Following exposure to ionizing radiation, DNA-PKcs^{-/-} MEFs are radiosensitized mainly as a result of the associated DNA double-strand break (DSB) repair defect. This defect manifests as an increase in the fraction of DSB rejoining with slow kinetics although nearly complete rejoining is achieved within 48 hours. Fifty-four hours after ionizing radiation, DNA-PKcs^{-/-} cells present with a high number of simple and complex chromosome rearrangements as well as with unrepaired chromosome breaks. Overall, induction of chromosome aberrations is 6-fold higher in DNA-PKcs^{-/-} MEFs than in their wild-type counterparts. Spectral karyotyping-fluorescence *in situ* hybridization technology distinguishes between rearrangements formed by prereplicative and post-replicative DSB rejoining and identifies sister chromatid fusion as a significant source of genomic instability and radiation sensitivity in DNA-PKcs^{-/-} MEFs. Because DNA-PKcs^{-/-} MEFs show a strong G₁ checkpoint response after ionizing radiation, we propose that the delayed rejoining of DNA DSBs in DNA-PKcs^{-/-} MEFs prolongs the mean life of broken chromosome ends and increases the probability of incorrect joining. The preponderance of sister chromatid fusion as a product of incorrect joining points to a possible defect in S-phase arrest and emphasizes proximity in these misrepair events. (Cancer Res 2005; 65(22): 10223-32)

Introduction

The vast majority of human cancers are genetically unstable. This genomic instability can take two different forms (1). Most cancer cells are unable to maintain chromosomal integrity and display gross abnormalities in their karyotype (2–4). In a few cases, the instability is observed at the nucleotide level and is the result of faulty DNA repair (nucleotide-excision repair and mismatch repair),

giving rise to base substitutions or deletions or insertions of a few nucleotides (5–9). The term genomic instability includes both forms of instability and can be defined as the continuous formation of new chromosome aberrations and mutations. This article focuses on the first form of instability, which results from the illegitimate rejoining of DNA double-strand breaks (DSB), generating, among other chromosome abnormalities, dicentric chromosomes and rings. These unstable chromosome forms can break during anaphase if they are pulled to opposite poles, generating the potential for new chromosome rearrangements in proliferating cells.

To maintain the integrity and stability of the genome, eukaryotic cells have developed at least two efficient pathways of DSB repair: nonhomologous end joining and homologous recombination (10–12). The main mechanism of DSB repair in mammalian cells is nonhomologous end joining. Six of the gene products required for nonhomologous end joining have been identified: Ku70 and Ku80, which form the Ku heterodimer that binds to DNA ends; the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs), which is recruited by the Ku heterodimer to DNA ends and which brings the ends together in a synaptic complex; XRCC4 and DNA ligase IV, which form a heterodimer with DNA ligase activity; and Artemis, which is thought to be involved in the processing of DNA ends (10). As expected, inactivation of the genes involved in nonhomologous end joining impairs DSB rejoining, causes radiosensitivity to killing, and predisposes to cancer. Loss of DNA-PKcs or Ku70 has been associated with increased rates of lymphomas in mice (13). This phenotype is exacerbated when nonhomologous end joining-deficient mice also lack p53 (14, 15). Humans are likely to be no exception and defects in nonhomologous end joining leading to genomic instability may result in cancer predisposition and, importantly, may also increase the sensitivity of patients to therapies utilizing agents inducing DSBs. Indeed, a leukemia patient with a *DNA ligase IV* mutation who died from radiation sensitivity was reported by Riballo et al. (16). Recently, two new genomic instability disorders directly related to nonhomologous end joining defects have been reported (17), extending thus the importance of nonhomologous end joining repair pathways to human health. The first disorder included several groups of patients with severe combined immunodeficiency resulting from defects in Artemis (18, 19). These patients show predisposition to B-cell lymphomas (20). The second disorder included five patients with hypomorphic mutations in *DNA ligase IV* (21), one of whom developed leukemia (16).

Equally important as the efficient and correct repair of DSBs is the presence of functional telomeres, the nucleoprotein structures located at the ends of the chromosomes that prevent their fusion (joining) with other chromosome ends. Telomere

Requests for reprints: Anna Genescà, Cell Biology Unit, Ed CS, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. Phone: 34-93-581-1498; Fax: 34-93-581-2295; E-mail: anna.genesc@uab.es.

©2005 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0932

dysfunction, either by excessive replication-dependent erosion of telomeric DNA or by loss of proteins in the telomeric loop structure, leads to chromosome end-to-end fusions which, on entering into fusion-bridge-breakage cycles, generate genomic instability that may contribute to carcinogenesis (22–24). Several nonhomologous end joining components such as Ku and DNA-PKcs contribute to the formation of functional telomeres. Telomeric dysfunction, due either to the loss of proteins involved in the telomeric protective loop structure or to telomeric DNA erosion, is sensed as a DSB by DNA damage response proteins (25, 26). In addition, unprotected telomeres act as DSBs not only by joining to other uncapped telomeres forming telomere-telomere fusions (24, 27, 28) but also by joining to radiation-induced DSBs, thus forming telomere-DSB fusions (29, 30). Both kinds of fusions can generate genomic instability and are therefore potentially tumorigenic.

To evaluate the contribution of the two distinct functions (i.e., DSB repair versus telomere protection) of DNA-PKcs in genomic stability, we used spectral karyotyping-fluorescence *in situ* hybridization (SKY-FISH) technology to analyze metaphase chromosomes of primary mouse embryo fibroblasts (MEF) obtained from mice in which the *DNA-PKcs* gene was ablated by homologous recombination (31). The results suggest that DNA-PKcs-mediated telomere dysfunction contributes only marginally to radiation sensitivity and genomic instability in primary MEFs. Most importantly, we identify postreplicative joining of broken sister chromatids as an important source of genomic instability and radiation sensitivity in DNA-PKcs-deficient MEFs.

Materials and Methods

Radiation exposure and cell culture. DNA-PKcs null mice (DNA-PKcs^{-/-}) and wild-type animals (DNA-PKcs^{+/+}) were used. For genetic studies, pregnant DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/+} females were irradiated on days 12 to 14 of gestation with a 2-Gy dose under a ⁶⁰Co source. Six hours after ionizing radiation, females were sacrificed and a cell suspension was obtained from each littermate embryo, which was incubated in DMEM (Synovis Life Technologies, St. Paul, MN). After 24 hours, cell cultures were washed with PBS to isolate the MEFs and were further incubated at 37°C in a 10% CO₂ atmosphere. For biochemical studies, irradiation was done *in vitro* to better control time for kinetic studies of DSB rejoining.

Spectral karyotyping. Colcemid (KaryoMAX, Life Technologies, Inc.; final concentration, 0.14 µg/mL) was added to irradiated DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/+} MEF cultures at 48 hours postirradiation and allowed to act for 4 to 6 hours. Metaphase chromosome suspensions were then obtained after hypotonic shock and methanol-acetic acid fixation. These were kept at -20°C until slide dropping. The SKY-FISH technique allows the simultaneous and differential painting of all mouse (20 pairs) chromosomes. SKY was applied on metaphase chromosome spreads following the instructions of the manufacturer. Images were captured with a Nikon ECLIPSE E800 microscope equipped with a Cohu camera and the SkyView 2.1 (Applied Spectral Imaging, Inc., Migdad Ha'Emek, Israel) software. The coordinates of each metaphase analyzed in this way were noted for later relocation.

Telomere labeling. After SKY analysis, labeling of telomeric sequences onto the same slides was applied as described by Martin et al. (32). FISH was done using a Cy3-labeled (CCCTAA)₃ peptide nucleic acid probe (Perseptive Biosystems, Framingham, MA). Metaphases were relocated and recaptured using an Olympus BX 60 microscope equipped with a Cohu camera and Smart Capture (Vysis, Inc., Downers Grove, IL) software.

Scoring of aberrations. *Telomere-telomere fusions* were scored using stringent criteria. We scored only those events in which the telomeres of adjoining chromosomes had fused into a single signal or in which no

telomere signals at the joining point could be observed. In the first case, telomere-telomere fusions containing TTAGGG repeats at the fusion point would indicate dysfunctional telomeres that have fused due to the loss of the telomeric capping structure. In the second case, fusion of whole chromosomes without TTAGGG repeats at the fusion point provides evidence of a telomere-shortening phenomenon. In this latter case, special care was taken to ensure that the chromosomes involved in this type of fusion were not broken or rearranged. *Telomere-DSB fusions* are rearrangements resulting from a dysfunctional telomere joined to a broken end. These rearrangements will be identified by the joining point: in a telomere-DSB fusion, a broken chromosome end is joined to a dysfunctional telomere of another chromosome. *Break-produced aberrations* include all conventional exchange type aberrations such as translocations, dicentric chromosomes, interstitial deletions, etc., as well as nonexchange type aberrations such as chromosome and chromatid breaks. In the case of translocations, each translocated chromosome and its reciprocal translocation, or the unrejoined centric and acentric fragment, were considered as a single aberration. Similarly, each dicentric chromosome and the accompanying compound acentric fragment, or the two unrejoined acentric fragments, were also considered as a single aberration. We considered as interstitial deletions chromosomes with visibly deleted interstitial segments showing a complete set of telomeres and accompanied or not by an acentric fragment from the same chromosome with no telomeres. Isodicentric chromosomes and isoacentric fragments were painted in a single color after SKY-FISH and the reverse 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) image, also provided by SKY-FISH, revealed a horizontal mirror image banding pattern.

Follow-up of the number of cell divisions after ionizing radiation. For SKY-FISH cytogenetic studies, MEFs were grown *in vitro* for 48 hours after female sacrifice. This time period favors the obtention of first and second mitosis after ionizing radiation. For sister chromatid fusion analysis, care was given in analyzing mainly first mitosis after irradiation. With this aim, MEFs were cultured in the presence of BrdUrd and metaphases were obtained at different time points after irradiation. After metaphase obtention, the BrdUrd + Hoechst 33258 protocol was applied as described by Martin et al. (32) and the slides with a frequency of first metaphases after irradiation higher than 75% were selected.

Sister chromatid fusion analysis. To analyze sister chromatid fusion on the previous selected slides, two consecutive stainings were applied. First, slides were solid stained with Leishman, which highly preserves the original chromosome morphology, thus providing a tool to observe the fusion of chromatids with detail. Centric and acentric fragments—presumably forming sister chromatid fusion—were identified during solid-staining analysis by the characteristic rounded aspect of one of their ends. Metaphase spreads were captured and their coordinates noted for later relocation. Subsequently, slides were processed for telomere labeling with peptide nucleic acid-FISH probes. Centric and acentric fragments with presumably fused chromatids in the solid-staining analysis were relocated and sister chromatid fusion was then confirmed with telomeric FISH analysis by the absence of telomere signals at fusion point.

Nucleoplasmic bridge analysis. Binucleated MEFs for nucleoplasmic bridge analysis were obtained by addition of cytochalasin B (Sigma) to irradiated DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/+} MEF cultures at 40 hours postirradiation to a final concentration of 6 µg/mL to block cytokinesis. Cells were trypsinized at 71 hours postirradiation, centrifuged, resuspended in cold hypotonic solution, and gently fixed in methanol-acetic acid. Binucleated MEF suspension was kept at -20°C until slide dropping. For binucleated MEF analysis, slides from irradiated DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/+} cells were Leishman solid-stained, which provides a well-defined shape for the nuclei and an unambiguous identification of the nucleoplasmic bridges. Binucleated MEFs presenting nucleoplasmic bridges were captured and coordinates were noted for relocation after telomeric FISH labeling. After solid-staining analysis, slides were washed in PBS, treated with pepsin, and fixed with 4% formaldehyde. Telomere labeling was applied as described before (32). Telomere-labeled binucleated MEFs were recaptured and analyzed.

Asymmetrical field inversion gel electrophoresis. For the evaluation of DSB repair kinetics, DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/-} MEFs were cultured *in vitro* until confluence. Cells were cooled to 4°C before irradiation and were irradiated on ice using a Pantak X-ray machine MXR-321, operated at 320 kV and 10 mA with a 1.65-mm aluminum filter. After irradiation, cells were returned to the incubator at 37°C to allow for repair. After each repair time interval, cells were trypsinized, centrifuged, washed with PBS, centrifuged again, and resuspended at a final concentration of 2 × 10⁶ cells/mL. This cell suspension was mixed with an equal volume of 1% low melting point agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) previously diluted in the cell culture medium and supplemented with 20 mmol/L HEPES and 5 mmol/L NaHCO₃. The mixed suspension was then pipetted into 3-mm-diameter glass tubes and placed on ice to allow solidification. The solidified cell-agarose suspension was extruded from the glass tubes and cut into 3 × 0.5 mm cylindrical blocks. Blocks were placed in lysis buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl (pH 7.6), 2% *N*-lauryl-sarcosyl, 0.2 mg/mL protease (Sigma), and incubated at 50°C for 20 hours. After lysis, agarose blocks were washed for 1 hour at 37°C in a buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, and 50 mmol/L NaCl (pH 7.6) and were then treated in the same buffer with 0.1 mg/mL RNase A.

Asymmetrical field inversion gel electrophoresis (FIGE) was carried out in 0.5% pure-grade agarose (Bio-Rad) gels, which were cast in the presence of 0.3 µg/mL ethidium bromide in 0.5 × Tris-borate EDTA at 8°C for 40 hours. During this time, cycles of 1.25 V/cm for 900 seconds in the direction of DNA migration alternated with cycles of 5.0 V/cm for 75 seconds in the reverse direction. The agarose gels were scanned immediately after running and were quantified to estimate DNA damage using ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) software.

DNA DSBs were quantified by calculating the fraction of activity released from the well into the lane (FAR) in irradiated and nonirradiated samples. The FAR measured in nonirradiated cells (background) was subtracted from the results shown with irradiated cells.

Cell cycle analysis. For cell cycle analysis, asynchronous exponentially growing DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/-} MEFs (passage 2-4) at 50% to 60% confluence were irradiated with 7 Gy of γ-rays and collected at different times after irradiation. Cells were trypsinized, centrifuged, washed in PBS, and fixed in 70% ethanol. After fixation, cells were stained with propidium iodide to perform analysis by flow cytometry. Activation of the G₁ checkpoint was evaluated by the decrease in the proportion of S-phase cells and by the increase in G₁/S ratio as a function of time after irradiation. The ratio G₁/S was used to indicate the concomitant modification in cell fraction in both phases of the cell cycle, which are expected to be modified in response to the activation of the G₁ checkpoint.

Results

Impaired DNA double-strand break repair contributes predominantly—and telomere dysfunction contributes marginally—both to spontaneous and radiation-induced

chromosomal aberrations in DNA-PKcs-deficient primary mouse embryo fibroblasts. Most mammalian cells and mice deficient in any of the components of the nonhomologous end joining, such as DNA-PKcs, Ku, and Ligase IV, are hypersensitive to ionizing radiation. To investigate the contribution of telomeric versus repair functions of DNA-PKcs to the radiosensitivity of DNA-PKcs-deficient mice, we generated MEFs from pregnant females immediately after ionizing radiation at days 12 to 14 of gestation. Table 1 and Fig. 1A show the results of the cytogenetic analysis. The rate of spontaneous chromosome aberrations was higher in DNA-PKcs^{-/-} than in wild-type MEFs. After ionizing radiation, this frequency was 6-fold higher in DNA-PKcs^{-/-} MEFs than in their wild-type counterparts. Among the aberrations observed in DNA-PKcs^{-/-} MEFs, those derived from chromosome breakage were more frequent than telomere-telomere fusions, which are indicative of telomere dysfunction. In the irradiated DNA-PKcs-deficient MEFs, we scored 1.41 break-produced aberrations per cell (Fig. 1B) but <1 telomere-telomere fusion per 20 cells, which translates to 0.04 per cell (Fig. 1C). Telomere-telomere fusions were only observed in DNA-PKcs^{-/-} MEFs, indicating that our scoring criteria are stringent enough to avoid false positives. The frequency of telomere-telomere fusions observed in this study was low compared with other studies using primary or immortalized DNA-PKcs-deficient MEFs irradiated *in vitro* (24, 27). Thirteen of the fourteen observed telomere-telomere fusions contained TTAGGG repeats at the point of fusion (Fig. 1C), indicating that they were due to a loss of the telomeric capping structure rather than to telomeric shortening. Only one cell contained a chromosome aberration resulting from a dysfunctional telomere joined to a broken chromosome end (Fig. 1D). On the other hand, chromosome aberrations deriving exclusively from DNA breakage represented 77.3% of total spontaneous aberrations in nonirradiated DNA-PKcs^{-/-} MEFs and 96.3% of the total aberrations in the irradiated knockouts (Table 1; Fig. 1A). Because the nonhomologous end joining defect is obvious in DNA-PKcs^{-/-} MEFs, we analyzed exchange and nonexchange type chromosome aberrations in the two genetic backgrounds (Table 1). Spontaneous aberrations in the nonirradiated DNA-PKcs^{-/-} MEFs were mainly of the nonexchange type (unrejoined breaks and fragments). Similar studies using conventional cytogenetics have also indicated the frequent occurrence of spontaneous chromosome fragmentation in cells lacking DNA-PKcs (27, 33). After ionizing radiation, a high number of exchange type aberrations were scored despite the end joining defect, representing 54% of the total break-induced aberrations in DNA-PKcs^{-/-} MEFs (0.772 and 0.018 rejoined aberrations per cell in irradiated DNA-PKcs-deficient and wild-type MEFs, respectively;

Table 1. Spontaneous and radiation-induced chromosome aberrations in DNA-PKcs^{-/-} and wild-type MEFs

DNA-PKcs genotype and dose	No. cells analyzed	Total no. aberrations (frequency/cell)	Break-produced aberrations		No. telomere-telomere fusions (frequency/cell)	No. telomere-DSB fusions (frequency/cell)
			No. nonexchange type aberrations (frequency/cell)	No. exchange type aberrations (frequency/cell)		
+/-, 0 Gy	121	9 (0.074)	8 (0.066)	1 (0.008)	—	—
-/-, 0 Gy	140	44 (0.314)	29 (0.207)	5 (0.036)	10 (0.071)	—
+/-, 2 Gy	55	12 (0.218)	11 (0.200)	1 (0.018)	—	—
-/-, 2 Gy	92	135 (1.467)	59 (0.641)	71 (0.772)	4 (0.043)	1 (0.011)

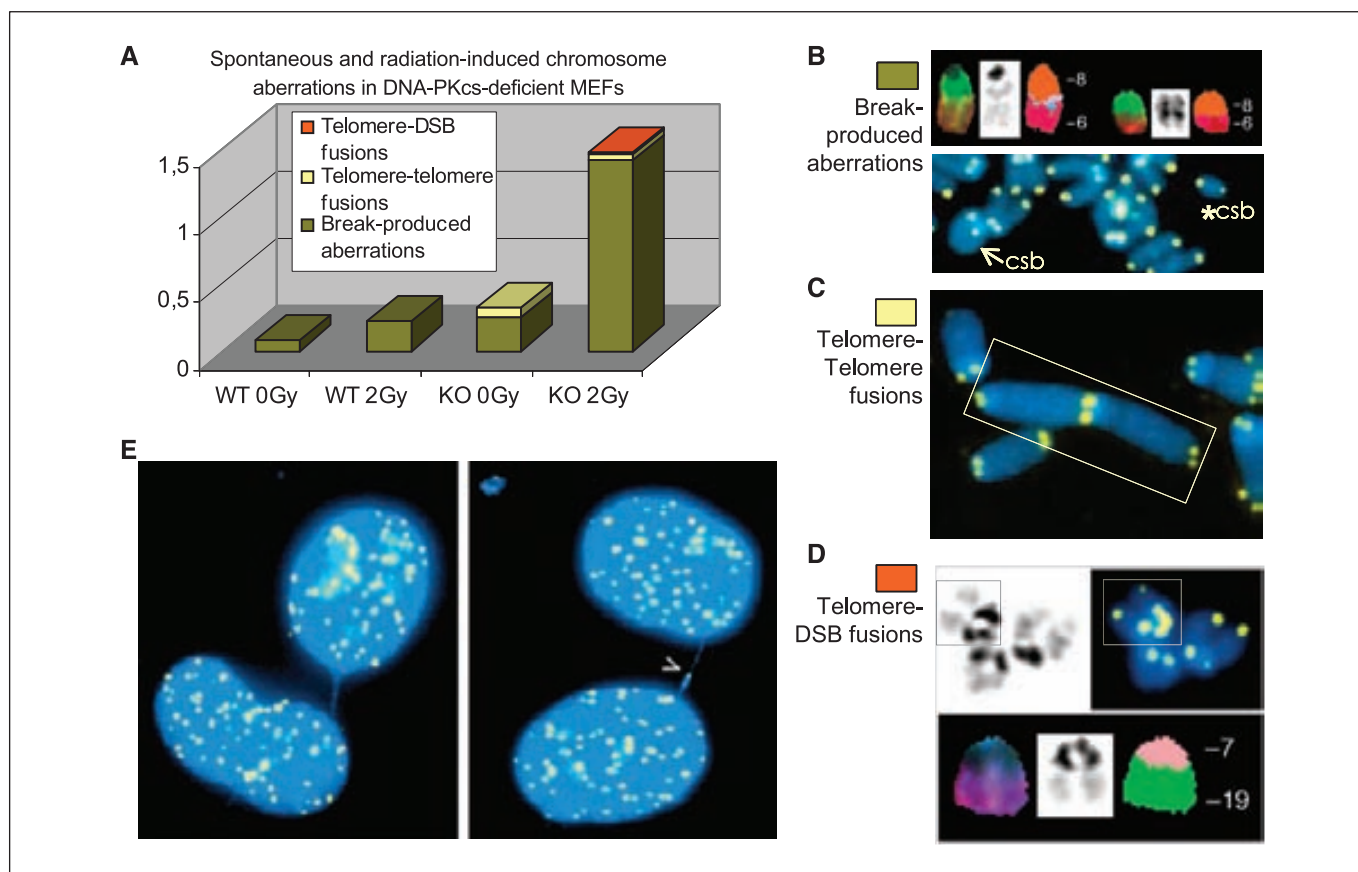


Figure 1. Chromosome aberration formation in DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/+} MEFs. **A**, frequencies of spontaneous and ionizing radiation-induced chromosome aberrations in DNA-PKcs^{-/-} and wild-type MEFs exposed to 0 and 2 Gy of ionizing radiation *in utero* and analyzed *in vitro* as described in Materials and Methods. Chromosome aberrations were classified into break-produced aberrations (green), telomere-telomere fusions (yellow), or telomere-DSB fusions (orange). **B** to **D**, representative examples. Note the high incidence of break-produced aberrations in both nonirradiated and irradiated DNA-PKcs^{-/-} MEFs. On the other hand, under the conditions employed, telomere-DSB fusions are not present in nonirradiated and are rare in irradiated DNA-PKcs^{-/-} MEFs. **B**, examples of break-produced aberrations. *Top row*, exchange-type aberration, specifically a reciprocal translocation between chromosomes 8 and 6 analyzed with SKY-FISH. For each figure, SKY-FISH provides the stained image (*left*), the DAPI reverse image (*middle*), and the pseudocolor image (*right*). *Bottom row*, nonexchange type aberration. *Arrow*, broken centric fragment with only one telomere pair; the resulting acentric fragment with the remaining telomere pair is also present (*asterisk*). **C**, example of a telomere-telomere fusion affecting both chromatids with telomeres present at the fusion point (*white square*). Note the increased strength of the telomeric signals at the fusion point, indicating that in this case the fusion was not associated with erosion in telomere length. **D**, telomere-DSB fusion. *Top row, left*, an inverted DAPI image where an apparently normal chromosome 19 is shown (*black box*). *Right*, when analyzing the telomeric FISH image, three telomeric pairs can be seen. *Bottom row*, SKY-FISH analysis where the chromosomes involved in the rearrangement can be identified: an unbroken chromosome 19, with a complete set of two telomere pairs, has joined to a centric fragment of chromosome 7, which also presents a telomere pair. The telomere pair at the p-arm of chromosome 19 is presumably dysfunctional because it has joined to the broken end of chromosome 7. **E**, examples of nucleoplasmic bridges in binucleated MEFs from irradiated DNA-PKcs^{+/+} (*left*) and DNA-PKcs^{-/-} (*right*) embryos. Irradiated DNA-PKcs^{+/+} derived binucleated MEFs showed a significantly lower frequency of nucleoplasmic bridges than irradiated DNA-PKcs^{-/-} binucleates. Moreover, 3% of binucleates from irradiated DNA-PKcs^{-/-} embryos presented a telomere signal in the bridge (*arrowhead*), presumably resulting from telomere-telomere fusions.

Table 1). Increased formation of exchange-type aberrations has also recently been reported in a DNA-PKcs-deficient human glioblastoma cell line (M059J) after exposure to ionizing radiation (34). In summary, the above results suggest that increased spontaneous chromosome aberrations and radiation sensitivity of primary DNA-PKcs^{-/-} MEFs irradiated *in utero* are mainly due to their DSB repair defect. Telomere dysfunction apparently contributes only marginally to their phenotype.

Sister chromatid joining as an important source of genomic instability in DNA-PKcs^{-/-} mouse embryo fibroblasts. It has been suggested that dicentric chromosomes generated either by DNA breakage or telomeric dysfunction trigger fusion-bridge-breakage cycles through the formation of anaphase bridges. Both telomere-telomere fusions and anaphase bridges occur in tumors and are thought to be important for their clonal evolution and

progression (3). To investigate the effect of DNA-PKcs deficiency on genomic instability, we analyzed the formation of nucleoplasmic bridges in binucleated cells using the techniques described under Materials and Methods. Nucleoplasmic bridges are a continuous nucleoplasmic link between the nuclei in a binucleated cell (Fig. 1E) and were scored according to the criteria established by Fenech et al. (35). In accordance with a role of DNA-PKcs in genomic stability, we found that DNA-PKcs^{-/-} MEFs show a significantly higher frequency of nucleoplasmic bridges than their wild-type counterparts (0.009 and 0.103 nucleoplasmic bridges per binucleated cell scored for wild-type and DNA-PKcs^{-/-} MEFs, respectively; 539 and 822 binucleated MEFs were scored for wild-type and DNA-PKcs^{-/-} MEFs, respectively; $P \leq 0.001$, χ^2 test).

To examine how impaired DSB repair could affect genomic stability in DNA-PKcs^{-/-} MEFs, we used SKY followed by

centromeric and telomeric labeling to ascertain which chromosome aberrations are potential sources of genomic instability. For this analysis, we first distinguished between two categories of chromosomal rearrangements: conventional rearrangements formed by prereplicative rejoining of two DSBs (translocations, dicentric chromosomes, rings, and interstitial deletions) and rearrangements derived from postreplicative joining of DSBs (isoacentric fragments and isodicentric chromosomes). Table 2 shows the frequencies of these two types of chromosome rearrangements. After irradiation, conventional prereplicative chromosome rearrangements are more frequent in DNA-PKcs^{-/-} than in wild-type MEFs (0.630 and 0.018 per metaphase cell analyzed, respectively). Among the conventional rearrangements observed, dicentric chromosomes contribute to genomic instability when a twist occurs between the two centromeres during division, leading to an anaphase bridge. Strikingly, rearranged chromosomes formed by postreplicative rejoining are only observed in DNA-PKcs^{-/-} MEFs (0.014 and 0.141 per metaphase plate in nonirradiated and irradiated DNA-PKcs^{-/-} MEFs, respectively). Several examples of such aberrations are shown in Fig. 2A. In terms of generating genomic instability, isodicentric chromosomes behave like conventional dicentrics.

Isoacentric fragments and isodicentric chromosomes probably derive from breaks that replicated before rejoining, producing thus sister chromatids with breakage at the same location. End joining to each other of these replicated chromatids (sister chromatid fusion) generates isoacentric fragments and isodicentric chromosomes in the subsequent cell division. In most metaphase plates, SKY allowed us to identify the isodicentric chromosome together with a normal homologue. This shows that the isodicentric chromosome did not originate by fusion of homologues but rather by sister chromatid fusion followed by DNA replication. Thus, two divisions after ionizing radiation are required to observe the rearrangements shown in Fig. 2A. The 6 hours between ionizing radiation and sacrifice, in addition to the 48 hours allowed for *in vitro* culture, are sufficient to obtain both first and second mitosis. Figure 2B shows a scheme of the possible generation of such rearrangements. According to this model, broken chromosomes with fusion of sister chromatids correspond to an intermediate step in the formation of isoacentric and isodicentric rearrangements. Thus, the identification of sister chromatid fusion events would represent an important support for our model. To experimentally test this possibility, we checked whether broken chromosomes with apparent fusion of sister chromatids could be identified in solid-stained first-division metaphases after exposure to 2 Gy. Suspected sister chromatid

fusion events were then confirmed by the absence of telomeric signals after telomeric peptide nucleic acid-FISH. A total of 107 broken chromosome ends showed apparent fusion of broken chromatids in the 112 DNA-PKcs^{-/-} MEFs analyzed for this purpose. All sister fusions were confirmed by the absence of telomeric signal at that end (Fig. 2C). Sister chromatid fusion affected ~1/3 of the broken ends identified in the DNA-PKcs-deficient background. In contrast, no sister chromatid fusion events were identified in the 128 metaphases analyzed in wild-type MEFs. Altogether, these results provide for the first time evidence that postreplicative joining of DNA DSBs is an important source of chromosome rearrangements contributing to the instability of DNA-PKcs-deficient genomes. Fusion of sister chromatids may result in gene amplification, as first shown by Toledo et al. (36) and Ma et al. (37). In this context, our results—high frequency of sister chromatid fusion and isodicentric chromosome formation in DNA-PKcs-deficient animals—are in accordance with the reported increase in gene amplification in immortal DNA-PKcs^{-/-} rodent cells (38).

Slow rejoining of ionizing radiation-induced double-strand breaks as a potential cause for the increased sister chromatid fusion and other chromosome rearrangement in DNA-PKcs^{-/-} cells. The model of formation of isoacentric and isodicentric aberrations through postreplicative sister chromatid fusion is compatible with a defect in G₁ checkpoint in DNA-PKcs^{-/-} cells that allows chromosomes with unrepaired DSBs to enter S phase and replicate the damage. To investigate this possibility, we measured cell cycle distribution after ionizing radiation in DNA-PKcs^{-/-} MEFs. Similar to wild-type cells, DNA-PKcs^{-/-} cells display a strong arrest in G₁, which is expressed as a strong reduction in the fraction of cells in S phase 8 hours after ionizing radiation (Fig. 3A). Moreover, irradiated DNA-PKcs^{-/-} MEFs show a larger G₁/S ratio than DNA-PKcs^{+/+} MEFs (Fig. 3B) probably because the persistence of unrepaired DSBs generates a stronger G₁ arrest. These observations are not compatible with a defect in G₁ checkpoint response and suggest that the formation of isoacentric and isodicentric aberrations in DNA-PKcs^{-/-} MEFs cannot be explained by a defect in this checkpoint.

Measurement of the DNA DSBs rejoining in the DNA-PKcs-deficient human glioblastoma cell line M059J showed that these cells are able to rejoin the majority of radiation induced DSBs albeit with slow kinetics (37). Slow rejoining of DSB in DNA-PKcs^{-/-} MEFs could also underlie the increased formation of chromosome rearrangements, particularly those derived from sister chromatid joining (fusion). To examine this possibility, we

Table 2. Chromosome aberrations formed by prereplicative and postreplicative joining of DSBs

DNA-PKcs genotype and dose	Total no. exchange-type aberrations	Rearrangements formed by prereplicative rejoining				Rearrangements formed by postreplicative rejoining		
		Translocations	Dicentric	Interstitial deletions	Total (frequency/cell)	Isoacentric	Isodicentric	Total (frequency/cell)
+/, 0 Gy	1	—	1	—	1 (0.008)	—	—	0
-/-, 0 Gy	5	—	2	1	3 (0.021)	2	—	2 (0.014)
+/, 2 Gy	1	—	1	—	1 (0.018)	—	—	0
-/-, 2 Gy	71	27	25	6	58 (0.630)	8	5	13 (0.141)

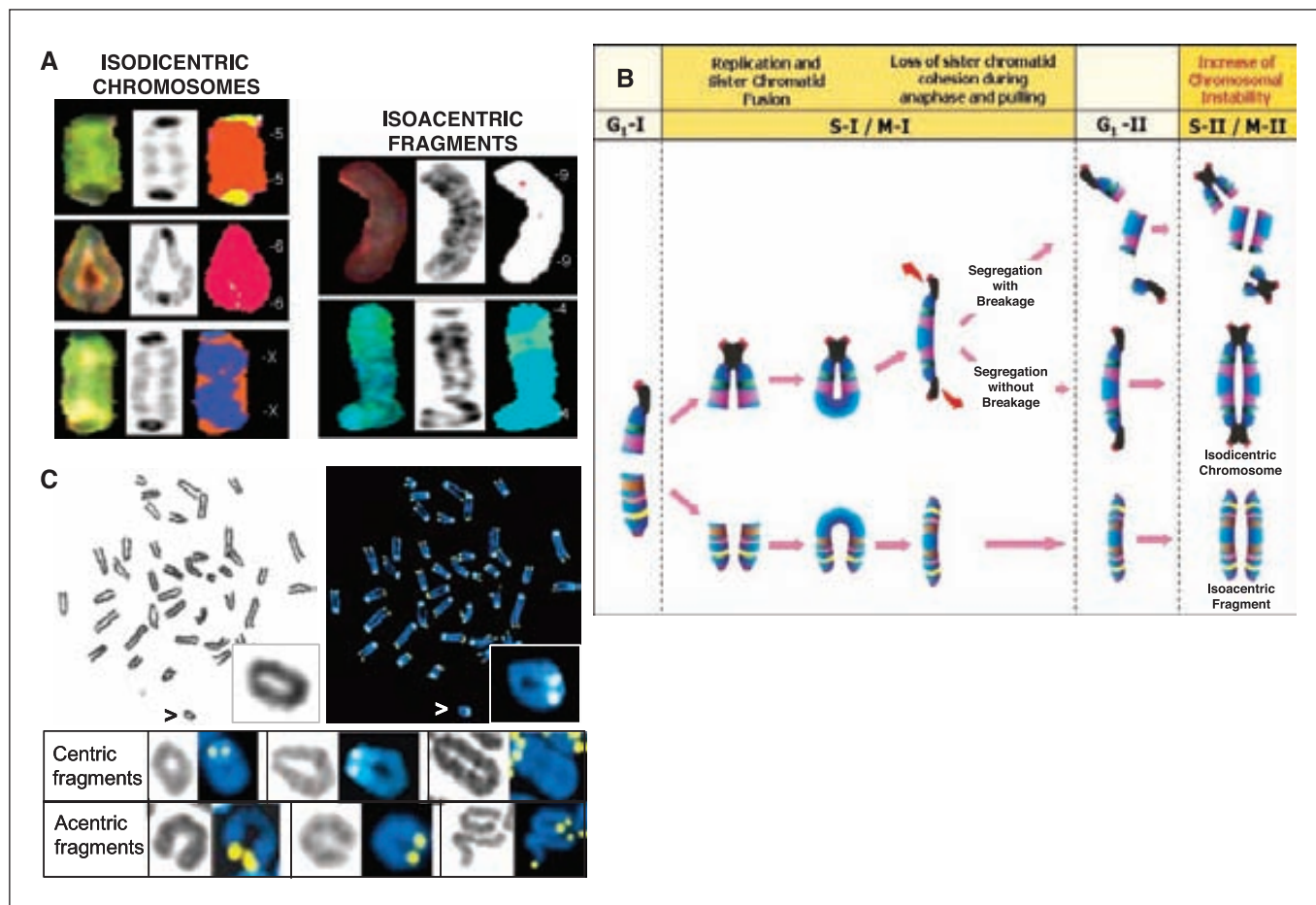


Figure 2. A, examples of isodicentric chromosomes (*left*) and isoacentric fragments (*right*) from DNA-PKcs^{-/-} MEFs obtained by SKY-FISH analysis. For cytogenetic analysis, SKY-FISH provides three images: the stained chromosome as seen in the microscope (*left*), the DAPI reverse image (*middle*), and the pseudocolor that the program assigns to each different fluorochrome combination (*right*). *Isodicentric chromosomes*, top to bottom, dic(5;5), dic(6;6), and dic(X;X). In most metaphase plates, SKY-FISH allowed us to identify the isodicentric chromosome together with a normal homologue chromosome, thus indicating that isodicentrics did not originate by fusion of homologues but rather by sister chromatid fusion and ulterior DNA replication. *Isoacentric fragments*, top, ace (9;9); bottom, ace (4;4). In both isodicentric chromosomes and isoacentric fragments, the DAPI reverse image (*middle*) provides evidence of a duplicated and symmetrical (mirrorlike) banding pattern. B, model for the formation of isodicentric chromosomes and isoacentric fragments. A break that occurs in G₁ reaches S phase before rejoining (the chromosome can also be broken in the S phase before replication). After replication, sister chromatids fuse and enter into anaphase. The generated isodicentric chromatids can then enter into fusion-bridge-breakage cycles. Isoacentric chromatids that replicate and progress through the cell cycle, as well as isodicentric chromatids that do not break during anaphase, will generate isoacentric fragments and isodicentric chromosomes, respectively, after the next replication (S-II/M-II). Thus, sister chromatid fusion events lead to an increase in chromosome instability by means of gene amplification and accumulation of chromosome aberrations in the following cell divisions. C, top row, DNA-PKcs^{-/-} metaphase at first division after irradiation. *Left*, the metaphase has been solid stained with Leishman. *Arrowhead*, a centric fragment of which chromatids are fused; this chromosome fragment is presented at a higher magnification (*inset*) showing evident sister chromatid fusion. After solid staining, a telomeric FISH is applied on the same slides (*right*). In this image, fusion of the chromatids is still evident and absence of telomeres in the q-arms is confirmed. *Bottom two rows*, further examples of centric and acentric fragments where sister chromatids have fused. For each fragment, solid staining evidencing sister chromatid fusion followed by telomeric FISH confirming absence of telomeres in the fused ends is presented.

measured the kinetics of DSB rejoining in irradiated DNA-PKcs^{-/-} and wild-type MEFs by asymmetrical FIGE. The results in Fig. 4A indicate a similar linear increase in FAR—a measure of DNA DSBs present—with increasing radiation dose in DNA-PKcs^{-/-} and wild-type MEFs. Because induction of DNA DSBs as a function of radiation dose is thought to be linear, the linear relationship between FAR and radiation dose in the range of interest also implies a linear relationship between FAR and DNA DSBs present. This allows evaluation of DNA DSBs rejoining directly from FAR versus time plots, obviating corrections otherwise required when the relationship between FAR and dose deviates significantly from linearity.

Figure 4 shows the kinetics of DNA DSB rejoining in DNA-PKcs^{+/+} and DNA-PKcs^{-/-} MEFs over a period of 48 hours after

exposure to 30 Gy of ionizing radiation. Similar to the results with M059J cells, DNA-PKcs^{-/-} MEFs rejoin the majority of DSBs albeit with slow kinetics. Forty-eight hours after irradiation, the amount of residual breaks in DNA-PKcs^{-/-} is similar to that in control MEFs (Fig. 4B). However, at shorter repair times (0.5-6 hours after irradiation), the level of rejoining is strikingly different in the two cell types (Fig. 4C). For example, 2 hours after ionizing radiation, most DSBs have been rejoined in wild-type MEFs whereas more than 50% remain unrejoined in DNA-PKcs^{-/-} MEFs (Fig. 4C). These results and those reported earlier (39) suggest that DNA-PK deficiency does not prevent joining of DSBs but significantly slows down the kinetics of this rejoining. This alteration in the kinetics could explain our cytogenetic observations as many more DSBs will be present simultaneously for rather long periods of time after

irradiation, increasing thus the probability of interaction between wrong ends, particularly when in close spatial proximity as is the case for sister chromatids.

Discussion

Proteins involved in nonhomologous end joining play an essential role in maintaining genomic stability and in preventing tumor formation (14, 15, 33, 40). Among these proteins, DNA-PKcs serves a dual function: it participates in the repair of DSBs by nonhomologous end joining (for a review, ref. 41) and it contributes to the organization of a functional telomere, thus preventing end joining of whole chromosomes (24, 27, 28). To evaluate the contribution of each of these important functions in protecting the integrity of the genome, we carried out an exhaustive cytogenetic analysis of the spontaneous and ionizing radiation-induced chromosome aberrations in the DNA-PKcs knockout mouse model. We observed a low frequency of telomere-telomere fusions indicative of a limited end-capping defect in our primary DNA-PKcs^{-/-} MEFs. Actually, only one instance of a dysfunctional telomere joined to radiation-induced DSB was found in the entire analysis. We therefore conclude that telomere dysfunction contributes only marginally to radiation sensitivity and genomic instability associated with DNA-PKcs deficiency in primary MEFs. These observations differ from those of Gilley et al. (24) in primary DNA-PKcs^{-/-} MEFs in which higher levels of telomere-telomere fusions (~20 fusions per 100 cells) were observed than in our study (6 telomere-telomere fusions per 100 cells). The reason for this difference is not clear but may be due to the different population doublings analyzed. In our study, embryos are irradiated *in utero* and the MEFs are analyzed in the first or second population doubling after female sacrifice. In the study by Gilley et al. (24), the MEFs were harvested for analysis after 10 population doublings. It may be important to differentiate

between phenotypes of cells maintained in culture over several population doublings and freshly derived MEFs. Further experimentation is required to clarify this issue. Our observations also differ from those of Bailey et al. (30) who showed that transformed *scid* fibroblasts have a strong telomeric phenotype with high rates of telomere-telomere and telomere-DSB fusions. It is likely that this difference in response derives from the transformed phenotype of the cells employed in the latter study and could reflect differences in telomere metabolism or telomere structure between primary and immortalized MEFs as recently suggested by Rebuzzini et al. (42).

Chromosomal rearrangements (exchange-type aberrations) are observed with a high frequency in our DNA-PKcs knockout mouse model and show that despite the repair defect, cells retain substantial DNA end-joining capacity. Similar results have been reported in human cells deficient in DNA-PKcs (34) and in other nonhomologous end joining repair mutants (40). The results of our DSB-rejoining experiments provide an explanation for our cytogenetic observations. Repair-competent cells of higher eukaryotes process DSBs in their genome within minutes using the DNA-PK-dependent nonhomologous end joining apparatus. However, cells with defects in this repair pathway, such as M059J (39) and DNA-PKcs^{-/-} MEFs (Fig. 4), use a backup pathway operating with slow kinetics to remove the majority of DSBs. In the slowly repairing DNA-PKcs^{-/-} MEFs, many DSBs will remain as repair substrates relatively close in space and time. As a consequence, the probability of misjoining will increase, leading to the formation of chromosome rearrangements. The longer the DSBs remain unrepaired, the higher the probability of interaction and formation of chromosome aberrations, suggesting that chromosome territories in the interphase nucleus are dynamic and capable of interaction. The nature of the pathway responsible for DNA DSB

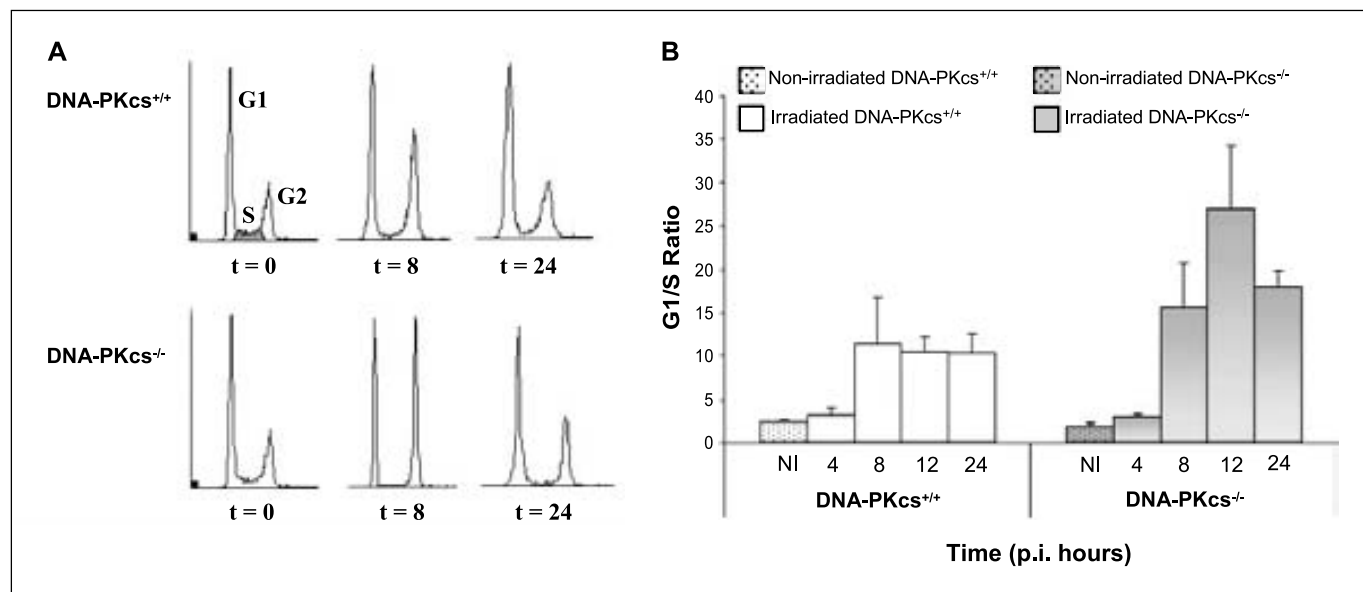


Figure 3. Activation of the G₁ checkpoint in DNA-PKcs^{-/-} MEFs. Primary DNA-PKcs^{+/+} and DNA-PKcs^{-/-} MEFs were prepared from 12- to 14-day-old embryos and grown in culture for two to four doublings. Exponentially growing cultures were exposed to 7-Gy ionizing radiation and returned to 37°C. At various times thereafter, cells were collected and analyzed by flow cytometry. *A*, flow cytometry profiles obtained at 0, 8, and 24 hours after irradiation. Note the depletion of S-phase cells at 8 hours and to a lesser extent at 24 hours after irradiation, which is a manifestation of the activation of the G₁ checkpoint, both in DNA-PKcs^{+/+} and DNA-PKcs^{-/-} MEFs. *B*, the ratio of the fraction of cells in G₁ and S (*G₁/S Ratio*) at different times after irradiation is presented. Arrest in G₁ manifests as an increase in this ratio and is evident for both cell types starting at 8 hours and reaching a peak at 8 to 12 hours after irradiation. *Columns*, mean from three different experiments; *bars*, SE.

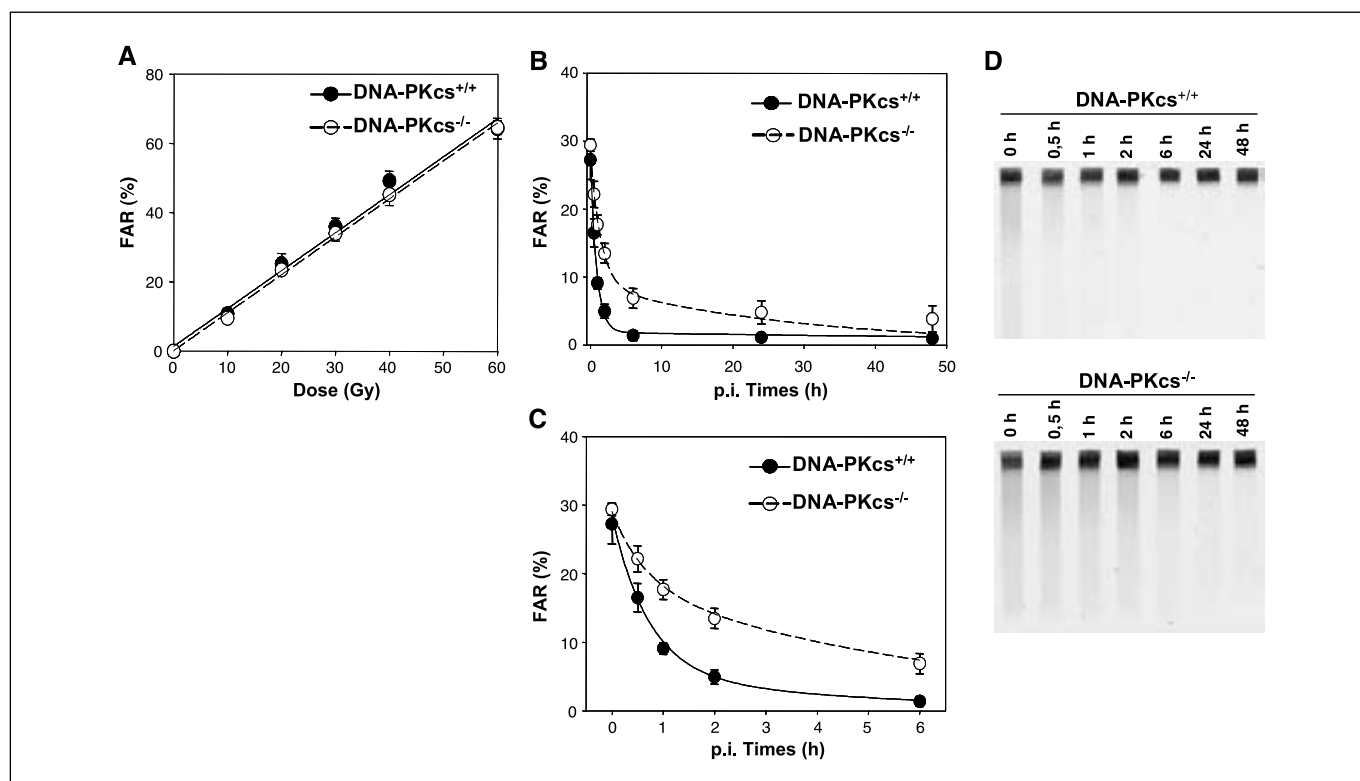


Figure 4. A, FAR as a function of radiation dose in the range of 0 to 60 Gy for DNA-PKcs^{+/+} and DNA-PKcs^{-/-} MEFs. MEFs were prepared from 12- to 14-day-old embryos and used for experiments after two to four cell doublings, subsequent to reaching confluence. Both types of MEFs showed an equal and approximately linear increase in FAR with increasing dose of radiation. Points, mean of two determinations from three independent experiments; bars, SD. B, repair kinetics for irradiated MEFs allowed to repair for up to 48 hours. Note the slower kinetics of end joining in DNA-PKcs^{-/-} MEFs but also that after 24 hours, the majority of the DSBs had been rejoined. C, repair kinetics during the first 6 hours after irradiation. Points, mean of two determinations from three independent experiments; bars, SD. D, typical asymmetrical FIGE gels of the kinetics of DSB rejoining in DNA-PKcs^{-/-} and DNA-PKcs^{+/+} MEFs.

rejoining in the absence of DNA-PKcs has not been elucidated completely (43). Although homologous recombination is an obvious candidate and has been actually shown to be stimulated in nonhomologous end joining-defective cells (44), an extensive study using DT40 cells did not support this possibility (45). In these cells, rejoining of ionizing radiation-induced DNA DSBs follows a kinetics similar to those of other cells of higher eukaryotes despite the 1,000-fold increase in their ability to carry out homologous recombination. In addition, DSB rejoining remained unchanged in knockout mutants with defects in Rad51, Rad51B, Rad52, or Rad54, and a Rad54 defect in a Ku70-deficient mutant remained without effect on DSB rejoining. It is therefore possible that an inherently slow nonhomologous end joining repair pathway operating independently of DNA-PK and DNA ligase IV/XRCC4 underlies the observed DSB rejoining in DNA-PK MEFs. Recent studies implicate DNA ligase III and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in this pathway of end joining (43, 46). In favor of a DNA-PK-independent alternative pathway of nonhomologous end joining, our results show that its function is associated with the joining of incorrect ends, an effect not compatible with homologous recombination.

The most striking and novel observation here is that chromosome aberrations formed by postreplicative rejoining are likely to make an important contribution to the radiosensitivity and chromosome instability of DNA-PKcs^{-/-} MEFs. Chromosome aberrations resulting from postreplicative joining were only observed in DNA-PKcs^{-/-} MEFs although the initial numbers of breaks produced after

irradiation were similar in the two genetic backgrounds as shown by the asymmetrical FIGE experiments (Fig. 4A). Sister chromatid fusion can result from a variety of dysfunctions. In telomerase-deficient cells and mice, replication-dependent telomere erosion during S phase causes unprotection of both chromatids at the same time, leading frequently to postreplicative end joining of sister chromatids (22). Moreover, the status of cell cycle checkpoints could also influence the occurrence of sister chromatid fusion as checkpoints will block the progression through the cell cycle of cells containing broken chromosomes. In a G₁ checkpoint-deficient genetic background, cells with DSBs progress into S phase, generating a broken sister chromatid that favors sister chromatid fusion. Indeed, sister chromatid fusion leading to isodicentric chromosomes and inverted repeats is a characteristic of mouse embryonic stem cells (47) and of the ES-30 cancer cell line (48), both of which lack the G₁ p53-dependent cell cycle checkpoint (47-50). In the case of DNA-PKcs-deficient MEFs, which possesses wild-type ATM and p53, our flow cytometry experiments failed to detect defects in the G₁ checkpoint response. Other studies with the DNA-PKcs^{-/-} mouse model also confirm the G₁ checkpoint response after DNA damage, manifested by a depletion of S-phase cells and an increase in the G₁/S ratio after ionizing radiation (51, 52). To explain the formation of isoacentric fragments and isodicentric chromosomes by sister chromatid fusion in DNA-PKcs^{-/-} MEFs, it should be taken into consideration that irradiation was done *in vivo* on an unsynchronized cell population. Thus, a fraction of cells in the mouse embryos was irradiated in S phase. Mounting evidence points

to a role for DNA-PKcs in damage-induced S-phase arrest and its reversal (53–56). Damage-induced S-phase arrest was reversed *in vitro* by the addition of a DNA-PK inhibitor or by immunodepletion of DNA-PKcs, suggesting that DNA-PKcs may be directly involved in S-phase checkpoint through modulation of replication proteins (53, 55). In this scenario, isoacentric and isodicentric rearrangements can be originated from individual DNA DSBs that progress through S phase, due to compromised damage-induced S-phase checkpoint, and generate two sister chromatids with breakage at the same site. Throughout G₂, sister chromatid cohesion may prevent free break ends from long-term diffusion (57). Favored by proximity, these broken sister chromatids can fuse and progress through the cell cycle until the next S phase and subsequent mitosis, when isoacentric and isodicentric rearrangements are observed.

In conclusion, our results show that in the absence of DNA-PKcs, broken DNA ends are processed with slow kinetics and the long-lived ends interact with other DNA ends in the vicinity before or after replication, causing the formation of exchange-type chromosome aberrations. Thus, the ability of cells to quickly and efficiently remove DSBs may, together with a correct S-phase checkpoint, play

a major role in maintaining the stability of the genome in unirradiated cells and in preventing the formation of lethal chromosome aberrations in cells exposed to agents inducing this type of lesion.

Acknowledgments

Received 3/21/2005; revised 8/2/2005; accepted 9/14/2005.

Grant support: European Union grant FI-CT-2003-508842; Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología grants 2001-SGR-00202 and SAF2002-11833-E (L. Tusell and A. Genescà); Ministerio de Ciencia y Tecnología grants SAF2001-1869 and GEN2001-4856-C13-08, Regional Government of Madrid grant 08.1/0054/01, European Union grants INTACT LSHC-CT-2003-506803, ZINCAGE FOOD-CT-2003-506850, and RISC-RAD FI6R-CT-2003-508842, and Josef Steiner Award 2003 (M.A. Blasco); Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany (G. Iliakis); European Union grant TELOSENS FIGH-CT-2002-00217 (G. Iliakis, A. Genescà, and M.A. Blasco); and Human Frontier Science Program Organization (G. Taccioli).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank R. Serrano and E. Santos for mouse care and genotyping, I. Ponsa for advice in the evaluation of binucleated cells, R. Eguia for advice with SKY analysis, F. Windhofer for advice with asymmetrical FISH, N. Agell for advice with flow cytometry, M. Puigcerver for technical assistance, and *SiMTRAD* at the Universitat Autònoma de Barcelona School of Modern Languages for editing of the manuscript.

References

- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643–9.
- Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623–7.
- Gisselsson D, Pettersson L, Houglund M, et al. Chromosome breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5357–62.
- Ribas M, Masramon L, Aiza G, Capellà G, Miró R, Peinado MA. The structural nature of chromosomal instability in colon cancer cells. *FASEB J* 2003;17:289–91.
- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812–6.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–61.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816–9.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Mismatch gene repair defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1996;2:169–74.
- Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 1984;5:511–4.
- Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23:687–96.
- Doherty AJ, Jackson SP. DNA repair: how KU makes ends meet. *Curr Biol* 2001;11:R920–024.
- Thompson LH, Shild D. Homologous recombination repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 2001;477:131–53.
- Li GC, Ouyang HH, Li XL, et al. Ku70: a candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma. *Mol Cell* 1998;2:1–8.
- Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, et al. DNA repair protein Ku 80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 2000;404:510–4.
- Gao Y, Ferguson DO, Xie W, et al. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability, and development. *Nature* 2000;404:897–900.
- Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, et al. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 1999;9:699–702.
- O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1227–35.
- Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, et al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 2001;105:177–86.
- Kobayashi N, Agematsu K, Sugita K, et al. Novel artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families. *Hum Genet* 2003;112:348–52.
- Moshous D, Pannetier R, Chasseval RD, et al. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J Clin Invest* 2003;111:381–7.
- O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard P-M, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting development delay and immunodeficiency. *Mol Cell* 2001;8:1175–85.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997;91:25–34.
- Artandi SE, Chang S, Lee S-L, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000;406:641–5.
- Gilley D, Tanaka H, Hande MP, et al. DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15084–8.
- d'Adda di Fagnagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426:194–8.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003; 13:1549–56.
- Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, et al. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14899–904.
- Goytisolo FA, Samper E, Edmonson S, Taccioli GE, Blasco MA. The absence of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol Cell Biol* 2001;21:3642–51.
- Latre L, Tusell L, Martín M, et al. Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. *Exp Cell Res* 2003;287:282–8.
- Bailey SM, Cornforth MN, Ullrich RL, Goodwin EH. Dysfunction mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:349–57.
- Taccioli GE, Amatucci AG, Beamish HJ, et al. Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity* 1998;9:355–66.
- Martin M, Genescà A, Latre L, et al. Radiation-induced chromosome breaks in AT cells remain open. *Int J Radiat Biol* 2003;79:203–10.
- Karanjawa ZE, Grawunder U, Hsieh CL, Lieber MR. The nonhomologous DNA end joining is important for chromosome stability in primary fibroblasts. *Curr Biol* 1999;9:1501–4.
- Virsik-Köpp P, Rave-Fränk M, Hofman-Hüther H, Schmidberger H. Role of DNA-PK in the process of aberration formation as studied in irradiated human glioblastoma cell lines M059K and M059J. *Int J Radiat Biol* 2003;79:61–8.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland M, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated lymphocyte cultures. *Mut Res* 2003;534:65–75.
- Toledo F, Le Roscouet D, Buttin G, Debatisse M. Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J* 1992;11:2665–73.
- Ma C, Martin S, Trask B, Hamlin JL. Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells. *Genes Dev* 1993; 7:605–20.
- Mondello C, Rebussini P, Dolzan M, Edmondson S, Taccioli GE, Giulotto E. Increased gene amplification in immortal rodent cells deficient for the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Cancer Res* 2001;61: 4520–5.
- DiBiase SJ, Zeng Z-C, 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.
- Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6630–3.
- Smith GCM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 1999;13:916–34.
- Rebuzzini P, Lisa A, Giulotto E, Mondello C. Chromosomal end-to-end fusions in immortalized mouse embryonic fibroblasts deficient in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Cancer Lett* 2004;203:79–86.

43. Wang H, Rosidi B, Perrault R, et al. DNA ligase III as a candidate component of back up pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 2005;65:4020-30.
44. Delacote F, Han M, Stamato TD, Jasin M, Lopez BS. An *xrcc4* defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3454-63.
45. Wang H, Zeng ZC, Bui TA, et al. Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* 2001;20:2212-24.
46. Audebert M, Salles B, Calsou P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 2004;279:55117-26.
47. Lo AW, Sprung CN, Fouladi B, et al. Chromosome instability as a result of double-strand breaks near telomeres in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2002a;22:4836-50.
48. Lo AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia* 2002b;4:531-8.
49. McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. Cell cycle arrest and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994;54:3718-22.
50. Aladjem MI, Spike BT, Rodewald LW, et al. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* 1998;8:145-55.
51. Burma S, Kurimasa A, Xie G, et al. DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem* 1999;274:17139-43.
52. Jimenez GS, Bryntesson F, Torres-Arzayus MI, et al. DNA-dependent protein kinase is not required for the p53-dependent response to DNA damage. *Nature* 1999;400:81-3.
53. Park JS, Park SJ, Peng X, Wang M, Yu MA, Le SH. Involvement of DNA-dependent protein kinase in UV-induced replication arrest. *J Biol Chem* 1999;274:32520-7.
54. Wang Y, Zhou XY, Wang H, Huq MS, Iliakis G. Roles of replication protein A and DNA-dependent protein kinase in the regulation of DNA replication following DNA damage. *J Biol Chem* 1999;274:22060-4.
55. Wang H, Guan J, Wang H, Perrault AR, Wang Y, Iliakis G. Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 2001;61:8554-63.
56. Guan J, DiBiase S, Iliakis G. The catalytic subunit DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) facilitates recovery from radiation-induced inhibition of DNA replication. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1183-92.
57. Sjogren C, Nasmyth K. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 2001;11:991-5.

CAPÍTOL II

Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open

M. MARTÍN†‡, A. GENESCA†*, L. LATRE†‡, M. RIBAS§, R. MIRÓ†‡, J. EGOZCUE†
and L. TUSELL†

(Accepted 23 December 2002)

Abstract.

Purpose: To determine if broken chromosome-end healing mechanisms through the addition of new telomeric sequences exist in cells having difficulties in rejoining the ends of broken chromosomes.

Materials and Methods: A full-colour painting protocol of all human chromosomes by FISH was combined with a telomeric and centromeric labelling using PNA probes to characterize the rejoining pattern and telomere status of radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia (A-T) and normal lymphoblastoid cell lines.

Results: It was first established that the cell lines used for chromosome healing analysis were chromosomally stable. FISH analysis provided evidence that the frequency of deleted chromosomes, apparently unrejoined, was much higher in A-T than in normal cells, as expected by the role of ATM in cell-cycle control, as well as in DNA repair. In spite of their high frequency, broken chromosome ends in A-T cells do not seem to act as substrates for telomerase since additional terminal telomere sequences (more than the 92 expected pairs) indicative of chromosome healing were never observed. Broken chromosome ends in A-T cells remained open.

Conclusion: The disability of cells to rejoin broken chromosome ends does not lead to the healing of DSBs by the acquisition of new telomeric sequences.

1. Introduction

Spontaneous or induced double-strand breaks (DSBs) on chromosomes represent a threat for the cell because they disrupt the integrity of the genome. In mammalian cells, non-homologous end-joining (NHEJ) is the main pathway for the repair of radiation-induced DSBs. This pathway can seal covalently two broken ends without requiring extensive sequence homology. Non-repaired DSBs lead to highly unstable open ends. In contrast, intact mammalian chromosomes, as well as rejoined chromosome configurations resulting from the non-homologous ligation of broken ends, possess telomeric repeat sequences (TTAGGG) $_n$ (Blackburn 1991).

Telomeres are nucleoprotein complexes forming a t-loop structure (Griffith *et al.* 1999) that cap the ends of the linear chromosomes, thus preventing end-to-end fusions. Telomere length is maintained from generation to generation by the enzyme telomerase, which is active in germ and embryonic cells but inactive in most somatic cells. Telomeric functions and DNA repair proteins are closely related. Several proteins originally identified by their role in NHEJ are found at telomeres and are required to cap the ends of mammalian chromosomes, preventing end fusions (Bailey *et al.* 1999, Samper *et al.* 2000, D'Adda di Fagagna *et al.* 2001, Goytisolo *et al.* 2001). Reciprocally, telomerase and DNA repair functions may also be interconnected. Considering the ability of telomerase to add telomeric sequences to the chromosomes and in light of the short regions of complementarity required for telomerase to add new TTAGGG repeats (Flint *et al.* 1994), it has been speculated that telomerase may participate in processes of chromosomal repair by *de novo* synthesis of telomere repeats at DSBs in a process called chromosome healing (Preston 1997, Slijepcevic *et al.* 1998, Srung *et al.* 1999). It has been suggested that this mechanism underlies several genetic diseases (Flint *et al.* 1994, Wong *et al.* 1997) as well as stabilizing the broken chromosome ends generated as a consequence of chromosome instability during tumour development (DePinho 2000, Rudolph *et al.* 2001). Indications for the existence of chromosome healing in humans are based on experiments repeatedly showing that telomerase increases its activity in response to radiation exposure (Leteurtre *et al.* 1997, Wang *et al.* 2000, Finnon *et al.* 2001). However, to date, no definitive demonstration for the *de novo* telomere acquisition events in mammalian cells has been reported.

It has been presumed that the *de novo* formation of telomeres could preferentially occur in cells with difficulties in rejoining the ends of DSBs (Sprung *et al.* 1999). In humans, some inherited syndromes with high sensitivity to radiation exposure are known. Among these, the recessive syndrome ataxia

*Author for correspondence. e-mail: Anna.Genesca@uab.es
†Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, and ‡Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain
§Servei de Radiofísica i Radioprotecció, Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau de Barcelona, Barcelona, Spain

telangiectasia (A-T) is an example. Cells from A-T patients show hypersensitivity to ionizing radiation (IR), as evidenced by an increased induction of chromosomal aberrations compared with control cells (Mozdarani and Bryant 1989, Pandita and Hittelman 1992). The ATM gene responsible for A-T is thought to play a crucial role in a signal transduction network responsible for cell-cycle arrest, apoptosis and DNA repair pathways that activate in response to radiation-induced DSBs (for a review, see Michelson and Weinert 2000). Cornforth and Bedford (1985) analysed solid-stained prematurely condensed chromosomes of A-T cells exposed to X-rays and reported that the fraction of residual breaks, apparently unrepaired, was five to six times greater in A-T cells than in normal cells. Some of these apparently unrejoined chromosome breaks could well be the substrate for telomerase to add new telomeric repeats. In the present study, an M-FISH protocol was combined with telomeric and centromeric labelling using peptid nucleic acid (PNA) probes to characterize the rejoining pattern and the telomere status of radiation-induced chromosome aberrations in A-T cells. The results indicate that a considerable number of breaks in A-T cells remain unrejoined. In spite of this, no evidence for *de novo* telomere acquisition events has been obtained and, therefore, broken chromosome ends in A-T cells remain open.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and γ -ray exposure

The ATM mutant fibroblast AT5BIVA cell line (kindly provided by Professor A. T. Natarajan, Leiden University) was derived from an A-T patient. The lymphoblastoid immortal cell lines GM08436A and GM09622 were derived from an A-T child and a matched control for sex and age, respectively. Both cell lines were obtained from the Coriel Cell Repositories. Fibroblasts were grown as monolayer cultures in DMEM (GIBCO/BRL, California) medium. Lymphoblastoid cell lines were grown in suspension in RPMI 1640 (GIBCO, BRL) medium. To perform irradiations at the G_0 stage of the cell cycle, fibroblasts were grown to confluency and lymphoblasts were allowed to reach the *plateau* stage, and then left at room temperature overnight, before irradiation. Cells in growth medium were irradiated under a ^{60}Co source with 1 Gy γ -rays (dose-rate 0.5 Gy min^{-1}). Immediately after irradiation, the cells were cultured in the presence of 5-bromo-deoxyuridine (0.6 mg ml^{-1}) in order to distinguish further post-irradiation divisions. Metaphase chro-

mosome preparations were obtained at 24, 48 and 72 h post-irradiation. From each culture flask, two fractions were made in order to obtain harvested cells for cytogenetic analysis and protein extract for the TRAP assay. For chromosome analysis, we proceeded according to standard protocols. Cell fractions in the first, second and third division post-irradiation were determined by the exposure of Hoechst 33258 (150 $\mu\text{g ml}^{-1}$) treated slides to UV light. Only those post-irradiation times having more than 95% of first divisions were chosen for analysis.

2.2. TRAP (telomeric repeat amplification protocol)

Protein extracts were obtained with a CHAPS detergent method (Kim *et al.* 1994). Cells were counted before extraction was carried out, and were centrifuged and resuspended in CHAPS lysis buffer. The CHAPS suspension was then centrifuged for 45 min at 15 441g at 4°C. The supernatant was collected and divided in aliquots kept at -80°C. These aliquots were diluted at different cell concentrations before performing PCR. An equivalent number of cells were processed for normal and A-T cells. PCR was performed according to the manufacturer's instructions (TRAPeze Kit, Intergen, Georgia). PCR products were analysed by PAGE in 1 \times Tris-borate EDTA on a 12% polyacrylamide gel. Each well was seeded with 25 μl PCR product. After electrophoresis, the gel was stained with SybrGreen I and gel visualization and pictures were obtained with a GEL DOC 1000 camera and software (BioRad, California).

2.3. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

- PNA-FISH: telomere and centromere PNA-FISH were carried out following the manufacturer's instructions using a Cy3-(CCCTAA)₃ PNA-probe for telomeres and a FITC-AAACACTCTTTTTGTAGA probe for centromeres (PE Biosystems, California). After PNA hybridization and counterstaining, fluorescence signals were visualized under an Olympus BX60 microscope equipped with epifluorescence optics and a CCD camera. The Olympus filter set included three simple filters for visualizing DAPI, FITC and Cy3 fluorescence. Images were captured and analysed using Smart Capture software (Vysis system, Illinois; Applied Imaging, Inc., California).
- M-FISH: after PNA-FISH, the same slides were used to perform a multiplex FISH in order to paint differentially the whole set of chromosomes using a set of five fluorochromes (Spectrum

GreenTM, Spectrum FRedTM, Spectrum RedTM, Spectrum GoldTM, Spectrum AquaTM). The M-FISH probe (Vysis, Inc.) was applied according to the manufacturer's instructions. After hybridization and counterstaining, each fluorochrome was visualized through simple filters. Images were captured and analysed using Quips SpectraVysion software (Vysis system).

2.4. Scoring of aberrations

First, images of well-spread metaphases were captured for the telomeric and centromeric signals. After this, the same slides were subjected to the M-FISH protocol and the same metaphases relocated and captured again. After these captures, we analysed the M-FISH hybridization pattern for each chromosome and each fragment, which were subsequently scored for the presence of telomeric and centromeric signals. Combination of M-FISH and PNA-telomeric and centromeric FISH provides an exhaustive analysis and scoring of aberrations, obtaining highly accurate information about otherwise undetected breaks. Only those cells providing a full set of 46 centromeric signals were used for the present analysis. The aberrations observed were: (1) multicentric chromosomes, chromosomes with more than one centromere (dicentrics and tracentrics); (2) translocations, containing a single centromeric signal and resulting from a centric fragment of a chromosome rejoined to an acentric fragment of another chromosome, this being visible by the distinct M-FISH pattern or by the presence of telomeric signals at both ends of the centric fragment (cryptic translocations); and (3) deleted chromosomes, visibly truncated chromosomes accompanied or not by the resulting acentric fragments. In the scoring of aberrations, each translocated chromosome, together with its reciprocal translocation or the resulting unrejoined centric and acentric fragments, was considered as a single aberration. Similarly, each dicentric chromosome and the accompanying compound acentric fragment, or the two resulting unrejoined fragments, were considered as a single aberration. A compound acentric fragment (two colours) accompanied by two unrejoined centric fragments was also scored as a dicentric. Chromosome exchanges (multicentric chromosomes and translocations) were considered complete when all broken ends had rejoined and, consequently, a pair of telomeric signals was present at each end of the rearranged chromosomes. Incomplete exchanges were those with one or more unrejoined fragments and, consequently, one pair of telomeres at only one end of these fragments could be observed. For aberration type scoring, complex exchanges (those resulting

from at least three breaks in two or more chromosomes) were reduced to simple aberration base types.

2.5. Statistical analysis

Statistical calculation was carried out using a GraphPad[®] calculator. For statistical significance, Student's *t*- and χ^2 -test values were calculated.

3. Results and discussion

3.1. Chromosomal stability of A-T cell lines

An increased spontaneous chromosomal instability was reported for many lymphoblastoid and fibroblast A-T cell lines (Waghray *et al.* 1991, Pandita *et al.* 1995), but there are also A-T cell lines that showed only a low frequency of aberrations or no chromosomal instability at all (Stumm *et al.* 2001). Since the analysis of the capping of radiation-induced chromosome breaks can only be performed in stable cells, we carried out a pilot study to assess the chromosomal stability of the two A-T cell lines. Chromosome aberrations were analysed in metaphase preparations of non-irradiated fibroblast (AT5BIVA) and lymphoblastoid (GM08436A) A-T cell lines. The analysis was carried out after the differential painting of all human chromosomes using an M-FISH protocol. The fibroblast A-T cell line was shown to be very unstable, having a considerable number of clonal and non-clonal rearrangements and a great variation in the number of chromosomes from cell to cell. Therefore, this cell line was rejected for further analysis. In contrast, the application of M-FISH procedures to the unirradiated lymphoblastoid A-T cell line demonstrated its stability. The same was observed for the matched normal (ATM proficient) lymphoblastoid cell line. In these two lymphoblastoid cell lines, all cells analysed showed a 46,XY karyotype, with no aberrations being observed (table 1). Telomere associations, often reported in blood lymphocytes of A-T patients as a consequence of an accelerated rate of telomere shortening and/or

Table 1. Aberrant metaphases in A-T and normal cells after M-FISH analysis.

	0 Gy		1 Gy γ -rays	
	A-T	Normal	A-T	Normal
No. of metaphases analysed	21	25	94	82
Cells with chromosome aberrations	–	–	47 (50.0%)	30 (36.6%)

alteration of chromatin structure (Pandita 2002), were not observed in our A-T immortal lymphoblastoid cell line. This apparent discrepancy might be due to these immortal A-T cells having recovered the ability to maintain telomere length by the addition of telomeric repeat sequences by telomerase, as shown when we performed the TRAP assay with protein extracts of the A-T lymphoblastoid cell line (data not shown). Taken together, these results point to the cytogenetic stability of our A-T and our normal lymphoblastoid cell lines, which is essential for the characterization of the capping of radiation-induced chromosome breaks in A-T cells.

3.2. Radiation-induced chromosome aberrations in A-T cells

Having established that chromosome stability existed in both lymphoblastoid cell lines, we then investigated whether, after radiation exposure, the A-T cell line chosen for chromosome capping analysis behaved according to the expected pattern. That is to say, we assessed whether radiation-induced residual breaks, which could be potential substrates for telomerase, were induced much more frequently in A-T cells than in normal cells. To this end, chromosome analysis was carried out by M-FISH after exposition of the cells at the G₀ stage to 1 Gy γ -rays. The analysis was restricted to complete metaphases (containing 46 centromeres) and was mainly carried out in first-division cells after irradiation (>95%). The results are shown in table 1. In both cell lines, the great majority of the aberrations were of the chromosome type, characteristic of the irradiation of a G₀ stage cell population. As expected, the frequency of aberrant metaphases was higher in the A-T (50.0%) than in the normal cell line (36.6%). This result is in concordance with many reports that repeatedly show A-T cells to be hypersensitive to IR exposure (Mozdarani and Bryant 1989, Pandita and Hittelman 1992: analysing solid stained chromosomes and G-banded preparations; Pandita *et al.* 1995, Stumm *et al.* 2001, Neubauer *et al.* 2002: using painting probes for a few chromosomes). Table 2 shows the results on the types of induced aberrations

with respect to whether they had a rejoined pattern (translocations and dicentrics), or one that was non-rejoined (deletions). We observed that the frequency of dicentric chromosomes and translocations was slightly lower in irradiated A-T than in normal cells (0.170 and 0.170 in A-T versus 0.259 and 0.185 in normal lymphoblastoid cells; a *t*-test was applied to the sum of dicentrics and translocations and showed a significant difference, $p=0.019$). When the frequencies of deleted chromosomes were compared, the difference between A-T and normal cells was very pronounced and in the opposite direction (0.628 deleted chromosomes/irradiated cell for A-T versus 0.173 for normal cells; a *t*-test was applied giving an extremely significant difference, $p<0.0001$). Our results are in concordance with previous studies showing an enhanced conversion of DSBs into visible chromosomal deletions in irradiated A-T cells (Cornforth and Bedford 1985, Mozdarani and Bryant 1989, Pandita and Hittelman 1992). The increased frequency of deleted chromosomes in A-T cells is consistent with a role of the functional ATM gene product in enhancing the rejoining of DNA DSBs. The functional ATM product has been reported to phosphorylate Nbs1 (Gatei *et al.* 2000, Lim *et al.* 2000, Wu *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2000), which, in mammalian cells, forms a complex with Rad50 and Mre11 that moves to DSBs and is involved in the end-to-end joining of chromosome fragments (Nelms *et al.* 1998). Colocalization of these proteins is reduced and delayed in A-T cells (Maser *et al.* 1997), possibly explaining the excess of deleted chromosomes in irradiated A-T cells.

3.3. De novo formation of telomeres

It has been presumed that the *de novo* formation of telomeres by telomerase could only occur in cells that have difficulties in rejoining the ends of DSBs (Sprung *et al.* 1999). Having established the chromosomal stability of the lymphoblastoid cell lines and the production of a great number of unrejoined deleted chromosomes in A-T cells, our objective was to analyse the formation of new telomeres at broken chromosome ends. The hybridization of telomeric sequences using PNA probes allowed unambiguous analysis of A-T and normal metaphases for the presence of additional telomere pairs suggestive of chromosome healing. This analysis was carried out in the same metaphases previously analysed for their M-FISH pattern, all of these containing 46 centromeres; thus, 92 pairs of telomeres would be expected in each metaphase. Additional telomere pairs were only observed in two irradiated normal cells. In both cases, a non-terminal telomere pair was observed, which was located at the

Table 2. Frequencies of rejoined and unrejoined aberrations in irradiated A-T and normal cells after M-FISH analysis.

	AT (1 Gy)	Normal (1 Gy)	<i>t</i> -test
Multicentric chromosomes (freq./cell)	16 (0.170)	21 (0.259)	$p=0.019$
Translocations (freq./cell)	16 (0.170)	15 (0.185)	$p=0.019$
Deleted chromosomes (freq./cell)	59 (0.628)	14 (0.173)	$p<0.0001$

colour junction of a dicentric chromosome (figure 1). These additional non-terminal telomeres did not result from the *de novo* addition of telomeric sequences but from an intratelomeric breakage, the subsequent rejoining giving rise to a split telomere signal. Telomeric sequences below a minimal length cannot

prevent end-to-end fusion of the chromosomes (Blasco *et al.* 1997, Hande *et al.* 1999) leading in the present study to dicentric chromosomes with small interstitial telomeric signals. Additional telomeres at the ends of the chromosomes or chromosome fragments were never observed in A-T cells, in spite of the high number

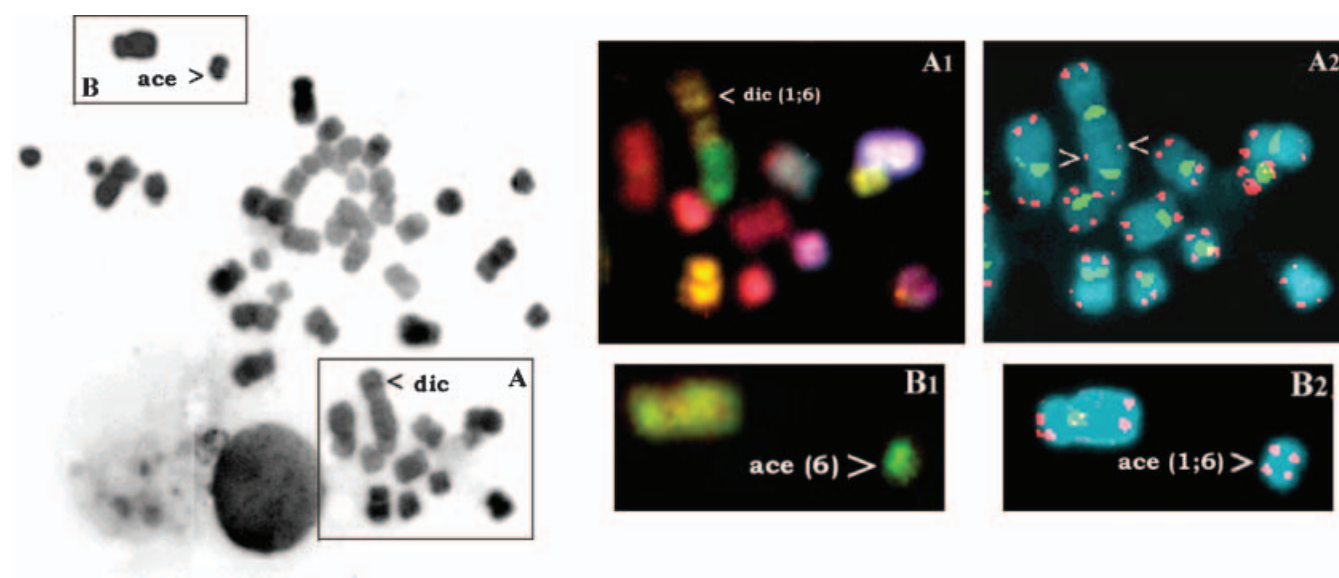


Figure 1. Metaphase of an irradiated normal cell with an additional non-terminal pair of telomeres. (left to right) DAPI reverse image of the metaphase where a dicentric chromosome (A) and an acentric fragment (B) can be observed (arrowheads). (top right) A₁, M-FISH hybridization reveals a dicentric (1;6) (the gold colour corresponds to chromosome 1, the green to chromosome 6); A₂, centromeric and telomeric labelling reveals a small additional pair of telomeres at the dicentric colour junction; B₁, M-FISH image of the accompanying acentric fragment. At this point, we would expect to find a compound acentric fragment (1;6), but the accompanying acentric fragment in the metaphase is painted in a single colour, corresponding to chromosome 6. Interestingly, the telomeric labelling of the acentric fragment reveals a pair of telomeric signals at each end. The observed interstitial telomeric sequences in the dic (1;6) have probably originated from an intratelomeric breakage in chromosome 1. The split telomere signal from chromosome 1 has rejoined with the acentric fragment of chromosome 6, giving rise to the expected compound acentric fragment (1;6) (cryptic rearrangement).

Table 3. Frequencies of rejoined and unrejoined-type aberrations in irradiated A-T and normal cells after M-FISH and telomeric labelling analysis.

	A-T (94 cells analysed)			Normal (82 cells analysed)		
	<i>N</i> (frequency)	Minimal number of breaks	Ends remaining open	<i>N</i> (frequency)	Minimal number of breaks	Ends remaining open
Complete exchanges						
Simple	5 (0.053)	10	–	22 (0.268)	44	–
Complex	–	–	–	6 (0.073)	19	–
Incomplete exchanges						
Simple	15 (0.160)	30	30	6 (0.073)	12	4
Complex	10 (0.106)	35	20	2 (0.024)	6	12
Terminal deletions	39 (0.415)	39	78	6 (0.073)	6	12
Interstitial deletions	6 (0.064)	12	4*	1 (0.012)	2	0*
Total		126	132		89	28
Fraction of aberrations with open ends**		64/75 (85.3%)			14/43 (32.6%)	

*Assuming that the fragments resulting from an interstitial deletion cap their ends, forming a ring structure.

**Incomplete exchanges + terminal deletions.

of truncated chromosomes produced in A-T cells after IR exposure. Thus, the *de novo* formation of telomeres does not seem to operate either in A-T or in normal

Table 4. Chromosome ends that remain open.

	A-T	Normal	<i>t</i> -test
Minimal number of breaks	126	89	$p < 0.05$
Reactive ends generated	252	178	$p < 0.0001$
Ends remaining open*	132	28	$p < 0.0001$
Fraction of reactive ends generated that remain open*	52.4	15.7	

*Without telomeric signals.

lymphoblastoid cells. Using confocal microscopy, Wong *et al.* (2002) showed that IR induces the sequestration of telomerase at the nucleolar sites, probably avoiding the enzyme's access to DSBs. Our results, showing a lack of healing in broken chromosomes, are in accordance with the recently reported radiation-induced sequestration of telomerase in response to DNA damage. However, our results do not preclude the existence of *de novo* formation of telomeres at the broken DNA ends in other mammalian cell environments, such as germline or early embryonic cells with high telomerase levels or in cells with a complete loss of NHEJ pathways.

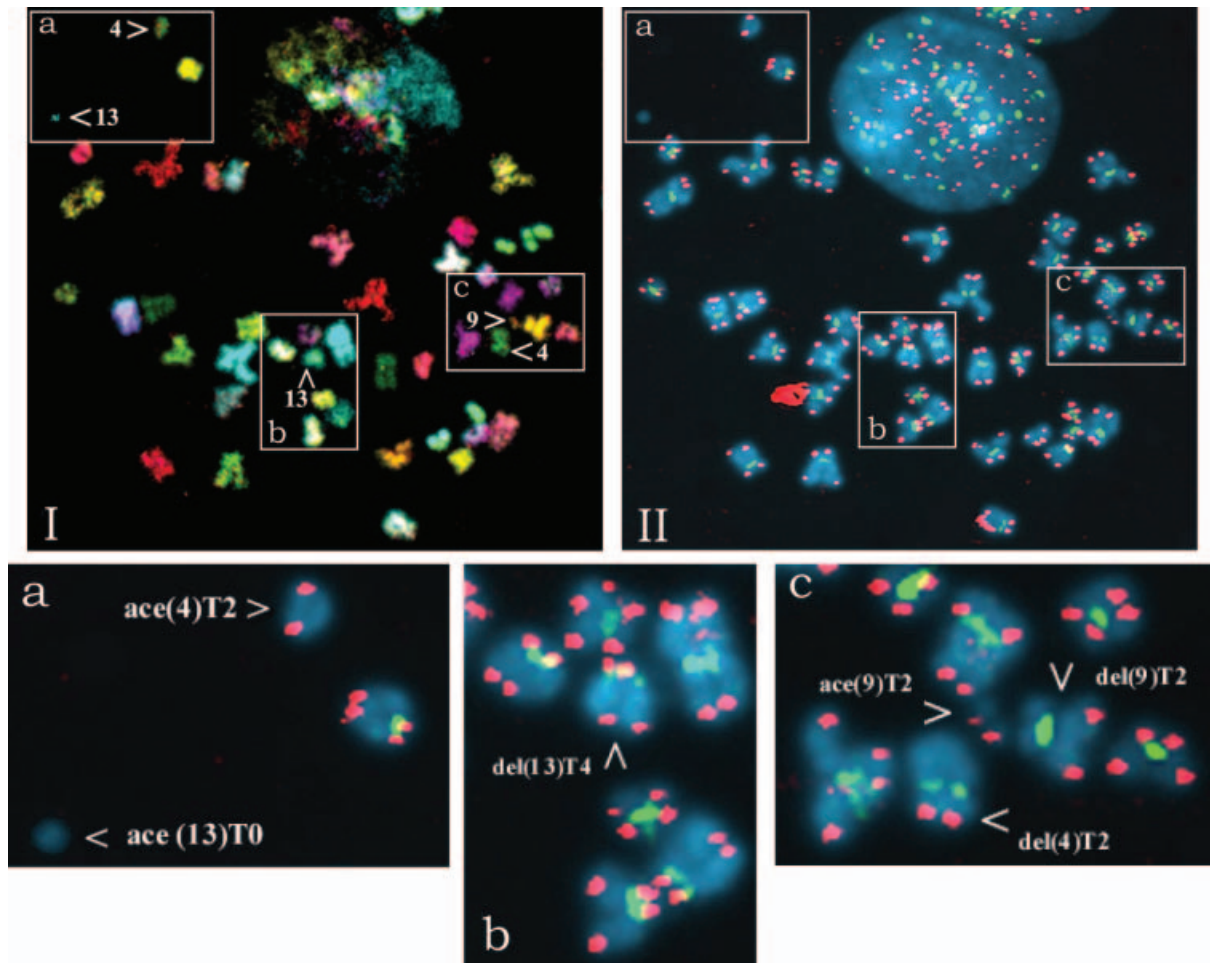


Figure 2. Metaphase of an irradiated A-T cell with several uncapped broken chromosome ends. (I) M-FISH image. Deleted chromosomes and the corresponding acentric fragments found in this metaphase are indicated by arrowheads in squares a, b and c. (Ia) Two acentric fragments from chromosomes 4 and 13; (Ib) centric fragment of chromosome 13; (Ic) centric fragments of chromosomes 4 and 9 and an acentric fragment of chromosome 9. (II) Telomere and centromere labelling of the same metaphase reveals the capping status of the centric and acentric fragments. Squares a, b and c are amplified below the metaphase images. a, Acentric fragment of chromosome 4 is capped at only one end with a telomere pair (T2). The broken chromosome end remains open. The acentric fragment from chromosome 13 shows no telomeric signals (T0) as it originates from an interstitial deletion in chromosome 13. b, Accordingly, deleted chromosome 13 presents four telomeric signals (T4). c, Centric fragments of chromosomes 4 and 9 show a pair of telomeric signals at only one end. The broken ends of both chromosomes remain open. The same occurs with the acentric fragment of chromosome 9. In summary, this metaphase underwent a minimum of four breaks and generated eight broken ends. Only fragments originating from chromosome 13 have rejoined. The rest remain open or unable to rejoin to other broken chromosomes.

3.4. Capping of breaks in A-T cells

It has been estimated that by using chromosome painting, the minimal size of translocated chromosome fragments that can be detected is approximately 2–3 Mb (Eils *et al.* 1998, Fauth *et al.* 2001). On the other hand, resolution limits of telomere detection using PNA probes were only a few hundred base pairs. Thus, the combination of chromosome painting and the detection of centromeres and telomeres enables highly accurate discrimination between real open deleted chromosomes and cryptic rearranged fragments. In our study, each metaphase was reanalysed to estimate the minimal number of breaks necessary to produce each chromosome aberration; additionally, the number of ends remaining open was scored (table 3). Overall, 30 chromosome aberrations in A-T cells and 36 in normal cells were finally classified as exchange patterns. While in normal cells 77.8% of the exchanges were complete (with all the broken ends rejoined as evidenced by the presence of a pair of telomere signals at each broken end), in A-T cells this fraction represented only 16.7% of the exchanges. Moreover, non-exchange patterns (deleted chromosomes not showing telomere signals at their broken ends) were observed far more frequently in A-T (41.5% of aberrations) than in normal cells (7.3%). Interstitial deletions were also observed in both types of cells. Although it is commonly assumed that interstitial fragments present two reactive ends, we consider that they have joined in a ring structure, capping the broken ends (Boei *et al.* 2000). In total, 85.3% of the aberrations induced in A-T cells had ends without telomeric signals (these were seemingly open ends), while this fraction was only 32.6% in normal cells.

The minimal number of breaks estimated to have been produced in A-T cells after M-FISH and telomere analysis was 126 and 89 in normal cells (*t*-test, $p < 0.05$) (tables 3 and 4). The number of reactive ends initially produced has been estimated by doubling the minimal number of breaks. The fraction of reactive ends remaining open in A-T cells was 52.4%, while only 15.7% did so in normal cells (table 4 and figure 2, the latter as a representative example). This represents a fraction of non-repaired residual breaks that is 3.3 times higher in A-T than in normal cells. At present, the nature of the radiation-induced lesions recognized by the product of ATM is unknown, but it is evident that an important fraction of DNA breaks remain open in A-T cells or are not amenable to rejoining. The results obtained in the present study show that an increased frequency of deleted chromosomes without detectable telomere signals at the broken ends are produced in A-T cells. However, in

spite of their high frequency, unrejoined broken chromosome ends remained open, and there were no signs of *de novo* telomere acquisition events.

Acknowledgements

The authors are grateful to M. Puigcerver and F. Garcia for technical assistance. They also thank I. Ponsa for technical advice and David Owen for improving the English. M. M. is recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona and L. L. is recipient of a grant from the Spanish Nuclear Safety Council. This research was supported by grants from the EURATOM programme of the European Union (FIGH-CT1999-009 and FIGH-CT-2002-00217). Research at the authors' laboratory was funded by grants PM99-0061 from the Ministry of Science and Technology and 2000SGR-00067 from the Generalitat de Catalunya.

References

- BAILEY, S. M., MEYNE, J., CHEN, D. J., KURIMASA, A., LI, G. C., LEHNERT, B. E. and GOODWIN, E. H., 1999, DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 14899–14904.
- BLACKBURN, E. H., 1991, Structure and function of telomeres. *Nature*, **350**, 569–573.
- BLASCO, M. A., LEE, H.-W., HANDE, P., SAMPER, E., LANSDORP, P., DEPINHO, R. and GREIDER, C. W., 1997, Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, **91**, 25–34.
- BOEI, J. J. W. A., VERMEULEN, S. and NATARAJAN, A. T., 2000, Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *International Journal of Radiation Biology*, **76**, 163–167.
- CORNFORTH, M. N. and BEDFORD, J. S., 1985, On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science*, **227**, 1589–1591.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F., HANDE, M. P., TONG, W., ROTH, D., LANSDORP, P. M., WANG, Z. and JACKSON, S. P., 2001, Effects of DNA nonhomologous end joining on telomere length and chromosomal instability in mammalian cells. *Current Biology*, **11**, 1192–1196.
- DEPINHO, R. A., 2000, The age of cancer. *Nature* **408**, 248–254.
- EILS, R., UHRIG, S., SARACOGLU, K., SÄTZLER, K., BOLZER, A., PETERSEN, I., CHASSERY, J. M., GANSER, M. and SPEICHER, M. R., 1998, An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenetics and Cell Genetics*, **82**, 160–171.
- FAUTH, C. and SPEICHER, M. R., 2001, Classifying by colors: FISH-based genome analysis. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **93**, 1–10.
- FINNON, P., WONG, H.-P., SILVER, A. R. J., SLIJEPEVIC, P. and BOUFFLER, S. D., 2001, Long but dysfunctional telomeres correlate with chromosomal radiosensitivity in a mouse AML cell line. *International Journal of Radiation Biology*, **77**, 1151–1162.

- FLINT, J., CRADDOCK, C. F., VILLEGAS, A., BENTLY, D. P., WILLIAMS, H. J., GALANELLO, R., CAO, A., WOOD, M. G., AYYUB, H. and HIGGS, D. R., 1994, Healing of broken chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Journal of Human Genetics*, **55**, 505–512.
- GATEI, M., YOUNG, D., CEROSALETTI, K. M., DESAI-MEHTA, A., SPRING, K., KOZLOV, S., LAVIN, M. F., GATTI, R. A., CONCANNON, P. and KHANA, K., 2000, ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nature Genetics*, **25**, 115–119.
- GOYTISOLO, F. A., SAMPER, E., EDMONSON, S., TACCIOLI, G. E. and BLASCO, M. A., 2001, The absence of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Molecular Cell Biology*, **21**, 3642–3651.
- GRIFFITH, J. D., COMEAU, L., ROSENFELD, S., STANSEL, R. M., BIANCHI, A., MOSS, H. and DE LANGE, T., 1999, Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503–514.
- HANDE, M. P., SAMPER, E., LANSDORP, P. and BLASCO, M. A., 1999, Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *Journal of Cell Biology*, **144**, 589–601.
- KIM, N. W., PIATYSZEK, M. A., PROWSE, K. R., HARLEY, C. B., WEST, M. D., HO, P. L. C., COVIELLO, G. M., WRIGHT, W. E., WEINRICH, S. L. and SHAY, J. W., 1994, Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011–2015.
- LETEURTRE, F., LI, X., GLUCKMAN, E. and CAROSELLA, D. E., 1997, Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia*, **11**, 1681–1689.
- LIM, D. S., KIM, S. T., XU, B., MASER, R. S., LIN, J., PETRINI, J. H. and KASTAN, M. B., 2000, ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, **404**, 613–617.
- MASER, R. S., MONSEN, K. J., NELMS, B. E. and PETRINI, J. H., 1997, HMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 6087–6096.
- MICHELSON, R. J. and WEINERT, T., 2000, Closing the gaps among a web of DNA repair disorders. *BioEssays*, **22**, 966–969.
- MOZDARANI, H. and BRYANT, P. E., 1989, Kinetics of chromatid aberrations in G₂ ataxia telangiectasia cells exposed to X-rays and ara A. *International Journal of Radiation Biology*, **55**, 71–84.
- NELMS, B. E., MASER, R. S., MACKAY, J. F., LAGALLY, M. G. and PETRINI, J. H., 1998, *In situ* visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science*, **280**, 590–592.
- NEUBAUER, S., ARUTYUNYAN, R., STUMM, M., DORK, T., BENDIX, R., BREMER, M., VARON, R., SAUER, R. and GEBHART, E., 2002, Radiosensitivity of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome homozygotes and heterozygotes as determined by three-color FISH chromosome painting. *Radiation Research*, **157**, 312–321.
- PANDITA, T. J., 2002, ATM function and telomere stability. *Oncogene* **21**, 611–618.
- PANDITA, T. K. and HITTELMAN, W. N., 1992, Initial chromosome damage but not DNA damage is greater in ataxia telangiectasia cells. *Radiation Research*, **130**, 94–103.
- PANDITA, T. K., PATHAK, S. and GEARD, C. R., 1995, Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia-telangiectasia cells. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **71**, 86–93.
- PRESTON, R. J., 1997, Telomeres, telomerase and chromosome stability. *Radiation Research*, **147**, 529–534.
- RUDOLPH, K. L., MILLARD, M., BOSENBERG, M. W. and DEPINHO, R. A., 2001, Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature Genetics*, **28**, 155–159.
- SAMPER, E., GOYTISOLO, F. A., SLIJEPCEVIC, P., VAN BUUL, P. P. W. and BLASCO, M. A., 2000, Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Reports*, **1**, 244–252.
- SLIJEPCEVIC, P., NATARAJAN, A. T. and BRYANT, P. E., 1998, Telomeres and radiation-induced chromosome breakage. *Mutagenesis*, **13**, 48–49.
- SPRUNG, C. N., REYNOLDS, G. E., JASIN, M. and MURNANE, J. P., 1999, Chromosome healing in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 6781–6786.
- STUMM, M., NEUBAUER, S., KEINDORFF, S., WEGNER, R.-D., WIEACKER, P. and SAUER, R., 2001, High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **92**, 186–191.
- WAGHRAY, M., GASCON, G. G., AL-SEDAIRY, S. and HANNAN, M. A., 1991, Cytogenetic investigations in three cell types of a Saudi family with ataxia telangiectasia. *Human Genetics*, **87**, 285–289.
- WANG, X., LIU, Y., CHOW, L. S., WONG, S. C., TSAO, G. S., KWONG, D. L., SHAM, J. S. and NICHOLLS, J. M., 2000, Regulation of telomerase activity by gamma-radiation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anticancer Research*, **20**, 433–437.
- WONG, A. C., NING, Y., FLINT, J., CLARK, K., DUMANSKI, J. P., LEDBETTER, D. H. and McDERMID, H. E., 1997, Molecular characterization of a 130-kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *American Journal of Human Genetics*, **60**, 113–120.
- WONG, J. M., KUSDRA, L. and COLLINS, K., 2002, Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nature Cell Biology*, **4**, 731–736.
- WU, X., RANGANATHAN, V., WEISMAN, D. S., HEINE, W. F., CICCONE, D. N., O'NEILL, T. B., CRICK, K. E., PIERCE, K. A., LANE, W. S., RATHBUN, G., LIVINGSTON, D. M. and WEAVER, D. T., 2000, ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature*, **405**, 477–482.
- ZHAO, S., WENG, Y. C., YUAN, S. S., LIN, Y. T., HSU, H. C., LIN, S. C., GERBINO, E., SONG, M. H., ZDZIENICKA, M. Z., GATTI, R. A., SHAY, J. W., ZIV, Y., SHILOH, Y. and LEE, E. Y., 2000, Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*, **405**, 473–477.

48

TITLE: Breaks *invisible* to the DNA damage repair machinery accumulate in ataxia-telangiectasia cells

Marta Martín^{1,2}, Mariona Terradas², George Iliakis³, Laura Tusell², Anna Genescà^{1,2}

¹Institute of Biotechnology and Biomedicine and ²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain; ³University Duisburg-Essen Medical School, 45122 Essen, Germany

SHORT TITLE: Invisible breaks accumulate in AT cells

Corresponding author:

Anna Genescà Garrigosa

e-mail: anna.genesca@uab.es

Telephone number: +34 93 581 14 98 / +34 562 07 11 22

FAX number: +34 93 581 22 95

Mail address:

Cell Biology Unit

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology

Biosciences Faculty

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona)

SPAIN

ABSTRACT

After irradiation AT cells accumulate unrepaired DSBs that can persist for several cell divisions. AT and normal cells were irradiated in order to provide further insight into the characteristics of these long-lived DSBs. Pulsed field gel electrophoresis results confirmed that AT cells, in contrast to normal ones, do not reach complete repair even after long post-irradiation times. A highly significant fraction of unrejoined chromosome breaks was confirmed in AT cells by using telomeric and mFISH probes, and sister chromatid fusion was ruled out as a cryptic mechanism that could be sealing these broken chromosomes. The γ H2AX and Mre11-labelling status of broken ends was analysed in metaphase spreads to check whether these DSBs were accurately detected in AT cells. One fourth of the scored breaks were devoid of γ H2AX and Mre11 foci at the broken end in AT cells, and this fraction was significantly higher than in normal cells. Thus, while chromosome breaks that are properly signalled will eventually be repaired, lesions devoid of γ H2AX and Mre11 labelling are not detected as breaks by the repair machinery. We propose that AT cells accumulate *invisible* DSBs, which may be rendered unrepaired due to deficient detection by the repair machinery.

INTRODUCTION

Failure to repair double strand breaks (DSBs) leads to genomic instability due to the loss of genetic material and the generation of deleterious mutations that contribute to oncogenesis. One of the main players involved in the cellular responses to DNA-damage (DDR) is the Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) protein, which belongs to the highly conserved PI3K-like protein kinase family (PIKKs). ATM plays an important role as a transducer and amplifier of the damage signal (Abraham & Tibbetts, 2005; Kurz & Lees-Miller, 2004; Shiloh, 2006), and phosphorylates many proteins involved in DNA-repair and cell cycle-checkpoint activation, thus providing the initiating steps of the DDR machinery.

One of the earliest responses to DNA damage is the phosphorylation of a highly conserved histone variant, H2AX, yielding a modified form called γ H2AX (Fernandez-Capetillo et al., 2004; Rogakou et al., 1998), which spreads over at least 2 Mb from the DSB site (Rogakou et al., 1999). γ H2AX is reported to recruit numerous DSB-repair proteins and DNA damage-sensors involved in DNA repair, as well as chromatin remodelling factors and cohesins (Celeste et al., 2003; Paull et al., 2000; Ward et al., 2003). After the exposure of cells to IR, histone H2AX phosphorylation occurs rapidly, and reaches a maximum 30-60 minutes later (MacPhail et al., 2003; Rogakou et al., 1999). It is generally believed that the number of γ H2AX foci reflects the number of DSBs generated in the genome (Rogakou et al., 1999; Rothkamm & Lobrich, 2003; Sedelnikova et al., 2002). Although most of these DSBs are repaired within minutes a few can remain unrepaired for longer periods, even weeks (Kühne et al., 2004). It is believed that these persistent γ H2AX foci represent unrejoined DSBs (Ichijima et al., 2005), which makes γ H2AX a useful marker for residual DSBs in irradiated cells.

Various protein kinases of the PIKK family such as ATM, ATM and Rad3-related (ATR) and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) are thought to be responsible for H2AX phosphorylation following different DNA insults. ATM and DNA-PKcs contribute to H2AX phosphorylation at DSBs generated by exposure to IR or radiomimetic drugs, while ATR seems to phosphorylate H2AX in response to UV-damage or after treatments causing a stalling of replication forks (Burma et al., 2001; Stiff et al., 2004). Even though ATM is one of the main kinases involved in H2AX phosphorylation after exposure to IR, γ H2AX foci are actually formed in AT cells, as they are also formed in DNA-PKcs defective cells (Ichijima et al., 2005; Kato et al., 2006; McManus & Hendzel, 2005; Rogakou et al., 1999). This suggests that H2AX phosphorylation is a highly significant and evolutionarily conserved cellular response to DSBs, and that the lack of one of the kinases involved in its phosphorylation is compensated by the activity of the remaining kinases.

Defects in ATM underlie the autosomal recessive disorder ataxia-telangiectasia (AT). Cells from affected individuals are highly sensitive to IR and radiomimetic drugs. Historically, an increased frequency of both chromosome and chromatid aberrations has been described in irradiated AT cells at the first mitosis. In 1985, Cornforth and Bedford (Cornforth & Bedford, 1985) reported a five to six times greater fraction of residual chromosome breaks in irradiated AT as compared to normal cells, after analysis in G1 using premature chromosome condensation (PCC). Subsequent work analysing chromosome aberration spectra in irradiated AT cells yielded variable results. Thus, while some studies point to an increased frequency of unrejoined chromosome breaks as the main contributor to AT radiosensitivity (Kawata et al., 2003; Martín et al., 2003), other studies suggest that increased radiosensitivity is mediated by an approximately equal increase in the frequency of both unrejoined breaks and exchanges (Loucas & Cornforth, 2004). One year later, Kühne *et al* (Kühne et al., 2004) re-examined the idea that the impairment of repair leading to unrejoined DSBs is an important hallmark of the AT phenotype. In this work the authors analysed DSB repair in AT cells using either pulsed field gel electrophoresis (PFGE) or γ H2AX foci scoring as end points. The results suggested that failure to repair a small subset of radiation-induced DSBs was the main cause of the increased radiosensitivity observed in AT cells. As a result of the partly conflicting above observations it remains uncertain whether misrepair in the form of chromosome exchanges, or a lack of repair, as manifested in a higher number of unrejoined DNA and chromosome breaks, is the dominant cause of AT radiosensitivity.

In the present work we investigate the induction and rejoining of DNA DSBs and analyze the properties of apparently terminal deletions in consecutive cell divisions in irradiated AT and normal lymphoblastoid cells using a combination of mFISH together with telomeric and centromeric probes. In an attempt to further explore the nature of DDR defect in AT cells, we cytologically identify visible DNA ends, and investigate whether they are labelled with γ H2AX. A combination of γ H2AX immunofluorescence and telomeric-FISH enables us to establish a direct link between a chromosome break and a γ H2AX focus. The results thus obtained show that AT cells present broken, unrejoined chromosome ends at a higher frequency than control cells at the first, second and third division after irradiation suggesting that the persistence of unrejoined chromosome breaks is a hallmark of AT cells. Remarkably, a significant fraction of chromosome breaks in AT cells lack γ H2AX. While γ H2AX foci at the breakpoints clearly co-localize with Mre11 foci, breaks devoid of γ H2AX signal also lack the Mre11 foci, suggesting that γ H2AX-labelling reflects correct sensing of DNA breaks and subsequent recruitment of DNA repair proteins. We propose that chromosome breaks lacking γ H2AX-labelling are inefficiently detected by the DDR machinery. As a consequence, these unlabelled breaks devoid of repair accumulate through subsequent cell divisions in AT cells.

RESULTS

1. An excess of broken, unrejoined chromosomes is a hallmark of irradiated AT lymphoblasts several divisions after irradiation

Our previous work has shown that at first division after exposure to 1 Gy γ -rays, a similar frequency of exchange aberrations is found in AT and normal cells. In contrast, irradiated AT cells showed a markedly higher frequency of broken and unrejoined chromosomes than normal cells (Martín et al., 2003). The first aim of the present study was to examine whether the accumulation of chromosome breaks in AT cells is still significant after the first division post-irradiation. Metaphase spreads from AT and normal cells were therefore analyzed at 71h p.i., a time corresponding to the second and third division. Telomeric and centromeric FISH was applied for this purpose followed by mFISH. The results obtained indicate that even after two or three cell divisions, the frequency of aberrant metaphases is higher in AT (65.0%) than in normal cells (46.7%) (Table 1). The percentage of complex aberrations is similar in both cell types, i.e. 14.8% in normal cells *versus* 13.5% in AT cells, as is also the mean number of breaks per complex aberration, i.e. 4.1 and 4.0 breaks/complex aberration in normal and AT cells, respectively. Because complex aberrations do not make a significant contribution to either cell type, we reduced complex aberrations to simple ones (see the Material and Methods section). After this transformation, the calculated frequency of total chromosome aberrations per cell is 0.84 aberrations in normal cells and 1.83 aberrations in AT cells, yielding a statistically significant difference between the two cell types of approximately a factor of two (χ^2 test, $p < 0.001$) (Table 1).

To evaluate possible differences between the rejoining capacities of the two cell types, chromosome aberrations were divided into two groups, i.e. exchange-type aberrations (including translocations, dicentrics and rejoined interstitial deletions), and non-exchange-type aberrations (including unrejoined chromosome breaks as well as terminal and unrejoined interstitial deletions) (Figure 1A). At second and third division p.i., exchange-type aberrations are the most frequent class of chromosome aberrations observed, both in AT as well as in normal cells. At this point, the frequency of exchange aberrations is 0.850 translocations/cell in AT *versus* 0.411 in normal cells, and 0.383 dicentrics/cell scored in AT *versus* 0.264 in normal cells. In addition, there are 0.066 rejoined interstitial deletions/cell in AT *versus* 0.035 in normal cells (Table 1). Despite these differences, neither individual nor grouped analysis of the exchange-type aberrations yielded a statistically significant difference between normal and AT cells.

As a next step we scored broken ends remaining unrepaired in AT and normal cells. Approximately one out of every three aberrations scored in AT cells are of the non-exchange type, whereas this fraction is only 16% in normal cells (statistically significant difference; χ^2 test, $p < 0.05$) (Figure 1B and Table 1). Notably, at the second and third division after

irradiation, the frequency of chromosome breaks and terminal deletions was 7 times higher in irradiated AT than in normal cells (0.47 vs 0.07 respectively; χ^2 test, $p < 0.01$). The frequency of all other types of aberrations was never more than 2 fold higher between AT and normal cells (Figure 1C and Table 1). Since each unrejoined break generates two ends, we sought to determine the total number of broken ends that remained open at this point in time (Table 2). For this calculation we only took into consideration chromosome breaks and terminal deletions. This is because unrejoined interstitial deletions make only a marginal contribution to the total amount of aberrations, and also because the rejoining status of interstitial fragments is often uncertain. Irradiated AT cells presented 0.983 open ends/cell, a more than 6 times higher frequency than normal cells, where 0.152 open ends/cell were scored (χ^2 test, $p < 0.0001$).

2. Sister Chromatid Fusion does not seal broken chromosomes in AT cells.

If AT cells reach the first and subsequent post-irradiation mitoses with a high number of unrejoined chromosomes, it is important to ascertain that these broken ends remain truly open. When performing the cytogenetic analysis described above we observed that, occasionally, chromosomes in irradiated AT cells presented with apparently rounded and continuous ends. If the sister chromatids of a broken chromosome fuse to form a loop, many of the chromosome ends without telomeric signal that were scored as breaks will actually reflect repair events. This scenario may even be sustained in AT cells by the associated cell-cycle checkpoint defect, which will allow cells to progress to the S phase with unrepaired chromosomes. In the S phase, the broken chromatid duplicates and it is theoretically possible that AT cells could find in the fusion of sister chromatids (SCF) a mechanism to seal a fraction of the unrepaired ends. To test this possibility, metaphases corresponding to first division p.i. were analysed on coded slides in order to search for chromosomes presenting with rounded ends. After this scoring, a telomeric probe was applied and an SCF event was scored when the previously detected rounded ends were devoid of telomeric signal. The results (Figure 2A) suggest that, for the cell types used here, this analysis is not specific enough to identify such events (as afterwards confirmed by the telomeric FISH), since an important number of false positives is detected (Figure 2A). Given the low specificity of the analysis, we are reluctant to use it as the only parameter to conclude that SCF is a mechanism for joining (and thus for stabilizing) the chromatids of broken chromosomes in AT cells. To conclusively clarify this issue, we looked for the expected cytogenetic outcomes of SCF events, i.e. isodicentric or isoacentric chromosomes showing the typical mirror-banding pattern. These rearrangements are the direct result of an SCF event which has evolved and persisted through at least two cell divisions (Figure 2B). Analysis of metaphases corresponding to second, third and further divisions p.i. (48, 71 and 141 h p.i) using mFISH reveals only a few iso-aberrations (Figure 2C) in either cell type. This result leads us to conclude that SCF does not play a role in repairing broken ends in irradiated AT cells. Therefore, most of the unrejoined, broken,

chromosomes scored in the previous cytogenetic analysis should be considered as uncapped broken ends that remain open.

3. Repair of DSBs is similar in AT and normal cells, but more DSBs may remain unrejoined in AT cells

Possible explanations for the higher yields of chromosome breaks in AT cells are a higher induction or a diminished repair of IR induced DSBs. We therefore tested induction and rejoining of DSBs in irradiated normal and AT lymphoblasts by Asymmetric Field Inversion Gel Electrophoresis (AFIGE). To our knowledge, information regarding induction and rejoining kinetics of DSBs in AT cells is only available for fibroblasts (Foray et al., 1997; Kühne et al., 2004; Löbrich et al., 2000), and it is in principle possible that lymphoblasts show a different response. The results in Figure 3 indicate that DSB induction is similar in AT and normal cells. Also, the kinetics of DSB rejoining is similar between AT and normal cells over a period of 8 hours after 30 Gy of radiation. At longer times post-irradiation AT cells appear to have a larger fraction of unrejoined DSBs. Although the difference does not reach statistical significance in our experiments (Figure 3B), numerous studies on DSB repair in AT fibroblasts confirm this observation (Blöcher et al., 1991; Foray et al., 1997; Kühne et al., 2004). In conclusion, our results rule out increased induction or delayed rejoining of DSBs as a cause for the accumulation of chromosome breaks and, instead, point to a failure to rejoin a fraction of the generated DSBs as the cause of radiosensitivity in AT cells.

4. AT cells show defects in H2AX phosphorylation in a fraction of chromosome breaks

The high number of unrejoined chromosomes observed in AT cells at different cell divisions after irradiation raises the question of whether these breaks are correctly sensed in AT cells. A physiologically important downstream target of ATM is H2AX, which is rapidly phosphorylated to concentrate repair proteins in the vicinity of DSBs. We decided to examine whether the absence of functional ATM leads to defective signalling of DSBs by H2AX, which might in turn cause defects in DNA ends modification, compromising repair. To ascertain whether γ H2AX formation occurs in AT cells with the same efficiency as in normal cells, we used telomeric-FISH to identify breaks in metaphase chromosomes and tested them for γ H2AX signal. Chromosome breaks were identified as broken centric or acentric fragments that had telomeric signal only on one end. In agreement with the above cytogenetic analysis and with AFIGE results, a higher frequency of breaks is scored in irradiated AT than in normal cells (0.85 vs 0.39 breaks/cell, respectively). Of these chromosome breaks the vast majority (0.330 out of 0.395 breaks/cell) displayed γ H2AX signal in normal cells, and a significant fraction (0.622 out of 0.846 breaks/cell) in AT cells (Figure 4A). Thus, γ H2AX is detectable on chromosome ends lacking a telomeric signal in AT as well as in normal cells, indicating that they reflect ends of chromosome breaks which are still open. As the AFIGE shows that the induction of DSBs is the same for normal and AT cells the results suggest that, although

correctly labelled, an important fraction of breaks accumulate in AT cells awaiting efficient repair.

As inferred from the results described above, breaks devoid of γ H2AX signal are also found, and they are more frequently observed in AT than in normal cells (Table 3 and Figure 4A). Also, the fraction of chromosome breaks without γ H2AX signal is similar before and after irradiation in both types of cells, suggesting that break-labelling is independent of radiation exposure. Therefore, we added the breaks scored before and after irradiation together and classified them on the basis of their γ H2AX labelling status. The results show that 26.4% of chromosome breaks are devoid of γ H2AX in AT cells, while only 16.5% of the breaks lacked γ H2AX in normal cells (χ^2 , $p < 0,05$) (Figure 4B). Thus, AT cells display a higher fraction of γ H2AX-unlabelled chromosome breaks. Following the γ H2AX scoring, mFISH was applied to the same slides. Most of the γ H2AX-labelled breaks (61%) correspond to chromatid or chromosome breaks in which both ends of the broken chromosomes (same colour fragments) are present in the cell (Figure 4C). With regard to γ H2AX-unlabelled breaks, mFISH analysis indicates that these scored centric or acentric fragments frequently lose the complementary fragment of the chromosome (Figure 4C), suggesting that cells carrying γ H2AX-unlabelled breaks are past the first division after irradiation.

5. DSBs without γ H2AX remain invisible to the DDR machinery

The above observations suggest that DSBs without γ H2AX signal fail to activate the DDR machinery and thus fail to prevent mitosis in the presence of DNA damage. This effect is greater in AT cells, in line with the checkpoint defect of these cells. To clarify definitively whether an absence of γ H2AX foci actually reflects a defect in the recruitment of repair factors to breakpoints, immunofluorescence detection of γ H2AX together with Mre11 was applied on metaphase chromosome preparations. Mre11 belongs to the MRN complex together with Nbs1 and Rad-50, and it is known to be recruited to the DSBs very soon after damage is inflicted, where it actively participates in DNA DSBs recognition and repair (Lavin, 2007; Lee & Paull, 2007; Williams et al., 2007). The results show that γ H2AX foci in breakpoints clearly co-localize with Mre11 foci, indicating that the break has been detected and that repair is taking place at the DSB (Figure 5). However, breaks devoid of γ H2AX-label also lack the Mre11 foci (Figure 5), indicating a lack of recruitment of DSB repair proteins to γ H2AX-unlabelled breaks. In this analysis, AT cells display a higher fraction of γ H2AX- and Mre11-unlabelled breaks than normal cells (Table 4). All together the present results suggest that an important hallmark of AT cells is the accumulation of an important fraction of breaks that lack both γ H2AX- and Mre11-labelling. Absence of recruitment of repair factors to these breaks renders them invisible to the cell repair machinery. If not efficiently sensed, these breaks can accumulate in an unrepaired state through subsequent cell divisions.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1

A. Exchange type vs non-exchange type aberrations. I, II and III: Fragments of metaphases carrying exchange type aberrations obtained from normal cells at 71 hours after irradiation. On the mFISH images (left) arrowheads signal reciprocal translocations (t). The capping status of these translocations is shown in the telomeric & centromeric image (right). All translocations shown are correctly capped and possess four telomeric signals. **I:** t(6;8) involving chromosomes 6 (green) and 8 (red). **II:** t(2;4) involving chromosomes 2 (red) and 4 (brown-green). **III:** t(6;11) involving chromosomes 6 (green) and 11 (light blue). **IV, V and VI:** Fragments of metaphases carrying open, non-exchange type aberrations obtained from AT cells at 71 hours after irradiation. **IV:** Arrowheads on the mFISH image (left) show two fragments of chromosome 6 (green). Arrowheads on the telomeric & centromeric image mark the broken centromeric fragment of chromosome 6 (bottom left) that lacks two telomeric signals. The corresponding acentric fragment of chromosome 6 with a single pair of telomeric signals is found in the same image (top right). **V:** Arrowheads in the mFISH image show two fragments corresponding to chromosome 4 (brown-green). Arrowheads in the telomeric & centromeric image show the broken centromeric fragment of chromosome 4 (top left) and the corresponding acentric fragment (top right), both of them with a single pair of telomeres. **VI:** Arrowheads in the mFISH image show a compound fragment of chromosomes 7 (violet) and 11 (bottom left) and a fragment of chromosome 11 (top left). Arrowheads in the telomeric & centromeric image show a broken dicentric (7;11) that lacks two telomeric signals on the end corresponding to chromosome 11 (bottom left) and an acentric fragment (top left) corresponding to chromosome 11. **B. Frequency of Exchange type aberrations (Ex Ab) vs Non-exchange type aberrations (Non-Ex Ab).** At 71 hours after irradiation, extreme radiosensitive AT cells present almost double frequency of aberrations per cell than irradiated normal cells (**). Most aberrations scored in both cell types are of the exchange-type, but AT cells present with 4 times more aberrations belonging to the non-exchange type group than normal cells (*). **C: Detailed frequency of all types of aberrations in normal and AT cells at 71h p.i.** t: translocations; dic: dicentrics; R-id: rejoined interstitial deletions; UR-id: unrejoined interstitial deletions; csb-del: chromosome breaks and terminal deletions. An in detail observation of the different aberrations types reveals that, while almost all aberrations are 1.5 to 2 times more frequently found in irradiated AT cells, chromosome breaks and terminal deletions present with an outstanding difference, being 7 times more frequent in irradiated AT cells than in irradiated normal cells (*).

Figure 1

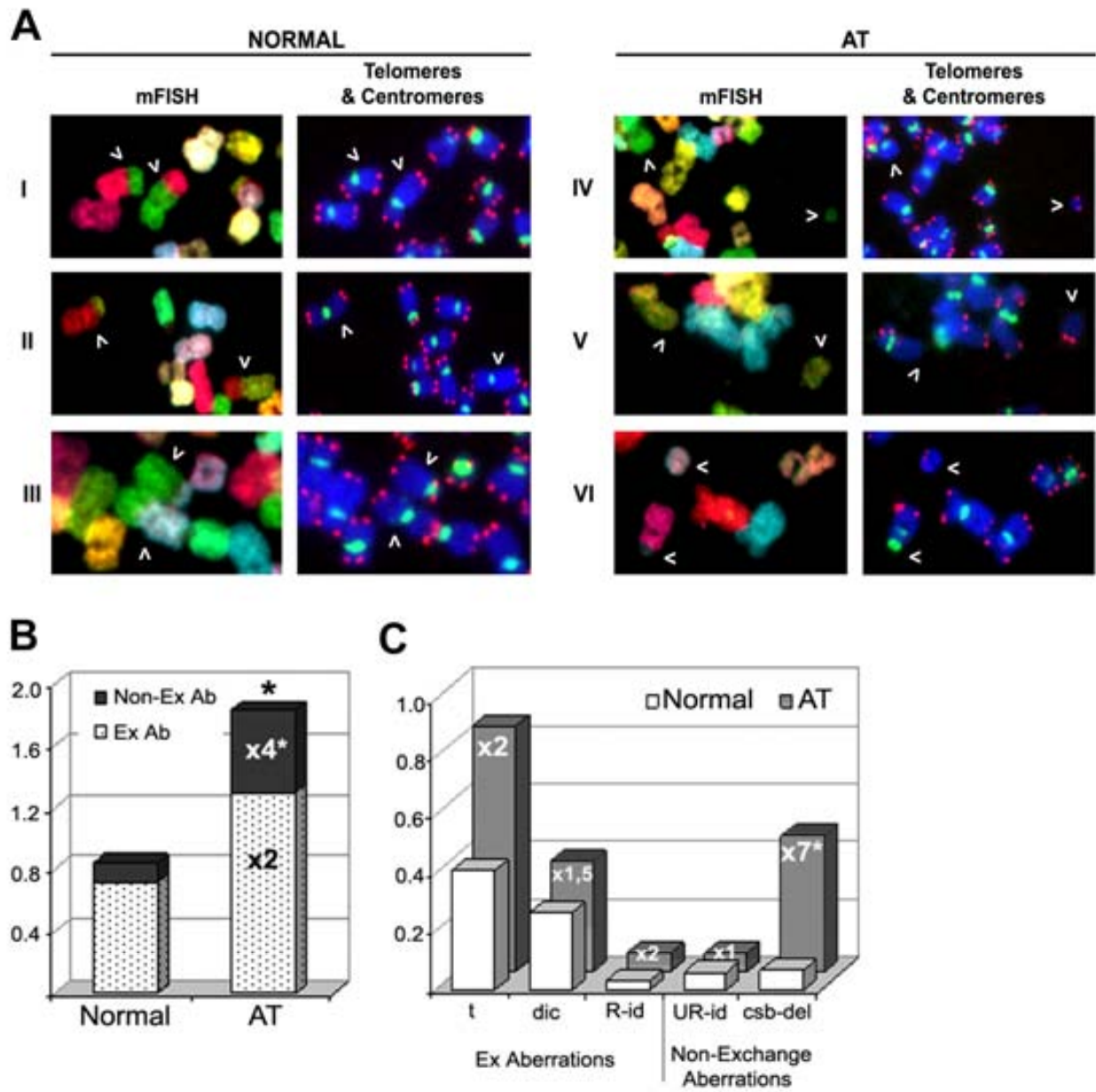


Figure 2

A. SCF events detection. True SCF events: Possible SCF events were detected using coded slides from normal and AT cells at first division after irradiation. Slides were Leishman stained and chromosomes presenting rounded, presumably sealed extremes (arrowheads) were annotated. After telomeric & centromeric FISH, the SCF events were confirmed if the previously scored rounded ends were devoid of a telomeric pair. **False SCF events:** A fraction of the possible SCF events scored during Leishman staining analysis (arrowheads) were discarded after the telomeric & centromeric FISH because of the presence of telomeres at the rounded end.

B. Formation of isodicentric and isoacentric figures after SCF: A chromosome is broken during **G1** and reaches the **S/G2** phase without being repaired. During S phase, the broken chromatid replicates and the broken sister chromatids can fuse (**SCF**). When this figure reaches **mitosis (M)** and begins anaphase, cohesins along the chromosomes arms will be destroyed and the two centromeres will be pulled to opposite poles (a). Thus, segregation of the broken centromeric fragment to the next division can take place with or without breakage. If the centromeres pulling results in breakage, a one-chromatid broken chromosome will be found in the G1 phase of the next division (b). If segregation resolves without breakage, a one-chromatid isodicentric will be found in the **G1** phase of the **next division** (c). The acentric fragment is not pulled to opposite poles during mitosis, so –if segregated– an intact one-chromatid acentric fragment will be found at G1 in one of the daughter cells (d). The banding pattern of the iso-figures will be a mirror image converging in the chromatid-fusion point. After entering S phase, chromatids will replicate again. Therefore, when the cell reaches the second mitosis after irradiation, inverted duplications, deletions, isodicentric chromosomes and isoacentric fragments can all be found in the metaphase spreads.

C: Iso-figure in irradiated AT cells. From left to right: *Inverted DAPI image:* 3 chromosomes can be seen in this image; a normal chromosome 6 (left), a deleted centric fragment of chromosome 6q (middle), and a duplication of the 6p acentric fragment (right). The mirror-banding pattern is evident in this 6p duplicated fragment (arrowhead). *Centromeric and telomeric hybridization image:* The 6p iso-fragment (right) is perfectly capped and four telomeres are scored. Finally, the *mFISH image* allows us to conclude that all figures implicated correspond to chromosome 6, thus discarding small translocations or other exchange type events.

Figure 2

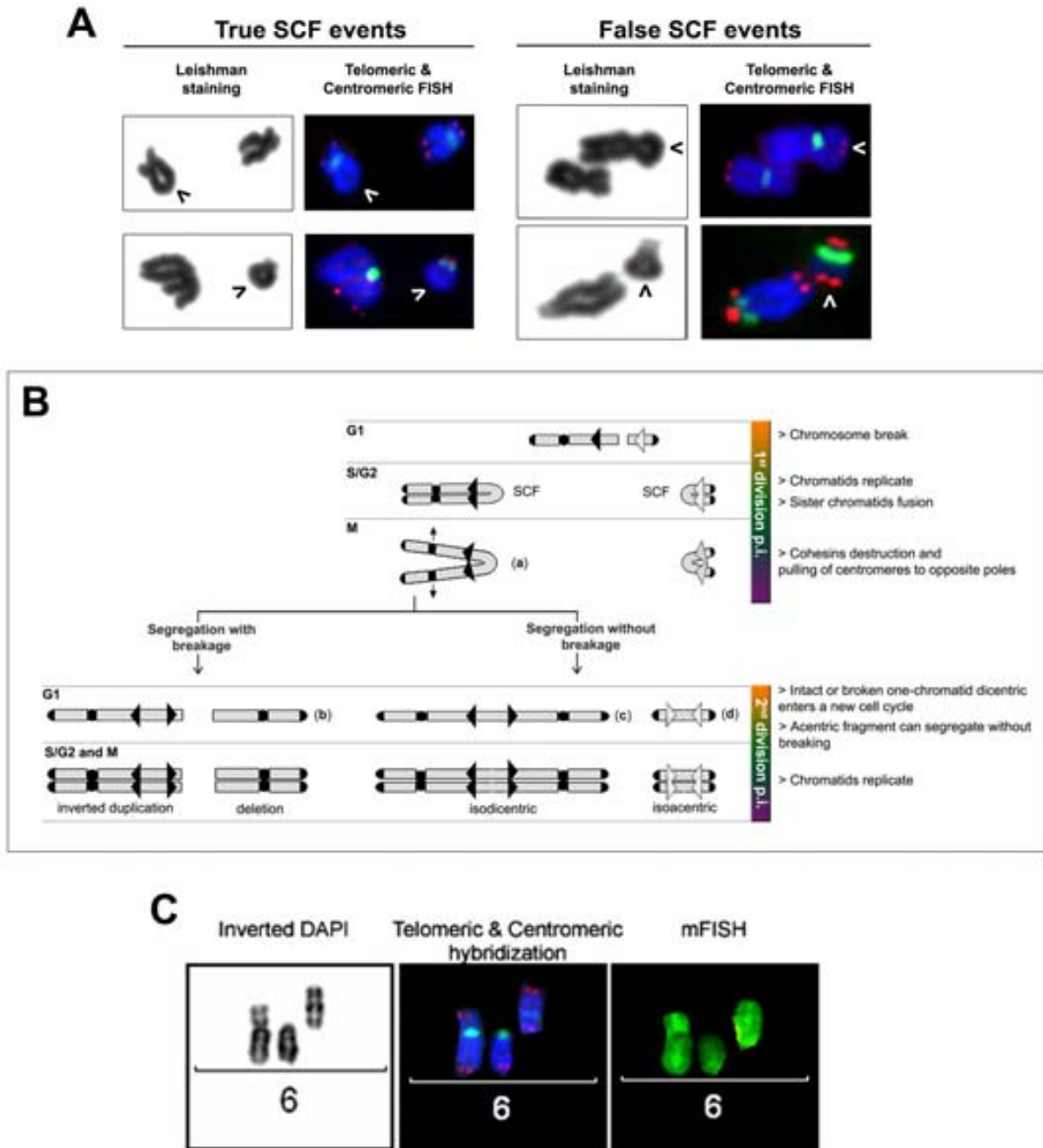


Figure 3

DSB repair kinetics for irradiated AT and normal cells. **A:** Typical asymmetrical FIGE gels corresponding to the DSB rejoining kinetics from normal and AT cells. Both cell types were irradiated at 30Gy and the repair rate was measured at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hours after irradiation. The repair rate for each time analysed was measured using the FAR (Fraction of Activity Released) value: fraction of DNA released to the gel lane compared to the total DNA (well + lane). **B:** The values for the time 0 after irradiation (arrowhead) are very similar for normal and AT cells, demonstrating that the initial radio-inflicted damage is almost the same for both cell lines. Overall, the repair rate in the first 8 hours is very similar for both cell lines. Twenty-four hours after irradiation AT cells have not reached complete repair, and the FAR value remains the same that at previous time points. Circles: mean of two determinations from three independent experiments; bars: SD.

Figure 3

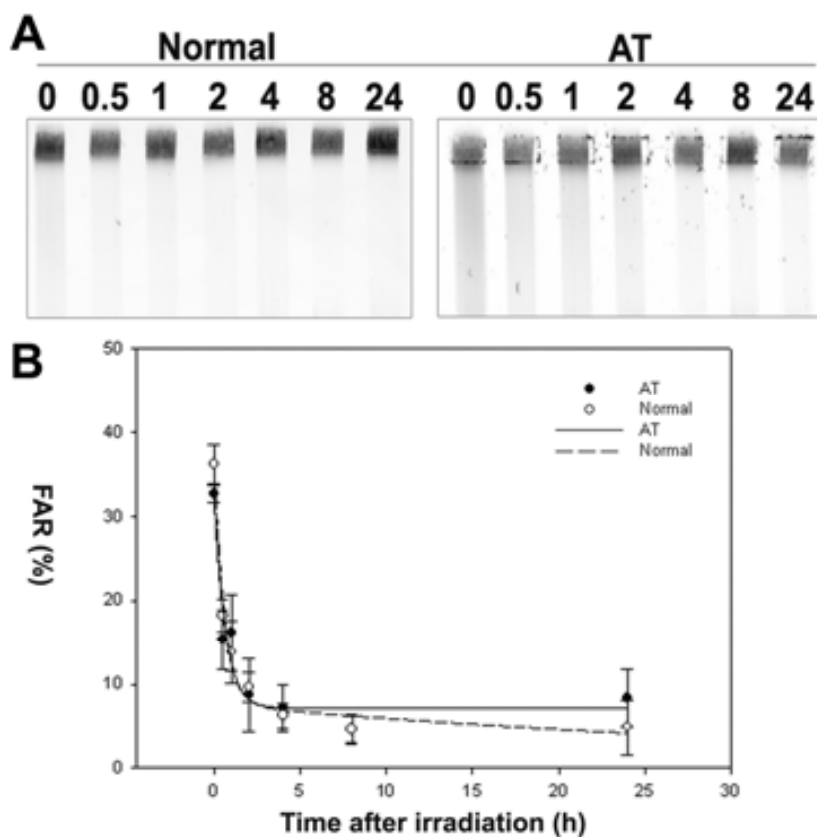


Figure 4

A. Breaks with and without histone labelling. (From top to bottom) **Break detection:** Chromosome breaks are detected after applying the telomeric probe on the slides, when chromosome ends devoid of telomeric signal are found. The square insets in the telomeric probe image highlight the detected breaks. A schematic representation of the affected broken chromosomes inside the square inset is found on the right of every photograph. **γ H2AX detection:** After detecting the break, γ H2AX-immunostaining is performed on the same slides. Both γ H2AX-labelled and unlabelled breaks were scored. **Merged:** merged image where telomeres and γ H2AX labelling at the breakpoint (if present) can be seen. **B. Diagram** showing the outcomes obtained from irradiated and non-irradiated cells computed together. As expected, frequency of total breaks is more than double in AT than in normal cells. While breaks signalled with histone (green) are the most frequent breaks in both cell lines, breaks devoid of histone signal (red) are strikingly more frequent in AT cells, being this difference statistically significant (*). **C. γ H2AX detection and mFISH hybridization. γ H2AX-labelled break. Break detection:** metaphase extension where two broken chromosome fragments are detected (arrowheads) after applying telomeric FISH. One of the chromosome breaks (bottom left) is a large chromosome fragment while the other (up right) is a very small chromosome fragment. Both fragments present 2 telomeric signals. **γ H2AX detection:** After immunostaining, both chromosome fragments present γ H2AX labelling (green) at the break point (arrowheads). **Identification of chromosomes:** After mFISH hybridization, the metaphase is karyotyped. The large chromosome fragment corresponds to a broken chromosome 8, which misses a small portion of the chromosome. The small acentric fragment corresponds to the missing piece of chromosome 8. The intact homologue chromosome 8 was also found on the metaphase. **γ H2AX-unlabelled break. Break detection:** metaphase extension where a chromosome break with only two telomeres is detected (arrowhead). **γ H2AX detection:** After immunostaining, the small chromosome fragment does not present γ H2AX labelling (green) at the breakpoint (arrowheads). **Identification of chromosomes:** After mFISH hybridization, the chromosomes involved in the aberration are identified. The acentric chromosome fragment corresponds to a piece of chromosome 4. Two intact chromosomes 4 were also found in the metaphase and are shown in the image. These intact chromosomes do possess four telomeres each and do not present any visible chromatid break, indicating that this acentric fragment most probably originated in the previous cell division, and has been segregated in an unrepaired status.

Figure 4

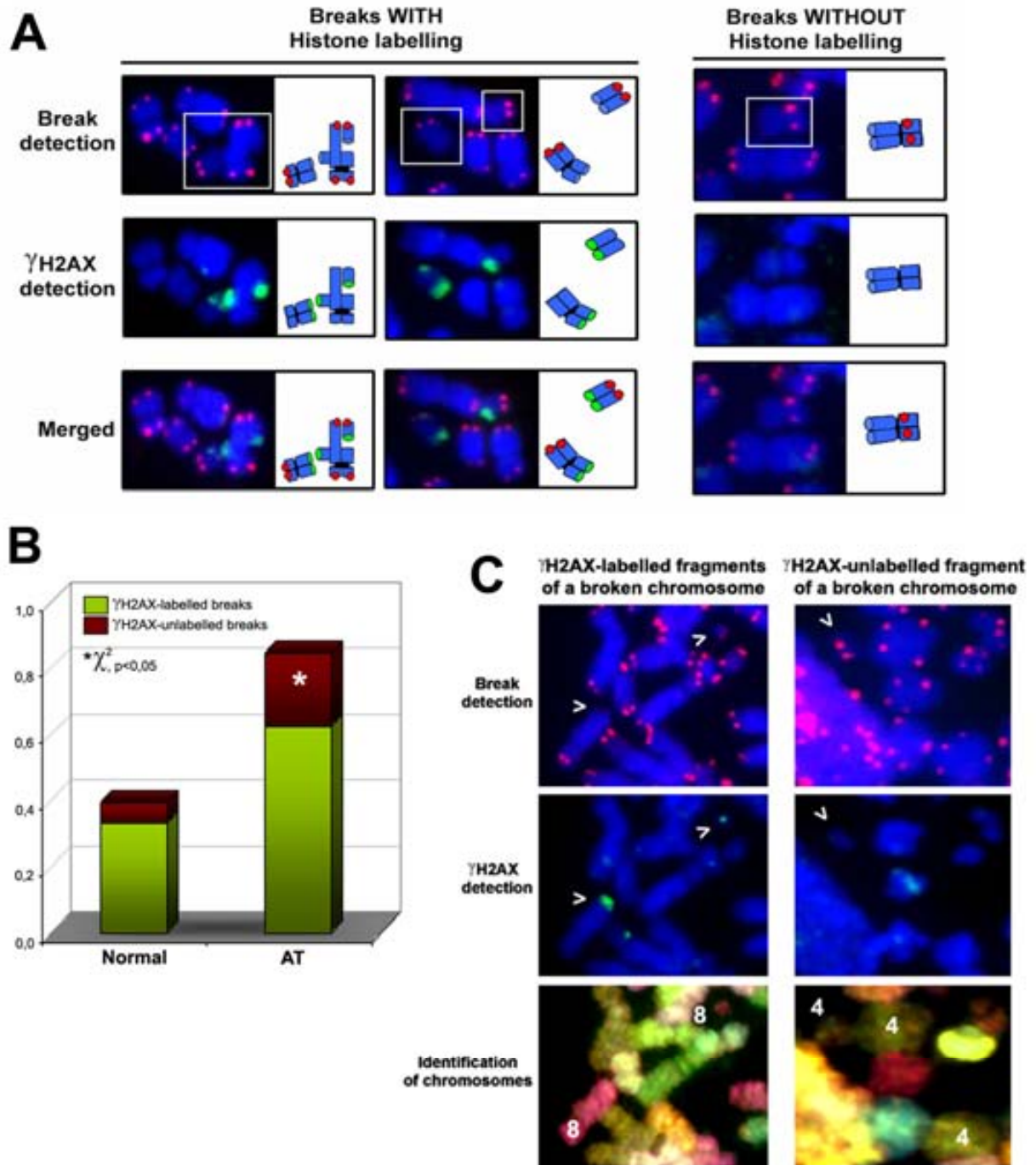
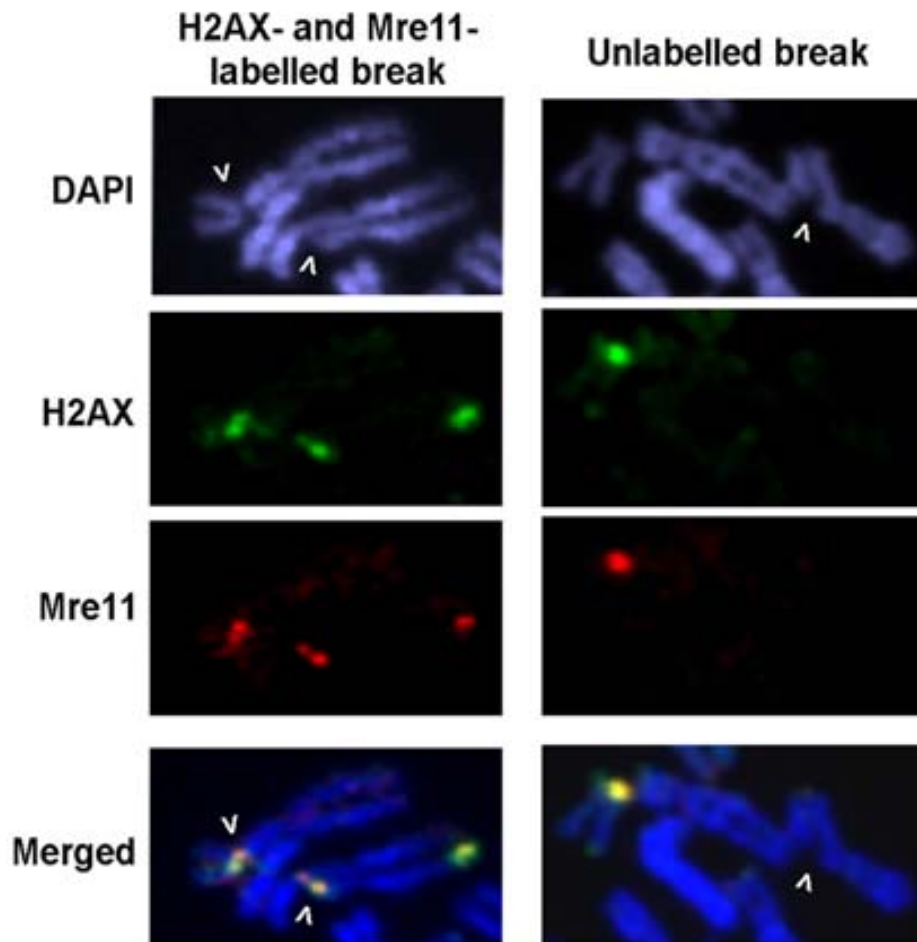


Figure 5.

γ H2AX- and Mre11-labelled break: Chromatid breaks were clearly identified after DAPI staining of metaphase spreads from irradiated AT and normal cells. Most of the scored breaks in both cell types presented a γ H2AX (green) focus at the breakpoint. The γ H2AX focus at the breakpoint always co-localized with an Mre11 (red) focus, which are seen as yellow foci in the merged image. **γ H2AX- and Mre11-unlabelled break:** All breaks scored devoid of γ H2AX focus also lacked an Mre11 labelling, suggesting that repair proteins are not present at γ H2AX-unlabelled breaks.

Figure 5

TABLES

Table 1. Number, frequency and types of aberrations in normal and AT cells at 71h p.i.

	Normal (freq/cell)		AT (freq/cell)		χ^2
Cells analysed	197		60		
Normal cells	105	(0.533)	21	(0.350)	
Abnormal cells	92	(0.467)	39	(0.650)	$p < 0,02$
Chromosome Aberrations	166	(0.843)	110	(1.833)	$p < 0,001$
Exchange type aberrations	140	(0.710)	78	(1.300)	
t	81	(0.411)	51	(0.850)	<i>n.s.</i>
dic	52	(0.264)	23	(0.383)	<i>n.s.</i>
R-id	7	(0.035)	4	(0.066)	<i>n.s.</i>
Non-Exchange type aberrations	26	(0.132)	32	(0.534)	$p < 0,05$
csb - del	14	(0.071)	28	(0.467)	$p < 0,01$
UR-id	12	(0.061)	4	(0.066)	<i>n.s.</i>

Chromosome aberrations: number of chromosome aberrations after reducing complex aberrations to simple aberrations (see material&methods); **Exchange type aberrations:** **t:** translocations; **dic:** dicentric; **R-id:** rejoined interstitial deletions; **Non-exchange type aberrations:** **csb-del:** chromosome breaks and terminally deleted chromosomes; **UR-id:** unrejoined interstitial deletions. ***n.s.:*** non-significant

Table 2. Breaks and chromosome open ends observed in normal and AT cells at 71h p.i.

	Normal			AT				
	MNB (freq/cell)	OEG (freq/cell)	REO (freq/cell)	MNB (freq/cell)	OEG (freq/cell)	ROE (freq/cell)		
Cells analysed	197			60				
Chromosome aberrations	166			110				
t	81	162	324	2	51	102	204	2
dic	52	104	208	-	23	46	92	1
R-id	7	14	28	-	4	8	16	-
csb - del	14	14	28	28	28	28	56	56
TOTAL	294 (1.492)	586 (2.985)	30* (0.152)^a	184 (3.066)	368 (6.133)	59* (0.983)^a		

* χ^2 , $p < 0.0001$; ^a6.5x difference

MNB: Minimal Number of Breaks required to obtain the observed number of chromosome aberrations. *I. ex:* to generate a translocation or a dicentric, two breaks are needed; each on a different chromosome. These 2 breaks (MNB) will generate 4 open ends (OEG); **OEG:** Open Ends Generated by these MNB; **ROE:** Remaining Open Ends at a specific time point. True ROE are detected and counted after applying the telomeric probe to the slides.

Table 3. Frequency of breaks with and without γ H2AX signal

Frequency of Breaks with and without γ H2AX signal

	Cells	Total Breaks (freq/cell)	Breaks with histone signal (freq/cell)	Breaks without histone signal (freq/cell)
Normal	276	109 (0.395)	91 (0.330)	18 (0.065) ^a
AT	233	197 (0.846)	145 (0.622)	52 (0.223) ^a

^a χ^2 test: $p < 0.05$

Table 4. γ H2AX and Mre11 labelling of radio-induced breaks in normal and AT cells.

	Total breaks analysed	HMB	HB	MB	Unlabelled breaks
Normal	42	38 (90.48%)	-	-	4 (9.52%)
AT	57	47 (82.46%)	-	-	10 (17.54%)

HMB: γ H2AX- and Mre11-labelled breaks. **HB:** γ H2AX- labelled breaks. **MB:** Mre11-labelled breaks. **Unlabelled breaks** showing neither γ H2AX- nor Mre11-labelling.

DISCUSSION

The work presented here demonstrates that unrejoined chromosome breaks are a hallmark of irradiated lymphoblastoid AT cells that may contribute to their exacerbated radiosensitivity. An excess in unrepaired chromosome breaks is observed in AT cells in the first, second and third divisions after irradiation, while the frequency of exchange aberrations is not statistically different between AT and normal cells. These results are reminiscent of those published by other authors (Cornforth & Bedford, 1985; Taylor, 1978), which showed an excess of chromosome fragments in irradiated AT cells compared to normal cells. Our cytogenetic results are in close accordance with the DNA DSB rejoining kinetics analysis, which demonstrates that although AT lymphoblasts display a significant DSB repair capacity, they are unable to repair a fraction of the induced DSBs that persist through subsequent cell divisions. Very similar rejoining kinetics results have been described before in AT fibroblasts (Foray et al., 1997; Kühne et al., 2004; Löbrich et al., 2000), and it has been reported that a fraction of the IR-induced breaks are refractory to efficient repair in AT cells.

As increased DSB induction and slower DSB rejoining kinetics were ruled out as causes of the accumulation of unrepaired chromosome breaks in AT cells, we inquired whether defects in sensing chromosome breaks underlie this effect. Considering that ATM is one of the main kinases involved in H2AX phosphorylation, checking the broken chromosome ends for γ H2AX labelling appeared to be an appropriate first step. It has been described that γ H2AX foci formation is not impaired in AT cells, as ATM and DNA-PKcs may function redundantly to phosphorylate H2AX after IR (Stiff et al., 2004). However, many studies that analyse γ H2AX foci induction after IR have been performed on interphase nuclei, which make it impossible to distinguish γ H2AX foci that signal DSBs from γ H2AX foci that form as a consequence of other processes such as cell cycle-dependent telomere uncapping, telomere dysfunction or replication stress. To avoid misinterpretations we developed a technique that allows γ H2AX foci specifically associated with previously scored broken chromosome ends to be identified. AT cells had more unrejoined ends than normal cells at all the times they were analysed, and many of these unrejoined breaks showed a robust γ H2AX focus at their end. This result is in line with studies that report a slower disappearance over time of γ H2AX foci in irradiated AT cells (Karlsson & Stenerlöw, 2004; Kato et al., 2006; Kühne et al., 2004; Rogakou et al., 1999). This slower disappearance suggests that the absence of ATM favours the persistence of γ H2AX-labelled broken chromosomes awaiting efficient repair. Our results are also consistent with recent studies on mouse peripheral blood lymphocytes, which report that most aberrations displayed by *Atm*^{-/-} B cells are chromosome breaks (Franco et al., 2006) that persist for several days (Callen et al., 2007).

Surprisingly, a fraction of the chromosome breaks scored in irradiated and non-irradiated AT and normal cells did not show a γ H2AX signal at the broken ends, and this fraction was

significantly higher in AT cells. It can be argued that the absence of γ H2AX signal is either due to technical limitations or the signal is below the detection limit. In this work, breaks devoid of γ H2AX signal have been detected in both cell types, and they are always more frequently scored in AT than in normal cells. If the absence of γ H2AX-signalling was due to technical limitations or because the signal was below the detection limit, the fraction of breaks devoid of γ H2AX foci would be similar in both cell types. In addition, we demonstrate that all γ H2AX-unlabelled breaks are always Mre11-unlabelled and vice versa. If the technique had detection defects, some breaks would appear as unlabelled in a random distribution. Thus, the labelling pattern of the two different repair proteins described here can be considered as not random in nature, as well as being significant and clear evidence that the lack of γ H2AX-labelling implies the absence of additional repair proteins at the affected breaks. Although it has been reported that H2AX phosphorylation does not regulate the initial recruitment of repair factors to DSBs, its presence is indeed required to concentrate several repair factors in the vicinity of DNA lesions and provides correct assembly and retention at the break site (Celeste et al., 2003; Fernandez-Capetillo et al., 2003; Paull et al., 2000; Rios-Doria et al., 2006). Moreover, both H2AX-deficient MEFs and Mre11-deficient ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) cells display increased radiosensitivity and accumulate unrejoined chromosome and chromatid breaks, which further supports the present results (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002; Theunissen et al., 2003). In our work, AT cells were analysed for the presence of γ H2AX foci 48 hours after irradiation, and the lack of γ H2AX-labelling at certain breaks at this time most probably implies the absence of additional repair factors at the DSB. It could be argued that these breaks can be capped somehow. Hairpin structures could seal these broken chromosomes and this event would explain the deficiency in γ H2AX-and Mre11-signalling. Although we cannot exclude this possibility, hairpin resolution during V(D)J coding ends formation is not impaired in ATM deficient cells (Niewolik et al., 2006), which suggests that AT cells are able to repair this kind of structure. We therefore propose that the fraction of chromosome breaks devoid of γ H2AX lacks the "red flag" that alerts the cell to unrepaired DSBs, and thus proper repair is hindered. Further support for this reasoning is found in the fact that all scored breaks without γ H2AX-labelling are also devoid of Mre-11 labelling. Thus, the absence of both Mre11- and γ H2AX-labelling corroborates the idea that unlabelled-DSBs are not being efficiently detected and, as a consequence, the entire DDR cascade does not take place at these particular breaks.

Normal cells are able to repair most of the DNA damage in a few hours, which suggests that breaks that persist 48 hours or longer may not be efficiently repaired. IR produces complex DSBs that involve multiple, clustered sites of damage that may be in need of extensive processing (Cadet et al., 2003; Kirsten Dahm, 2007; O'Driscoll & Jeggo, 2006). In the present work, cells were analysed at long times after irradiation and mFISH results suggest that γ H2AX-unlabelled breaks are more commonly scored at second or further cell divisions post-irradiation. Therefore, we speculate that some of the breaks devoid of the γ H2AX signal

were initially labelled but lost the labelling after several cell divisions despite the lack of rejoining, thus silencing the γ H2AX mediated signalling. This effect is much more pronounced in AT cells, as they have a marked inability to repair a significant fraction of the radiation-induced breaks together with their well-known checkpoint defects. In this context, both fast DSB rejoining and correct cell cycle functioning are essential factors for avoiding accumulation of unrejoined breaks. It may be less likely that these breaks will be detected and repaired as the cell continues to divide, and eventually they become invisible to the DDR machinery. Further work is needed to establish whether the initial formation of a γ H2AX focus is defective in AT cells, or whether γ H2AX forms but decays before repair is completed.

In conclusion, we have examined the role of ATM in chromosome aberration formation and its relation to long-lived chromosome breaks. We demonstrate that (1) AT lymphoblastoid cells have a higher number of unrepaired chromosome breaks than normal cells at several times after irradiation and (2) a significant fraction of the generated chromosome breaks in AT cells lacks γ H2AX-labelling. The absence of both Mre11 and γ H2AX foci at these breakpoints suggests that breaks without the γ H2AX signal fail to properly initiate repair. The existence of this subset of breaks provides clear evidence that an important fraction of the radiation-induced breaks remains invisible to the repair machinery and they can accumulate in an unrepaired state through consecutive cell divisions in AT cells.

MATERIAL AND METHODS

1. Cell culture and γ -ray exposure. The lymphoblastoid immortal cell lines GM08436A (AT) and GM09622, derived from an AT child and a matched control for sex and age, respectively, were obtained from the Coriel Cell Repositories. Both cell lines were grown in suspension in RPMI 1640 (GIBCO, BRL) medium and incubated at 37°C and 15% CO₂ atmosphere. Cells were irradiated with 1Gy γ -rays while exponentially growing using a CSL 15 R-¹³⁷Cs source (dose-rate: 6.14 Gy/min). Immediately after irradiation, BrdU (Sigma) was added to the culture at a final concentration of 12 μ g/ml in order to distinguish between post-irradiation divisions. Metaphase chromosome preparations were obtained at 24, 48, 71 and 144 h after irradiation as described elsewhere (BrdU was added to the cell culture every 48 hours). Cells in the first, second, third and further cell divisions post-irradiation were determined by the exposure to UV light of Hoechst 33258 (Sigma) treated slides (150 μ g/ml). Post-irradiation times presenting more than 90% of first divisions were chosen for SCF analysis. Post-irradiation times presenting more than 90% of second or further divisions were chosen for γ H2AX and cytogenetic analysis respectively.

2. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Unless otherwise specified, fluorescent signals were visualized under an Olympus BX 51 microscope using a 100X (Olympus) U Plan Apochromat lens (1.35 NA). The microscope was equipped with epifluorescence optics and a CV-M300 camera (MetaSystems GmbH.). Images were captured and analysed using Isis V5.0 software (FISH Imaging System, MetaSystems).

2.1 Telomeric and Centromeric FISH. Telomeric and centromeric hybridization was performed following the manufacturer's instructions using a Cy3-(CCCTAA)₃ PNA-probe for telomeres and a FITC-AAACACTCTTTTGTAGA probe for centromeres (PE Biosystems). After PNA hybridization, DAPI counterstain was applied and images were captured and analysed using Isis V5.0 software (FISH Imaging System, MetaSystems).

2.2 Multiplex FISH (mFISH). After PNA-FISH, the same slides were used to perform multiplex FISH, in order to obtain the differential paintings of the whole set of chromosomes. The mFISH probe (Vysis, Inc.) containing five fluorochromes (Spectrum Gold™, Spectrum Aqua™, Spectrum FRed™, Spectrum Green™ and Spectrum Red™) was applied following the manufacturer's instructions. After mFISH hybridization and DAPI counterstaining, metaphases were relocated and re-captured using the Isis V5.0 software (FISH Imaging System, MetaSystems).

3. Cytogenetic analysis. Following metaphase capture, the mFISH hybridization pattern for each chromosome and each fragment was analyzed. Subsequently, the number of centromeric signals in each chromosome and fragment, and the number of telomeric signals

at their natural ends were scored. A combination of mFISH and PNA-telomeric and -centromeric FISH allows an exhaustive scoring of aberrations, giving highly accurate information about otherwise undetected breaks. The **simple aberrations** considered here were: *Dicentric chromosomes*: two-colour chromosomes with two centromeres. *Translocations*: two-colour chromosomes containing a single centromeric signal, resulting from the illegitimate joining of a centric fragment of a chromosome to an acentric fragment of a different chromosome. *Interstitial deletions*: one-colour chromosome broken at two distinct points, generating three fragments. *Chromosome breaks*: One-colour chromosome broken at one point, generating a centric fragment accompanied by the corresponding acentric fragment. *Terminal deletions*: One-colour chromosome broken at one point, with the peculiarity that one of the generated fragments is missing. For aberration type scoring, **complex aberrations** (those resulting from the exchange between two or more chromosomes that have suffered at least three breaks) were reduced to the simple aberration types described. All simple aberrations were classified as exchange type aberrations and non-exchange type aberrations. **Exchange type aberrations** included dicentrics, translocations and those interstitial deletions where two of the three generated fragments had rejoined. **Non-exchange type aberrations** included chromosome breaks, terminal deletions and those interstitial deletions where the broken fragments remained unrejoined.

4. Scoring of aberrations. For each simple aberration, and after reducing complex aberrations to simple events, we scored as a single aberration the following combinations: **Dicentrics**: (1) each dicentric chromosome and the accompanying compound acentric fragment. (2) A dicentric chromosome accompanied by the two resulting unrejoined acentric fragments. (3) A compound acentric fragment (two colours) accompanied by the two unrejoined centric fragments. (4) A dicentric chromosome alone. (5) A compound acentric fragment alone. **Translocations**: (1) each translocated chromosome, together with its reciprocal translocation. (2) A translocated chromosome accompanied by the resulting unrejoined centric and acentric fragments. (3) A translocated chromosome alone. **Interstitial deletions**: (1) a centric or acentric fragment devoid of telomeric signals at both ends and accompanied by the two or three rejoined chromosome fragments of the same chromosome. (2) A centric or acentric fragment devoid of telomeric signals at both ends and accompanied by the two or three unrejoined chromosome fragments of the same chromosome origin. (3) A centric or acentric fragment devoid of telomeric signals at both ends alone. **Capping status**: An aberration was considered **rejoined** when a pair of telomeric signals was present at each end of the rearranged chromosomes. An aberration was considered **unrejoined** when at least one of the ends was devoid of telomeric signals.

5. Sister chromatid fusion (SCF) analysis. Slides corresponding to first divisions after irradiation of normal and AT cells were selected and coded prior to any treatment, in order to perform a blind analysis. Slides were solid stained with Leishman, which strongly preserves

the original chromosome morphology, thus providing a resolution tool to observe the fusion of chromatids. Centric and acentric fragments presumably forming SCF were identified by the characteristic rounded aspect of one of their ends. Subsequently, telomeric-FISH was applied to the same slides and fragments with presumably fused chromatids scored in the solid-staining analysis were relocated. SCF events were actually confirmed when the previously detected rounded ends were devoid of telomere signals at the fusion point.

6. Asymmetrical field inversion gel electrophoresis (AFIGE). For the evaluation of DSB repair kinetics, AT and normal cells were cultured *in vitro* until both cell lines reached the *plateau* phase. Cells were cooled to 4°C before irradiation and were irradiated on ice at 30 Gy using a Pantak X-ray machine MXR-321, operated at 320 kV and 10 mA with a 1.6 mm Al filter. After irradiation, the cells were returned to the incubator at 37°C to allow for repair. After each repair time interval, cells were centrifuged, washed with PBS, centrifuged again, and resuspended at a final concentration of 1×10^6 cells/ml. Details of cell-agarose blocks preparation as well as the AFIGE are described in (Martín et al., 2005). The agarose gels were scanned immediately after electrophoresis and were quantified to estimate DNA damage using ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) software. DNA DSBs were quantified by calculating the fraction of activity released from the well into the lane (FAR) in irradiated and non-irradiated samples. The FAR measured in non-irradiated cells (background) was subtracted from the results shown with irradiated cells.

7. Immunofluorescence. After irradiation, cells were cultured for 48h and chromosome spreads were obtained as described by Jeppesen *et al* (2000). Briefly: cells were centrifuged and resuspended to a final concentration of 5×10^4 cells/ml in a 1:1 proportion of cell culture medium and hypotonic solution (KCl 0,075M) supplemented with 0.1% Tween 20. Immediately thereafter, cells were cytocentrifuged and slides were washed with potassium chromosome medium (KCM) for 15 min at room temperature (RT). After air drying, 15 µl of blocking solution was applied to the slides (2% (v/v) serum in KCM) for 1h at RT. Both primary and secondary antibodies were diluted in KCM containing 10% (v/v) serum. Slides were removed from KCM and 15µl of 1:800-diluted mouse anti-phospho-histone H2A.X (ser139) (Upstate) antibody was applied alone or together with 15 µl of 1:200-diluted rabbit anti-Mre11 (Abcam). Incubation was performed for 1h at 37°C. Before secondary antibody incubation, the preparations were washed twice in KCM (5 min each) and the 1:400-diluted Alexa 488 and 1:1000-diluted Alexa 568 secondary antibodies (Molecular Probes; Invitrogen) were applied. After 40 minutes incubation at RT, the slides were 2x5 min washed in KCM and fixed in KCM containing 4% (w/v) formaldehyde (15min). Finally, the preparations were briefly rinsed in distilled water and allowed to air dry. DAPI counterstain was applied to the slides and chromosome spreads were visualized and captured. In a correlative manner, a telomeric-FISH and an mFISH probe was applied to the same slides and metaphases were relocated and re-captured.

REFERENCES

- Abraham, R.T. & Tibbetts, R.S. (2005). *Science*, **308**, 510-511.
- Bassing, C.H., Chua, K.F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S.R., Fleming, J.C., Monroe, B.C., Ciccone, D.N., Yan, C., Vlasakova, K., Livingston, D.M., Ferguson, D.O., Scully, R. & Alt, F.W. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 8173-8178.
- Blöcher, D., Sigut, D. & Hannan, M.A. (1991). *International Journal of Radiation Biology*, **60**, 791-802.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D.J. (2001). *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 42462-42467.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. & Ravanat, J.-L. (2003). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Oxidative DNA Damage and its Repair Base Excision Repair*, **531**, 5-23.
- Callen, E., Jankovic, M., Difilippantonio, S., Daniel, J.A., Chen, H.-T., Celeste, A., Pellegrini, M., McBride, K., Wangsa, D., Bredemeyer, A.L., Sleckman, B.P., Ried, T., Nussenzweig, M. & Nussenzweig, A. (2007). *Cell*, **130**, 63-75.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M. & Nussenzweig, A. (2003). **5**, 675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Olaru, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C. & Nussenzweig, A. (2002). *Science*, **296**, 922-927.
- Cornforth, M.N. & Bedford, J. (1985). *Science*, **29**, 1589-1591.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A. & A, N. (2003). *Cell Cycle*, **2**, 426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. & Nussenzweig, A. (2004). *DNA Repair*, **3**, 959-967.
- Foray, N., Priestley, A., Alsbeih, G., Badie, C., Capulas, E., Arlett, C. & Malaise, E. (1997). *International Journal of Radiation Biology*, **72**, 271-283.
- Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., Lou, Z., Bassing, C.H., Manis, J.P., Chen, J., Carpenter, P.B. & Alt, F.W. (2006). *Molecular Cell*, **21**, 201-214.
- Ichijima, Y., Sakasai, R., Okita, N., Asahina, K., Mizutani, S. & Teraoka, H. (2005). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**, 807-812.
- Karlsson, K.H. & Stenerlöv, B. (2004). *Radiation Research*, 517-527.
- Kato, T.A., Nagasawa, H., Weil, M.M., Little, J.B. & Bedford, J.S. (2006). *Radiation Research*, 443-453.
- Kawata, T., Ito, H., George, K., Wu, H., Uno, T., Isobe, K. & Cucinotta, F.A. (2003). *Radiation Research*, 597-603.
- Kirsten Dahm. (2007). *Journal of Cellular Biochemistry*, **100**, 1346-1351.
- Kühne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P.A. & Lohrich, M. (2004). *Cancer Res*, **64**, 500-508.
- Kurz, E.U. & Lees-Miller, S.P. (2004). *DNA Repair*, **3**, 889-900.
- Lavin, M.F. (2007). **26**, 7749-7758.
- Lee, J.-H. & Paull, T.T. (2007). **26**, 7741-7748.
- Löbrich, M., Kühne, M., Wetzels, J. & Rothkamm, K. (2000). *Genes, Chromosomes and Cancer*, **27**, 59-68.

- Loucas, B.D. & Cornforth, M.N. (2004). *Radiation Research*, 554-565.
- MacPhail, S., Banáth, J., Yu, T., Chu, E., Lambur, H. & Olive, P. (2003). *Int J Radiat Biol*, **79**, 351-358.
- Martín, M., Genescà, A., Latre, L., Jaco, I., Taccioli, G.E., Egozcue, J., Blasco, M.A., Iliakis, G. & Tusell, L. (2005). *Cancer Res*, **65**, 10223-10232.
- Martín, M., Genescà, A., Latre, L., Ribas, M., Miró, R., Egozcue, J. & Tusell, L. (2003). *International Journal of Radiation Biology*, **79**, 203 - 210.
- McManus, K.J. & Hendzel, M.J. (2005). *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5013-5025.
- Niewolik, D., Pannicke, U., Lu, H., Ma, Y., Wang, L.-C.V., Kulesza, P., Zandi, E., Lieber, M.R. & Schwarz, K. (2006). *J. Biol. Chem.*, **281**, 33900-33909.
- O'Driscoll, M. & Jeggo, P.A. (2006). **7**, 45-54.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. & Bonner, W.M. (2000). *Current Biology*, **10**, 886-895.
- Rios-Doria, J., Fay, A., Velkova, A. & Monteiro, A.N.A. (2006). *Cancer Biology & Therapy*, **5**, 142-144.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W.M. (1999). *J. Cell Biol.*, **146**, 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. (1998). *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 5858-5868.
- Rothkamm, K. & Lobrich, M. (2003). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 5057-5062.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G. & Bonner, W.M. (2002). *Radiation Research*, 486-492.
- Shiloh, Y. (2006). *Trends in Biochemical Sciences*, **31**, 402-410.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M. & Jeggo, P.A. (2004). *Cancer Res*, **64**, 2390-2396.
- Taylor, A. (1978). *Mutation Research*, **50**, 407-418.
- Theunissen, J.-W.F., Kaplan, M.I., Hunt, P.A., Williams, B.R., Ferguson, D.O., Alt, F.W. & Petrini, J.H.J. (2003). *Molecular Cell*, **12**, 1511-1523.
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G. & Chen, J. (2003). *J. Biol. Chem.*, **278**, 19579-19582.
- Williams, R.S., Williams, J.S. & Tainer, J.A. (2007). *Biochem. Cell Biol.*, **85**, 509-520.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the European Union, Grant number FI-CT-2003-508842; Fundació La Marató, Grant number TV32005-050110; *Ministerio de Educación y Ciencia*, Grant numbers SAF2004-20372-E and SAF2006-01653; *Instituto de Salud Carlos III*, Grant number RD06/0020/1020; and Generalitat de Catalunya, Grant number 2005SGR-00437.

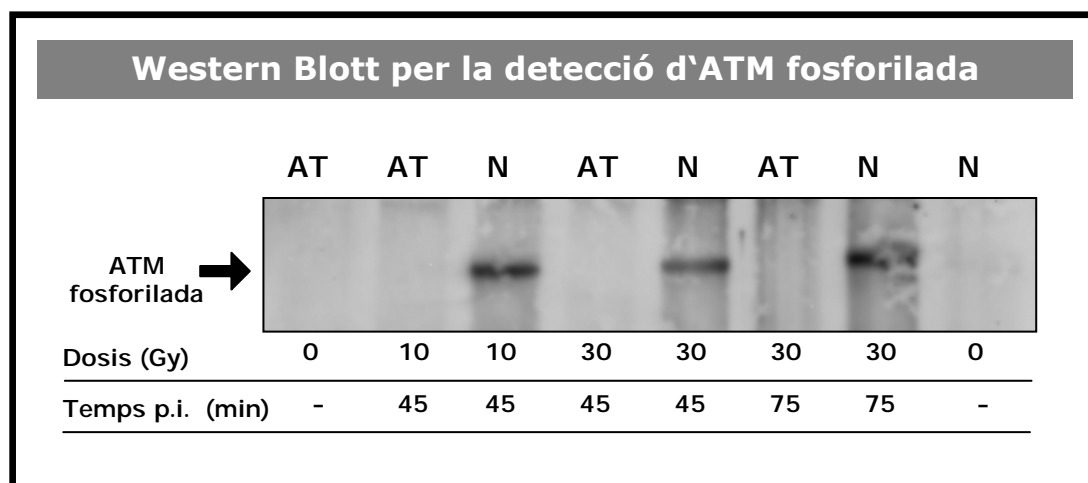
We thank the Language Advisory & Translation Unit at the Universitat Autònoma de Barcelona Language Service for editing the manuscript.

ANNEX DE RESULTATS

A continuació es
presenten resultats que
no han estat inclosos als
articles

1. Absència d'ATM fosforilada en cèl·lules limfoblastoids AT

Per tal de comprovar el fenotip de les cèl·lules limfoblastoids amb les que treballàvem es va realitzar un Western Blott¹ per detectar la presència d'ATM fosforilada a la Ser1984 abans i després d'irradiar.

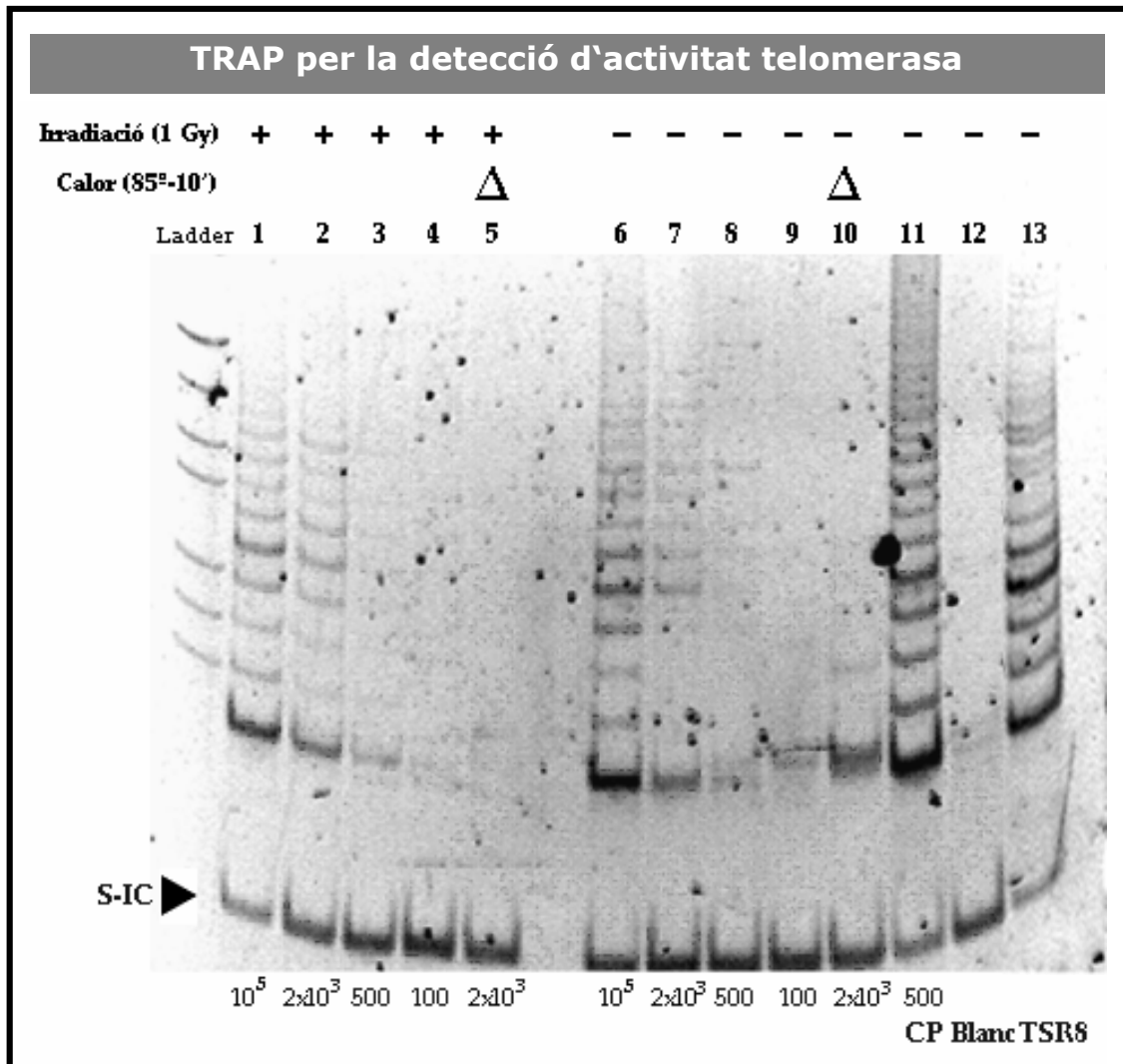


Les cèl·lules es van irradiar a dues dosis diferents (10 i 30Gy) i els extractes proteics es van preparar a dos temps p.i. diferents (45 i 75 minuts). Tal i com esperàvem, no hi havia senyal corresponent a la presència d'ATM fosforilada en els extractes proteics corresponents a cèl·lules AT o normals (N) no irradiades. Aquest resultat concorda amb els experiments que demostren que ATM es troba formant dímers inactius. Aquests dímers esdevenen monòmers actius fosforilats en resposta a les radiacions. No es va trobar senyal d'ATM fosforilada en l'extracte proteic de cèl·lules AT irradiades a cap temps p.i. ni a cap de les dosis avaluades. En canvi es va trobar una banda clara d'ATM fosforilada corresponent a 250 Kdaltons en tots els extractes proteics de cèl·lules normals irradiades. Aquests resultats demostren que no hi ha cap vestigi d'ATM activa en les cèl·lules limfoblastoids AT emprades.

2. Activitat telomerasa en cèl·lules limfoblastoids AT

Un dels objectius del primer article sobre ATM presentat en aquesta tesi era l'anàlisi de la presència de telòmers extra (nombre de telòmers superior a l'esperat) com a conseqüència d'un fenomen de *chromosome healing* a les metafases corresponents a la primera divisió p.i. Tot i que s'ha descrit que la majoria de línies immortalitzades són telomerasa positives, vam decidir realitzar un anàlisi de l'activitat telomerasa en les cèl·lules limfoblastoids prèviament a la resta de l'experimental. Per analitzar la presència d'activitat telomerasa es va realitzar un TRAP (*telomerase-repeat amplification protocol*).

¹ Aquesta tècnica es va dur a terme al laboratori del Dr. George Iliakis i, excepte la irradiació cel·lular, va ser bàsicament realitzada per personal del seu laboratori.



La comprovació es va realitzar amb extracte proteic procedent de cèl·lules AT 24h després de ser irradiades a 1Gy (carrils 1 a 4) i no irradiades (carrils 6 a 10). Cada alíquota contenia un nombre decreixent de cèl·lules: 10⁵, 2x10³, 500 i 100 cèl·lules. Els **controls d'inactivació per calor** (△) es van realitzar a partir d'alíquotes amb 2x10³ cèl·lules (carrils 5 i 10). El **control positiu (CP)** proporcionat pel *kit* es va realitzar amb 500 cèl·lules (carril 11). Els resultats demostren que les cèl·lules AT limfoblastoids sí presenten activitat telomerasa. La presència d'un control de contaminació i de dímers o **blanc** completament net (carril 12) i l'amplificació del control intern (**S-CI**) en tots els carrils demostra que la prova és vàlida i que l'escala de productes observada és conseqüència de l'activitat telomerasa present als extractes proteica avaluats. Tanmateix aquesta activitat telomerasa de les cèl·lules AT no és molt elevada si es compara amb la del CP i amb el TSR8 (carril 13) i, de fet, és gairebé indetectable en quantitats cel·lulars ≤ 500 cèl·lules. El gel també demostra clarament que l'activitat telomerasa de les cèl·lules AT no es veu incrementada en resposta a les radiacions.

***RESUM DELS
RESULTATS***

Cèl·lules defectives en DNA-PKcs

Els resultats relatius a les cèl·lules deficientes en DNA-PKcs presentats en aquesta tesi demostren que, en absència de la cinasa, els MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) analitzats manifesten un cert grau d'instabilitat cromosòmica. Sorprenentment, tot i posseir un control del cicle cel·lular a G1 plenament funcional, els MEFs defectius per a DNA-PKcs acumulen aberracions d'origen post-replicatiu abans i després d'irradiar. A més a més, la deficiència en DNA-PKcs afavoreix la formació de fusions telomèriques, que no veuen incrementada la seva freqüència després de la irradiació. Tot i que ambdós tipus d'aberracions es donen amb una freqüència relativament baixa, la seva estructura les converteix en una font potencial i significativa d'instabilitat cromosòmica. Després de ser sotmeses a radiacions ionitzants, l'extrema radiosensibilitat de les cèl·lules defectives per DNA-PKcs es fa palesa per l'acumulació d'un gran nombre d'aberracions cromosòmiques. L'anàlisi de la cinètica de reparació en aquestes cèl·lules revela un alentiment significatiu respecte a les cèl·lules normals, afavorint l'acumulació d'aberracions i les reunions il·legítimes de DSBs, esdevenint així un factor determinant en la radiosensibilitat dels MEFs defectius per a DNA-PKcs. Finalment, destacar que les cèl·lules defectives en DNA-PKcs mantenen una considerable capacitat de reparació de DSBs, ja que la majoria de les aberracions cromosòmiques descrites després d'irradiar són del tipus intercanvi.

Cèl·lules defectives en ATM

En aquests treballs es presenta un exhaustiu seguiment de les aberracions cromosòmiques radio-induïdes en cèl·lules AT. En totes les divisions post-irradiació analitzades, les cèl·lules AT acumulen un nombre significatiu de trencaments i delecions terminals, mentre que la freqüència d'aberracions del tipus intercanvi no és significativament superior a la de les cèl·lules normals. L'anàlisi de la cinètica de reunió de DSBs mitjançant AFIGE demostra que les cèl·lules AT no presenten una cinètica de reparació alentida, i tanmateix un nombre significatiu d'extrems trencats pendents de ser reparats persisteix en aquestes cèl·lules llarg temps després de ser irradiades. Aquests resultats posen de manifest la incapacitat d'aquestes cèl·lules per reparar una fracció dels trencaments generats. En analitzar la presència de γ H2AX i Mre11 en els extrems radio-induïts de cèl·lules AT es demostra que (1) l'absència d'ATM afavoreix la persistència dels trencaments radio-induïts en espera de ser reparats, i (2) una fracció significativa dels trencaments radio-induïts en cèl·lules AT no són eficientment detectats per la maquinària de reparació.

DISCUSSIÓ



- (...) Jo, per exemple, tinc cent un anys, cinc mesos i un dia –va dir la Reina.

- Això no m'ho puc creure! – exclamà l'Àlicia.

- De veritat no pots? –li va dir la Reina en un to compassiu-. Serà perquè no ho has provat. A veure. Respira fons i tanca els ulls.

- No avancem res provant! –deia l'Àlicia rient-. **No es poden** creure les coses impossibles!

- Serà perquè no ho has provat – li va dir la Reina-. Quan jo tenia la teva edat ho intentava mitja hora cada dia... Abans de l'hora d'esmorzar de vegades ja m'havia cregut sis coses impossibles...

La manca d'ATM i de DNA-PKcs comporta una marcada predisposició a patir diferents tipus de càncers. El seu paper primordial en la regulació de la detecció del dany, en l'activació i/o coordinació de vies d'aturada del cicle i en els mecanismes d'inducció de la reparació del DNA les converteix en protectors genòmics (*genomic caretakers*) essencials. Les cèl·lules deficientes en DNA-PKcs i ATM són ineficients en la reparació de DSBs espontanis i radio-induïts, en el control del cicle cel·lular, la recombinació V(D)J i en el manteniment telomèric. Aquests defectes fan que ambdós tipus cel·lulars siguin molt radiosensibles, acumulant nombroses aberracions cromosòmiques després de ser irradiades.

Tot i que ATM i DNA-PKcs comparteixen un cert grau de complementarietat en les seves funcions, els resultats demostren que tant la naturalesa de la inestabilitat cromosòmica dels tipus cel·lulars estudiats com els factors que determinen la seva radiosensibilitat són marcadament diferents. Aquestes diferències es manifesten en un patró d'aberracions cromosòmiques i una persistència de les mateixes en el temps clarament diferenciat. A continuació i a partir dels resultats obtinguts, analitzarem els diferents factors que afavoreixen -i en últim terme determinen de forma significativa- la seva radiosensibilitat i inestabilitat cromosòmica. Els factors analitzats seran la disfunció telomèrica, la cinètica de reunió dels DSBs radio-induïts, les possibles alteracions en el control del cicle cel·lular i la capacitat de detecció dels trencaments generats. D'aquesta manera podrem aprofundir en la naturalesa del defecte en la resposta al dany de les cèl·lules deficientes en ATM i en DNA-PKcs.

1. És important la contribució de la disfunció telomèrica a la radiosensibilitat de les cèl·lules defectives per a PIKKs?

Tot i que ATM i DNA-PKcs es localitzen als telòmers, només els MEFs defectius per a DNA-PKcs manifesten una disfuncionalitat telomèrica implicada en la formació d'aberracions cromosòmiques. Els MEFs presenten telòmers disfuncionals que es fusionen entre ells, generant estructures dicèntriques que contribueixen a la inestabilitat cromosòmica d'aquestes cèl·lules. En canvi, en els limfoblasts AT els telòmers són aparentment funcionals i no contribueixen a la seva inestabilitat cromosòmica, que haurà de ser explicada per altres causes.

La disfunció telomèrica contribueix a la inestabilitat cromosòmica de les cèl·lules defectives en DNA-PKcs.

En el treball presentat en aquesta tesi, els MEFs deficientes en DNA-PKcs presenten un cert grau de disfunció telomèrica que es tradueix en l'aparició de fusions telomèr-telòmer. Les fusions telomèriques són presents abans i després d'irradiar les cèl·lules, indicant que la naturalesa d'aquesta disfunció és inherent a la manca de DNA-PKcs i que la irradiació no fa

incrementar el seu nombre. Els telòmers disfuncionals també poden unir-se a DSBs (Latre *et al*, 2003; Bailey *et al*, 2004), però donada la baixa freqüència de telòmers disfuncionals en els MEFs estudiats, no és estrany que només s'hagi detectat un sol cas de fusió telòmer-DSB.

Els nostres resultats estan en consonància amb altres estudis realitzats en cèl·lules deficientes en DNA-PKcs que han descrit la presència de fusions telomèriques espontànies sense escurçament telomèric aparent (Bailey *et al*, 1999; Gilley *et al*, 2001; Goytisolo *et al*, 2001). La DNA-PKcs es localitza als telòmers associada al complex TRF1 (Blasco, 2005) i en absència de la cinasa la longitud telomèrica roman intacta (Gilley *et al*, 2001; Goytisolo *et al*, 2001) però el telòmer esdevé disfuncional, sent susceptible de fusionar-se amb un DSB o amb altres telòmers desprotegits. La presència de fusions telomèriques en cèl·lules DNA-PKcs indica que la cinasa desenvolupa alguna funció relacionada amb el manteniment de l'estructura telomèrica i que aquesta funció és essencial per a la protecció de l'extrem cromosòmic. En algun dels treballs anteriorment citats (Bailey *et al*, 2001; Gilley *et al*, 2003) s'observa que la freqüència de fusions és superior en cèl·lules deficientes en DNA-PKcs transformades, i també en cèl·lules no transformades però cultivades durant vèries PDs (*population doublings*); suggerint que l'activitat replicativa de les cèl·lules és un factor afavoridor de la disfunció telomèrica.

En resum, els resultats demostren que els MEFs defectius per a DNA-PKcs manifesten un cert grau de disfuncionalitat telomèrica. Les fusions telomèriques generen estructures de tipus dicèntric que són una font potencial d'instabilitat cromosòmica, però donada la baixa freqüència de fusions telòmer-telòmer en aquestes cèl·lules podem concloure que aquest factor no contribueix de manera determinant a la instabilitat cromosòmica inherent a aquestes cèl·lules ni és un factor decisiu que pugui explicar la seva gran radiosensibilitat.

La disfunció telomèrica no contribueix a la radiosensibilitat dels limfoblasts AT. No s'ha demostrat que el fenomen de "chromosome healing" contribueixi a la reparació de DSBs en cèl·lules AT limfoblastoids.

Les cèl·lules AT limfoblastoids amb les que han estat realitzats els treballs presentats en aquesta tesi no presenten instabilitat cromosòmica associada a una disfuncionalitat o escurçament telomèric. En analitzar la FISH telomèrica, els telòmers de les cèl·lules AT presenten una certa heterogeneïtat en la seva mida i, en general són visualment més curts que els de les cèl·lules normals, tal i com s'ha descrit en molts altres treballs (Metcalf *et al*, 1996; Wong *et al*, 2003; Qi *et al*, 2003). Recordem que les cèl·lules limfoblastoids emprades són telomerasa positives, i aquest enzim és l'encarregat de mantenir la longitud telomèrica en aquelles cèl·lules en les que és actiu. Per tant, no és sorprenent que, tot i presentar una mida heterogènia, l'escurçament telomèric en els limfoblasts AT no sigui suficient com per donar lloc a fusions telomèriques ni fusions telòmer-DSB.

S'han descrit situacions en què un extrem cromosòmic trencat pot ser segellat mitjançant seqüències telomèriques, i aquest procés s'ha anomenat cicatrització cromosòmica (*chromosome healing*). Existeixen diferents mecanismes potencialment capaços d'afegir aquestes seqüències telomèriques estabilitzadores: així, el *chromosome healing* es pot donar per recombinació homòloga amb seqüències telomèriques intactes d'un altre cromosoma. D'altra banda, la telomerasa podria addicionar seqüències telomèriques sintetitzades *de novo* en un extrem trencat, mecanisme que podria explicar el fenomen del *chromosome healing* a cèl·lules telomerasa positives. Aquest darrer mecanisme s'ha observat en alguns organismes, i és una característica normal del desenvolupament a *Paramecium*, *Tetrahymena* i *Ascaris*. Encara que també s'ha descrit la cicatrització de DSBs espontanis o induïts per addició de seqüències telomèriques a *Plasmodium*, *Saccharomyces cerevisiae*, cèl·lules mare embrionàries de ratolí i inclús a cèl·lules humanes (*revisat a Pennaneach et al, 2006*), no s'ha pogut determinar si aquestes han estat sintetitzades *de novo* per la telomerasa o si el DSB ha estat segellat mitjançant altres mecanismes.

Quan s'afegeixen seqüències telomèriques a un extrem trencat, el resultat serà l'estabilització del fragment centromèric amb la consegüent fixació d'una deleció al genoma. Les delecions terminals s'observen amb relativa freqüència en cèl·lules tumorals i s'han relacionat amb aproximadament el 10% de les malalties genètiques associades a aberracions cromosòmiques. En seqüenciar els punts de trencament de les delecions terminals associades a l' α -talassèmia (cromosoma 16p) o a algunes formes de retard mental (cromosoma 22) es va demostrar que aquestes delecions s'havien estabilitzat mitjançant seqüències telomèriques que eren presents a l'extrem trencat (Flint *et al*, 1994; Wong *et al*, 1997), però tampoc en aquest cas es va poder demostrar la implicació de la telomerasa en aquest procés de *chromosome healing*. En base a aquests resultats es va hipotetitzar que, en cèl·lules telomerasa positives, aquest enzim podria afegir seqüències telomèriques a DSBs espontanis o induïts per tal d'estabilitzar-los, esdevenint la telomerasa un sistema alternatiu de reparació. Aquest mecanisme podria ser rellevant sobretot en cèl·lules defectives en alguna proteïna de reparació, ja que en aquestes cèl·lules els DSBs persisteixen durant més temps sense reparar. Tipus cel·lulars candidats per manifestar *chromosome healing* serien, per exemple, les cèl·lules defectives en ATM, on és demostrada la persistència d'alguns DSBs durant molt temps després d'haver estat induïts (Foray *et al*, 1997; Löbrich *et al*, 2000; Kühne *et al*, 2004).

En el primer treball d'ATM presentat en aquesta tesi (Martín *et al*, 2003) es va analitzar la presència de seqüències telomèriques addicionals en cèl·lules analitzades a la primera divisió després d'haver estat irradiades. Tot i l'elevada freqüència de delecions i trencaments detectats en aquestes cèl·lules, en cap de les metafases analitzades es va trobar cap parell telomèric addicional indicatiu de l'existència del fenomen de *chromosome healing* mitjançant

l'addició de seqüències telomèriques *de novo*. Prèviament s'havia confirmat la presència d'activitat telomerasa en aquestes cèl·lules; per tant l'absència de *chromosome healing* no es pot explicar per la manca de l'enzim. El *chromosome healing* és molt poc freqüent en cèl·lules de mamífers i és més habitual en llevat. Tanmateix, estudis realitzats en aquest organisme han posat de manifest que, fins i tot en llevat, la via més habitual de *chromosome healing* és la recombinació homòloga, mentre que l'addició de seqüències telomèriques *de novo* per la telomerasa és un mecanisme secundari. Per aquest organisme s'ha demostrat que la telomerasa actua sobre extrems de DNA trencat la seqüència dels quals guarda molta similitud amb les seqüències telomèriques. Només si s'inhibeix l'acció de determinades helicases l'addició de telòmers *de novo* es veu incrementada i té lloc a partir de qualsevol tipus de seqüència (Zhou *et al*, 2000). Aquests resultats indiquen que existeixen enzims que inhibeixen l'acció de la telomerasa sobre el DNA no telomèric (Mangahas *et al*, 2001) i descarten l'addició de telòmers *de novo* com a via majoritària de *chromosome healing* en llevat.

Es podria argumentar que potser la telomerasa sí afegeix seqüències telomèriques en els extrems trencats de les cèl·lules AT, però no en la quantitat suficient com per poder ser detectades en la primera divisió post-irradiació. El límit de resolució de la sonda PNA emprada per a la detecció dels telòmers és de 150 – 200 parells de bases (Blasco *et al*, 1997; Marcand *et al*, 2000), i si la telomerasa afegís menys nucleòtids, no es podria detectar la presència d'aquestes mini-seqüències. En un treball recent sobre *chromosome healing* en cèl·lules mare embrionàries de ratolí s'ha descrit que la telomerasa afegeix una mitjana de 1500 bp per divisió cel·lular a trencaments induïts enzimàticament en zones del DNA molt properes als telòmers (Gao *et al*, 2008). Aquesta mida telomèrica seria perfectament detectable per la nostra sonda, i per tant descarta una possible manca de sensibilitat en la tècnica.

No s'ha trobat cap indicatiu conclouent de l'estabilització de DSBs per addició de seqüències telomèriques *de novo* per part de la telomerasa en les cèl·lules defectives per ATM i telomerasa positives emprades en aquest estudi. Les evidències experimentals que s'han anat recollint en els darrers anys apunten a que el *chromosome healing* es dona de forma excepcional en cèl·lules de mamífers, i encara més excepcionalment per l'acció de la telomerasa. En aquestes cèl·lules no s'han trobat seqüències telomèriques en la majoria de DSBs induïts per radiació o per enzims de restricció (Sargent *et al*, 1997; Honma *et al*, 2007). Podria ser que el fenomen d'addició de telòmers *de novo* es donés amb eficiència en tipus cel·lulars específics, com ara línies germinals o embrionàries, que presenten nivells elevats d'activitat telomerasa (Blasco *et al*, 1997; Gao *et al*, 2008), però, ara per ara, en eucariotes superiors només s'ha pogut demostrar formalment la seva participació en la reparació de DSBs a escala evolutiva (Nergadze *et al*, 2007).

2. Quina és la contribució dels defectes en el control del cicle cel·lular a la radiosensibilitat i inestabilitat de les cèl·lules defectives per a ATM i DNA-PKcs?

ATM és una proteïna *mestra* en la regulació del cicle cel·lular, ja que pot induir l'aturada a totes les fases del mateix en resposta a un dany en el DNA. Per tant, en les cèl·lules AT, els defectes en el control del cicle cel·lular molt probablement contribueixen a la persistència durant varies divisions post-irradiació dels trencaments radio-induïts no reparats. En quant a DNA-PKcs, tot i que aquesta cinasa contribueix a la regulació del cicle, la seva acció en aquest mecanisme és més limitada i està restringida a algunes fases del mateix. La presència de cromàtides germanes fusionades i de cromosomes isodicèntrics i fragments isoacèntrics en els MEFs defectius per a DNA-PKcs suggereix un més que probable defecte en l'aturada o senyalització del dany a la fase S en aquestes cèl·lules.

Les aberracions cromosòmiques d'origen post-replicatiu són inherents als MEFs defectius en DNA-PKcs i contribueixen de manera important a la inestabilitat cromosòmica i a la radiosensibilitat d'aquestes cèl·lules.

Les aberracions cromosòmiques degudes a un processament post-replicatiu dels trencaments semblen jugar un paper important en la inestabilitat cromosòmica espontània i radio-induïda de les cèl·lules deficientes en DNA-PKcs. Aquestes aberracions ja són presents en les cèl·lules DNA-PKcs no irradiades, suggerint que el mecanisme que indueix la seva formació es troba íntimament relacionat amb la manca de DNA-PKcs i es veu exacerbat després de la irradiació. La fusió post-replicativa de les cromàtides trencades té com a conseqüència la formació de cromosomes isodicèntrics i fragments isoacèntrics. Els cromosomes isodicèntrics es classifiquen com a tals quan a la metafase també hi és present el cromosoma homòleg del que forma l'isodicèntric, descartant així que es tracti d'un dicèntric convencional format per la fusió de dos cromosomes homòlegs trencats. A l'origen d'aquestes aberracions hi ha un cromosoma que s'ha trencat a G1 o a l'inici de la fase S i que ha progressat pel cicle cel·lular sense ser reparat. Un cop comprovat que aquestes cèl·lules s'aturen a G1 de manera efectiva després de la irradiació, hem de concloure que cap -o molt pocs- dels trencaments induïts a les cèl·lules quan es trobaven a G1 en el moment de la irradiació avançaran fins a la fase S. En consonància amb els nostres resultats, no s'han descrit defectes en el control del cicle cel·lular a G1 en cèl·lules defectives en DNA-PKcs (Burma *et al*, 1999; Jhappan *et al*, 2000). Per tant, és lògic concloure que els isodicèntrics i isoacèntrics observats en aquests MEFs molt probablement tenen el seu origen en cèl·lules irradiades durant la fase S (recordem que la irradiació es realitza en l'estadi embrionari, quan les cèl·lules es troben en fase exponencial de creixement).

Existeixen evidències de la implicació de DNA-PKcs en l'aturada del cicle a S, i s'ha demostrat la presència de DNA-PKcs en trencaments generats durant la replicació del DNA (Furuta *et al*,

2003; Chen *et al*, 2005). Després de ser irradiades amb llum ultraviolada (UV), les cèl·lules MO59K (amb DNA-PKcs funcional) aturen la síntesi de DNA, mentre que les MO59J (deficients en DNA-PKcs) es veuen molt menys afectades (Park *et al*, 1999), suggerint que la cinasa juga un paper important en l'aturada de la fase S en resposta al dany replicatiu. La relació entre DNA-PKcs i l'aturada a la fase S podria estar arbitrada per RPA, una proteïna involucrada en la replicació, la reparació i la recombinació del DNA. Se sap que RPA i DNA-PKcs són fosforilades en resposta a la llum ultraviolada, però la fosforilació de DNA-PKcs només té lloc en cèl·lules que estan replicant el DNA en el moment de la irradiació (Yahima *et al*, 2006). D'altra banda, la fosforilació d'RPA en resposta a les radiacions ionitzants està alentida en cèl·lules deficients en DNA-PKcs i en ATM i es veu totalment inhibida en presència de wortmanina (un potent inhibidor d'ambdues cinases). Això suggereix que, en resposta a les radiacions, DNA-PKcs i ATM col·laboren en la fosforilació d'RPA per tal de redirigir les seves funcions des de la replicació del DNA cap a l'aturada del cicle i reparació del DNA (Wang *et al*, 2001). En base a aquests resultats s'ha plantejat un model pel qual la RPA associada a la forca de replicació és fosforilada per la DNA-PK associada a un DSB. Aquesta fosforilació podria senyalar la presència de dany en el DNA que s'està replicant, iniciant una aturada del cicle cel·lular a la fase S (Shao *et al*, 1999). Aquest model explicaria l'aparició d'isodicèntrics i isoacèntrics en els MEFs deficients en DNA-PKcs: en absència de la cinasa la fosforilació d'RPA podria ser ineficient o veure's alentida i les cèl·lules amb un DSB podrien acabar de replicar-se. Si un DSB arriba a la fase S o és induït durant aquesta fase i no s'atura la replicació, es generarà un cromosoma amb dues cromàtides trencades al mateix punt. Donat que ATM és present en aquestes cèl·lules, podria ser que en el DSB original s'hi trobessin factors de reparació, de manera que, un cop finalitzada la síntesi i degut a la proximitat entre les dues cromàtides trencades, es podria veure afavorida la fusió de les cromàtides germanes.

El possible defecte en l'aturada del cicle a la fase S que presenten les cèl·lules defectives en DNA-PKcs només afectaria als trencaments que han estat induïts durant la fase S del cicle cel·lular, i això explicaria (1) que les figures tipus isoacèntric i isodicèntric apareguin amb una freqüència relativament baixa i (2) que aquestes figures es trobin en MEFs DNA-PKcs^{-/-} no irradiats, ja que en absència d'altres fonts exògenes de dany, és freqüent la generació de DSBs durant la replicació del DNA. Tot i que la freqüència d'isoacèntrics i isodicèntrics no és molt elevada, són estructures potencialment inestables i poden induir fàcilment una escalada d'inestabilitat cromosòmica en aquestes cèl·lules.

Els defectes en el control del cicle cel·lular causats per la manca d'ATM afavoreixen la persistència de les aberracions cromosòmiques al llarg de varies divisions post-irradiació

ATM indueix l'aturada del cicle cel·lular a G1, S i G2 en resposta al dany radio-induït, permetent a la cèl·lula reparar els DSBs. Les cèl·lules AT no s'aturen en resposta a la

irradiació, continuant la seva progressió pel cicle cel·lular tot i ser portadores de DSBs no reparats. Degut a aquest defecte en el control del cicle cel·lular, les cèl·lules AT es caracteritzen per manifestar una síntesi radio-resistent de DNA. És a dir, després d'haver estat irradiades, les cèl·lules AT no s'aturen a fase S i la síntesi de DNA no es veu interrompuda (Zhang *et al*, 1997). Tenint en compte aquesta característica, es va plantejar la possibilitat que la fusió post-replicativa de cromàtides germanes també tingués lloc en aquestes cèl·lules. L'anàlisi de la freqüència de cromàtides germanes fusionades en cèl·lules AT irradiades en fase exponencial de creixement va demostrar que aquesta no era significativament més elevada que en cèl·lules normals. Per tal d'aclarir aquesta possibilitat de manera definitiva es va voler determinar la presència d'isoacèntrics i isodicèntrics en segones i terceres divisions post-irradiació. Només es va trobar una figura tipus isocromosoma en totes les metafases analitzades, de manera que podem concloure que, tot i els defectes en l'aturada del cicle a la fase S i la capacitat de síntesi radio-resistent de DNA, la fusió de cromàtides germanes no és un fenomen habitual de reparació en cèl·lules AT.

S'ha descrit que les cèl·lules AT irradiades a la fase G1 o S s'aturen correctament a G2 per un mecanisme independent d'ATM (Xu *et al*, 2002); de manera que les cèl·lules AT del nostre primer treball -irradiades a G1- podrien aturar-se a G2 per tal de reparar els trencaments radio-induïts. Tanmateix, en analitzar les metafases corresponents a la primera divisió post-irradiació es va detectar un nombre significatiu de trencaments i delecions cromosòmiques que havien superat aquest mecanisme de control de G2 independent d'ATM. De manera similar, al 1985 Cornforth i Bedford van irradiar fibroblasts AT i van analitzar les aberracions radio-induïdes a G1 utilitzant la tècnica de condensació prematura de cromosomes. Els autors van demostrar que les cèl·lules AT acumulaven sis vegades més delecions que les cèl·lules control, i ja que l'ús d'aquesta tècnica evitava que el defecte en el control del cicle influís sobre els resultats, els autors suggerien que la radiosensibilitat de les cèl·lules AT és essencialment deguda a un problema de reparació.

En resum, tot i la deficiència en el control del cicle cel·lular -àmpliament demostrada- en les cèl·lules AT, el conjunt dels resultats suggereix que és el defecte en la reparació d'una fracció dels trencaments radio-induïts el principal responsable de l'acumulació de trencaments cromosòmics en aquestes cèl·lules. Els defectes en l'aturada del cicle cel·lular en resposta a aquests trencaments no semblen ser la causa principal de la radiosensibilitat en cèl·lules AT, però poden amplificar aquest defecte, afavorint fins a cert punt l'acumulació d'aberracions potencialment letals a les cèl·lules filles.

3. Existeixen diferències significatives en la cinètica de reunió de DSBs en les cèl·lules defectives per les dues PIKKs.

El nombre inicial de trencaments radio-induïts és el mateix per les cèl·lules defectives en alguna de les dues cinases que per als seus respectius controls, demostrant que l'absència d'ATM o DNA-PKcs no comporta una major sensibilitat a les radiacions *per se*, sinó una resposta ineficient a la reparació dels trencaments generats. Les cèl·lules AT presenten una cinètica de reunió dels extrems radio-induïts molt semblant a la de les cèl·lules normals, suggerint que la capacitat per reparar la totalitat dels trencaments generats no està relacionada amb la velocitat, sinó amb la dificultat per reparar una fracció dels trencaments radio-induïts. Els MEFs defectius en DNA-PKcs presenten una cinètica de reparació significativament més lenta que els MEFs normals, acumulant múltiples DSBs en el temps.

La cinètica de reparació alentida dels MEFs defectius per a DNA-PKcs contribueix de manera determinant a la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica d'aquestes cèl·lules

Resultats molt similars als presentats en aquest treball s'han obtingut en analitzar les cinètiques de reunió de DSBs de les cèl·lules d'origen humà MO59J (defectiva en DNA-PKcs) i MO59K. Sis hores després d'una irradiació de 40Gy, les cèl·lules MO59K assoleixen una reparació gairebé completa, mentre que les MO59J només han reparat aproximadament el 60% dels seus trencaments, i no és fins a les 32h post-irradiació que reparen tots els trencaments radio-induïts (DiBiase *et al*, 2000). En els MEFs deficients en DNA-PKcs, els trencaments persisteixen durant més temps que en les cèl·lules normals, i aquest factor incrementa de manera efectiva la possibilitat de que es donin reunions il·legítimes entre els DSBs radio-induïts. La presència de molt poques aberracions de tipus intercanvi en els MEFs defectius per a DNA-PKcs no irradiats afavoreix aquesta hipòtesi. La freqüència de DSBs generats de manera espontània és molt menor que la induïda per radiació. Si no hi ha altres fragments propers, els dos extrems resultants d'un DSB es repararan de forma correcta encara que sigui amb una cinètica alentida, donant lloc a un espectre d'alteracions cromosòmiques totalment diferent, on les aberracions tipus intercanvi són significativament minoritàries. Per contra, la presència de múltiples DSBs radio-induïts afavorirà la reunió de fragments il·legítims i aquest efecte es veurà exacerbada per una cinètica de reparació alentida.

Altres treballs realitzats amb cèl·lules deficients en diferents factors de la NHEJ on s'ha avaluat la cinètica de reparació i la fidelitat d'aquesta reparació corroboren aquesta hipòtesi (Rothkamm *et al*, 2001). Aquests experiments demostren que 24h després d'irradiar a dosis elevades (80Gy), tant les cèl·lules normals com les deficients en DNA-PKcs, Ku80 i Lligasa IV reparen de manera correcta només el 50% dels trencaments. El conjunt dels resultats

suggereix que la fidelitat de la reparació depèn, en gran mesura, de la velocitat de reunió dels DSBs, ja que aquesta velocitat determinarà la quantitat d'extrems legítims reunits, tant en cèl·lules defectives en enzims de reparació com en cèl·lules normals.

En resum, la cinètica de reunió de DSBs radio-induïts esdevé un factor determinant en la radiosensibilitat dels MEFs defectius per DNA-PKcs. Una reparació alentida afavoreix la reunió de fragments il·legítims, generant un gran nombre de reorganitzacions cromosòmiques en aquestes cèl·lules.

Les cèl·lules AT presenten una cinètica de reparació normal, i per tant aquest factor no contribueix a la inestabilitat cromosòmica d'aquestes cèl·lules

La presència de delecions en espera de ser eficientment reparades en diverses divisions post-irradiació en cèl·lules AT podria explicar-se per (1) una major inducció de trencaments o bé per (2) una cinètica de reparació alentida en aquestes cèl·lules. Els resultats obtinguts descarten ambdues possibilitats i demostren que les cèl·lules AT reparen la majoria dels trencaments radio-induïts en les primeres hores post-irradiació, sense apreciar-se diferències significatives amb les cèl·lules normals. Tanmateix, la fracció de DSBs que no són reunits en aquestes primeres hores roman sense reparar a llargs temps post-irradiació, suggerint que les cèl·lules deficientes en ATM no poden reparar eficientment una fracció dels trencaments generats. Resultats similars als obtinguts en aquest treball han estat descrits en altres tipus cel·lulars, com ara fibroblasts defectius en ATM (Foray *et al*, 1997; Löbrich *et al*, 2000; Kühne *et al*, 2004).

La cinètica de reparació en cèl·lules AT és comparable a la de les cèl·lules normals i els resultats demostren que no constitueix un factor que afavoreixi a la generació d'inestabilitat cromosòmica en aquestes cèl·lules. La naturalesa d'aquest defecte de reparació podria estar relacionat amb la funció d'ATM i/o amb les característiques d'aquests trencaments.

4. Naturalesa de la radiosensibilitat i la inestabilitat cromosòmica en les cèl·lules deficientes en ATM

No s'ha observat cap contribució de la disfunció telomèrica a la radiosensibilitat dels limfoblasts AT. En ser irradiades, aquestes cèl·lules reuneixen la majoria dels trencaments radio-induïts amb una cinètica normal, però una fracció dels trencaments s'acumula sense reparar i pot persistir en les següents divisions cel·lulars. Els defectes en el control del cicle cel·lular inherents a la manca d'ATM afavoreixen la persistència i progressió d'aquests trencaments, però no expliquen l'absència de reparació. Donat l'importantíssim paper d'ATM en la transmissió del senyal del dany en el DNA, es va plantejar si, en absència d'ATM, els trencaments radio-induïts eren correctament detectats. Com que la γ H2AX és un senyalador molt primerenc del dany i la seva fosforilació en resposta a les radiacions és bàsicament responsabilitat d'ATM (Rogakou *et al*, 1999), es va procedir a analitzar la presència de γ H2AX en aquests trencaments. Els resultats mostren que les cèl·lules AT (1) presenten més delecions terminals que les cèl·lules normals en qualsevol temps analitzat; (2) la majoria d'extrems trencats en cèl·lules AT presenten marcatge amb γ H2AX; i (3) sorprenentment, una fracció dels trencaments presents en cèl·lules AT -significativament més elevada que la detectada a cèl·lules normals- no presenta marcatge amb γ H2AX.

Trencaments persistents en cèl·lules AT senyalitzats amb γ H2AX i Mre11

L'activació d'ATM immediatament després de la inducció de dany es tradueix en la fosforilació de la histona H2AX, que s'estén fins a 2 megabases al llarg del DSB (Rogakou *et al*, 1999). Els resultats obtinguts en el nostre treball demostren que la majoria dels cromosomes trencats en cèl·lules AT estan correctament senyalitzats amb γ H2AX. Encara que ATM sigui la principal responsable de fosforilar H2AX en resposta a les radiacions ionitzants, se sap que en absència d'ATM aquesta activació també pot ser duta a terme per la DNA-PKcs (Stiff *et al*, 2004), explicant així la presència de *foci* de γ H2AX en cèl·lules AT (Rogakou *et al*, 1999; Karlsson i Stenerlöv, 2004; Kühne *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2006). Donat que el marcatge amb γ H2AX s'utilitza habitualment com indicador de la presència de DSBs pendents d'ésser reparats (Rogakou *et al*, 1999; Rothkamm i Lobrich, 2003; Ichijima *et al*, 2005), també es va voler comprovar la presència d'algun factor de reparació associat a aquests *foci*; concretament la proteïna Mre11. Mre11 és una nucleasa que pertany al complex MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) i que actua per sobre i per sota d'ATM en la resposta a la inducció de dany. Els pacients amb mutacions al gen que codifica per Mre11 presenten un fenotip tan similar al dels pacients AT que la malaltia s'anomena *Ataxia-telangiectasia like disease* (ATLD). Les cèl·lules d'aquests pacients també són molt radiosensibles i acumulen trencaments de cromosoma i cromàtide (Theunissen *et al*, 2003). En els resultats obtinguts el senyal de γ H2AX associat als extrems cromosòmics trencats sempre coincideix amb el d'Mre11, tant en cèl·lules AT com en

cèl·lules normals, suggerint que aquests trencaments són correctament senyalitzats i que un reclutament efectiu de factors de reparació està produint-se en aquests DSBs.

Tot i ser correctament senyalitzats, l'absència d'ATM afavoreix la persistència a llargs temps post-irradiació de trencaments pendents d'ésser reparats. El defecte de reparació que presenten les cèl·lules deficientes en ATM podria estar íntimament associat a la pròpia naturalesa d'aquests trencaments. Les radiacions ionitzants generen el que s'ha anomenat *trencaments bruts* o *trencaments difícils*. Al voltant d'aquest tipus de DSBs s'acumulen altres lesions com ara SSBs o bases danyades (Cadet *et al*, 2003; O'Driscoll i Jeggo, 2006; Dahm, 2007), fet pel qual aquests trencaments molt probablement necessitin d'un extens processament -que implicaria el reclutament de múltiples factors de reparació- abans de ser eficientment reunits. Les cèl·lules normals reparen la majoria dels DSBs en les primeres hores posteriors a la seva inducció, suggerint que els trencaments que persisteixen durant temps més llargs però que són correctament detectats, presenten alguna característica que els fa de més difícil resolució i la cinasa podria ser necessària per la seva reparació. No sabem si els trencaments llargament persistents detectats en el nostre treball són *trencaments difícils*, però el fet que, en general, les cèl·lules AT acumulin trencaments també quan no han estat irradiades suggereix que aquesta no seria la única explicació per la persistència de DSBs en cèl·lules deficientes en ATM.

D'altra banda, i donat el paper bàsicament regulador d'ATM, una altra possibilitat que explicaria el defecte de reparació en cèl·lules AT seria que l'absència de la cinasa comportés la manca o el retard en l'activació o regulació d'altres factors activats per ATM, com per exemple la proteïna Artemis. Les cèl·lules deficientes en Artemis presenten una elevada radiosensibilitat i la seva cinètica de reparació és molt similar a la de les cèl·lules AT, acumulant una fracció de trencaments durant llargs temps post-irradiació. Mentre que l'activació d'Artemis en la via de NHEJ i en la V(D)J sembla dependre de la DNA-PKcs, s'ha demostrat que Artemis és fosforilada per ATM en resposta a les radiacions (Riballo *et al*, 2004; Poinsignon *et al*, 2004; Chen *et al*, 2005). Aquesta fosforilació radio-induïda és duta a terme per DNA-PKcs en cèl·lules AT, tot i que de forma menys eficient i més lenta que la duta a terme per ATM (Stiff *et al*, 2004). Totes aquestes característiques han portat a diversos autors a suggerir que el defecte en la reparació de les cèl·lules AT pot estar relacionat amb una deficient activació d'Artemis; l'acció de la qual seria important per reparar una fracció de trencaments especialment complexes o que necessitessin de l'acció concreta d'aquesta proteïna (Riballo *et al*, 2004; Jeggo i Löbrich, 2005). Els nostres resultats no poden descartar ni afavorir aquesta hipòtesi, però així com la relació Artemis-ATM sembla molt clara en resposta a les radiacions, no explica tan clarament la persistència de trencaments no reparats en cèl·lules AT no irradiades.

Recentment estudis realitzats en cèl·lules B de ratolins *Atm*^{-/-} han permès demostrar que alguns trencaments espontanis generats durant la V(D)J romanen fins i tot setmanes sense ser reparats (Franco *et al*, 2006; Callén *et al*, 2007). En ambdós treballs també es va descriure la presència de reorganitzacions (dicèntrics i translocacions) en les que el punt de trencament i posterior reorganització corresponia a diferents *loci* dels receptors d'antigen, indicant que alguns d'aquests trencaments es veuen posteriorment involucrats en reunions il·legítimes. Altres treballs que han investigat el paper d'ATM en la V(D)J descriuen l'acumulació d'unions de tipus codificant no resoltes en limfòcits deficients per ATM (Bredemeyer *et al*, 2006). Aquestes unions s'acumulen en les cèl·lules AT tot i la presència d'una NHEJ funcional (inclosa la proteïna Artemis). Amb el temps, les forquetes de DNA presents als extrems codificants (veure Introducció: 7.1 *Recombinació V(D)J*) són finalment processades, i molts d'aquests extrems es veuen freqüentment involucrats en la formació de reunions híbrides (unió d'un extrem codificant i un extrem de recombinació). El conjunt dels resultats suggereix que ATM pot desenvolupar un paper molt important en la regulació de la NHEJ, i els autors proposen un paper essencial per a ATM en el manteniment i l'estabilització dels DSBs en els complexos de reparació després de l'acció de les RAG (Bredemeyer *et al*, 2006; Bredemeyer *et al*, 2008). Aquest possible vincle entre ATM i la NHEJ posa de manifest una vegada més la constant interacció i la gran complexitat de les vies i els factors implicats en la reparació del DNA.

Aquests resultats estan en consonància amb els presentats en aquesta tesi, i en general suggereixen que la persistència de trencaments senyalitzats en cèl·lules AT respon a algun procés de reparació que es produeix habitualment en les cèl·lules normals i que està íntimament associat a la presència i funció de la cinasa. Cal recordar que l'estructura d'ATM és molt similar a la de la DNA-PKcs, i ambdues disposen d'un domini en forma de braç (*arm-like domain*) capaç d'envoltar i subjectar la doble hèlix de DNA, afavorint així el reclutament i l'acció de diversos factors de reparació al DSB (Llorca *et al*, 2003). Ku i DNA-PKcs són immediatament reclutats als DSBs i desapareixen poc temps després (Kim *et al*, 2005). Donada la similitud estructural entre ambdues cinases (**Figura 1**) (Boskovic *et al*, 2003), és possible que ATM realitzi una funció similar a la de la DNA-PKcs però de manera més tardana. Tal com suggereixen Bredemeyer i col·laboradors (2006 i 2008), en absència d'ATM els extrems trencats del DNA poden allunyar-se els uns dels altres o ser menys accessibles a les proteïnes de reparació, resultant en trencaments llargament persistents i altament susceptibles de veure's finalment involucrats en reorganitzacions cromosòmiques.

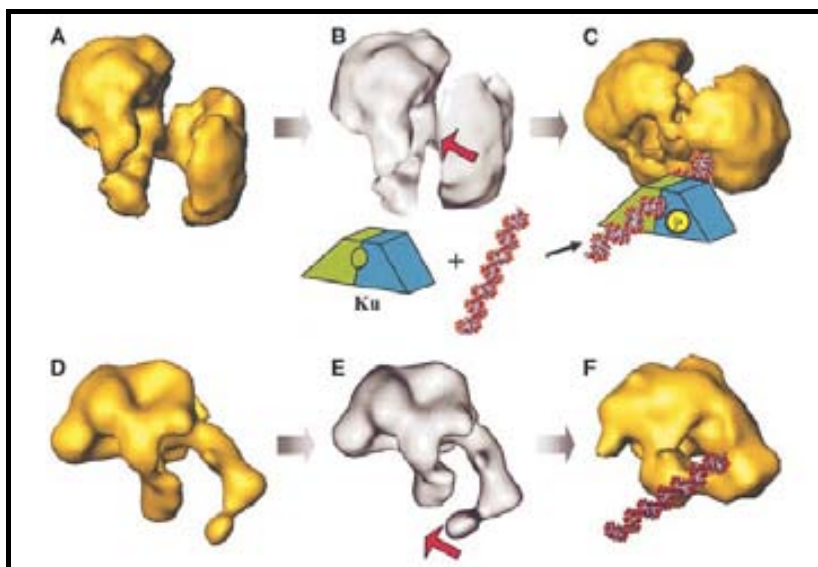


Figura 1 (Boskovic *et al*, 2003). Models d'unió de DNA-PKcs i Ku (A, B i C) i d'ATM (D, E i F) a la doble hèlix de DNA.

Trencaments persistents en cèl·lules AT no senyalitzats amb γ H2AX i Mre11

En analitzar la presència o absència de proteïnes senyalitzadores i de reparació sobre els cromosomes trencats, ens va sorprendre detectar una fracció important de trencaments radio-induïts no senyalitzats amb γ H2AX. El fet que aquest tipus de trencaments sempre hagin estat comptabilitzats més freqüentment en cèl·lules AT que en cèl·lules normals - independentment de que aquestes hagin estat irradiades o no-, descarta un problema associat a la sensibilitat de la tècnica. Tot i que la γ H2AX no és una proteïna de reparació *per se*, la seva presència és indispensable perquè es doni una correcta reparació dels DSBs. Les cèl·lules deficientes en H2AX són molt radiosensibles i acumulen nombrosos trencaments (Bassing *et al*, 2002; Celeste *et al*, 2002), demostrant que la manca d'H2AX fosforilada induïx un defecte en la reparació. En absència de γ H2AX les proteïnes de reparació són reclutades als DSBs, però ràpidament desapareixen i no formen els característics *foci* de reparació associats als DSBs (Paull *et al*, 2000; Celeste *et al*, 2003; Fernández-Capetillo *et al*, 2003; Rios-Doria *et al*, 2006). Donat que la H2AX és fosforilada de manera tan extensa al voltant del DSB, és més que probable que suposi una excel·lent plataforma de reclutament, necessària per a que les proteïnes implicades en la reparació s'associïn a la cromatina i actuïn sobre els DSBs (veure Introducció: 3. *Detecció del dany i amplificació de la resposta*). En consonància amb això, tots els trencaments no marcats amb γ H2AX tampoc presenten marcatge amb Mre11. Aquesta absència de marcatge descarta un cop més insuficiències tècniques i suggereix que els trencaments no marcats no estan sent eficientment detectats com a DSBs pendents de reparació.

Donat que ATM és la *gran reguladora* de la resposta al dany radio-induït en el DNA, ens podem plantejar si la seva absència implicaria la no-detecció d'alguns trencaments.

Tanmateix, diferents estudis han demostrat que molt probablement el factor essencial en la detecció del dany no sigui ATM sinó el complex MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). La unió d'ATM als DSBs i la seva activació és dependent del complex MRN, i les cèl·lules defectives en Nbs1 (NBS; *Nijmegen Breakage Syndrome*) i Mre11 (ATLD; *ataxia-telangiectasia-like disease*) presenten una deficient activació d'ATM enfront de les radiacions (Uziel T *et al*, 2003; Lee i Paull, 2004 i 2005). ATM és reclutada als DSBs després de que aquests hagin estat detectats, on s'encarrega d'iniciar la cascada d'amplificació del senyal per tal d'aturar del cycle cel·lular i iniciar la reparació. Si MRN s'encarrega de la detecció dels DSBs, potser la manca de senyalització en aquests trencaments ens està indicant un funcionament erroni de la cascada d'amplificació de la resposta al dany; aquesta sí dependent d'ATM. Sense amplificació del senyal o amb una amplificació defectuosa o alentida, molts menys factors de reparació seran reclutats al DSB, dificultant la seva resolució.

D'altra banda, hem de recordar que les cèl·lules normals també presenten una fracció (significativament més petita) de trencaments no senyalitzats, suggerint que la *no-senyalització* és un fenomen que també es dona en cèl·lules normals i que, per tant, pot ser independent d'ATM. La majoria d'aquests trencaments no senyalitzats corresponen a fragments localitzats en metafases corresponents a la segona divisió post-irradiació. Aquest patró de marcatge podria estar indicant una evolució temporal en la senyalització dels trencaments. Tot i que amb les tècniques aplicades no podem descartar que aquests trencaments hagin estat *no-senyalitzats* des del principi, proposem que, a mida que la cèl·lula passa per diferents divisions en presència de trencaments no reparats, sigui més probable la pèrdua del marcatge de les proteïnes de senyalització i reparació. Donat que les cèl·lules AT acumulen molts més trencaments no reparats que les cèl·lules normals, aquest procés afectaria les cèl·lules deficientes en ATM de forma més significativa.

El reclutament de factors de reparació als DSBs és dinàmic i varia, entre altres coses, en funció del moment del cycle cel·lular. D'aquesta manera al DSBs s'alterna la presència de proteïnes de reparació que pertanyen a una via de reparació o l'altra: mentre que el reclutament de Ku i DNA-PKcs als DSBs és immediat a la seva inducció, aquestes proteïnes desapareixen al cap de poques hores. D'altra banda, proteïnes de la via d'HR com ara Rad50 o RPA són reclutades de forma més tardana als DSBs, suggerint que a mida que el DSB va sent processat i s'exposa DNA de cadena simple, els factors de la via d'HR accedeixen al DSB (Kim *et al*, 2005). Durant tot aquest temps, el marcatge amb γ H2AX es manté, en consonància amb el seu paper de senyalització del dany. Aquest dinamisme dels factors de reparació en funció del cycle cel·lular també afecta a la fase M. Per exemple, 53BP1 es troba als *foci* de reparació dels DSBs en totes les fases del cycle excepte en mitosi, quan es localitza als cinetocors, on la seva funció és encara desconeguda tot i que s'especula amb la possibilitat que col·labori activament en el control del cycle a mitosi (Jullien *et al*, 2002). Altres

proteïnes de reparació com BRCA1 o p53 també realitzen funcions a nivell de senyalització i control del cicle durant la fase M (Fukasawa *et al*, 1996; Xu *et al*, 1999). Finalment, molts factors de reparació són reclutats als telòmers al final de la fase S i durant la fase G2 (Verdún *et al*, 2005), suggerint que les proteïnes involucrades en la senyalització i reparació del dany al DNA desenvolupen un paper molt dinàmic, migrant als DSBs, als telòmers o a altres localitzacions a mida que el cicle cel·lular avança. A més a més, una cèl·lula amb mecanismes de reparació efectius aturaria el cicle en presència de dany i repararia la majoria dels DSBs en les primeres hores p.i, de manera que la majoria d'aquests factors ja haurien acabat la seva missió reparadora. Tot i que entrem en el terreny de l'especulació, -faria falta un ampli ventall d'experiments per poder determinar la presència o absència de diferents factors de reparació als DSBs durant les diferents fases del cicle per poder comprovar aquesta hipòtesi-, la possible redistribució dels factors de reparació durant la fase G2 i/o M podria fer disminuir la seva presència als DSBs encara no reparats. Un cop es reiniciés la interfase, aquests factors haurien de ser reclutats novament als DSBs no reparats, que corren el risc de no ser correctament *relocalitzats*. En el cas de les cèl·lules AT l'escenari és encara més dramàtic, ja que sumat al seu defecte de reparació, l'absència de la cinasa comporta defectes en el correcte funcionament dels diferents controls del cicle, afavorint la propagació dels trencaments no reparats.

5. Naturalesa de la inestabilitat cromosòmica i de la radiosensibilitat en cèl·lules defectives en DNA-PKcs

Els resultats obtinguts ens permeten assenyalar el control del cicle cel·lular i la cinètica de reparació dels DSBs com els factors que contribueixen de manera determinant a la radiosensibilitat i a la inestabilitat cromosòmica dels MEFs defectius per DNA-PKcs. Tot i que la manca de la cinasa es tradueix en l'acumulació d'aberracions cromosòmiques, aquestes cèl·lules mantenen una considerable capacitat de reparació, posant de manifest el caràcter bàsicament regulador de la cinasa.

Control del cicle cel·lular i cinètica de reparació dels DSBs

La presència de fusions telomèriques i d'isocromosomes en les cèl·lules defectives en DNA-PKcs suggereix que aquests MEFs presenten un defecte relacionat amb la reparació de DSBs associats a la replicació del DNA, i aquest defecte és inherent a l'absència de DNA-PKcs, ja que també és present en MEFs DNA-PKcs^{-/-} no irradiats. Per què relacionar la presència dels dos tipus de reorganitzacions amb la replicació del DNA? S'ha demostrat que els MEFs analitzats manifesten una aturada a G1 plenament funcional; per tant la fusió de cromàtides germanes -que pot donar lloc a la formació d'isocromosomes- només pot afectar als trencaments generats durant la fase S. Respecte a les fusions telomèriques, s'ha descrit una alta incidència de fusions telomèriques intercromosòmiques que impliquen una sola cromàtide en cèl·lules defectives en DNA-PKcs. En aquestes fusions sempre es troba implicat el telòmer de la cadena conductora (cadena *leading*) (Bailey *et al*, 2001 i 2004; Espejel *et al*, 2002). La replicació d'aquesta cadena comporta un processament específic de la mateixa que dóna lloc a la formació de l'extrem 3' de cadena simple indispensable per generar el llaç telomèric, suggerint una relació entre el defecte telomèric i la seva replicació. Les figures de tipus isocromosoma i les fusions telomèriques són estructuralment comparables a un cromosoma dicèntric i també comparteixen amb ell la seva inestabilitat. Aquestes estructures són molt susceptibles d'entrar en cicles BFB que, alhora, poden generar nous fragments i iniciar una escalada d'inestabilitat cromosòmica, contribuint a la radiosensibilitat i a la inestabilitat cromosòmica dels MEFs defectius per DNA-PKcs.

L'anàlisi dels resultats ens indica però, que el factor determinant en la radiosensibilitat d'aquestes cèl·lules és la seva cinètica de reparació. Una reparació alentida afavoreix la reunió il·legítima de molts dels extrems trencats radio-induïts, generant una elevada freqüència de reorganitzacions cromosòmiques. En les cèl·lules DNA-PKcs^{-/-} no irradiades no és freqüent la presència de reorganitzacions il·legítimes. En aquestes cèl·lules es produeixen trencaments però, en absència d'altres fragments, la reparació restaurarà el cromosoma original encara que ho faci de manera alentida. En cas que la reparació sigui massa lenta es

pot perdre el fragment acèntric en la següent divisió cel·lular, explicant així la presència de deleccions. En canvi, en les cèl·lules DNA-PKcs^{-/-} irradiades coexisteixen molts fragments en el temps i aquests, en ser reparats lentament, veuen incrementada la possibilitat de patir reorganitzacions il·legítimes. Per tant, és indispensable que la cèl·lula disposi de mecanismes de reparació competents per mantenir la seva estabilitat cromosòmica. Aquests mecanismes han d'assegurar que la reparació sigui ràpida per tal de promoure una reparació fidel. Els resultats demostren que aquest és un factor determinant en la radiosensibilitat i molt probablement en la inestabilitat cromosòmica en els MEFs deficients en DNA-PKcs.

El paper regulador de DNA-PKcs en la NHEJ

Tot i haver establert els factors més importants que determinen la radiosensibilitat i inestabilitat cromosòmica d'aquestes cèl·lules, encara podem anar una mica més enllà. La cinètica de reunió alentida és una característica que comparteixen -en graus similars- tots els mutants en alguns dels factors de la NHEJ, suggerint que la via de NHEJ es veu alentida quan falta qualsevol dels seus factors. A més a més, és evident que tot i aquest alentiment, els MEFs defectius per a DNA-PKcs presenten una considerable capacitat de reparació, ja que, després de ser irradiades, les aberracions de tipus intercanvi són significativament més freqüents que els trencaments cromosòmics. No deixa de ser sorprenent que aquestes cèl·lules mantinguin una més que significativa capacitat de reunió tot i la manca de DNA-PKcs, suggerint que l'absència de la cinasa altera la regulació de la reparació més que la reparació *per se*.

El paper concret de la DNA-PKcs en la NHEJ és encara incert. No s'han trobat homòlegs per a DNA-PKcs a *S. cerevisiae* ni a *C. elegans*, suggerint que la funció de DNA-PKcs no està evolutivament conservada i, per tant, podria ser potencialment dispensable per a la NHEJ (Costantini *et al*, 2007). DNA-PKcs pot fosforilar Ku, XRCC4, Lligasa IV i Artemis *in vitro*, però no es coneix amb certesa la importància d'aquesta fosforilació en l'eficàcia global del procés de NHEJ *in vivo*. Ja hem explicat que DNA-PKcs fosforila Artemis i la implicació d'aquesta interacció en la NHEJ. En quant al complex XRCC4/Lligasa IV, s'ha descrit que DNA-PKcs pot fosforilar a la Lligasa IV, desestabilitzant-la (Wang *et al*, 2004) i que la forma fosforilada de la XRCC4 es troba unida als extrems trencats d'DNA. Tanmateix, aquesta fosforilació no és indispensable per a la reunió dels DSBs (Yu *et al*, 2003; Lee *et al*, 2004) ni per al reclutament del complex XRCC4/Lligasa IV al DSB (Hsu *et al*, 2002; Calsou *et al*, 2003). De manera similar, DNA-PKcs pot fosforilar Ku *in vitro*, però aquesta fosforilació no és essencial per a la NHEJ, ja que la introducció d'una forma de Ku amb els llocs de fosforilació mutats és capaç de complementar la sensibilitat de cèl·lules irradiades deficients en Ku (Douglas *et al*, 2005).

No hem d'oblidar que el substrat més important i estudiat de DNA-PKcs és ella mateixa, i alteracions en la seva activitat cinasa són bàsiques per a un correcte funcionament de la NHEJ (Chan *et al*, 2002; Cui *et al*, 2005; Douglas *et al*, 2007; Weterings i Chen, 2008). En ser una proteïna tan gran i amb activitat cinasa, molts estudis suggereixen que DNA-PKcs serveix de plataforma de reclutament i de manteniment d'altres factors de reparació en la proximitat del trencament (Cui *et al*, 2005; Meek *et al*, 2007; Costantini *et al*, 2007). La cinasa posseeix múltiples llocs d'autofosforilació que, en ser activats, li indueixen diferents canvis conformacionals que promouen una reparació eficient i efectiva (Meek *et al*, 2007; Uematsu *et al*, 2007). Aquests canvis conformacionals afavoriran l'acoblament i desacoblament de diferents factors de reparació al lloc del DSB, en un complex equilibri entre la protecció del DSB de la degradació excessiva i l'accés dels factors de reparació adequats. Per exemple, DNA-PKcs estimula la interacció del complex XRCC4/Lligasa IV amb Ku (Costantini *et al*, 2007) i també influeix en el reclutament al DSB de la pol μ , la pol λ i la TdT, mitjançant complexes reaccions d'autofosforilació (Cui *et al*, 2005). L'escenari emergent és dinàmic, de manera que els diferents factors implicats en la NHEJ -inclòs el complex DNA-PK- serien activats i reclutats al DSB, així com desactivats i retirats del mateix, de manera contínua (Cui *et al*, 2005; Meek *et al*, 2007; Costantini *et al*, 2007). S'ha especulat que, mitjançant aquestes reaccions de fosforilació i desfosforilació la DNA-PKcs podria inclús influir en l'elecció de la via de reparació (Cui *et al*, 2007). Així doncs, el substrat principal de DNA-PKcs és ella mateixa, i la seva activitat cinasa és essencial per al seu propi funcionament; és a dir, una exquisida coordinació de l'accés de la resta de factors de reparació al DSB.

CONCLUSIONS

Després de l'anàlisi detallat dels factors que poden contribuir a la inestabilitat cromosòmica de les cèl·lules defectives en ATM i DNA-PKcs podem concloure que la naturalesa de la inestabilitat cromosòmica és ben diferent per a cada tipus cel·lular, donant lloc a fenotips característics i a respostes a la radiació clarament diferenciades.

Absència d'ATM: la importància d'una correcta detecció dels DSBs

El defecte de reparació de les cèl·lules AT roman per determinar. Cap dels factors analitzats en els diferents treballs presentats sembla contribuir de manera determinant a la radiosensibilitat d'aquestes cèl·lules. De tota manera, queda demostrada l'acumulació de trencaments pendents de ser reparats en cèl·lules AT, i aquesta acumulació apareix com la contribució més important a la inestabilitat cromosòmica d'aquestes cèl·lules. Els trencaments *no senyalitzats* amb γ H2AX ni Mre11 no expliquen la totalitat de trencaments pendents de ser reparats detectats en les cèl·lules AT, però implica una major persistència d'una fracció dels trencaments: mentre que els trencaments correctament senyalitzats han reclutat els factors necessaris, i per tant és d'esperar que la seva reparació sigui efectiva amb el temps, els no senyalitzats poden romandre trencats durant temps indefinit.

Absència de DNA-PKcs: la importància d'una correcta regulació de la reparació.

Els resultats obtinguts en el treball presentat serien coherents amb el paper que la literatura recent atorga a la DNA-PKcs: la manca del factor regulador *mestre* en la via de NHEJ no aboliria completament la capacitat de reparació d'aquestes cèl·lules, però l'eficàcia i fidelitat de la reparació es veuria significativament compromesa. Aquestes cèl·lules disposen del dímer Ku, (que és el primer en unir-se al DSB i el principal reclutador de la DNA-PKcs). També hi és present el complex XRCC4/Lligasa IV (encarregat de catalitzar la unió dels extrems dels DSBs) i de tots la resta de factors de processament del DSB necessaris. Tanmateix el seu reclutament i retenció al DSB, així com l'adequada coordinació en les seves actuacions, es veurien alterats en absència de DNA-PKcs. Aquesta absència podria justificar un alentiment en la cinètica de reparació, el principal factor responsable de la radiosensibilitat que presenten aquestes cèl·lules.

MATERIAL I MÈTODES



-És així i ho saps perfectament-
la va renyar la Reina Vermella.

La primera cosa que ha
d'aprendre una nena és a dir la
veritat. La segona, a pensar
abans de parlar. I la tercera, a
apuntar-ho tot per no oblidar-se
de res.

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. Cèl·lules limfoblastoids AT i normals

Per investigar el defecte de reparació associat a la manca de la proteïna ATM es van utilitzar les línies limfoblastoids GM08436A i GM09622 (*Coriell Cell Repositories, USA*). GM08436A és una línia derivada d'un pacient (masculí) afecte d'atàxia-telangiectasia, i GM09622 és una línia derivada d'un control de la mateixa edat, raça i sexe.

1.1.1. Metodologia de cultiu

Les línies limfoblastoids GM08436A i GM09622 creixen en suspensió. El medi de cultiu utilitzat va ser RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Invitrogen), suplementat amb un 15% de FBS (*foetal bovine serum; GIBCO-BRL, Invitrogen*) i un 1% d'antibiòtic (GIBCO-BRL, Invitrogen). Ambdues línies cel·lulars es van mantenir a l'incubador a 37°C a una atmosfera del 5% de CO₂.

Perquè el seu creixement fos òptim, ambdues línies es van sembrar a una concentració inicial mínima de $2,5 \times 10^5$ cèls/ml. Les cèl·lules entren en la fase exponencial de creixement al cap de dos o tres dies, i es mantenen en ella mentre la seva densitat oscil·la entre $0,6 \times 10^6$ i $1,6 \times 10^6$ cèls/ml aproximadament (**Figura 1**). Arribades a aquesta densitat, i si no es subcultiven, les cèl·lules entren en la fase *plateau* (**Figura 1**). En cas que les cèl·lules romanguin en la fase *plateau* durant molt temps, els subcultius següents es divideixen més lentament, i fins i tot poden no iniciar la fase de creixement exponencial.

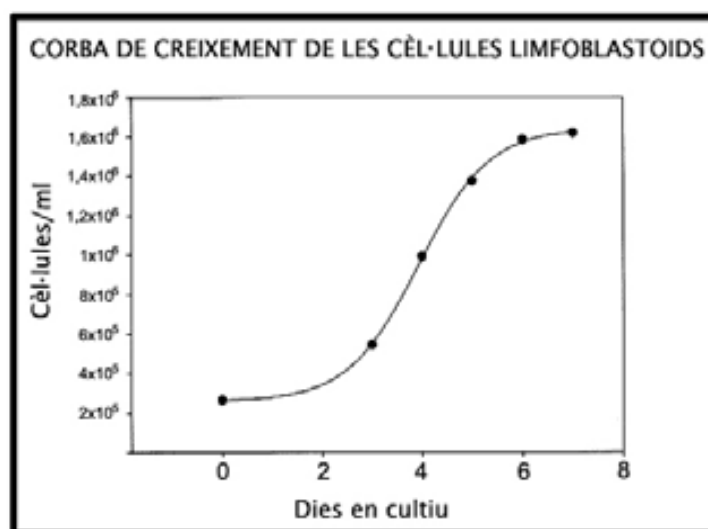


Figura 1: Corba de creixement corresponent a cèl·lules limfoblastoids AT. Les cèl·lules normals presentaven una corba de creixement molt similar, tot i que la seva taxa de creixement era lleugerament més elevada.

Metodologia de subcultiu: En créixer en suspensió, els limfoblasts formen agregats cel·lulars que es dipositen al fons del flascó. Aquesta característica permet subcultivar seguint dues metodologies:

1. Els agregats cel·lulars poden disgregar-se fàcilment amb l'ajut d'una pipeta Pasteur, aspirant i alliberant de nou les cèl·lules al medi varies vegades amb suavitat. A continuació es fa un recompte cel·lular i una ressembrada en medi fresc a la densitat desitjada, procurant que no sigui inferior a $2,5 \times 10^5$ cèls/ml. Aquest mètode permet controlar la densitat cel·lular, però s'ha de tenir en consideració que cada cop que disgreguem els agregats, les cèl·lules aturen el seu creixement durant 24–48h.
2. També podem subcultivar sense disgregació: una fracció del medi i dels agregats cel·lulars pot ser eliminada per aspiració amb molta cura. Aquest mètode no permet controlar la densitat cel·lular del cultiu però, per altra banda, no altera la taxa de creixement de les cèl·lules, de manera que podem mantenir-les en la fase de creixement exponencial durant més temps.

1.2. Fibroblasts embrionaris DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}

Per estudiar el defecte de reparació associat a la manca de la proteïna DNA-PKcs es van obtenir fibroblasts primaris d'embrions (MEFs: *mouse embryonic fibroblasts*) de ratolins DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-} (Taccioli *et al*, 1999). Els animals van ser cedits per la Dra M.A. Blasco i van ser genotipats al seu laboratori (CNB, Madrid) prèviament a la seva estabulació a la UAB.

1.2.1. Metodologia de cultiu

Creuament dels animals: Per obtenir embrions DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-} es creuava un mascle amb una femella del genotip corresponent. La femella era controlada diàriament fins a observar l'aparició del tap vaginal, dia que es considerava el primer de la gestació. Es permetia l'avanç de la gestació durant 12-14 dies, moment en el qual la femella era irradiada a 0 ó 2Gy. Aproximadament 6 h després de la irradiació la femella era sacrificada mitjançant dislocació cervical per obtenir els embrions.

Obtenció i disgregació dels embrions: La femella gestant era disseccionada en un ambient estèril (campana d'extracció en sala de cultius). En aquest moment de la gestació l'úter apareix com un rosari en forma de "V" que ocupa gran part de la cavitat abdominal. Es separa amb cura l'úter i es diposita en una placa de Petri que conté 1xPBS estèril. Seguidament s'obre l'úter per alliberar els embrions embolcallats en el sacs amniòtics, que també han de ser eliminats. Els embrions nets d'embolcalls es dipositen a una segona

placa de Petri que conté 1xPBS estèril. A continuació es diposita un embrió dins d'una bossa de roba de malla¹ i la bossa es submergeix en una placa de Petri petita (60x15mm) que conté 5 ml de medi de cultiu. L'embrió es disgrega suaument exercint pressió amb l'ajut d'unes pinces corbes, i les cèl·lules alliberades difonen al medi de cultiu a través dels porus de la malla. El teixit que no ha estat eficientment disgregat queda dins de la bossa. D'aquesta manera s'obté ràpidament un cultiu amb molts pocs grumolls cel·lulars. Aquest procés es repeteix per cada embrió. Un cop disgregats els embrions, els MEFs obtinguts es deixen a l'incubador durant 24-48h per aconseguir la màxima adhesió cel·lular. Passat aquest temps s'elimina el medi i s'afegeix medi nou.

Els MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-} creixen adherits. El medi de cultiu utilitzat va ser DMEM (GIBCO-BRL, Invitrogen), suplementat amb un 10% de FBS i un 1% d'antibiòtic (GIBCO-BRL, Invitrogen). Els cultius es van mantenir a l'incubador a 37°C i a una atmosfera del 10% de CO₂.

Metodologia de subcultiu: Els subcultius es van realitzar per tripsinització. Breument: s'elimina el medi de cultiu de la placa de Petri per aspiració i seguidament s'afegeix 1xPBS (sense Ca²⁺ ni Mg²⁺), que s'escampa suaument sobre les cèl·lules. Immediatament després s'aspira l'1xPBS i s'afegeix la tripsina preescalfada (GIBCO-BRL, Invitrogen), que es deixa actuar durant 4-5 minuts a 37°C. Passat aquest temps les cèl·lules han perdut l'adherència a la placa i també entre elles. Per tal d'inactivar l'acció de la tripsina en aquest punt, s'afegeix medi fresc a la placa i es recullen les cèl·lules suspeses en tripsina i medi en un tub. Les cèl·lules es centrifuguen a 600-800g durant 7 minuts, s'elimina el líquid sobrenedant i són ressebrades a la dilució adequada (normalment 1:2 ó 1:3) en medi fresc. S'ha de tenir en compte que, en treballar amb un cultiu primari, la taxa de creixement d'aquestes cèl·lules disminueix amb cada subcultiu. En els nostres experiments es van poder realitzar fins a 4/5 subcultius mantenint una taxa de creixement elevada. A partir d'aquí les cèl·lules comencen a dividir-se molt més lentament i canvien la seva morfologia, probablement degut a l'entrada en senescència.

2. IRRADIACIÓ

Tant les **cèl·lules limfoblastoids** com els **MEFs** es van irradiar en diferents fases del creixement en funció de les anàlisis que es volien dur a terme (veure, al final de *Material i Mètodes*, l'esquema del disseny experimental dut a terme):

¹ Per disgregar els embrions es pot fer servir roba de malla que es compra a fàbriques tèxtils. Per tal d'aconseguir una disgregació fina del teixit embrionari, la roba de malla ha de tenir un porus de 135 o bé de 211µm. La roba ha de ser tallada i termosegellada per tal d'obtenir bosses d'aproximadament 2,5 x 2,5 cm. Les bosses es col·loquen en un pot de vidre i són esterilitzades a l'autoclau.

2.1. Anàlisi de la presència de seqüències telomèriques degudes al fenomen de *chromosome healing* i anàlisi citogenètica en cèl·lules limfoblàstoids. La telomerasa és activa durant la fase S del cicle cel·lular, i si és capaç de segellar trencaments cromosòmics no reparats, és important que aquests s'hagin produït abans de la seva activació. Per tant, per dur a terme aquesta anàlisi, les cèl·lules limfoblàstoids es van irradiar en fase *plateau* de creixement; quan es troben a la fase G1 del cicle cel·lular. A més, l'anàlisi es va limitar a les metafases corresponents a la primera divisió post-irradiació, per tal d'assegurar que la possible presència de telòmers addicionals només podia ser deguda al fenomen de *chromosome healing*, i no a la presència de fragments duplicats i/o reorganitzats de forma críptica en divisions posteriors.

Metodologia: Les **línies limfoblàstoids** es van mantenir en cultiu fins assolir la fase *plateau*. Per tal d'assegurar encara amb més certesa l'entrada en un estat quiescent, les cèl·lules es van mantenir fora de l'incubador a temperatura ambient durant les 12h prèvies a la irradiació. Les cèl·lules es van irradiar sota una font de ^{60}Co a una dosi d'1Gy (taxa: 0,5Gy/min)². Un flascó de cada tipus cel·lular no irradiat va ser sotmès a les mateixes condicions i manipulacions. Després de la irradiació les cèl·lules es van subcultivar a la densitat adequada per tal d'estimular la seva entrada en fase exponencial de creixement, i van ser retornades a l'incubador.

2.2. Anàlisi de la presència de cromàtides germanes fusionades, d'isoacèntrics i isodicèntrics i anàlisi citogenètica en cèl·lules limfoblàstoids i en MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}. Recordem que els cromosomes amb cromàtides fusionades han patit un trencament a G1 o a l'inici de la fase S, i per tant necessitem cèl·lules en ambdues fases del cicle cel·lular. Per aquesta raó, la irradiació es va realitzar durant la fase de creixement exponencial dels dos tipus cel·lulars. Per analitzar la presència del fenomen de **fusió de cromàtides** es van analitzar metafases corresponents a la primera divisió post-irradiació. Per analitzar la presència de **cromosomes isodicèntrics i fragments isoacèntrics** (reorganitzacions resultants d'una fusió de cromàtides germanes que han arribat a la 2^a ó 3^a divisió p.i.) es van analitzar metafases corresponents a la segona i posteriors divisions post-irradiació. Aquestes metafases també es van utilitzar per realitzar l'anàlisi citogenètica corresponent a les segones i posteriors divisions post-irradiació.

² Irradiació realitzada al Servei de Radiofísica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, sota la supervisió de la Dra. Montserrat Ribas.

Metodologia: Les **línies limfoblàstoids** van ser irradiades en fase exponencial de creixement. La irradiació va tenir lloc sota una font de ^{137}Cs a una dosi d'1Gy (taxa: 6,14Gy/min)³. Un flascó de cada tipus cel·lular no irradiat va ser sotmès a les mateixes condicions i manipulacions. La irradiació de les **cèl·lules DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** es va dur a terme *in vivo*. La femella en el dia 12-14 de gestació va ser anestesiada⁴ i irradiada sota una font de ^{60}Co a una dosi de 2Gy (taxa: 0,5Gy/min)². La irradiació es va limitar a la zona abdominal de l'animal -on es troba l'úter- mitjançant l'ús de plaques protectores de plom. El sacrifici de la femella i obtenció dels MEFs es va realitzar 6h després de la irradiació per tal de permetre a les cèl·lules irradiades iniciar el procés de reparació. Donat que les cèl·lules irradiades *in vivo* són cèl·lules embrionàries, s'assumeix que aquestes es troben en fase exponencial de creixement. Les metafases amb que es va realitzar l'anàlisi citogenètica provenien de MEFs que havien estat 24 ó 48h en cultiu i que s'havien subcultivat una o cap vegada.

2.3. Anàlisi de la presència de γH2AX i Mre11 en els cromosomes trencats en cèl·lules limfoblàstoids. Amb aquesta anàlisi es pretén valorar la presència o absència de *foci* de γH2AX i Mre11 en els extrems trencats dels cromosomes. Tot i que per aquesta avaluació no és necessari irradiar a una fase concreta del cicle cel·lular, es va decidir irradiar les cèl·lules en fase exponencial de creixement. D'aquesta manera es van poder comparar els resultats d'aquesta anàlisi amb els obtinguts en l'anàlisi citogenètica anterior (2.2).

Metodologia: Les **línies limfoblàstoids** van ser irradiades en fase exponencial de creixement. La irradiació va tenir lloc sota una font de ^{137}Cs a una dosi d'1Gy (taxa: 6,14Gy/min)³. Un flascó de cada tipus cel·lular no irradiat va ser sotmès a les mateixes condicions i manipulacions.

2.4. Anàlisi de la presència de ponts nucleoplasmàtics en binucleats de MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}. Es va voler avaluar la presència i la freqüència de ponts nucleoplasmàtics en els binucleats obtinguts de **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** irradiats i no irradiats.

Metodologia: La irradiació de les **cèl·lules DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** es va dur a terme *in vivo*. La femella en el dia 12-14 de gestació va ser anestesiada i irradiada sota una font de ^{60}Co a una dosi de 2Gy (taxa: 0,5Gy/min)². El sacrifici de la femella i obtenció dels MEFs es va realitzar 6h després de la irradiació

³ Irradiació realitzada a la UTPR (Unitat Tècnica de Protecció Radiològica) de la UAB.

2.5. Anàlisi del control del cicle cel·lular en MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}. Per tal d'avaluar l'eficiència de l'aturada del cicle cel·lular a G1 en absència de DNA-PKcs es van fer servir bateries de cultius en creixement exponencial de MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-} irradiats a 0 i 7Gy.

Metodologia: Per aquesta anàlisi, la irradiació es va dur a terme *in vitro*. Una sèrie de cultius sembrats en plaques de Petri que havien patit entre 2 i 4 PDs (*population doublings*) i amb una densitat cel·lular del 50-60% van ser irradiats a 7Gy sota una font de ¹³⁷Cs (taxa: 6,14 Gy/min)³ i retornats a l'incubador. Les mostres van ser recollides a diferents temps (4, 8, 12 i 24h p.i.) després de la irradiació.

2.6. Anàlisi de la cinètica de reunió de DSBs mitjançant AFIGE en cèl·lules limfoblastoids i en MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}. Per dur a terme els experiments d'**AFIGE** les cèl·lules limfoblastoids van ser irradiades en fase *plateau* de creixement i els MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-} es van irradiar *in vitro* un cop havien assolit la confluència. Els detalls de la irradiació i posterior obtenció i manipulació de les cèl·lules es troben en la secció de Material i Mètodes on s'explica l'AFIGE (*Material i Mètodes*, 12. AFIGE).

3. OBTECIÓ DE METAFASES

Es van obtenir extensions metafàsiques de **cèl·lules AT i normals** irradiades a 0 i 1Gy a les 24, 48, 72, 95 i 141h post-irradiació i de **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** irradiats a 0 i 2Gy a les 24, 48 i 96h p.i. Per obtenir metafases de cèl·lules limfoblastoids es va obtenir una alíquota del flascó irradiat per cada temps escollit⁵. En el cas dels MEFs es treballava amb una placa de Petri per cada temps escollit. A totes les alíquotes s'hi va afegir Colcemid® (KaryoMAX, GIBCO-BRL, Invitrogen) a una concentració final de 0,14µg/ml de medi per tal de bloquejar la mitosi a l'estadi de metafase. El Colcemid® es va deixar actuar durant aproximadament 4 hores en el cas dels MEFs i de 2 a 3h en el cas de les cèl·lules limfoblastoids. Passat aquest temps les cèl·lules limfoblastoids van ser recollides en un tub i els MEFs van ser tripsinitzats. Tots els tipus cel·lulars es van centrifugar a 600g durant 10 minuts. El *pellet* obtingut es va resuspendre en medi hipotònic prèviament escalfat (KCl 0,075M a 37°C) i es va mantenir en un bany a 37°C durant 30 minuts en el cas dels MEFs i de 20 a 30 minuts en el cas de les cèl·lules limfoblastoids. El medi hipotònic va ser eliminat per centrifugació (10 minuts a 600g) i immediatament es va procedir a la fixació del DNA

⁴ Les femelles van ser anestesiades prèviament a la irradiació amb **Avertin**: Solució *stock* : 10g de 2,2,2-tribromoetanol en 10ml de 2-metil-2-butanol. Solució de treball: 0,18ml de la solució *stock* + 10ml de NaCl 0,9%. L'Avertin era subministrat intraperitonealment a una dosi de 20µl d'Avertin (solució de treball) /g de pes l'animal (el pes mitjà d'un ratolí adult és d'aproximadament 25g).

⁵ D'aquesta manera es treballava SEMPRE amb les mateixes cèl·lules. Les alíquotes es separaven sense resuspendre per tal de no destorbar la taxa de creixement de les cèl·lules i obtenir així una dada acurada de les divisions post-irradiació que havien tingut lloc.

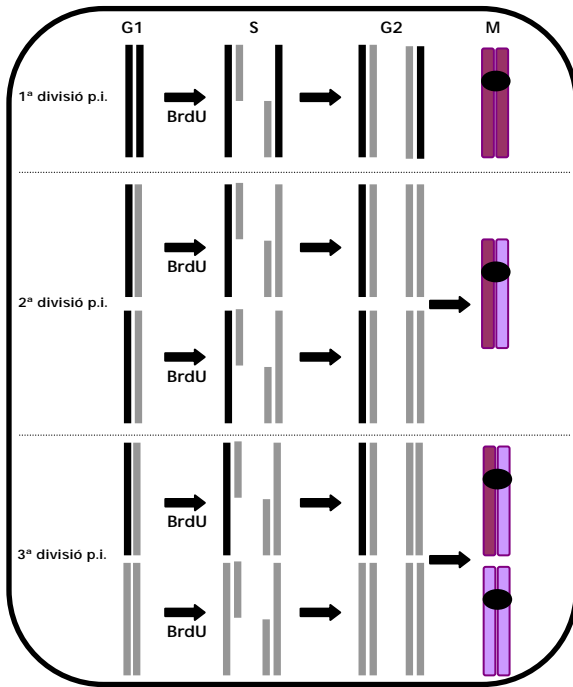
amb 3 rentats de metanol-acètic (3:1). Acabat el processament es van realitzar extensions metafàsiques sobre portaobjectes⁶. Les extensions obtingudes es van conservar a -20°C.

4. CONTROL DE LES DIVISIONS CEL·LULARS POST-IRRADIACIÓ

Per tal de conèixer el nombre de metafases en primera, segona i posteriors divisions post-irradiació es va aplicar una variació del protocol d'intercanvi de cromàtides germanes. Aquest protocol es basa en l'ús de 5-bromo-2'-deuxiridina (BrdU, Sigma-Aldrich) i Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). La BrdU és un anàleg de la timidina. Si les cèl·lules repliquen el DNA en presència de BrdU, aquesta és incorporada a la cadena de nova síntesi, formant un dímer amb l'adenina. Durant la primera replicació en presència de BrdU, la cadena motlle del DNA conté timidina mentre que la cadena de nova síntesi incorpora BrdU. A la segona replicació en presència de BrdU una cadena parental ja conté BrdU (la va incorporar a la primera divisió) i les dues noves còpies generades tornen a incorporar-la.

Metodologia: Immediatament després de la irradiació es van afegir 20µl de BrdU (dissolta a una concentració de 0,6mg/ml) per cada ml de medi de cultiu, i es va permetre el creixement cel·lular en la seva presència. Per evitar l'esgotament de la BrdU, se'n tornava a afegir la mateixa concentració en el medi de cultiu cada 48h. **Cèl·lules limfoblàstoids:** Es van obtenir portes amb extensions metafàsiques a les 24, 48, 72, 95 i 141 hores p.i. **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}:** Es van obtenir portes amb extensions metafàsiques a les 24, 48 i 96h p.i. Per detectar la incorporació de BrdU al DNA es va fer servir Hoechst 33258, un tint fluorescent i fotosensible que s'intercala a les regions A-T del DNA (en aquest cas, les regions A-BrdU). Els portes es van submergir en Hoechst 33258 (150µg/ml) durant 20 minuts, es van rentar amb abundant aigua destil·lada i es van deixar assecar. Un cop eixutes, les preparacions es van col·locar en una cambra humida oberta. Els portes es van cobrir amb abundant 2xSSC (prèviament filtrat) i un cobreobjectes de 24x60mm. En aquestes condicions, les preparacions es van sotmetre a l'acció de llum UV (OSRAM Vitalux, 300W) a una distància de 10-20 cm de la font de llum, durant 2-3 minuts. La llum UV indueix la fotòlisi de les cromàtides bromo-substituídes, i aquesta acció es veu afavorida per la presència del tint fotosensible Hoechst 33258. Per finalitzar, els portes es van rentar amb aigua destil·lada abundant i es van tenyir amb Leishman per procedir amb l'anàlisi de les metafases.

⁶ Els portes es mantenen en metanol i a -20°C fins al moment del seu ús.



Com a resultat de la incorporació de la BrdU i després del tractament amb Hoechst les metafases en primera divisió p.i. presenten el 100% de les cromàtides tenyides amb Leishman (fosques). Les metafases en 2^a divisió p.i. presenten el típic aspecte arlequinat: tots els cromosomes presenten una cromàtide fosca i una clara. Les metafases en 3^a divisió p.i. presenten el 75% de les cromàtides clares i el 25 % de les cromàtides fosques. És molt complicat diferenciar les metafases en 4^a i posteriors divisions p.i.

► **Cèl·lules limfoblàstoids:** Es van considerar mostres corresponents a la primera divisió p.i. aquelles que presentaven com a mínim un 95% de metafases en primera divisió p.i. i van correspondre a les obtingudes a les 24h p.i. Les mostres corresponents a segones i posteriors divisions p.i. presentaven ≤ 5-13% de metafases en primera divisió p.i. i es van obtenir a les 71 i 95 hores p.i. respectivament.

► **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}:** Es va treballar amb les mostres dels MEFs obtingudes a les 48h p.i., que presentaven un 75% de metafases en primera divisió p.i. i un 25% de metafases en segona divisió p.i.

5. FISH (*fluorescence in situ hybridization*) TELOMÈRICA I CENTROMÈRICA

Per realitzar la FISH de telòmers i centròmers es van utilitzar, per tots els tipus cel·lulars (**limfoblàstoids** i **MEFs**) la sonda telomèrica Cy3-(CCTAAA)₃. La sonda centromèrica (FITC-AAACTCTTTTTGTAGA) només es va utilitzar en les mostres d'origen humà (limfoblàstoids), ja que no és específica per a la regió centromèrica dels cromosomes de ratolí. Ambdues sondes són de PE Biosystems i tenen la particularitat de ser sondes PNA (*peptid nucleic acid*); és a dir, contenen un esquelet sucre i fosfat de càrrega neutra. La càrrega neutra no és repel·lida pel DNA diana -prèviament fixat en el portaobjectes-, de manera que s'aconsegueix una hibridació més sensible i estable. Els portes amb extensions metafàsiques es van envellir a temperatura ambient durant la nit o a dins d'una estufa a 65°C durant 1h aproximadament.

A continuació es van sotmetre a un tractament amb pepsina⁷ durant 5-7 minuts per tal d'eliminar les possibles restes de citoplasma. Seguidament les preparacions es van rentar amb 1xPBS i es van sotmetre a una post-fixació de 2 minuts amb formaldehid⁸, seguida d'un rentat amb 1xPBS. Després els portes es van deshidratar en una sèrie d'etanols i es van deixar assecar. Paral·lelament al tractament del DNA cel·lular, les sondes telomèrica i centromèrica es van barrejar en una solució d'hibridació⁹ a una concentració final de 0,5µM cadascuna. La desnaturalització del DNA i de les sondes es va dur a terme per separat o conjuntament:

Desnaturalització per separat: El DNA dels portes es va desnaturalitzar en formamida 70% en 2xSSC (pH 7) a 72-73°C durant 5-6 minuts. Posteriorment els portes es van sotmetre a una sèrie d'etanols freds per evitar la renaturalització del DNA i es van deixar eixugar. Un cop secs, s'hi van aplicar 10-12µl de la solució d'hibridació que conté les sondes (telomèrica i centromèrica) i que havia estat prèviament desnaturalitzada a 85°C durant 10 minuts. A les preparacions s'hi va aplicar un cobreobjectes que es va segellar amb goma. Les preparacions així muntades es van mantenir a l'incubador en una cambra humida a 37°C durant 12h -24h per permetre la hibridació del DNA cel·lular i les sondes. Finalment es va procedir a fer els rentats post-hibridació¹⁰, per tal d'eliminar l'excés de sonda.

Desnaturalització conjunta: Es van dipositar 10-12µl de la solució d'hibridació sobre els portes seguit d'un cobreobjectes que no va ser segellat. El DNA i les sondes es van desnaturalitzar conjuntament fent servir una placa calenta de temperatura controlada (Hybrite[®]) a 74-76°C durant 2 minuts en el cas de les cèl·lules limfoblastoids i a 80°C durant 2-3 minuts en el cas dels MEFs. Immediatament després, els portes es van dipositar en una cambra humida. Aquesta cambra humida es va col·locar dins d'una segona cambra humida ben segellada, a temperatura ambient. La hibridació és efectiva en 2 hores. Els rentats post-hibridació¹⁰ van ser els mateixos que els descrits en l'apartat anterior.

La desnaturalització per separat només es va realitzar amb algunes mostres de cèl·lules limfoblastoids, mentre que la desnaturalització conjunta va esdevenir la rutinària en els treballs presentats en aquesta tesi i es va realitzar amb tots els tipus

Després dels rentats, els portes es van deshidratar en una sèrie creixent d'etanols i es van assecar a temperatura ambient. Finalment als portes s'hi va aplicar la contratinció de DAPI

⁷ **Tractament amb Pepsina:** 20-25µl de pepsina (100 µg/ml) en 50 ml d'H₂O + 500µl d'HCl 1N a 37°C. Un cop dissolta la pepsina, esperar 10 minuts abans d'afegir les mostres per assolir la màxima activació d l'enzim.

⁸ Formaldehid al 4% en *dd*H₂O a temperatura ambient.

⁹ **Solució d'hibridació:** 70% formamida desionitzada, 1% TrisHCl (pH 7,2), 8,5% *buffer* MgCl₂, 5% d'1x solució bloquejant.

¹⁰ **Rentats post-hibridació:** 2 rentats amb 70% formamida en 1xPBS (pH 7) de 15 minuts seguits de 3 rentats amb TNT (0,05M Tris, 0,15M NaCl i 0,05% Tween20, a pH 7.5) de 5 minuts. Tots els rentats es realitzen a temperatura ambient.

(4',6-diamidino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich) per visualitzar el DNA, junt amb solució *antifade* (Vectashield®), que retarda la pèrdua de fluorescència durant l'anàlisi microscòpica.

Per al rastreig de les preparacions i captura de les imatges es van fer servir els microscopis Olympus BX60 i Olympus BX51, ambdós equipats amb òptica d'epifluorescència i una càmera CCD (*charged coupled device*) o CV-M300 respectivament. Els filtres utilitzats van ser DAPI; per la visualització del DNA, FITC; per la visualització dels centròmers, i Cy3 o Texas Red; per la visualització dels telòmers (Olympus o MetaSystems respectivament). En ambdós equips el fluorocrom Cy3 també va ser capturat utilitzant el filtre Gold, resultant en una captura més brillant i lleugerament més neta. Les imatges es van capturar i analitzar fent servir els softwares Quips SpectraVysion i Smart Capture (Vysis System) pel microscopi BX60 i el software Isis V5.0 (FISH Imaging System, MetaSystems) pel microscopi BX51.

6. mFISH (*multifluor o multiplex fluorescence in situ hybridization*)

A la tècnica d'mFISH s'utilitzen sondes de DNA marcades amb 5 fluorocroms diferents. La combinació d'aquests fluorocroms permet la identificació inequívoca dels cromosomes autosòmics i sexuals, ja que cada parell d'homòlegs, així com el cromosoma X i l'Y presenten un color diferenciat. Degut a que en aquesta tesi es va treballar amb cromosomes d'origen humà i de ratolí, es van fer servir dues tècniques diferents d'mFISH.

6.1. mFISH

L'mFISH sobre **cèl·lules limfoblàstics** normals i defectives en ATM d'origen humà es va realitzar amb la sonda de Vysis¹¹. Les metafases ja hibridades van ser visualitzades i capturades mitjançant l'ús dels microscopis equipats amb epifluorescència i amb els softwares descrits anteriorment (*Material i Mètodes*, 5. FISH telomèrica i centromèrica).

Metodologia: l'mFISH sempre es va realitzar a continuació de la FISH telomèrica i centromèrica. Per això es considera que la mostra ja està envellida i, tal i com s'ha descrit anteriorment, ja ha patit un tractament amb pepsina. Les mostres es van rentar amb 4xSSC-Tween20 i es van sotmetre a un tractament amb RNAsa A durant 30 minuts en cambra humida a 37°C. El tractament amb RNAsa A¹² disminueix les hibridacions inespecífiques i incrementa la qualitat de la hibridació. Acabats els pretractaments, les mostres es van rentar dues vegades en 2xSSC, es van post-fixar¹³ durant 5 minuts i es van rentar dues vegades amb 1xPBS. Prèviament a la desnaturalització, les mostres es van deshidratar en una sèrie creixent d'etanols (70%, 85%, 100%). Les mostres es van

¹¹ Les sondes d'mFISH de Vysis estan marcades amb 5 fluorocroms: Spectrum Green™, Spectrum FRed™, Spectrum Red™, Spectrum Gold™, Spectrum Aqua™. La captura es realitza amb els filtres FITC, Fred, Cy3 o Texas Red, Gold i Aqua respectivament.

¹² RNAsa A: 20µl d'RNAsa A (100µg/ml) sobre la mostra del portaobjectes.

¹³ Post-fixació: 1% formaldehid + 0,05 M MgCl₂ en 1xPBS.

desnaturalitzar en formamida¹⁴ durant 4 minuts a 72°C, es van sotmetre a una sèrie d'etanols freds i es van deixar assecar. La sonda d'mFISH es va desnaturalitzar durant 5 minuts a 72°C abans de ser aplicada sobre la mostra. Finalment es va permetre la hibridació en cambra humida a 37°C durant 24-48h. Passat aquest temps es va procedir amb els rentats post-hibridació¹⁵, acabats els quals es va aplicar DAPI i *antifade* sobre les mostres.

6.2. SKY (*spectral karyotyping*)

L'mFISH sobre **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** es va realitzar amb la tecnologia d'SKY, utilitzant la sonda d'Applied Spectral Imaging¹⁶. Un cop hibridades, les metafases van ser visualitzades i capturades mitjançant l'ús del microscopi Nikon ECLIPSE E800 equipat amb una càmera Cohu CCD i el software SkyView 2.1 (Applied Spectral Imaging). A diferència del cas anterior, on la visualització i la captura d'imatges es basa en l'epifluorescència, l'SKY es basa en l'ús d'un element de dispersió òptica que permet l'anàlisi de l'espectre d'emissió de llum de tots els fluorocroms per cada píxel rastrejat, i que tradueix aquesta informació en color/s.

Metodologia: Contràriament a l'mFISH, la hibridació amb la sonda d'SKY sempre es va realitzar prèviament a la FISH telomèrica. Els portes es van rentar dos cops en 1xPBS i seguidament van ser sotmesos al tractament amb pepsina prèviament descrit. Després de 2 nous rentats amb 1xPBS els portes es van post-fixar¹⁷ i es van sotmetre a una sèrie d'etanols freds per, finalment, deixar-se assecar. Els portes es van desnaturalitzar en formamida¹⁴ durant 2 minuts a 72°C, es van sotmetre a una sèrie d'etanols freds i es van deixar assecar. Paral·lelament la sonda es va desnaturalitzar a 80°C durant 7 minuts i es va deixar renaturalitzar a 37°C durant 1h abans de ser aplicada sobre la mostra. Finalment es va permetre la hibridació en cambra humida a 37°C durant 48h. Passat aquest temps es va procedir amb els rentats post-hibridació¹⁸, acabats els quals es va aplicar el primer anticòs¹⁶ (avidina-Cy5), que es va deixar actuar durant 1h a 37°C. Les mostres es van rentar 3 cops amb 4xSSC-0,05% Tween20 a 45°C abans d'aplicar el segon anticòs¹⁶ (anti-digoxigenina-Cy5.5), que també es va deixar actuar durant 1h a 37°C. Es van repetir els rentats amb 4xSSC-0,05% Tween20 i els portes es van esbandir amb d_3H_2O i es van deixar assecar abans d'aplicar el DAPI+*antifade* subministrat per Applied.

¹⁴ 70% formamida en 2xSSC (pH 7)

¹⁵ **Rentats post-hibridació:** un rentat amb 0,4xSSC durant 1-2 minuts a 72°C seguit d'un rentat en 2xSSC-0,05% Tween20 d'1 minut a T^o ambient. Ambdós rentats es realitzen en agitació. Finalment les mostres es deshidraten i es deixen assecar.

¹⁶ Les **sondes d'SKY d'Applied Spectral Imaging** estan marcades amb 3 fluorocroms (Cy3TM, Texas RedTM i Spectrum GreenTM) i amb biotina i digoxigenina. Aquestes darreres sondes es detecten de manera secundària amb avidina-Cy5 i anti-digoxigenina-Cy5.5 respectivament. La hibridació es visualitza a través d'un filtre de 3 cares que excita tots els fluorocroms alhora en una sola exposició.

¹⁷ **Post-fixació:** Un rentat de 5 minuts en 0,05M MgCl₂ en 1xPBS seguit d'un rentat en 1% formaldehid de 10 minuts.

¹⁸ **Rentats post-hibridació:** Tres rentats de 50% formamida en 2xSSC a 45°C seguit de 2 rentats en 1xSSC a 45°C i un rentat en 4xSSC-0,05% Tween20 a 45°C. Tots els rentats són de 5 minuts.

7. ANÀLISI DE METAFASES

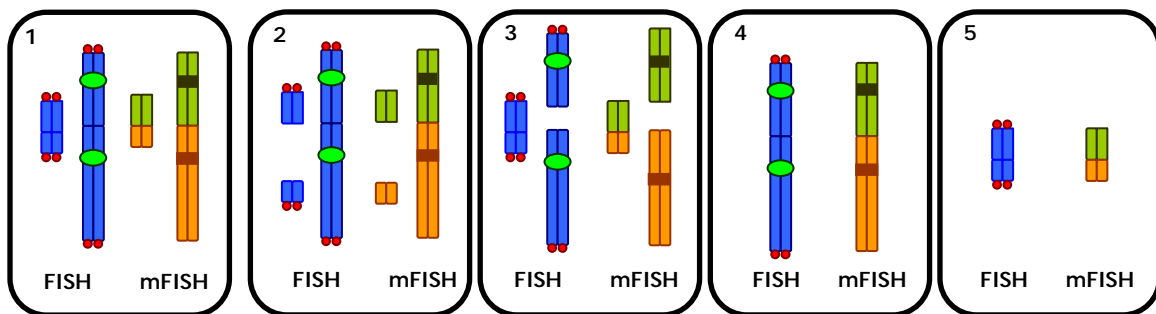
Anàlisi Citogenètica: Es va analitzar el patró d'hibridació d'mFISH per cada cromosoma i/o fragment cromosòmic. Paral·lelament, els senyals telomèrics i/o centromèrics corresponents a cada figura també van ser analitzats.

1. Aberracions simples i complexes

En avaluar les alteracions cromosòmiques presents, primerament aquestes es van classificar en aberracions simples i complexes. Les **aberracions complexes** són aquelles que resulten de l'intercanvi de material entre dos o més cromosomes que han patit com a mínim 3 trencaments. Un cop detectades, les aberracions complexes es van reduir a aberracions simples (p.ex.: translocació més dicèntric). A continuació es descriuen els paràmetres que es van tenir en compte a l'hora de classificar les aberracions simples durant l'anàlisi citogenètica

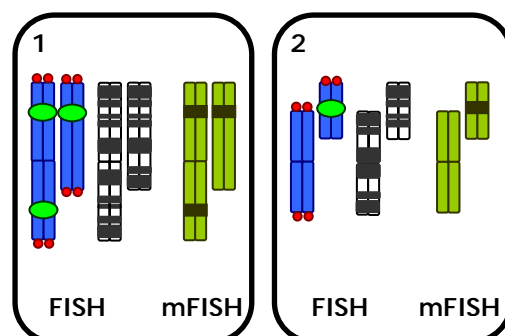
Aberracions simples:

Cromosoma dicèntric: (1) Un cromosoma amb dos colors i 2 centròmers acompanyat del corresponent fragment acèntric reorganitzat de dos colors; (2) un cromosoma amb dos colors i 2 centròmers acompanyat dels dos fragments acèntrics corresponents no reorganitzats; (3) un fragment acèntric reorganitzat de dos colors acompanyat dels corresponents fragments cèntrics no reorganitzats; (4) un sol cromosoma amb dos colors i 2 centròmers i (5) un sol fragment acèntric reorganitzat de dos colors.



Isodicèntrics i isoacèntrics: (1) Un cromosoma amb un sol color i dos centròmers. El patró de bandes proximal d'aquest dicèntric és una imatge especular de la part distal. L'isodicèntric ha d'estar acompanyat del seu cromosoma homòleg per descartar que aquesta figura sigui el resultat de la formació d'un dicèntric entre dos cromosomes homòlegs i (2) un fragment acèntric d'un sol color. El patró de bandes proximal d'aquest fragment és una

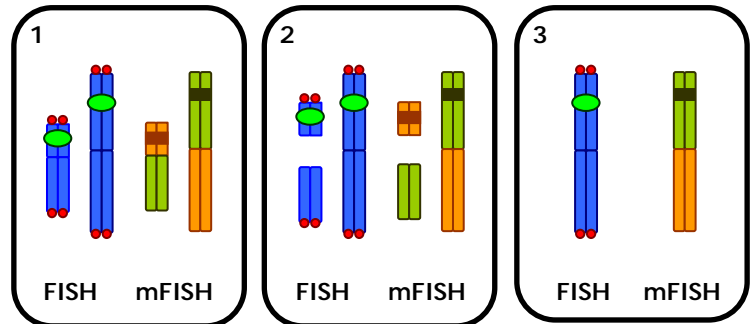
imatge especular de la part distal. L'isoacèntric pot estar acompanyat del fragment cèntric reorganitzat o no.



En els treballs presentats es descriu la presència de cromosomes isodicèntrics i fragments isoacèntrics. Encara que aquestes reorganitzacions són morfològicament, molt similars a un cromosoma dicèntric, tenen un origen completament diferent i, en analitzar les metafases, era necessari distingir els cromosomes dicèntrics dels cromosomes isodicèntrics. Per aquesta raó es descriuen separadament dels cromosomes dicèntrics.

Translocació: (1) Un cromosoma amb dos colors i un sol centròmer acompanyat de la seva translocació recíproca de dos colors; (2) un cromosoma de dos colors i un sol centròmer acompanyat dels fragments cèntric i acèntric corresponents no reorganitzats

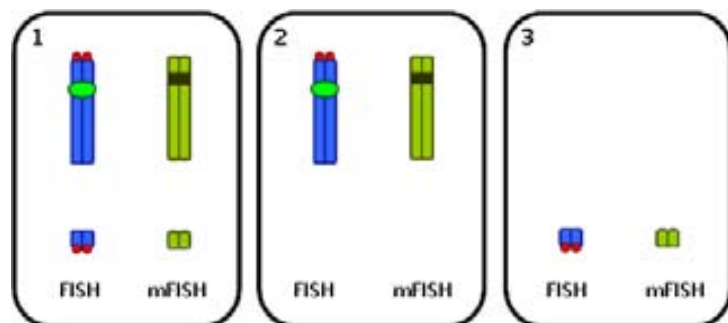
i (3) un cromosoma sol amb dos colors i un centròmer.



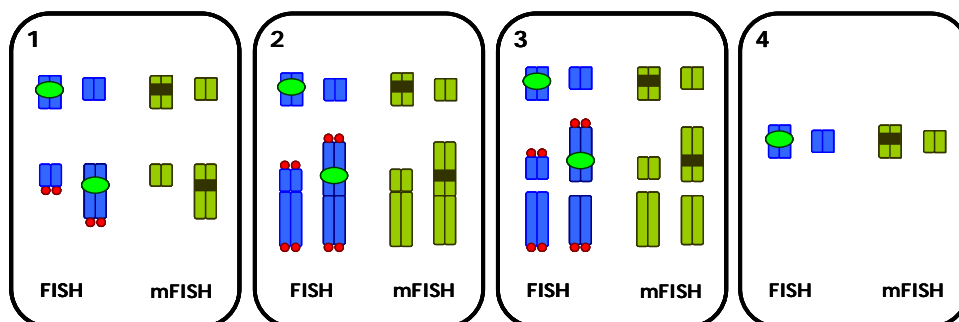
Trencament cromosòmic:

(1) Un fragment cèntric i un fragment acèntric d'un sol i mateix color. Cada fragment presenta només un parell telomèric; (2) un fragment cèntric d'un sol color amb només un parell telomèric (també anomenat **deleció**

terminal) i (3) un fragment acèntric d'un sol color amb només un parell telomèric.



Deleció intersticial: (1) Un fragment cèntric o acèntric d'un sol color que no presenta senyals telomèrics en cap extrem i que està acompanyat d'un (1), dos (o més) fragments del mateix color reorganitzats (2) o no reorganitzats (3) i que presenten senyals telomèrics al seus extrems; (4) un sol fragment cèntric o acèntric, d'un color, i que no presenta senyals telomèrics en cap extrem.

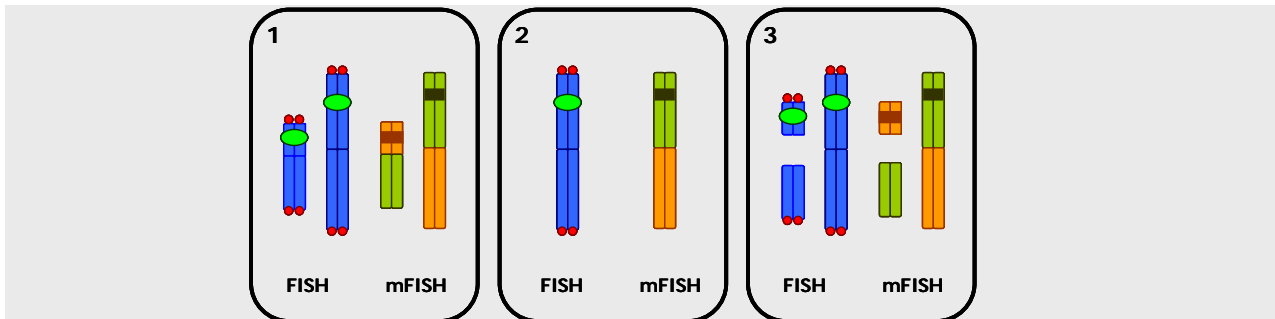


Un cop les aberracions presents a les metafases van ser identificades tenint en compte les categories fins ara descrites, van ser classificades de nou en funció de dos paràmetres: aberracions reunides o no reunides:

2. Aberracions reunides i no reunides

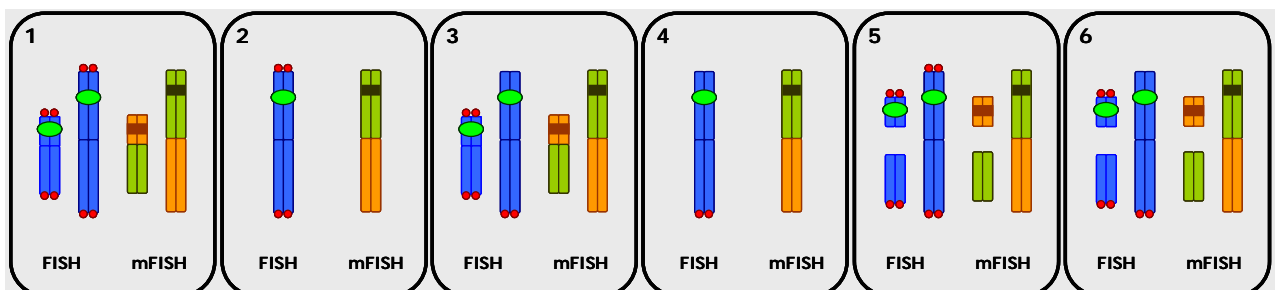
Aberracions reunides: inclouen dicèntrics, translocacions i aquelles delecions intersticials on tots els fragments generats presents a la metafase s'han reorganitzat.

Aberracions no reunides: inclouen dicèntrics, translocacions i aquelles delecions intersticials on alguns dels fragments generats i presents a la metafase no s'han reorganitzat. Evidentment, els trencaments cromosòmics pertanyen tots a aquesta categoria.



Exemple: en el cas d'una translocació podem trobar una **translocació reunida** en la que (1) tots els extrems generats són presents a la metafase i s'han reunit; o bé (2) part dels fragments generats s'han perdut, però els fragments presents s'han reunit. Una **translocació no reunida** seria aquella en la que (3) part dels fragments generats i presents a la metafase no s'han reunit.

La combinació d'mFISH i FISH telomèrica i centromèrica permet obtenir informació extremadament acurada del nombre **mínim** de trencaments que s'han radioinduit, així com del tipus de reorganitzacions presents. A més, és especialment útil per a detectar delecions i reorganitzacions terminals críptiques.



Exemple: Diferents translocacions analitzades per mFISH són classificades com **simples i reunides** (1, 2, 3 i 4) o **simples i no reunides** (5, 6). Algunes d'aquestes alteracions esdevenen **complexes** (3, 4 i 6) en realitzar l'anàlisi conjunta d'ambdues FISH.

8. IMMUNODETECCIÓ FLUORESCENT DE PROTEÏNES

Obtenció de metafases: Les mostres per immunofluorescència es van processar seguint el protocol de Jeppesen *et al* (2000). Després del tractament de Colcemid® prèviament descrit (*Material i Mètodes*, 3. Obtenció de metafases), les cèl·lules limfoblastoïdes es van disgregar i resuspendre en medi hipotònic (KCl 0,075M) fred. La solució de cèl·lules i medi hipotònic es va deixar a l'incubador a 37°C durant 15 minuts. Passat aquest temps es va recollir una alíquota i es va barrejar amb medi hipotònic + 0,1% Tween20, procurant que la concentració final de cèl·lules no fos molt elevada ($5-10 \times 10^5$ cèls/ml). Aquesta dilució cel·lular es va citocentrifugar durant 5 minuts (1500 rpm, velocitat mitjana) per tal d'obtenir les extensions metafàsiques sobre els portes. Donat que el material obtingut no ha estat sotmès a cap fixació, l'eficiència de la immunofluorescència és òptima si es duu a terme immediatament després d'obtenir les extensions metafàsiques sobre els portaobjectes. En cas contrari, les preparacions es poden conservar a la nevera 1 ó 2 dies. A partir de les 48 hores l'eficiència de la tècnica -seguint aquest protocol- disminueix dràsticament.

Immunofluorescència: Els portes es van assecar durant 10 ó 15 minuts abans de ser rentats amb KCM¹⁹ durant 10 minuts. Després del rentat es va aplicar la solució de bloqueig (KCM + 4% FBS) i es va deixar actuar durant 1h en cambra humida, a temperatura ambient. Passat aquest temps es van aplicar 15-20µl de la dilució²⁰ 1:800 de l'anticòs primari de ratolí anti-fosfo-histona H2A.X (Ser139) (Upstate) sol o barrejat amb la dilució 1:200 de l'anticòs primari de conill anti-Mre11 (Abcam), i es va deixar incubar durant 1h en cambra humida i a temperatura ambient. Després de dos rentats amb KCM es van aplicar 15-20µl de la dilució d'anticòsos secundaris Alexa 488 (color verd) 1:400 i Alexa 568 (color vermell) 1:100 (Molecular Probes; Invitrogen) per la detecció de la γH2AX i Mre11 respectivament. La incubació dels anticòsos secundaris es va dur a terme en cambra humida a temperatura ambient durant 40 minuts o a 4°C durant la nit, seguida de dos rentats amb KCM. Finalment les preparacions es van fixar en formaldehid al 4% durant 5 minuts i es van rentar amb abundant aigua destil·lada, abans d'aplicar DAPI i solució *antifade*. La visualització i anàlisi de les metafases es va realitzar amb els microscopis, filtres i softwares prèviament detallats (*Material i Mètodes*, 5. FISH telomèrica i centromèrica).

Variació del FISH telomèric: Es va realitzar una FISH telomèrica sobre els portes on prèviament s'havia realitzat una immunofluorescència per γH2AX. Per tal d'optimitzar els resultats es va modificar el protocol de FISH telomèric explicat prèviament (*Material i Mètodes*, 5. FISH telomèrica i centromèrica) de la següent manera: Després de la immunofluorescència, els portes es van netejar amb 4xSSC-Tween 20 durant 5 minuts i amb

¹⁹ KCM (pH 7,5): 120mM KCl, 20mM NaCl, 10mM TrisHCl, 0,5mM EDTA, 0,1% Tritó X-100.

²⁰ Dilució de l'anticòs en KCM + 2% FBS.

KCM tres vegades. Seguidament el material va ser post-fixat amb formaldehid al 4% diluït en KCM durant 5 minuts i rentat amb abundant aigua destil·lada. La desnaturalització conjunta del DNA i la sonda així com la posterior hibridació es va dur a terme en les condicions prèviament descrites (*Material i Mètodes*, 5. FISH telomèrica i centromèrica). Els rentats post-hibridació de la FISH es van substituir per 3 rentats en KCM i un en aigua destil·lada. Els portes es van deixar assecar i, finalment, es va aplicar el DAPI i la solució *antifade*.

9. FUSIÓ DE CROMÀTIDES GERMANES

Per tal d'analitzar si es produïa la fusió de cromàtides germanes en **cèl·lules limfoblàstoids** i en **MEFs** es van fer servir metafases en primera divisió post-irradiació. És en aquesta primera divisió on les cromàtides germanes trencades poden unir els seus extrems, generant una estructura similar a un anell de cromàtides. Les mostres es van tenyir amb Leishman per tal de preservar el màxim possible l'estructura cromosòmica i les anàlisis es van dur a terme a cegues, amb els portes codificats. Durant el rastreig dels portes es van anotar les coordenades de les metafases que presentaven fragments centrals o acèntrics amb el característic aspecte arrodonit corresponent a una possible fusió de les seves cromàtides. Un cop finalitzat el rastreig, es va aplicar una FISH telomèrica sobre els mateixos portes i les metafases van ser relocalitzades. Si les cromàtides dels fragments prèviament anotats no presentaven senyal telomèric es considerava que les cromàtides germanes estaven fusionades.

10. BINUCLEATS

Per tal d'analitzar la presència de ponts nucleoplasmàtics en els **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** es va procedir a l'obtenció de binucleats mitjançant l'ús de citocalasina B (Sigma-Aldrich), un blocant de la citocinesi. La citocalasina B (2mg/ml) es va afegir al cultiu de MEFs 40h després de la irradiació (0 i 2Gy) a una concentració final de 6µg/ml i es va deixar actuar durant 30 hores. A continuació es van tripsinitzar i recollir les cèl·lules molt suaument i es van centrifugar a 400g. Seguidament les cèl·lules van ser resuspeses en medi hipotònic fred (KCl 0,075M), seguit de 3 fixacions amb metanol-acètic (3:1). Durant tot aquest procés la resuspensió del material ha de ser molt suau i duta a terme amb molta cura. Les centrifugacions sempre es van realitzar a 400g. La suspensió de binucleats es va guardar a -20°C fins al moment de tirar les gotes sobre els portes (a una distància molt propera al porta i suaument per evitar el trencament dels ponts i del citoplasma).

Per tal d'analitzar els binucleats i la presència o absència de ponts nucleoplasmàtics, els portes es van tenyir amb Leishman. Aquesta tinció permet valorar amb extrema certesa la presència d'un únic citoplasma al voltant de dos nuclis, així com la presència de ponts, fins i tots els més primers. Els criteris de recompte de binucleats i ponts es van ajustar als descrits

per Fenech i col·laboradors (2003). Es va realitzar un recompte de binucleats i de ponts nucleoplasmàtics en MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-} irradiats i no irradiats i es van anotar les coordenades d'aquells binucleats que presentaven ponts nucleoplasmàtics. Posteriorment els portes van ser destenyits amb sèries d'etanols i rentats amb 1xPBS. Un cop destenyits, els portes es van sotmetre a un tractament amb pepsina, seguit d'una post-fixació amb formaldehid al 4%. Els binucleats que presentaven ponts nucleoplasmàtics anteriorment comptabilitzats van ser relocalitzats i la seva imatge capturada per tal d'analitzar la presència de telòmers en l'estructura del pont.

11. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR

Per tal d'analitzar l'eficiència de l'aturada del cicle cel·lular a G1 en els **MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}** es van fer servir bateries de cultius en creixement exponencial no sincronitzats. Una sèrie de cultius que havien patit entre 2 i 4 PDs (*population doublings*) i amb una densitat cel·lular del 50-60% van ser irradiats a 0 i 7Gy i retornats a l'incubador. Les mostres van ser recollides a diferents temps (4, 8, 12 i 24h p.i.), es van tripsinitzar, centrifugar i rentar en 1xPBS tres vegades per ser finalment fixades en etanol 70%. La fixació en etanol ha de ser d'un mínim de 2h; a partir d'aquest temps les mostres es poden conservar 7 dies a 4°C i durant mesos a -20°C. Després de la fixació les cèl·lules es van centrifugar, resuspendre en 1xPBS durant 1 minut i centrifugades de nou. El *pellet* obtingut va ser resuspès en 1 ml de solució de iodur de propidi²¹, un agent intercalant del DNA de color vermell fluorescent. Un cop tenyides, les mostres van ser analitzades per citometria de flux (FACSCalibur; Becton, Dickinson and Company). Per tal d'avaluar l'aturada del cicle a G1 es va calcular la relació G1/S als diferents temps p.i. en tres experiments diferents. Una relació G1/S elevada indica un gran nombre de cèl·lules en G1, mentre que una relació baixa indica un gran nombre de cèl·lules en S. El seu càlcul a diferents temps p.i. és indicador del nombre de cèl·lules que avancen des de G1 a S, i per tant de la magnitud de l'aturada a G1 com a conseqüència de la irradiació.

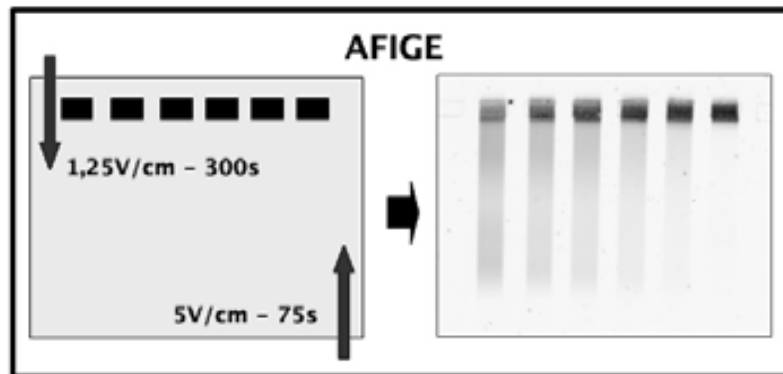
12. AFIGE (*asymmetrical field inversion gel electrophoresis*)

L'AFIGE és una tècnica d'electroforesi modificada que permet avaluar la cinètica de reunió o reparació de fragments trencats d'una mostra de DNA. En una electroforesi convencional s'aplica un corrent elèctric que afavoreix la migració del DNA en funció de la seva mida des del pol negatiu al pol positiu, però no discrimina tot el rang de fragments presents degut al fenomen de reptació²². A l'AFIGE s'alternen dos corrents elèctrics de diferents intensitats i en

²¹ **Tinció amb solució de iodur de propidi:** A 10 ml de 0,1% Tritó X-100 en 1xPBS s'afegeixen 200 µl de iodur de propidi (1mg/ml) + 1 ml d'RNAsa A (2mg/ml) prèviament bullida.

²² Sota les condicions constants de voltatge i temps de l'electroforesi convencional, les molècules més grans de DNA s'orienten en la direcció del camp elèctric i es mouen a una determinada velocitat independentment del seu pes molecular; de manera que el DNA molt gran corre a velocitats similars al DNA més petit mentre que les mides intermèdies tenen una mobilitat propera a 0.

sentit invers l'un de l'altre. Aquesta metodologia força al DNA de menor pes molecular a migrar en la direcció de menor voltatge si s'apliquen temps relativament llargs en aquesta direcció. El resultat és que les molècules de DNA més grans no surten dels pous mentre que les més petites migren en funció de la seva mida.



Aquesta tècnica ens va permetre realitzar l'anàlisi de la cinètica de reparació de DSBs per les **cèl·lules limfoblàstoides** i pels **MEFs** irradiats i no irradiats. Les cèl·lules limfoblàstoides van ser cultivades fins assolir la fase *plateau* i els MEFs es van cultivar fins assolir la confluència en cultiu. Per tal d'aturar les cèl·lules, aquestes es van refredar a 4°C i van ser immediatament irradiades -sobre gel- a una dosi de 30Gy, sota una font de raigs X. Després de la irradiació les cèl·lules es van retornar a l'incubador a 37°C per permetre la reparació del DNA, i es van processar a diferents temps p.i. (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 i 48h p.i.) amb el tractament següent:

Metodologia: Les cèl·lules limfoblàstoides van ser disgregades, centrifugades, rentades amb 1xPBS i centrifugades de nou. Els MEFs van ser tripsinitzats, centrifugats, rentats amb 1xPBS i centrifugats de nou. Un cop netes, les cèl·lules (qualsevol tipus cel·lular) es resuspenien en 1xPBS a una concentració final de 2×10^6 cèl·lules/ml²³. La suspensió cel·lular en PBS es barrejava amb un volum igual d'una solució d'agarosa²⁴ de baix punt de fusió a l'1%. La barreja era injectada -mitjançant pipetes- en tubs de vidre de 3 mm de diàmetre i es deixava solidificar en gel. Un cop solidificada, la suspensió de cèl·lules en agarosa era extruïda dels tubs de vidre i tallada en blocs cilíndrics de 3mm x 0,5cm. Per tal d'alliberar el DNA de les membranes cel·lulars, aquests blocs se sotmetien immediatament a un tractament de lisi²⁵ durant 20h en un bany a 50°C en agitació. Després de la lisi, els blocs d'agarosa es netejaven²⁶ durant 1h a 37°C i durant una altra

²³ Per tal d'aturar la reparació del DNA en les cèl·lules que estaven sent processades i aconseguir així que cada mostra fos representativa de la reparació que havia tingut lloc NOMÉS durant el temps d'incubació a 37°C, tots aquests passos es van realitzar en fred, fent servir centrifugues refrigerades i gel.

²⁴ La **solució d'agarosa de baix punt de fusió a l'1%** es dilueix en el medi de cultiu habitual de les cèl·lules i es suplementa amb 20mM HEPES i amb 5mM NaHCO₃. La solució final es manté calenta fins al moment del seu ús per evitar la seva solidificació.

²⁵ **Solució de lisi:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM EDTA, 50mM NaCl (pH 7.6), N-lauryl-sarcosyl al 2% i 0.2 mg/ml de proteasa.

²⁶ **Solució de neteja:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM EDTA i 50mM NaCl (pH 7.6).

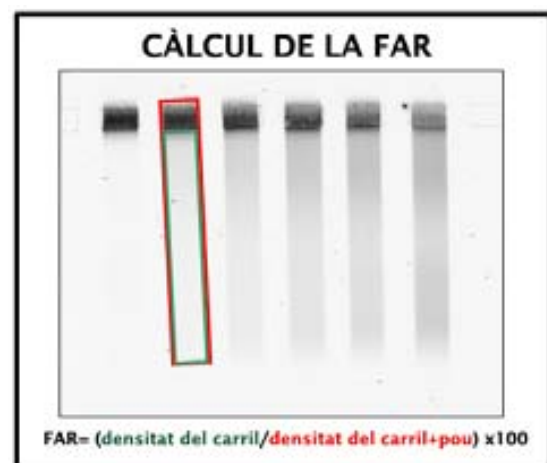
hora en la mateixa solució de neteja a la que s'hi havia afegit RNAsa A (0,1mg/ml). Després de la neteja, els blocs podien ser conservats a 4°C fins al moment de córrer el gel. Aquest procediment es repetia per totes les mostres corresponents als diferents temps p.i.

L'AFIGE es va dur a terme en gels d'agarosa de grau pur al 0,5%. Un bloc d'agarosa corresponent a cada temps p.i. va ser dipositat a cadascun dels pous dels gels. Per tal d'evitar perdre els blocs cilíndrics en submergir el gels en TBE, els pous amb els blocs eren segellats amb agarosa a l'1%. El gels ja preparats van córrer durant 40h a 8°C en una solució de 0,5xTBE. Durant aquest temps, les mostres van ser sotmeses a cicles de 1,25 V/cm durant 300 segons en la direcció de migració del DNA (negatiu → positiu) alternats amb cicles de 5,0 V/cm durant 75 segons en la direcció contrària. Passades les 40h, els gels d'agarosa es van tenyir en 500ml d'una dilució de bromur d'etidi (0,5µg/ml) durant un mínim de 2h i immediatament després van ser escanejats i quantificats utilitzant el software ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences). Pels càlculs finals es realitzaven dues mesures (AFIGE) per experiment (irradiació) i dos o tres experiments (irradiacions) diferents.

Quantificació

Durant l'AFIGE només migren des del pou cap al carril els fragments de DNA més petits, de manera que la quantitat de DNA alliberat és una mesura indirecta de la quantitat de DNA fragmentat, és a dir, que no ha estat reparat. Així, la quantitat de DSBs pendents d'ésser reparats a un temps determinat es calcula mesurant la quantitat de DNA alliberat al carril corresponent, i s'anomena FAR (*fraction of activity released*). La FAR és la *ratio* entre la quantitat de DNA alliberat (carril) i la fracció de DNA total (pou + carril). La FAR resultant de les mostres no irradiades es

considera el nivell de *background* del gel i el seu valor es resta als valors de FAR obtinguts en les mostres irradiades.



Resposta a la Dosi

L'AFIGE es basa en la mesura de la FAR com un indicador de la quantitat de DSBs alliberats al gel. Per tal de validar aquesta presumpció es van realitzar els experiments de Resposta a la Dosi d'irradiació per cada tipus cel·lular. En aquest experiments se sotmet una bateria de mostres dels diferents tipus cel·lulars a dosis creixents de radiació (0, 10, 20, 30, 40 i 60Gy). L'objectiu d'aquest experiment es comprovar el tipus de relació entre dosi i FAR dins el rang

de dosi utilitzada en els experiments (en el nostre cas 30Gy). Donat que s'assumeix que la relació entre la inducció de DSBs i la dosi emprada és lineal, una relació lineal entre FAR i dosi implicaria una relació lineal entre FAR i DSBs presents. Si es confirma aquesta relació lineal entre FAR i dosi podem avaluar la reunió de DSBs mitjançant la relació entre les mesures de la FAR obtingudes i el temps p.i. Per realitzar els experiments de Resposta a la Dosi es va fer servir la mateixa metodologia abans descrita, amb la particularitat que es preparaven les cèl·lules en blocs d'agarosa prèviament a la irradiació i els blocs se sotmetien a diferents dosis d'irradiació. Per obtenir els càlculs finals també es realitzaven dues mesures (AFIGE) per experiment i tres experiments diferents.

13. TRAP (*telomeric-repeat amplification protocol*)

Per avaluar la presència d'activitat telomerasa en les **cèl·lules limfoblàstoids** es va obtenir extracte proteic d'ambdues línies i es va avaluar la presència de telomerasa activa en aquest extracte mitjançant l'ús d'un *kit* comercial (TRAPeze, *Telomerase detection kit*, INTERGEN) basat en la tècnica de PCR.

Obtenció de l'extracte proteic: Es va obtenir extracte proteic de les cèl·lules AT i normals no irradiades i 24h després de ser irradiades (1Gy de raigs γ sota una font de ^{60}Co , taxa: 0,5Gy/minut). Les cèl·lules es van resuspendre, es va fer un recompte de les mateixes i es van rentar amb 1xPBS fred (4°C) dues vegades per ser finalment resuspeses en alíquotes de 10^5 i 3×10^5 cèl·lules en 100 i 300 μl de solució CHAPS freda (4°C) respectivament. La solució CHAPS²⁷ lliça la membrana plasmàtica i l'embolcall nuclear, alliberant així l'enzim telomerasa. Després de 30 minuts de tractament, les alíquotes es van centrifugar a 15300 rpm durant 45 minuts en fred (4°C) i es va recuperar el sobrenedant, que conté l'extracte proteic. Les alíquotes amb l'extracte proteic es van conservar a -80°C fins al moment de la PCR.

TRAP: La PCR que permet valorar la presència i quantitat d'activitat telomerasa en una mostra consta d'una incubació a 30°C durant 30 minuts anomenada **reacció d'elongació**, seguida de la reacció d'amplificació típica. L'elongació permet a la telomerasa -si està present en l'extracte proteic- afegir repeticions telomèriques (GGTTAG)_n a l'extrem 3' d'un oligonucleòtid substrat (TS) de 50bp. Donat que la telomerasa afegeix repeticions de 6 nucleòtids, després del procés d'elongació s'hauran obtingut diferents productes amb increments exponencials de 6 parells de bases entre ells: 50bp (la telomerasa no ha afegit cap repetició a l'oligonucleòtid TS), 56bp (la telomerasa ha afegit una repetició), 62bp (la telomerasa ha afegit dues repeticions) etc. La segona part de la PCR permet amplificar aquests productes mitjançant l'ús de dos encebadors: TS i el seu revers; RP. D'aquesta

²⁷ **Solució CHAPS:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 0,5% CHAPS, 5mM β -mercaptoetanol, 0,1 mM benzamidina (subministrada pel *kit*).

manera, si la telomerasa és present a l'extracte proteic problema i ha elongat l'oligonucleòtid TS afegint diferents quantitats de *repeats* telomèrics, el resultat final de la PCR visible al gel serà una escala de bandes de pes molecular creixent en intervals de 6bp de diferència (Veure exemple a la secció Annex de Resultats).

Finalment, el *kit* conté un altre encebador anomenat K1 i el seu substrat (TSK1), que amplifiquen un producte de 36bp que funciona com a control estàndard intern (S-IC). L'amplificació d'aquest producte no depèn de l'extracte proteic sinó de les condicions de la PCR i de la Taq polimerasa, de manera que **sempre** és amplificat. La no amplificació d'aquest producte indicaria la presència d'inhibidors de la Taq polimerasa a la mostra analitzada.

Controls utilitzats: paral·lelament a les mostres problema, en realitzar un experiment de TRAP sempre es van utilitzar els següents controls:

Control inactivat per calor: La telomerasa és un enzim que s'inactiva amb la calor. Per tal de descartar falsos positius, per a cada extracte es van realitzar 2 assaigs: l'extracte problema i el mateix extracte sotmès a un tractament amb calor. La inactivació de la telomerasa per calor en es va dur a terme incubant l'extracte proteic a 85°C durant 10 minuts prèviament a la PCR. En el carril corresponent a aquest control només hauria d'amplificar la banda del control estàndard intern (S-IC) de 36bp.

Control positiu: el *kit* subministra extracte proteic obtingut a partir de cèl·lules que presenten una robusta activitat telomerasa. En el carril corresponent a aquest control hauria d'aparèixer la típica escala de bandes amb 6bp de diferència.

Control de la formació de dímers o de contaminació (BLANC): Per cada PCR es va preparar un blanc on l'extracte proteic problema va ser substituït per solució CHAPS (2µl). En el carril corresponent a aquest control només hauria d'amplificar la banda del control estàndard intern (S-IC) de 36bp. En cas que apareguessin altres bandes, aquestes podrien ser degudes a artefactes generats a conseqüència de la formació de dímers entre els encebadors, o bé a la presència d'una contaminació per telomerasa en algun dels components emprats per la PCR.

Control de quantificació TSR8: Per cada PCR es va preparar un control de quantificació on l'extracte proteic problema va ser substituït per TSR8 (2µl). El TSR8 és un oligonucleòtid amb una seqüència idèntica al TS però que ja conté una elongació de 8 repeticions telomèriques (98 bp). La presència d'aquest control té una funció bàsicament quantitativa, ja que ens permet inferir la quantitat d'activitat telomerasa que té una mostra comparant les bandes del seu carril amb les que es generen a la mostra problema.

PCR: La PCR es va realitzar seguint les instruccions del *kit*²⁸. El programa constava de:

- 1. Fase d'elongació:** 30 minuts a 30°C.
- 2. Fase d'amplificació:** 30 segons a 94°C i 30 segons a 59°C, durant 31 cicles²⁹.

Anàlisi dels productes amplificats: Els productes amplificats a la PCR es van analitzar mitjançant PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) en un gel al 12,8 % de poliacrilamida en 1xTBE que es va córrer durant 30 minuts a 200V seguit d'110 minuts a 400V. El gel es va tenyir amb SYBR[®]Green³⁰ (Molecular Probes) diluït en 1xTBE (1:10000) durant 40 minuts. El gel va ser visualitzat i analitzat amb un transil·luminador de llum UV amb càmera i software acoblat GEL DOC 1000 (BioRad).

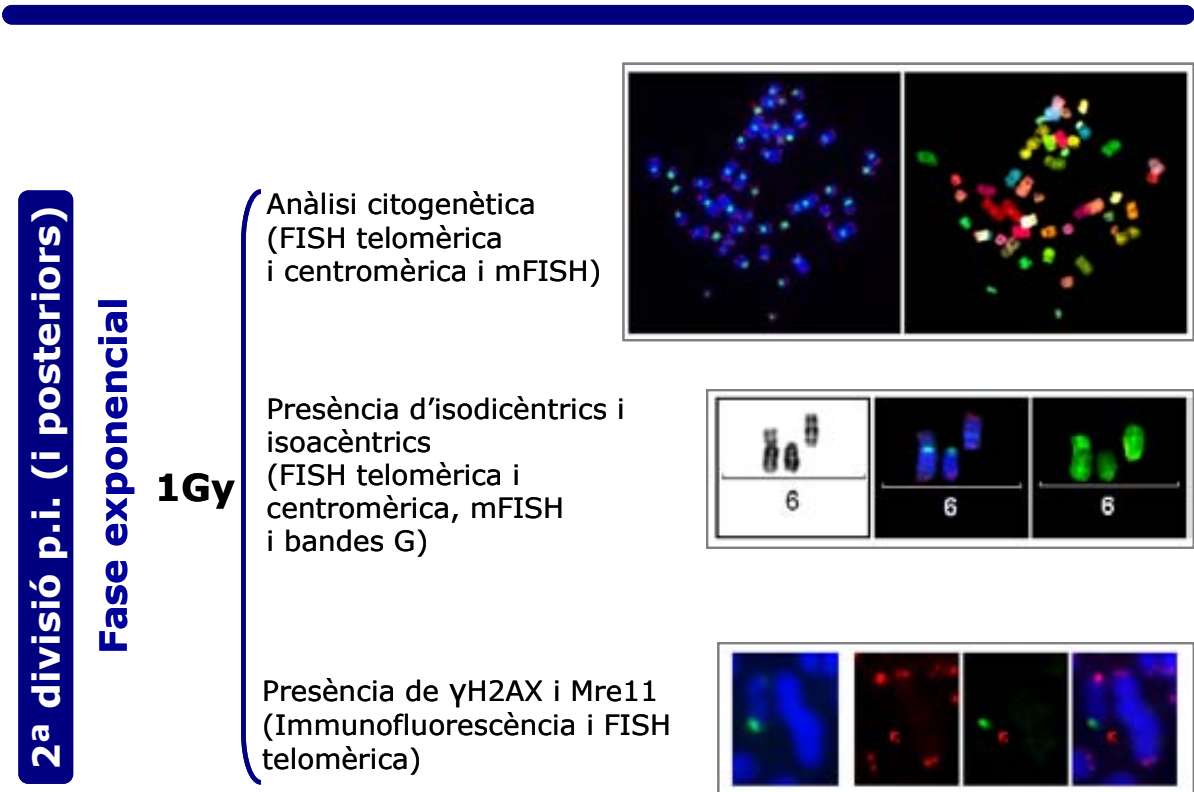
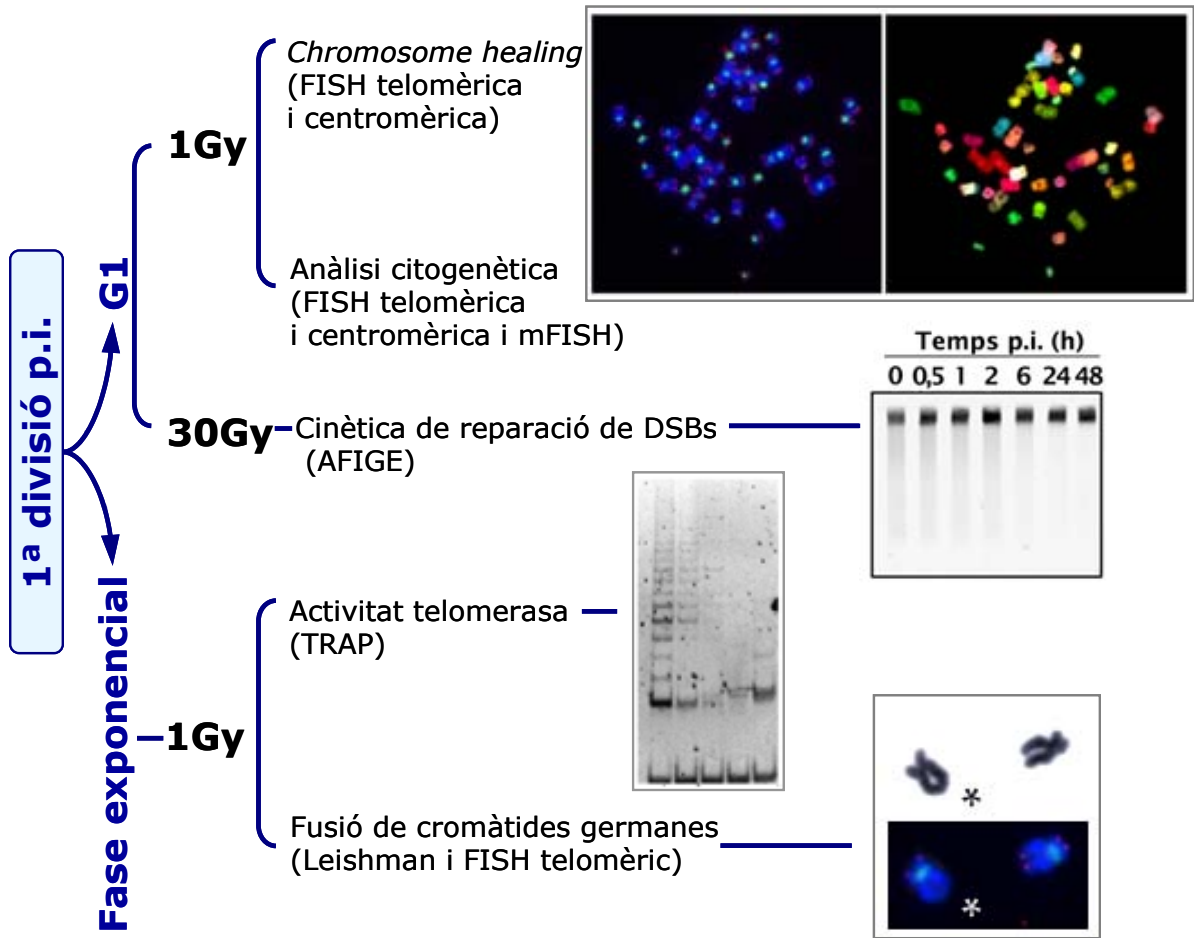
²⁸ El TRAPeZe[®] subministra el *buffer* CHAPS de lisi, el *buffer* TRAP per la PCR, la barreja de nucleòtids, d'encebadors i l'aigua. També especifica les dilucions i les concentracions finals a la PCR per cada reactiu.

²⁹ La primera pujada de temperatura fins a 94°C inactiva la telomerasa present a l'extracte proteic.

³⁰ SYBR[®]Green és un colorant per gels d'agarosa i poliacrilamida que presenta una major afinitat i adhesió als àcids nucleics que el bromur d'etidi. A més a més, la seva mutagenicitat és inferior a la del bromur d'etidi. La màxima emissió de fluorescència del SYBR[®]Green es produeix en ser excitat amb una font de llum UV a 254 ó 300nm.

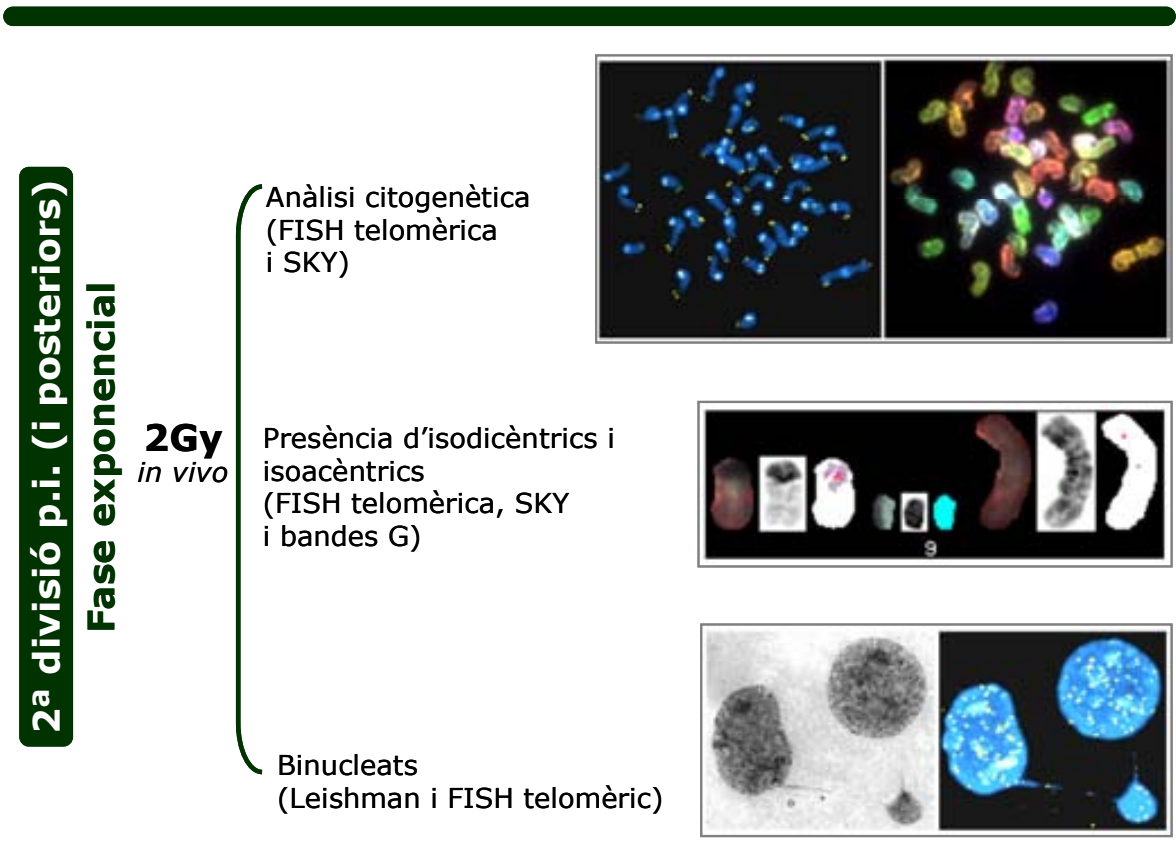
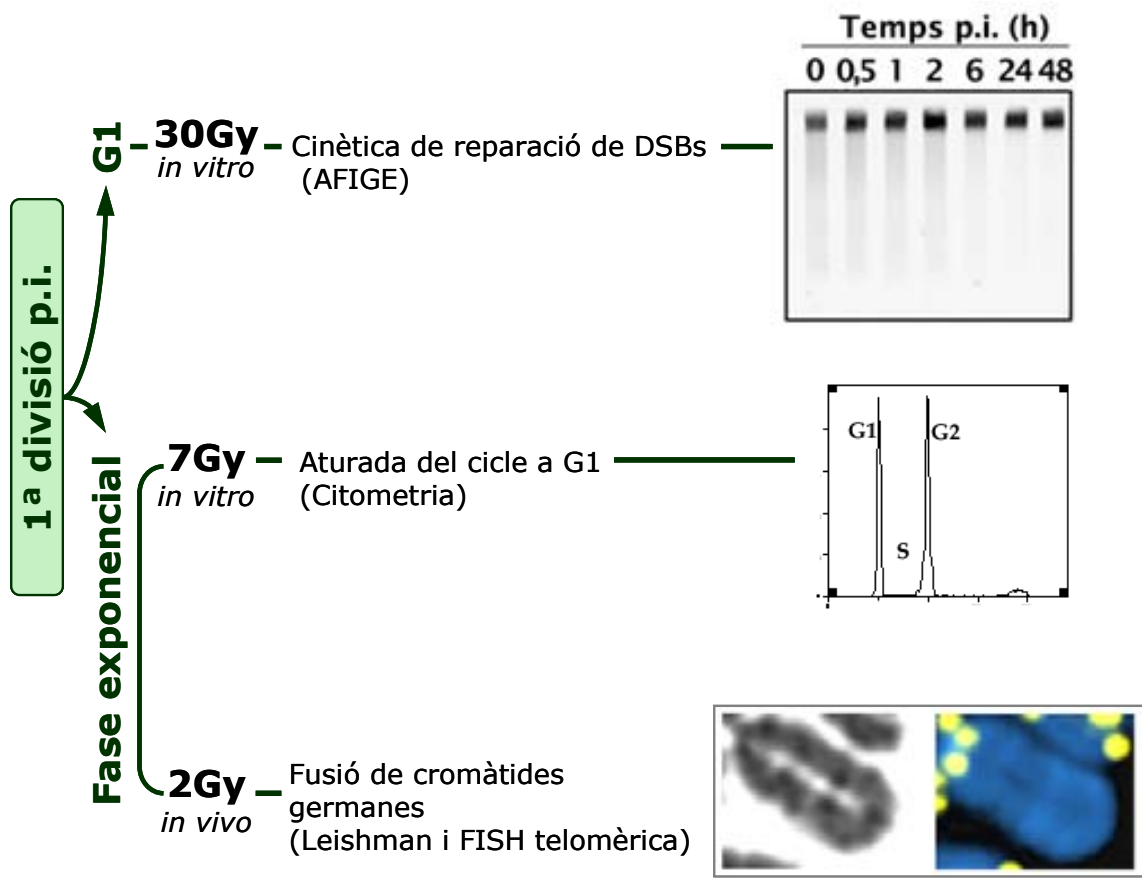
Cèl·lules limfoblàstoids AT i normals

Fase Dosi Anàlisi (Metodologia)



MEFs DNA-PKcs^{+/+} i DNA-PKcs^{-/-}

Fase Dosi Anàlisi (Metodologia)



BIBLIOGRAFIA

A

- Abraham, R.T. and R.S. Tibbetts, *Guiding ATM to Broken DNA*. *Science*, 2005. **308**(5721): p. 510-511.
- Acilan, C., D.M. Potter, and W.S. Saunders, *DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2007. **46**(6): p. 522-531.
- Ahnesorg, P., P. Smith, and S.P. Jackson, *XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 301-313.
- Allen, C., et al., *DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(6): p. 3758-3763.
- Allen, C., J. Halbrook, and J.A. Nickoloff, *Interactive Competition Between Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(12): p. 913-920.
- Arakawa, H., *p53, apoptosis and axon-guidance molecules*. 2005. **12**(8): p. 1057-1065.

B

- Bailey, S.M., et al., *DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(26): p. 14899-14904.
- Bailey, S.M., et al., *Strand-Specific Postreplicative Processing of Mammalian Telomeres*. *Science*, 2001. **293**(5539): p. 2462-2465.
- Bailey, S.M., et al., *The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres*. *DNA Repair*, 2004. **3**(3): p. 225-233.
- Bailey, S.M., et al., *Dysfunctional mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks*. *DNA Repair*, 2004. **3**(4): p. 349-357.
- Bailey, S.M. and J.P. Murnane, *Telomeres, chromosome instability and cancer*. *Nucl. Acids Res.*, 2006. **34**(8): p. 2408-2417.
- Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. 2003. **421**(6922): p. 499-506.
- Bassing, C.H., et al., *Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(12): p. 8173-8178.
- Beckman, K.B. and B.N. Ames, *Oxidative Decay of DNA*. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**(32): p. 19633-19636.
- Blasco, M.A., et al., *Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA*. *Cell*, 1997. **91**(1): p. 25-34.
- Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. *Nature Reviews Genetics*, 2005. **6**(8): p. 611-622.
- Boskovic, J., et al., *Visualization of DNA-induced conformational changes in the DNA repair kinase DNA-PKcs*. *EMBO Journal*, 2003. **22**: p. 5875-5882.
- Bredemeyer, A.L., et al., *ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination*. 2006. **442**(7101): p. 466-470.
- Bredemeyer, A.L., et al., *Aberrant V(D)J Recombination in Ataxia Telangiectasia Mutated-Deficient Lymphocytes Is Dependent on Nonhomologous DNA End Joining*. *J Immunol*, 2008. **181**(4): p. 2620-2625.
-

- Buck, D., et al., *Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 287-299.
- Burma, S., et al., *DNA-dependent Protein Kinase-independent Activation of p53 in Response to DNA Damage*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(24): p. 17139-17143.
- Burma, S., et al., *ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(45): p. 42462-42467.
- Burma, S. and D.J. Chen, *Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks*. *DNA Repair-BRIDGE OVER BROKEN ENDS - The Cellular Response to DNA Breaks in Health and Disease*, 2004. **3**(8-9): p. 909-918.
- Burma, S., B.P.C. Chen, and D.J. Chen, *Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity*. *DNA Repair-Mechanisms of chromosomal translocation*, 2006. **5**(9-10): p. 1042-1048.

C

- Cadet, J., et al., *Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Oxidative DNA Damage and its Repair Base Excision Repair*, 2003. **531**(1-2): p. 5-23.
- Callen, E., et al., *ATM Prevents the Persistence and Propagation of Chromosome Breaks in Lymphocytes*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 63-75.
- Calsou, P., et al., *Coordinated Assembly of Ku and p460 Subunits of the DNA-dependent Protein Kinase on DNA Ends is Necessary for XRCC4-ligase IV Recruitment*. *Journal of Molecular Biology*, 2003. **326**(1): p. 93-103.
- Cavaciuti, E., et al., *Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2005. **42**(1): p. 1-9.
- Celeste, A., et al., *Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX*. *Science*, 2002. **296**(5569): p. 922-927.
- Celeste, A., et al., *Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks*. 2003. **5**(7): p. 675-679.
- Chan, D.W., et al., *Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks*. *Genes Dev.*, 2002. **16**(18): p. 2333-2338.
- Charames, G. and B. Bapat, *Genomic instability and cancer*. *Current Molecular Medicine*, 2003. **3**(7): p. 589-596.
- Chen, F., et al., *Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52*. *Mutation Research*, 1997. **384**(3): p. 205-211.
- Chen, B.P.C., et al., *Cell Cycle Dependence of DNA-dependent Protein Kinase Phosphorylation in Response to DNA Double Strand Breaks*. *J. Biol. Chem.*, 2005. **280**(15): p. 14709-14715.
- Chen, L., et al., *Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage*. *Cancer Science*, 2005. **96**(2): p. 134-141.
- Chen, B.P.C., et al., *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Is Essential for DNA-PKcs Phosphorylations at the Thr-2609 Cluster upon DNA Double Strand Break*. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282**(9): p. 6582-6587.
- Cornforth, M.N. and J. Bedford, *On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia*. *Science*, 1985. **29**(227): p. 1589-1591.
- Costantini, S., et al., *Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK*. *DNA Repair*, 2007. **6**(6): p. 712-722.
-

Cui, X., et al., *Autophosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Regulates DNA End Processing and May Also Alter Double-Strand Break Repair Pathway Choice*. Mol. Cell. Biol., 2005. **25**(24): p. 10842-10852.

Cui, X., et al., *Autophosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Regulates DNA End Processing and May Also Alter Double-Strand Break Repair Pathway Choice*. Mol. Cell. Biol., 2005. **25**(24): p. 10842-10852.

D

Dahm, K., *Functions and regulation of human artemis in double strand break repair*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **100**(6): p. 1346-1351.

Delacote, F., et al., *An xrcc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells*. Nucl. Acids Res., 2002. **30**(15): p. 3454-3463.

Denchi, E.L. and T. de Lange, *Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1*. 2007. **448**(7157): p. 1068-1071.

Déry, U. and J.-Y. Masson, *Twists and turns in the function of DNA damage signaling and repair proteins by post-translational modifications*. DNA Repair, 2007. **6**(5): p. 561-577.

DiBiase, S.J., et al., *DNA-dependent Protein Kinase Stimulates an Independently Active, Nonhomologous, End-Joining Apparatus*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1245-1253.

Douglas, P., et al., *DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining*. DNA Repair, 2005. **4**(9): p. 1006-1018.

Douglas, P., et al., *The DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Phosphorylated In Vivo on Threonine 3950, a Highly Conserved Amino Acid in the Protein Kinase Domain*. Mol. Cell. Biol., 2007. **27**(5): p. 1581-1591.

E

Espejel, S., et al., *Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance*. EMBO Journal, 2002. **21**(22): p. 6275-6287.

Espejel, S., et al., *Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs deficient mice*. EMBO reports, 2004. **5**(5): p. 503-509.

F

Feldser, D., M.A. Strong, and C.W. Greider, *Ataxia telangiectasia mutated (Atm) is not required for telomerase-mediated elongation of short telomeres*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(7): p. 2249-2251.

Fenech, M., et al., *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003. **534**(1-2): p. 65-75.

Fernandez-Capetillo, O., et al., *H2AX: the histone guardian of the genome*. DNA Repair, 2004. **3**(8-9): p. 959-967.

Flint, J., et al., *Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats*. American Journal of Human Genetics, 1994. **55**(3): p. 505-512.

Foray, N., et al., *Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks*. International Journal of Radiation Biology, 1997. **72**(3): p. 271-283.

Franco, S., et al., *H2AX Prevents DNA Breaks from Progressing to Chromosome Breaks and Translocations*. *Molecular Cell*, 2006. **21**(2): p. 201-214.

Frank-Vaillant, M. and S. Marcand, *Transient Stability of DNA Ends Allows Nonhomologous End Joining to Precede Homologous Recombination*. *Molecular Cell*, 2002. **10**(5): p. 1189-1199.

Fukasawa, K., *Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development*. *Cancer Letters*, 2005. **230**(1): p. 6-19.

Fukushima, T., et al., *Genetic Analysis of the DNA-dependent Protein Kinase Reveals an Inhibitory Role of Ku in Late S-G2 Phase DNA Double-strand Break Repair*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**(48): p. 44413-44418.

Furuta, T., et al., *Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(22): p. 20303-20312.

G

Gao, Q., et al., *Telomerase-dependent and -independent chromosome healing in mouse embryonic stem cells*. *DNA Repair*, 2008. **7**(8): p. 1233-1249.

Gatti, R.A., et al., *Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23*. 1988. **336**(6199): p. 577-580.

Gilley, D., et al., *DNA-PKcs is critical for telomere capping*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. **98**(26): p. 15084-15088.

Gisselsson, D., et al., *Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(10): p. 5357-5362.

Gisselsson, D., et al., *Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. **98**(22): p. 12683-12688.

Goodarzi, A.A., et al., *DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity*. *EMBO Journal*, 2006. **25**: p. 3880-3889.

Goytisolo, F.A., et al., *The Absence of the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in Mice Results in Anaphase Bridges and in Increased Telomeric Fusions with Normal Telomere Length and G-Strand Overhang*. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. **21**(11): p. 3642-3651.

Griffith, J.D., et al., *Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop*. *Cell*, 1999. **97**(4): p. 503-514.

Gurley, K.E. and C.J. Kemp, *Synthetic lethality between mutation in Atm and DNA-PKcs during murine embryogenesis*. *Current Biology*, 2001. **11**(3): p. 191-194.

H

Hammarsten, O., L.G. DeFazio, and G. Chu, *Activation of DNA-dependent Protein Kinase by Single-stranded DNA Ends*. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(3): p. 1541-1550.

Hartley, K.O., et al., *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: A relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product*. *Cell*, 1995. **82**(5): p. 849-856.

Hecht, F. and B. Hecht, *Cancer in ataxia-telangiectasia patients*. *Cancer Generics and Cytogenetics*, 1990. **46**(1): p. 9-19.

Helleday, T., et al., *DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment*. *DNA Repair-Replication Fork Repair Processes*, 2007. **6**(7): p. 923-935.

Hirao, A., et al., *DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2*. *Science*, 2000. **287**(5459): p. 1824-1827.

Hodes, R.J., K.S. Hathcock, and N.-p. Weng, *Telomeres in T and B cells*. 2002. **2**(9): p. 699-706.

Honma, M., et al., *Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells*. *DNA Repair*, 2007. **6**(6): p. 781-788.

Hsu, H.-L., S.M. Yannone, and D.J. Chen, *Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4*. *DNA Repair*, 2002. **1**(3): p. 225-235.

Hug, N. and J. Lingner, *Telomere length homeostasis*. *Chromosoma*, 2006. **115**(6): p. 413-425.

I

Ichijima, Y., et al., *Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **336**(3): p. 807-812.

J

Jeggo, P.a. and M. Lobrich, *Artemis links ATM to Double Strand Break Rejoining*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(3): p. 359-362.

Jeppesen, P., *Immunofluorescence in cytogenetic analysis: method and applications*. *Genetics and Molecular Biology*, 2000. **23**(4): p. 1107-1114.

Jhappan, C., et al., *The p53 Response to DNA Damage In Vivo Is Independent of DNA-Dependent Protein Kinase*. *Mol. Cell. Biol.*, 2000. **20**(11): p. 4075-4083.

Jin, S. and D.T. Weaver, *Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions*. *EMBO Journal*, 1997. **16**: p. 6874-6885.

Johnson, R.D. and M. Jasin, *Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells*. *EMBO Journal*, 2000. **19**(3398-3407).

Jonnalagadda, V.S., T. Matsuguchi, and B.P. Engelward, *Interstrand crosslink-induced homologous recombination carries an increased risk of deletions and insertions*. *DNA Repair*, 2005. **4**(5): p. 594-605.

Jullien, D., et al., *Kinetochore localisation of the DNA damage response component 53BP1 during mitosis*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(1): p. 71-79.

K

Karlseder, J., et al., *p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2*. *Science*, 1999. **283**(5406): p. 1321-1325.

Karlsson, K.H. and B. Stenerlöv, *Focus Formation of DNA Repair Proteins in Normal and Repair-Deficient Cells Irradiated with High-LET Ions*. *Radiation Research*, 2004: p. 517-527.

Kato, T.A., et al., *Levels of gamma-H2AX Foci after Low-Dose-Rate Irradiation Reveal a DNA DSB Rejoining Defect in Cells from Human ATM Heterozygotes in Two AT Families and in Another Apparently Normal Individual*. *Radiation Research*, 2006: p. 443-453.

Kim, J.-S., et al., *Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells*. *J. Cell Biol.*, 2005. **170**(3): p. 341-347.

Krangel, M.S., *Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond*. 2003. **4**(7): p. 624-630.

Krempler, A., et al., *An Imperfect G2M Checkpoint Contributes to Chromosome Instability Following Irradiation of S and G2 Phase Cells*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(14): p. 1682-1686.

Kuhne, M., et al., *A Double-Strand Break Repair Defect in ATM-Deficient Cells Contributes to Radiosensitivity*. *Cancer Res*, 2004. **64**(2): p. 500-508.

Kurz, E.U. and S.P. Lees-Miller, *DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways*. *DNA Repair*, 2004. **3**(8-9): p. 889-900.

L

Latre, L., et al., *Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair*. *Experimental Cell Research*, 2003. **287**(2): p. 282-288.

Lavin, M.F. and Y. Shiloh, *The genetic defect in ataxia-telangiectasia*. *Annual Review of Immunology*, 1997. **15**(1): p. 177-202.

Lavin, M.F., *The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks*. *DNA Repair*, 2004. **3**(11): p. 1515-1520.

Lee, S., et al., *Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle*. *Mol. Cell. Biol.*, 1997. **17**(3): p. 1425-1433.

Lee, J.-H. and T.T. Paull, *Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex*. *Science*, 2004. **304**(5667): p. 93-96.

Lee, K.-J., et al., *Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutations at these sites on DNA end joining in a cell-free system*. *DNA Repair*, 2004. **3**(3): p. 267-276.

Lee, J.-H. and T.T. Paull, *ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex*. *Science*, 2005. **308**(5721): p. 551-554.

Lees-Miller, S.P., et al., *Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53*. *Mol. Cell. Biol.*, 1992. **12**(11): p. 5041-5049.

Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. 1998. **396**(6712): p. 643-649.

Llorca, O., et al., *Electron microscopy and 3D reconstructions reveal that human ATM kinase uses an arm-like domain to clamp around double-stranded DNA*. 2003. **22**(25): p. 3867-3874.

Lou, Z., et al., *MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals*. *Molecular Cell*, 2006. **21**(2): p. 187-200.

Löbrich, M., et al., *Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2000. **27**(1): p. 59-68.

M

Ma, Y., et al., *Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination*. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 781-794.

Mangahas, J.L., et al., *Repair of Chromosome Ends after Telomere Loss in Saccharomyces*. *Mol. Biol. Cell*, 2001. **12**(12): p. 4078-4089.

Mao, Z., et al., *Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells*. *DNA Repair*, 2008. **7**(10): p. 1765-1771.

Marcand, S., et al., *Cell cycle restriction of telomere elongation*. *Current Biology*, 2000. **10**(8): p. 487-490.

- Martensson, S. and O. Hammarsten, *DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR KINASE ACTIVATION BY DNA ENDS*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(4): p. 3020-3029.
- Martín, M., et al., *Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open*. International Journal of Radiation Biology, 2003. **79**(3): p. 203-210.
- Maser, R.S., et al., *DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Not Required for Dysfunctional Telomere Fusion and Checkpoint Response in the Telomerase-Deficient Mouse*. Mol. Cell. Biol., 2007. **27**(6): p. 2253-2265.
- Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-1166.
- McClintock, B., *The stability of broken ends of chromosomes in Zea Mays*. Genetics, 1941. **26**(2): p. 234-282.
- Meek, K., et al., *trans Autophosphorylation at DNA-Dependent Protein Kinase's Two Major Autophosphorylation Site Clusters Facilitates End Processing but Not End Joining*. Mol. Cell. Biol., 2007. **27**(10): p. 3881-3890.
- Metcalf, J.A., et al., *Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia*. 1996. **13**(3): p. 350-353.
- Mirzoeva, O.K. and J.H.J. Petrini, *DNA Damage-Dependent Nuclear Dynamics of the Mre11 Complex*. Mol. Cell. Biol., 2001. **21**(1): p. 281-288.
- Mitelman, F. and S. Heim, *Quantitative acute leukemia cytogenetics*. Genes Chromosomes Cancer, 1992. **5**(1): p. 57-66.
- Moshous, D., et al., *Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency*. Cell, 2001. **105**(2): p. 177-186.
- Mukherjee, B., et al., *DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells*. DNA Repair, 2006. **5**(5): p. 575-590.

N

- Nergadze, S., et al., *Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution*. Genome Biology, 2007. **8**(12): p. R260.
- Nick McElhinny, S.A., et al., *Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends*. Mol. Cell. Biol., 2000. **20**(9): p. 2996-3003.
- Nowak, M.A., et al., *The role of chromosomal instability in tumor initiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(25): p. 16226-16231.

O

- O'Driscoll, M. and P.A. Jeggo, *The role of double-strand break repair - insights from human genetics*. 2006. **7**(1): p. 45-54.

P

- Park, J.-S., et al., *Involvement of DNA-dependent Protein Kinase in UV-induced Replication Arrest*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(45): p. 32520-32527.
- Paull, T.T., et al., *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Current Biology, 2000. **10**(15): p. 886-895.
- Peng, Y., et al., *Deficiency in the Catalytic Subunit of DNA-Dependent Protein Kinase Causes Down-Regulation of ATM*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1670-1677.
-

Pennaneach, V., C.D. Putnam, and R.D. Kolodner, *Chromosome healing by de novo telomere addition in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 2006. **59**(5): p. 1357-1368.

Poinsignon, C., et al., *Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage*. European Journal of Immunology, 2004. **34**(11): p. 3146-3155.

Prokopcova, J., et al., *The role of ATM in breast cancer development*. Breast Cancer Research and Treatment, 2007. **104**(2): p. 121-128.

Q

Qi, L., et al., *Short Telomeres and Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficiency Cooperatively Increase Telomere Dysfunction and Suppress Tumorigenesis*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8188-8196.

R

Riballo, E., et al., *A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to gamma-H2AX Foci*. Molecular Cell, 2004. **16**(5): p. 715-724.

Rios-Doria, J., et al., *DNA Damage Response: Determining the Fate of Phosphorylated Histone H2AX*. Cancer Biology & Therapy, 2006. **5**(2): p. 142-144.

Rivera-Calzada, A., et al., *Three-Dimensional Structure and Regulation of the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit (DNA-PKcs)*. Structure, 2005. **13**(2): p. 243-255.

Rivera-Calzada, A., et al., *Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs*. EMBO reports, 2007. **8**(1): p. 56-62.

Rogakou, E.P., et al., *DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5858-5868.

Rogakou, E.P., et al., *Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo*. J. Cell Biol., 1999. **146**(5): p. 905-916.

Rooney, S., et al., *Leaky Scid Phenotype Associated with Defective V(D)J Coding End Processing in Artemis-Deficient Mice*. Molecular Cell, 2002. **10**(6): p. 1379-1390.

Rooney, S., et al., *Defective DNA Repair and Increased Genomic Instability in Artemis-deficient Murine Cells*. J. Exp. Med., 2003. **197**(5): p. 553-565.

Roth, D.B., et al., *V(D)J recombination: Broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes*. Cell, 1992. **70**(6): p. 983-991.

Rothkamm, K., et al., *Radiation-induced Genomic Rearrangements Formed by Nonhomologous End-Joining of DNA Double-Strand Breaks*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 3886-3893.

Rothkamm, K. and M. Lobrich, *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(9): p. 5057-5062.

Saleh-Gohari, N. and T. Helleday, *Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells*. Nucl. Acids Res., 2004. **32**(12): p. 3683-3688.

S

Sargent, R., M. Brenneman, and J. Wilson, *Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination*. Mol. Cell. Biol., 1997. **17**(1): p. 267-277.

- Shao, R.-G., et al., *Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes*. EMBO Journal, 1999. **18**: p. 1397-1406.
- Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. 2003. **3**(3): p. 155-168.
- Shiloh, Y. and A.R. Lehmann, *Maintaining integrity*. 2004. **6**(10): p. 923-928.
- Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff, *Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. Cell Research, 2008. **18**(1): p. 134-147.
- Siple, J.D., et al., *Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(16): p. 7515-7519.
- Smogorzewska, A., et al., *DNA Ligase IV-Dependent NHEJ of Deprotected Mammalian Telomeres in G1 and G2*. Current Biology, 2002. **12**(19): p. 1635-1644.
- Spagnolo, L., et al., *Three-Dimensional Structure of the Human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 Complex Assembled on DNA and Its Implications for DNA DSB Repair*. Molecular Cell, 2006. **22**(4): p. 511-519.
- Sprung, C.N., et al., *Normal telomere maintenance in immortal ataxia telangiectasia cell lines*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1997. **379**(2): p. 177-184.
- Stiff, T., et al., *ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2390-2396.
- Stracker, T.H., et al., *The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex*. 2007. **447**(7141): p. 218-221.
- Stucki, M., et al., *MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-1226.
- Stucki, M. and S.P. Jackson, *[gamma]H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes*. DNA Repair, 2006. **5**(5): p. 534-543.

T

- Taccioli, G.E., et al., *Targeted Disruption of the Catalytic Subunit of the DNA-PK Gene in Mice Confers Severe Combined Immunodeficiency and Radiosensitivity*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 355-366.
- Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres*. Current Biology, 2003. **13**(17): p. 1549-1556.
- Takata, M., et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. EMBO Journal, 1998. **17**: p. 5497-5508.
- Taylor, A., et al., *Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia*. Blood, 1996. **87**(2): p. 423-438.
261. Taylor, A.M.R. and P.J. Byrd, *Molecular pathology of ataxia telangiectasia*. J Clin Pathol, 2005. **58**(10): p. 1009-1015.
- Theunissen, J.-W.F., et al., *Checkpoint Failure and Chromosomal Instability without Lymphomagenesis in Mre11ATLD1/ATLD1 Mice*. Molecular Cell, 2003. **12**(6): p. 1511-1523.

U

- Uematsu, N., et al., *Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks*. J. Cell Biol., 2007. **177**(2): p. 219-229.
- Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. EMBO Journal, 2003. **22**: p. 5612-5621.
-

V

van Gent, D.C., J.H.J. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. 2001. **2**(3): p. 196-206.

Verdun, R.E., et al., *Functional Human Telomeres Are Recognized as DNA Damage in G2 of the Cell Cycle*. *Molecular Cell*, 2005. **20**(4): p. 551-561.

Vilenchik, M.M. and A.G. Knudson, *Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(22): p. 12871-12876.

Vispe, S. and M.S. Satoh, *DNA Repair Patch-mediated Double Strand DNA Break Formation in Human Cells*. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(35): p. 27386-27392.

W

Walker, J.R., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair*. 2001. **412**(6847): p. 607-614.

Wang, Y. and W. Eckhart, *Phosphorylation sites in the amino-terminal region of mouse p53*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. **89**(10): p. 4231-4235.

Wang, S., et al., *The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(4): p. 1584-1588.

Wang, H., et al., *Replication Protein A2 Phosphorylation after DNA Damage by the Coordinated Action of Ataxia Telangiectasia-Mutated and DNA-dependent Protein Kinase*. *Cancer Res*, 2001. **61**(23): p. 8554-8563.

Wang, Y.-G., et al., *Phosphorylation and Regulation of DNA Ligase IV Stability by DNA-dependent Protein Kinase*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**(36): p. 37282-37290.

West, A. and H. Attikum, *Chromatin at the crossroads. Meeting on signalling to chromatin epigenetics*. *EMBO reports*, 2006. **7**(12): p. 1206-1210.

Weterings, E. and D.J. Chen, *The endless tale of non-homologous end-joining*. 2008. **18**(1): p. 114-124.

Wong, A., et al., *Molecular characterization of a 130-kb terminal deletion at 22q in a child with mental retardation*. *American Journal of Human Genetics*, 1997. **60**(1): p. 113-120.

Wong, K.-K., et al., *Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing*. 2003. **421**(6923): p. 643-648.

X

Xu, X., et al., *Centrosome Amplification and a Defective G2-M Cell Cycle Checkpoint Induce Genetic Instability in BRCA1 Exon 11 Isoform-Deficient Cells*. *Molecular Cell*, 1999. **3**(3): p. 389-395.

Xu, B., et al., *Two Molecularly Distinct G2/M Checkpoints Are Induced by Ionizing Irradiation*. *Mol. Cell Biol.*, 2002. **22**(4): p. 1049-1059.

Y

Yajima, H., K.-J. Lee, and B.P.C. Chen, *ATR-Dependent Phosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in Response to UV-Induced Replication Stress*. *Mol. Cell Biol.*, 2006. **26**(20): p. 7520-7528.

You, Z., et al., *ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1*. Mol. Cell. Biol., 2005. **25**(13): p. 5363-5379.

Yu, Y., et al., *DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination*. DNA Repair, 2003. **2**(11): p. 1239-1252.

Z

Zhang, N., et al., *Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(15): p. 8021-8026.

Zhou, J.-Q., et al., *Pif1p Helicase, a Catalytic Inhibitor of Telomerase in Yeast*. Science, 2000. **289**(5480): p. 771-774.

BIBLIOGRAFIA ONLINE

Animacions de la via d'HR: <http://web.mit.edu/engelward-lab/animations/>

DNA repair Systems: <http://it.stlawu.edu/~tbudd/repair.html>

DNA Repair (molt bona):

http://asaji.roswellpark.org/huberman/DNA_Repair/damage_types.html

Mammalian DNA repair systems: <http://tango01.cit.nih.gov/sig/dna/dnawhatis.html>

OMIM:

ATM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=607585>

AT: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=208900>

Nbs1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602667>

NBS: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=251260>

Mre11: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600814>

ATLD: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=604391>

ATR: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601215>

DNA-PKcs: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600899>

Artemis: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=605988>

Cernunnos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=611290>

Ku70: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=152690>

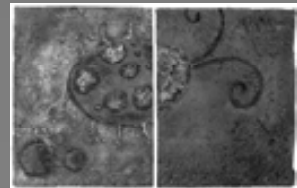
Ku80: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=194364>

XRCC4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=194363>

Lligasa IV: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601837>

SPIKE (*ATM signalling network*): <http://www.cs.tau.ac.il/~spike/> (a dins de la pàgina, clicar a "MAPS"). Pàgina on es mostra tota la xarxa de proteïnes activades per ATM o que activen a ATM.

AGRAIMENTS



Va passar que un dia tenia ganes de saber més, de tornar a estudiar. I em va sorgir la oportunitat de fer una tesi en Biologia Cel·lular. I no la vaig deixar passar. D'això ja en fa molts anys, i ha estat un camí... què he de dir? Un camí com tots: amb coses bones i dolentes, però aquest era el **meu** camí, i jo l'he gaudit moltíssim, de veritat ho dic. L'he gaudit perquè m'he entusiasmat i emocionat moltes vegades. També m'he enfadat, desesperat i desesperançat d'altres. Hi ha aquells dies en què et lledes contentíssima, amb ganes d'arribar al laboratori perquè els resultats surten! I són macos! I et fan venir mil idees més al cap. I després hi ha aquelles èpoques en que no surt res, en que ja no saps què provar ni què llegir i durant les quals - evidentment -, sembla que les idees visquin a l'altra banda del planeta. A mi, tots aquests anys m'han fet pensar i sentir, m'han mantingut desperta, inquieta, atenta, curiosa. M'han fet entendre millor les meves virtuts i els meus defectes: m'han estimulat i m'han fet créixer com a persona. Puc demanar alguna cosa més? I una part molt important de TOT això ho ha fet possible la gent que m'ha acompanyat en aquest camí. Treballar envoltada de persones que, com tu, tenen inquietuds, il·lusions i ganes de saber, de trobar, de fer-se preguntes i d'obtenir respostes. D'ajudar-se, compartir i d'involucrar-se en idees i en propostes. Persones a les què explicar acudits sobre ciència i també aquella anècdota tan graciosa del laboratori - que ningú de fora troba graciosa -. Aquesta companyia ha estat per mi molt valuosa i un gran estímulo. Crec que sóc afortunada: el camí ha estat molt millor i més planer gràcies a la gent que m'ha envoltat.

Gràcies a l'Anna i la Laura, per donar-me l'oportunitat de fer una tesi amb elles. Treballen dur, tenen idees i ganes. Hem passat moments divertits amb la meva tossuderia, ho sé. Però finalment he aportat el meu gra de sorra al grup, i entre tots i totes l'hem tirat endavant i l'hem fet créixer.

Gràcies a la resta de gent del meu grup: Imma, Laura, Gema, David, Judit i Mariona. L'Imma va ser la primera persona que vaig conèixer, el meu primer dia de doctorat: m'ha ensenyat moltes coses i sempre està disposada a donar un cop de mà. Amb la Laura Latre hem passat tantes estones juntes! Aquells principis a l'antic IBF, intentant - fins a altes hores - que el TRAP sortís, emocionades amb cada *paper*, amb cada banda que sortia, amb cada variació de protocol que posàvem en marxa... moments bons i dolents, xerrades i riures però sobretot moltes il·lusions. Després va arribar la Gema, amb la seva força i *desparpajo* i aquest cor tan gran i delicat: moltes estones de treball i confidències... bons moments. El David i la Judit, els reis del microscopi, gràcies per mostrar-me el vostre afecte. I la Mariona, chamaquitaaaaa!!!! Treballadora i dolça, sempre inquieta: ciència, llibres, música, projectes... gràcies per les hores i l'amistat compartides.

Les noies de Citogenètica de l'IBB han estat una mena de família. A part de feina, hem compartit alegries i penes acompanyades de cafès, infusions, música, sopars, trasllats, reunions, vídeos de *fundís*...Tantes hores juntes i soletes allà dalt, al final ens ho sabíem tot; si a l'una li sortia la FISH i a l'altra li sortia un gra! La Núria, tan delicada i forta alhora, sempre disposada a escoltar, sempre carinyosa. I la Laia, valenta i resolutiva, sempre amb ganes de fer coses i tirar endavant. M'han aportat molt. Crec que fèiem un trio curiós però que funcionava! Ha estat fantàstic compartir els dies amb vosaltres.

Les companyes més veteranes de la Unitat: Zaix (qui no vol "una Zaix" al seu costat?), una gran companya; Ester, gràcies pels teus consells sobre la tesi!; Pili, sempre animada i regalant somriures; i

què puc dir de les meves nenes? L'Assumpta, amb la seva visió especial de la vida, m'ha fet reflexionar i preguntar-me tantes coses. M'encanta. La Nerea, extraordinària i millor persona, sap escoltar. Cris, natural, entregada i carinyosa. Sempre m'heu fet costat i m'heu escoltat, sé que hi sou. I tots, tots: Naïma, Marta Farré, Sheyla, Nuno; Marta Pladevall, Lydia, Elisabet, Óscar, Sergi, Marc, Jonathan, Sílvia, Joan, Elena, Montse, Leo, Josep, Fanny, Carme, Dolors, Óscar, Ester, Maria Oliver, Javi. Amb tots vosaltres he compartit feina, microscopis, trasllats, cigarretes, dinars, sopars, dificultats, riures, experiments, seminaris, classes, exàmens... gràcies! Tots heu format part del meu dia a dia, tots m'heu regalat somriures i de tots he après coses.

També vull agrair a tota la gent que no treballa amb mi però que ha compartit les meves explicacions sobre experiments del tot incomprendibles per ells, i que en aquest últim tram del doctorat han pensat que estava adduïda per la tesi. Merche, Sisco, Anna, Arnau, Mavi, Ester, Joan Marc, Martona, Jordi, Mari, Natàlia, Cristina, Aurora, Ana, Jose, Montse, Marta Garcia, Marc, Josep Maria, Joan, Ramon, Santi... Gràcies per preguntar *què tal va tot* - tot i el rotllo que us venia després -, per distreure'm i relaxar-me, per oferir-me ajuda...

En resum: gràcies a tots i totes per acompanyar-me. Ha estat un plaer.

Als homes els encanta meravellar-se. Aquesta és la llavor de la ciència.
R.W Emerson
