JORNADA DE I+D+i

Proyectos de Investigación en CSN
Protección Radiológica

CSN CONSEJO DE SEGURIDAD NUCLEAR

Búsqueda de marcadores genéticos de sensibilidad a las bajas dosis de radiación en células linfoides humanas

Javier Santos
Catedrático de Genética
CBM (IUBM)-UAM

UAM Universidad Autónoma de Madrid · CBM Severo Ochoa EXCELENCIA SEVERO OCHOA 2023-2027 · UAB · UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI · isciii cne

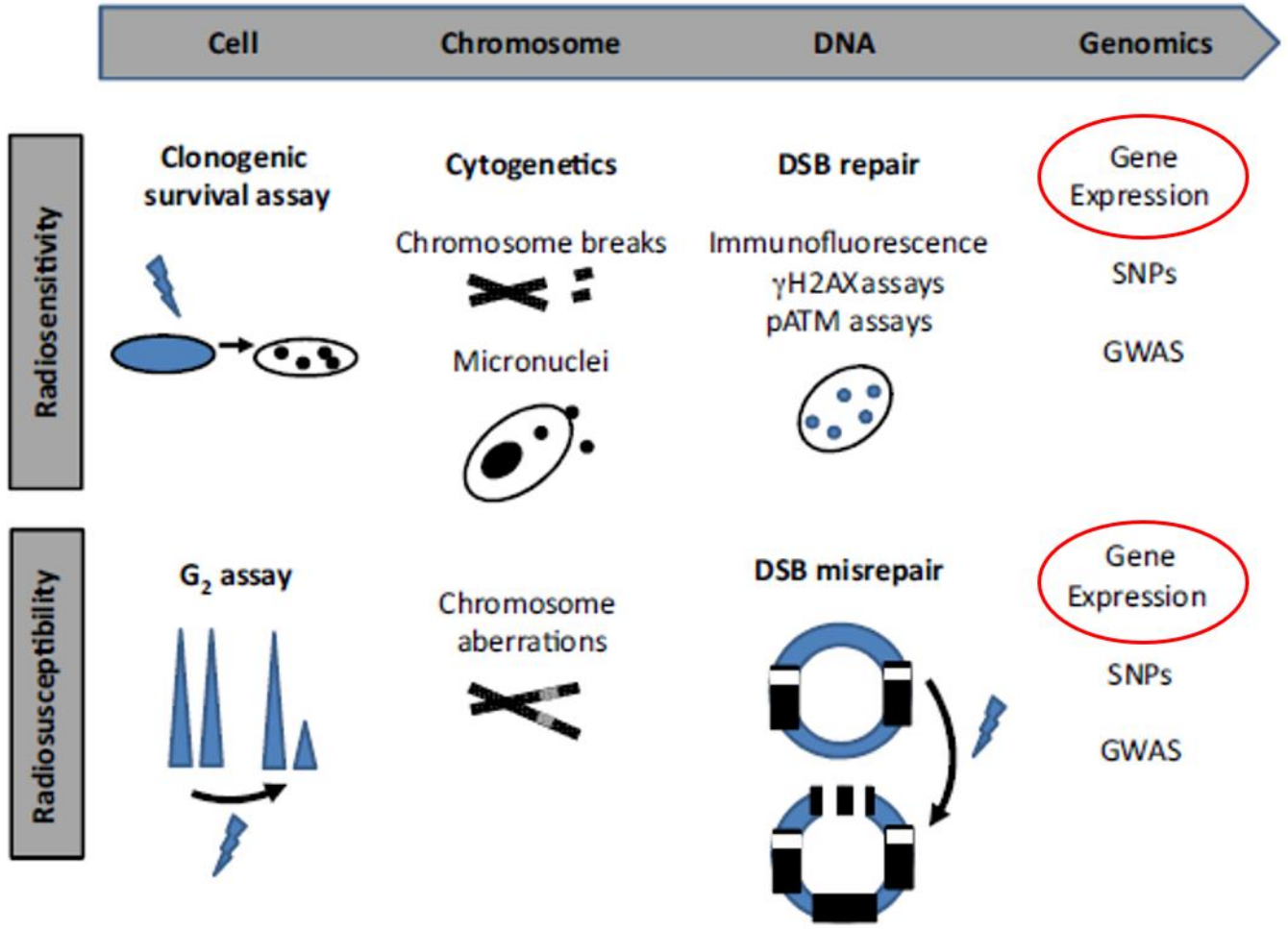
Antecedentes

En la actualidad existen distintas técnicas para evaluar la radiosensibilidad y la radiosusceptibilidad a nivel celular, cromosómico, del ADN y genómico

RADIOSENSIBILIDAD: propensión a sufrir efectos tisulares adversos (muerte celular) inducidos por la radiación

RADIOSUSCEPTIBILIDAD: propensión al cáncer inducido por la radiación

Técnicas para evaluar la radiosensibilidad y radiosusceptibilidad



Antecedentes

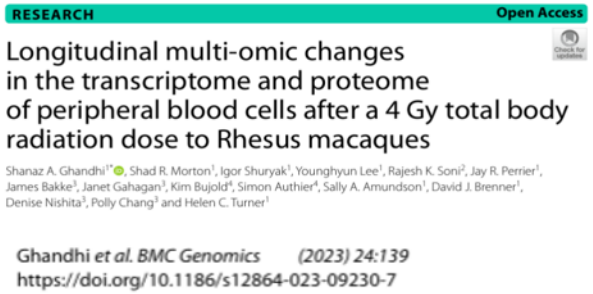
OPEN ACCESS Freely available online PLOS MEDICINE

Gene Expression Signatures That Predict Radiation Exposure in Mice and Humans

Holly K. Dressman[1,2], Garrett G. Muramoto[3], Nelson J. Chao[3], Sarah Meadows[3], Dawn Marshall[3], Geoffrey S. Ginsburg[1], Joseph R. Nevins[1,2], John P. Chute[1,3*]

April 2007 | Volume 4 | Issue 4 | e106

Los **análisis transcriptómicos** han permitido desarrollar **firmas genéticas** capaces de clasificar con alta precisión muestras de sangre periférica humana irradiada ***ex vivo*** procedente de individuos no expuestos, dentro del rango de los **0,5-10 Gy (altas dosis)**



RESEARCH Open Access

Longitudinal multi-omic changes in the transcriptome and proteome of peripheral blood cells after a 4 Gy total body radiation dose to Rhesus macaques

Shanaz A. Ghandhi[1*], Shad R. Morton[1], Igor Shuryak[1], Younghyun Lee[1], Rajesh K. Soni[2], Jay R. Perrier[1], James Bakke[3], Janet Gahagan[3], Kim Bujold[4], Simon Authier[4], Sally A. Amundson[1], David J. Brenner[1], Denise Nishita[3], Polly Chang[3] and Helen C. Turner[1]

Ghandhi *et al. BMC Genomics* (2023) 24:139
https://doi.org/10.1186/s12864-023-09230-7

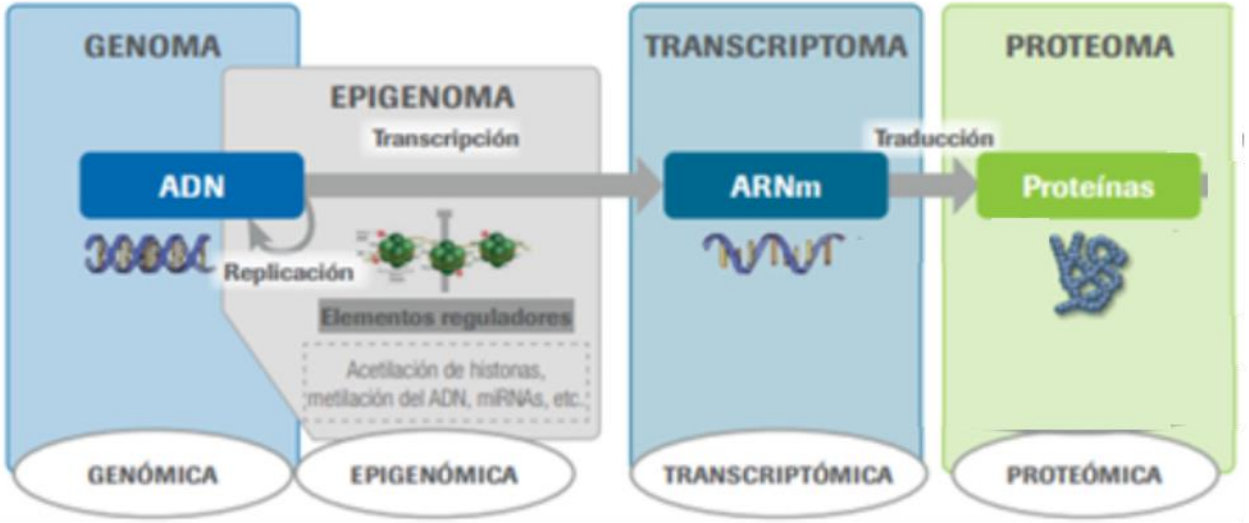
Otros estudios transcriptómicos se han centrado en la **reconstrucción de dosis** a partir de muestras de sangre de las que se desconoce con exactitud la dosis recibida, encontrando **firmas genéticas** capaces de **predecir** dosis de radiación específicas en el rango de 0,5-4,5 Gy (39) o de 2-8 Gy (dosis altas)

Los perfiles de expresión génica podrían ser iutilizados como biodosímetros de la exposición a la radiación ionizante

OBJETIVO

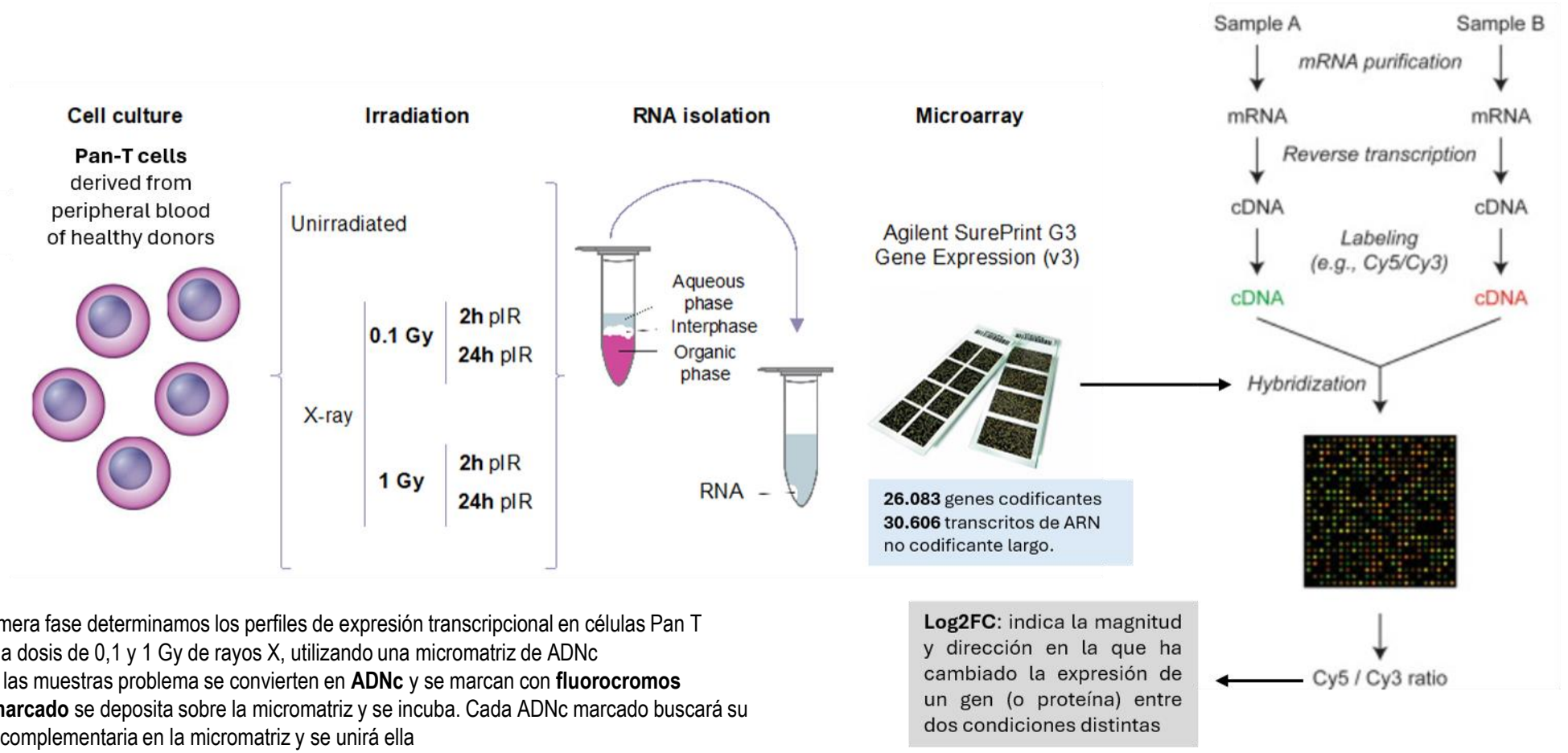
Desarrollar **proyecto exploratorio** enfocado a la identificación de **genes** implicados en radiosensibilidad individual a partir de un análisis *in vitro* que estudie de manera global los **cambios** en la **expresión génica** a nivel del **transcriptoma** y del **proteoma,** así como las alteraciones en los patrones de metilación del ADN (**epigenoma**) en una línea celular de origen linfoide expuesta a bajas dosis de radiación ionizante.

"cell-based" analyses



Análisis del transcriptoma

Determinación de los perfiles de expresión transcripcional mediante **micromatrices de cDNAs** (**Agilent SurePrint G3 Gene Expression Microarrays (v3)**)



- En una primera fase determinamos los perfiles de expresión transcripcional en células Pan T expuestas a dosis de 0,1 y 1 Gy de rayos X, utilizando una micromatriz de ADNc
- El ARN de las muestras problema se convierten en **ADNc** y se marcan con **fluorocromos**
- El **ADNc marcado** se deposita sobre la micromatriz y se incuba. Cada ADNc marcado buscará su secuencia complementaria en la micromatriz y se unirá ella
- La **intensidad fluorescente** en cada punto de la micromatriz indicará la cantidad de ARN que se expresa para ese gen en la muestra original
- La ratio **Cy5/Cy3** mide **la expresión génica diferencial** entre dos muestras de forma comparativa y ésta se transforma a valores logarítmicos

Análisis del transcriptoma

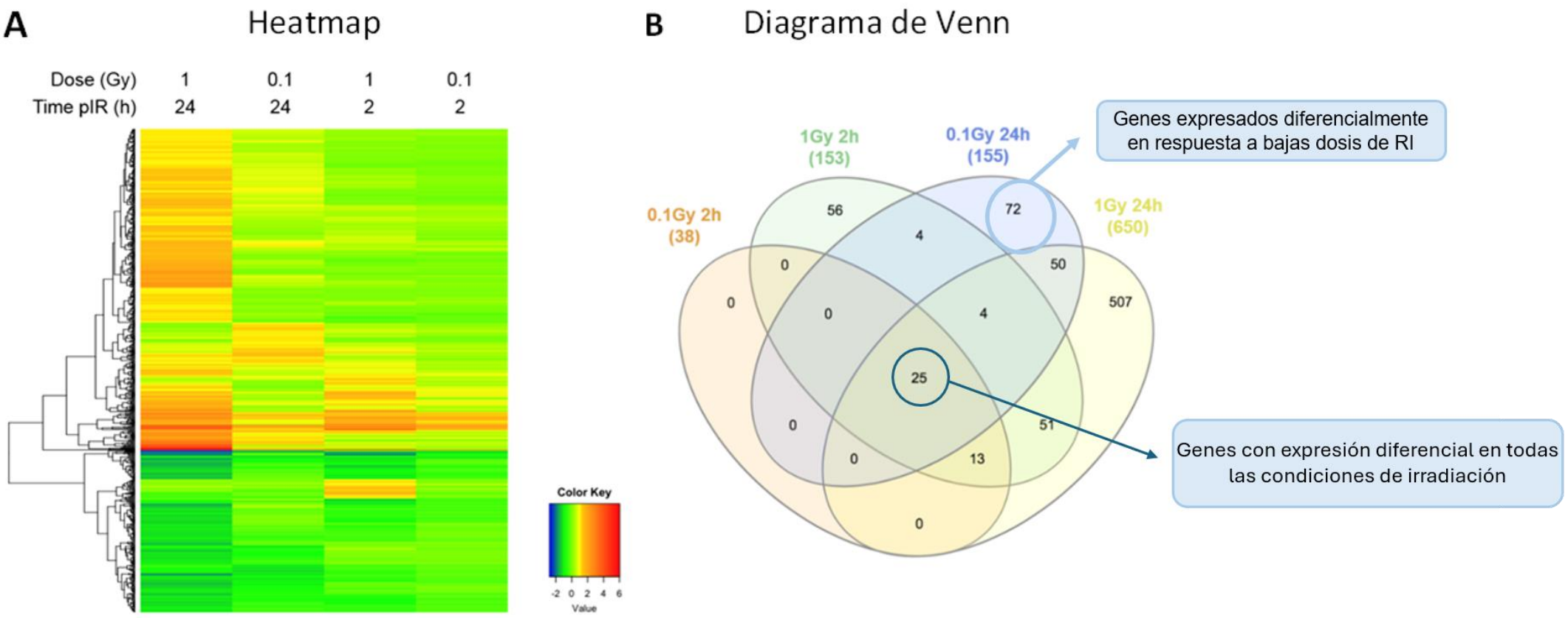
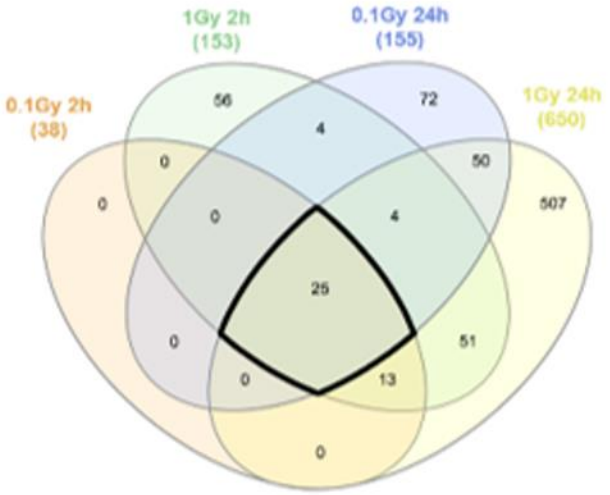


Figura 4. Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados con la radiación mediante (A) un Heatmap (B) un diagrama de Venn.

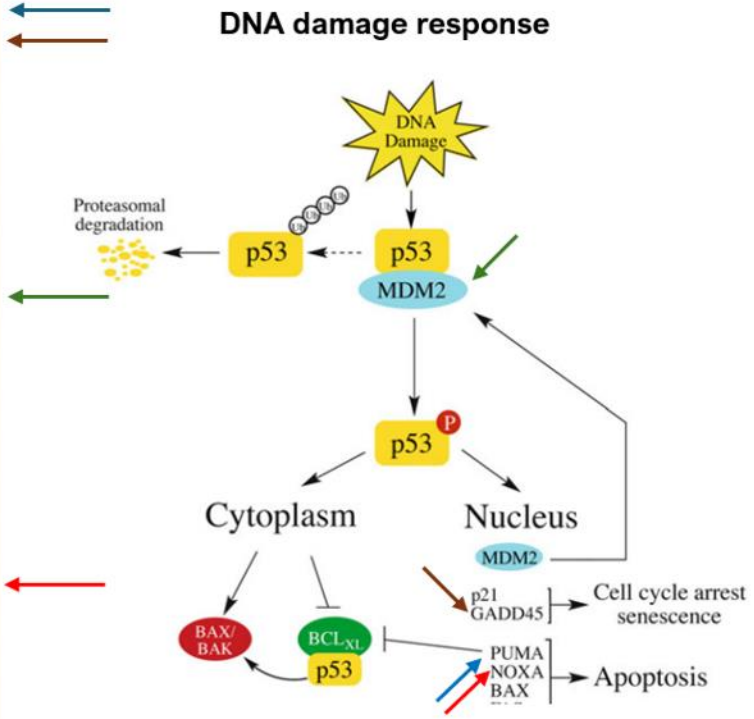
- En esta diapositiva se muestra una **representación gráfica** de los **genes diferencialmente expresados** con la radiación mediante un mapa de calor (izquierda) y un diagrama de Venn (derecha).
- En este análisis se identificaron **72** genes diferencialmente expresados **exclusivos** de **bajas dosis** y otros **25** comunes a todas a **todas las condiciones de irradiación.**

Análisis del transcriptoma



	Gene	0.1 Gy 2 h	0.1 Gy 24 h	1 Gy 2 h	1 Gy 24 h	Mean logFC	Type of gene
1	BBC3	3,67	3,04	5,02	5,03	4,19	Protein coding
2	GADD45A	2,52	1,88	3,33	3,68	2,85	Protein coding
3	ATF3	1,89	1,21	4,56	3,05	2,68	Protein coding
4	PHLDA3	2,17	2,16	2,46	3,69	2,62	Protein coding
5	FDXR	1,94	2,23	2,56	3,65	2,60	Protein coding
6	VWCE	1,02	1,54	1,78	6,03	2,59	Protein coding
7	TNFRSF10B	2,16	2,13	2,44	3,50	2,56	Protein coding
8	MDM2	2,11	1,76	2,60	3,44	2,48	Protein coding
9	TNFSF4	1,74	1,75	1,97	4,07	2,38	Protein coding
10	lnc-MYC-2 = PVT1	1,97	2,01	2,19	2,75	2,23	Non-coding
11	TNFRSF10D	1,36	1,35	1,62	3,68	2,00	Protein coding
12	DRAM1	1,91	1,08	2,20	2,77	1,99	Protein coding
13	TP53INP1	1,81	1,19	2,12	2,79	1,98	Protein coding
14	AEN	1,91	1,32	2,32	2,35	1,98	Protein coding
15	PMAIP1	1,29	1,01	2,90	1,99	1,80	Protein coding
16	PLK3	1,36	1,1	2,08	1,94	1,62	Protein coding
17	MGAT3	1,23	1,29	1,25	2,50	1,57	Protein coding
18	C12orf5	1,51	1,02	1,69	2,05	1,57	Protein coding
19	XPC	1,28	1,16	1,52	2,18	1,54	Protein coding

Tabla 8. Listado de genes diferencialmente expresados con todas las condiciones de irradiación. Se detalla para cada gen el logaritmo del Fold Change para cada condición, así como la media de estos valores y el tipo de gen del que se trata. En amarillo se resaltan los 19 genes validados mediante RT-qPCR.

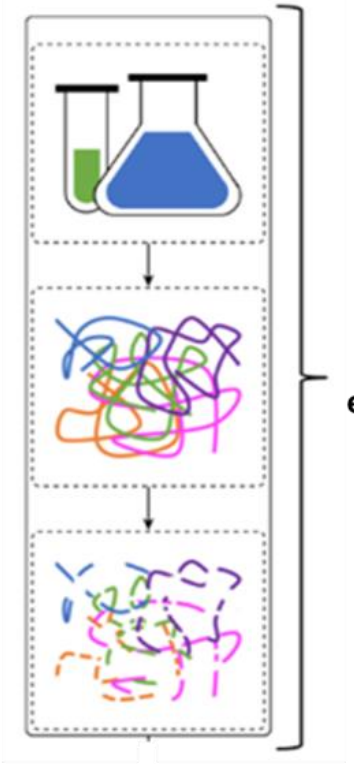


CONCLUSION La existencia de diferencias en los perfiles de expresión transcripcional a bajas y altas dosis para los genes de respuesta al daño permite considerarlos como potenciales biomarcadores de radiosensibilidad

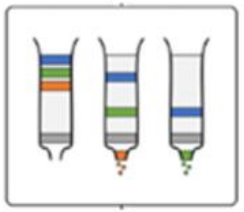
- En esta imagen se muestra un listado de genes diferencialmente expresados en todas las condiciones de irradiación validados por RT-Qpcr.
- En muchos casos existen genes con diferencias de expresión significativas entre bajas y altas dosis de irradiación (recuadros en rojo).
- Algunos de ellos tienen un papel relevante en la respuesta al daño en el ADN inducido por la RI (marcados con flechas), como MDM2 GADD45A, BBC3 (PUMA) o PMAIP1 (NOXA).
- **CONCLUSION** La existencia de diferencias en los perfiles de expresión transcripcional a bajas y altas dosis para los genes de respuesta al daño permite considerarlos como potenciales biomarcadores de radiosensibilidad.

Análisis del proteoma

Identificación y cuantificación de proteínas el acoplamiento de la **Cromatografía Líquida (LC)** con la **Espectrometría de Masas (MS)** utilizando el sistema **nanoLC-(Orbitrap)MS/MS**



Digestión enzimática



Cromatografía Líquida (nanoLC)

Los **péptidos** eluidos se convierten en iones en fase gaseosa(**ionización por Electrospray**)

Luegose separan en una **columna capilar**, usando caudales de **nanolitros por minuto**, maximizando la sensibilidad y permitiendo detectar proteínas de baja abundancia

Espectrometría de Masas (Orbitrap MS/MS)

El espectrómetro realiza un escaneo inicial para medir la **masa exacta** de los **péptidos (MS).** Luego, selecciona los **péptidos,** los fragmenta **(MS/MS)** y registra los **espectros de fragmentación**

Análisis bioinformático

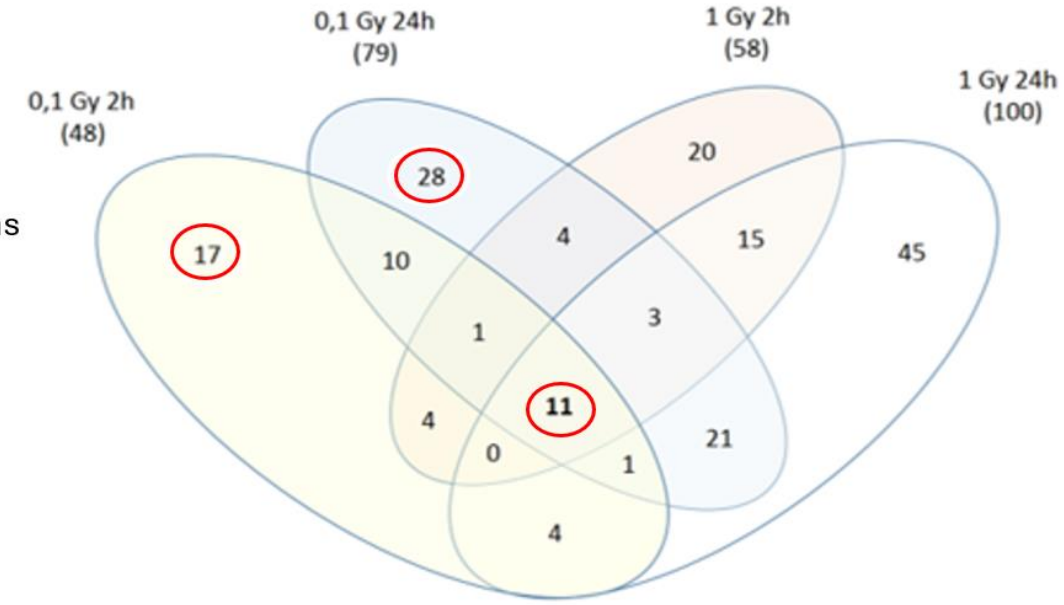
Los espectros generados se comparan **con bases de datos de secuencias proteicas** para identificar la proteína original

En una segunda etapa procedimos al análisis proteómico utilizando un protocolo experimental basado en el **acoplamiento** de la **cromatografía líquida** y la **espectroscopía de masas**, y cuyo **flujo de trabajo** se muestra en esta diapositiva.

Análisis del proteoma

282 proteínas **diferencialmente expresadas** respecto de la situación control (log2FC>o<1.5)

654 proteínas identificadas



45 proteínas expresadas en **bajas dosis**
11 proteínas en **todas** las **condiciones** de **irradiación**

- Dicho análisis identificó **654** proteínas, de las que **282** estaban diferencialmente expresadas, utilizando como criterio de filtro un **log2FC >o<1,5.**
- De estas últimas, **45** se expresaban exclusivamente en condiciones de **bajas dosis**, mientras que **11** aparecían en **todas** las **condiciones de irradiación.**

Análisis del proteoma

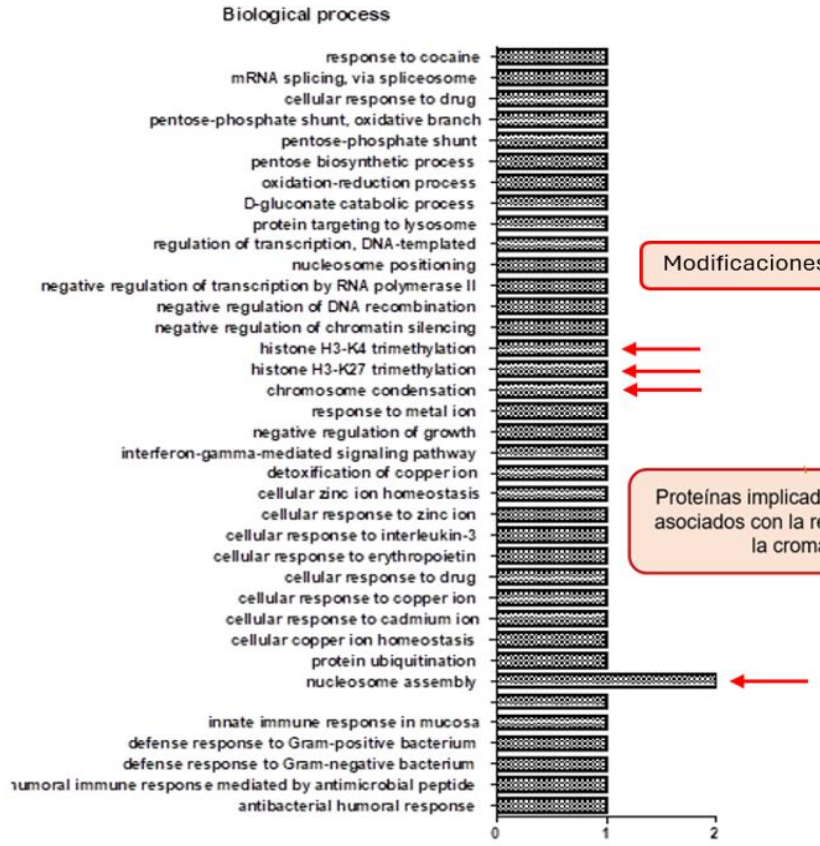
En esta diapositiva se muestra un listado de **proteínas diferencialmente expresadas** con la irradiación y donde observamos en la **mitad de los casos** perfiles de expresión **inversos** entre bajas y altas dosis de irradiación.

	0,1Y 2H	0,1GY 24H	1GY 2H	1GY 24H	
P06899	-2,4278	-1,899	-1,689	-3,458	Histone H2B type 1-J
P02795	1,553	-1,839	1,39	-1,962	Metallothionein-2 OS=Homo sapiens
P16402	-1,837	-1,353	-2,091	-3,813	Histone H1.3
F5GXE0	2,595	3,845	-2,468	-2,21	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (Fragment)
A0A2R8Y4D6	-1,91	-2,16	1,303	1,912	Casein kinase II subunit alpha (Fragment)
P52209	-3,843	-1,642	1,411	4,663	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
A0A0C4DGS1	-1,813	1,925	2,886	2,762	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
Q15029	1,568	1,863	1,696	1,778	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component
K7ERQ7	-1,353	-1,789	2,602	2,544	Kinetochore protein Spc24 (Fragment)
C9JDH9	-1,243	-3,000	6,161	2,322	Serine/threonine-protein kinase 25 (Fragment)
V9GYZ6	-1,483	2,549	-2,295	-1,505	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase 1 (Fragment)

Tabla 5 *Listado de proteínas diferencialmente expresadas con la irradiación. Se detalla para cada proteína la media del logaritmo del* Fold Change.

CONCLUSION: La existencia **de perfiles inversos de expresión proteína** entre bajas y altas dosis hace del análisis del proteoma una fuente adicional de potenciales biomarcadores de radiosensibilidad

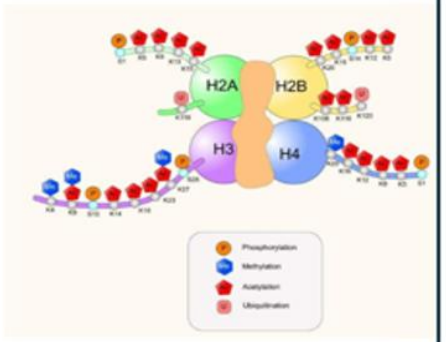
Análisis del proteoma

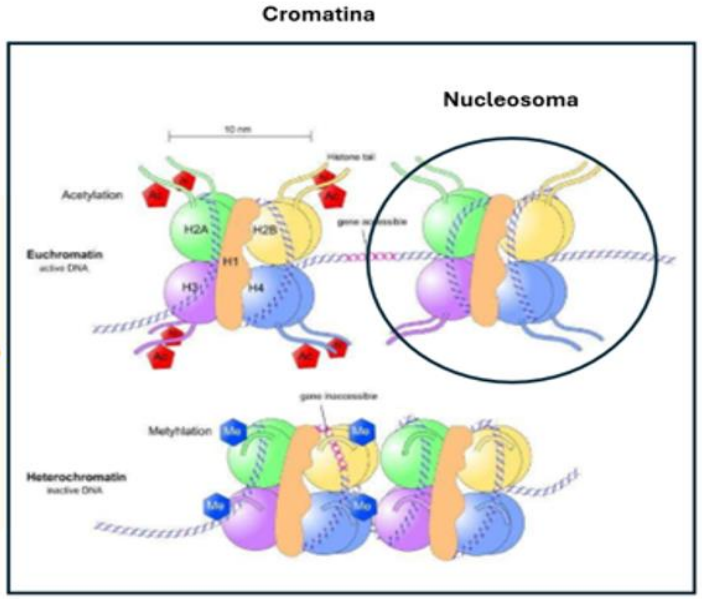


Procesos biológicos en los que participan las 11 proteínas diferencialmente expresadas en todas las dosis de RI

Modificaciones post-traduccionales de histonas

Proteínas implicadas en procesos asociados con la remodelación de la cromatina





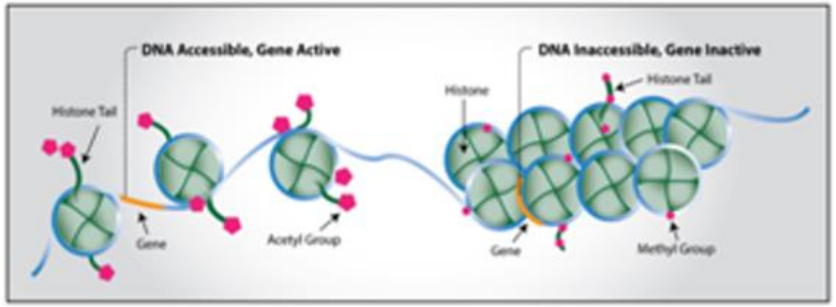
- El análisis de los **procesos biológicos** en los que participan las 11 proteínas diferencialmente expresadas en todas las condiciones de irradiación mostró un **enriquecimiento** en proteínas implicadas en procesos relacionados con la **remodelación de la cromatina** y con la **modificación de las histonas.**

- En la parte de la derecha se muestra la estructura del **nucleosoma** (el primer nivel de organización del ADN) y el impacto de las modificaciones de las histonas en la condensación de la cromatina.

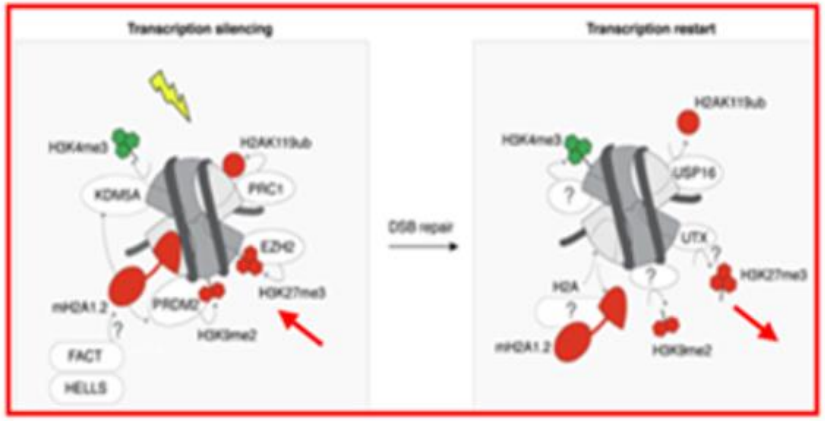
Análisis del proteoma

CONCLUSION: En los análisis proteómicos encaminados a buscar biomarcadores de radiosensibilidad se debe prestar especial atención a aquellas proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina y en la modificación de las histonas

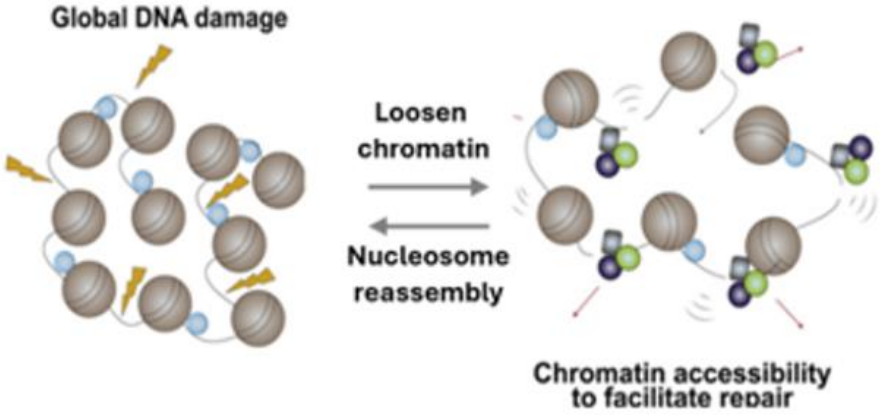
La **remodelación de la cromatina** es el proceso epigenético mediante el cual la célula modifica la **estructura del ADN empaquetado** mediante **modificaciones postraduccionales de las histonas**



La trimetilación de la histona 3 lisina 27 **(H3K27me3)** es una marca epigenética que **reprime** la **expresión génica** con papel **dinámico** en la **reparación** de **los DSBs** inducidos por la radiación



El **ensamblaje de nucleosomas** es esencial en la **respuesta al daño al ADN**. Cuando la RI provoca DBSs en el ADN, las células **descondensarn la cromatina** para permitir el acceso de las proteínas de reparación.. Una vez completada la reparación, se produce el **reensamblaje de nucleosomas**



Análisis del epigenoma

	Metilación Global	Hidroximetilación Global
PAN T 0H 0,1 Gy	0,647945398	0,017568651
PAN T 0H 0,1 Gy	0,580324997	0,026080171
PAN T 0H 1Gy	0,85368573	0,021060557
PAN T 2H 0 Gy	0,661260485	0,015058844
PAN T 2H 0,1 Gy	0,619509477	0,019969336
PAN T 2H 1Gy	0,712054549	0,018114261
PAN T 24H 0 Gy	0,637385485	0,077258416
PAN T 24H 0,1 Gy	0,664798548	0,044412677
PAN T 24H 1Gy	0,45454391	0,029135589

CONCLUSION:
Los cambios epigenéticos debidos a variaciones en los patrones de metilación del ADN son de escasa relevancia en respuesta a dosis iguales o inferiores a 1Gy

Tabla 1. Niveles globales de metilación e hidroximetilación en células linfoides sometidas a dosis de radiación X de 0,1G y 1Gy a las 0h, 2h y 24 h de finalizados los tratamientos obtenidos en el análisis colorimétrico

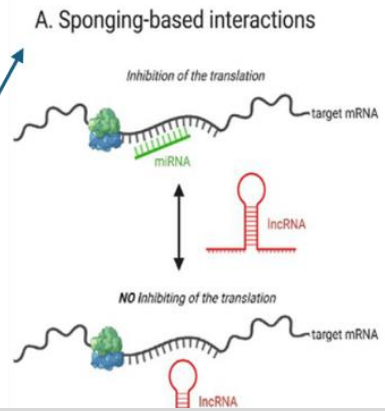
- Finalmente, llevamos a cabo un análisis epigenómico midiendo los niveles de **metilación e hidroximetilación global del ADN** mediante un análisis colorimétrico.
- En la figura de la izquierda se muestra un esquema ilustrativo del papel de la metilación del ADN a nivel de las citosinas y su impacto en el control de la expresión génica.
- En esta tabla se muestran los niveles globales **NO observándose diferencias significativas** entre las distintas condiciones experimentales.

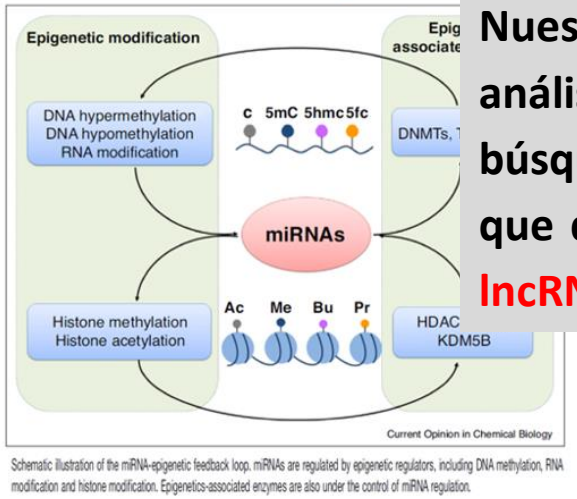
Types of Epigenetic Changes

DNA Methylation

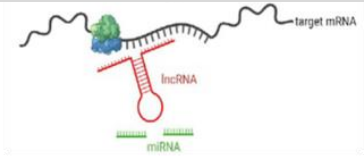
Histone modification

Non-coding RNA/ silencing

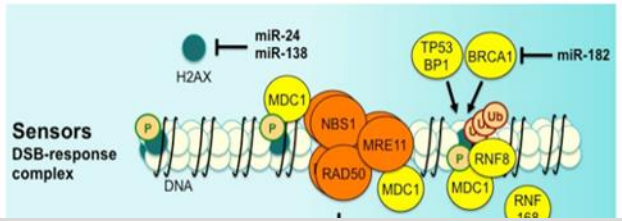


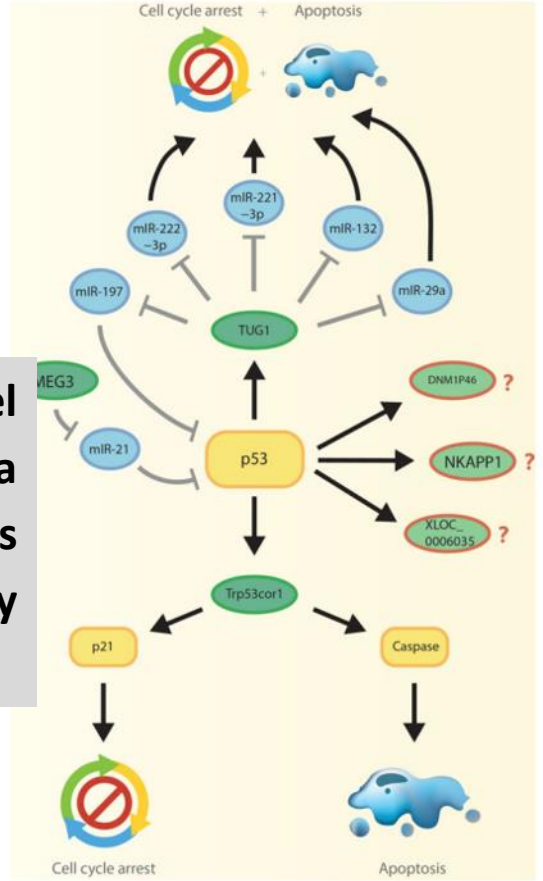


Schematic illustration of the miRNA-epigenetic feedback loop. miRNAs are regulated by epigenetic regulators, including DNA methylation, RNA modification and histone modification. Epigenetics-associated enzymes are also under the control of miRNA regulation.



La importancia de los ARN no codificantes en la respuesta a la radiación ionizante





Interacciones lncRNA-miRNA-mRNA en la respuesta inducida por IR y su asociación con p53

Nuestros resultados del epigenoma abren nuevas perspectivas en el análisis epigenómico de las células linfoides encaminadas a la búsqueda de nuevos biomarcadores epigenéticos analizando genes que dirigen la trasncripción de ARNs no codificantes (microRNAs y lncRNAs).

- Sin embargo, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas NO son los únicos cambios epigenéticos que modulan la expresión génica. Existe un tercer tipo en el que están implicados los ARN no codificantes, aquellos que NO dirigen la síntesis de proteínas.
- En la parte izquierda se ilustra el papel de los ARNc en el control de la expresión génica, **silenciando** genes en el caso de los **miRNAs** y en la **regulación** de éstos por parte de los **lncRNAs.**
- Además, los ARNnc juegan un papel esencial en la respuesta a la radiación ionizante.

En este contexto, se enmarcan dos proyectos colaborativos en los que está participando nuestro grupo.

Identificación de biomarcadores de sensibilidad a bajas dosis de radiación ionizante mediante microRNAs-BIORAMI.

GOBIERNO DE ESPAÑA · MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN · Instituto de Salud Carlos III

(2022-2025) IP Dr Pablo Fernández Navarro (CNE)

Identificación de biomarcadores genéticos cuya expresión se ve afectada por la exposición ocupacional a la radiación de cardiólogos intervencionistas utilizando un análisis transcriptómico de genes codificantes y no codificantes-CARDIORAD

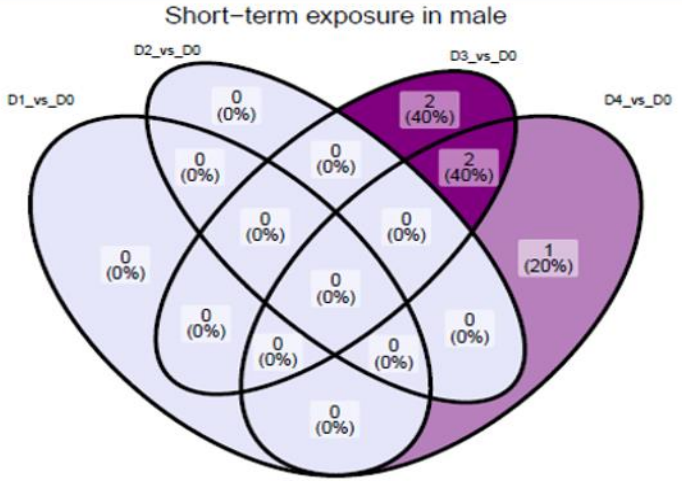
CSN CONSEJO DE SEGURIDAD NUCLEAR

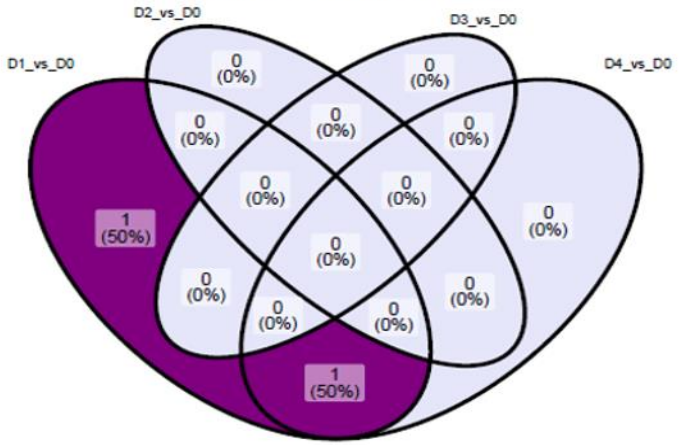
(2026-2028) IP Dr Javier Santos Hernández (CBM-UAM)

Participantes: UAM Universidad Autónoma de Madrid · CBM Severo Ochoa · EXCELENCIA SEVERO OCHOA · isc cne · quirónsalud

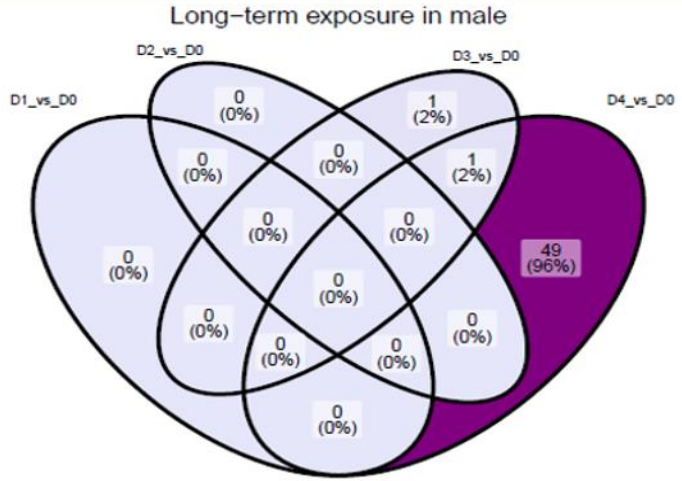
HU Fundación Jiménez Díaz
HU Rey Juan Carlos
HU Infanta Elena
H General de Villalba

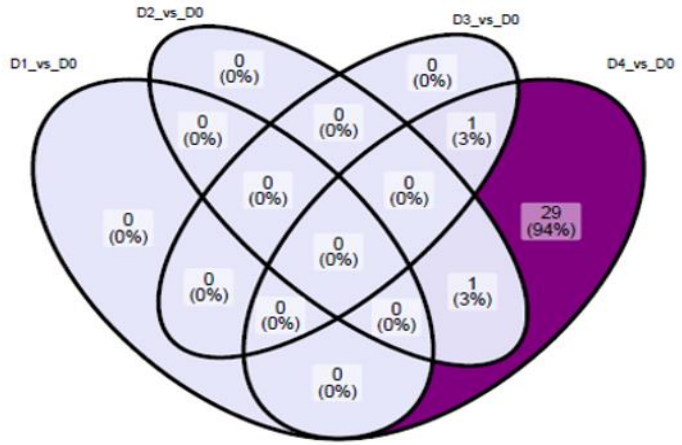
Proyecto BIORAMI





- 58 miRNAs diferencialmente expresados identificados.
- Se observaron patrones dependientes de dosis, sexo y tiempo de exposición.
- Se seleccionaron 8 candidatos prioritarios para validación.



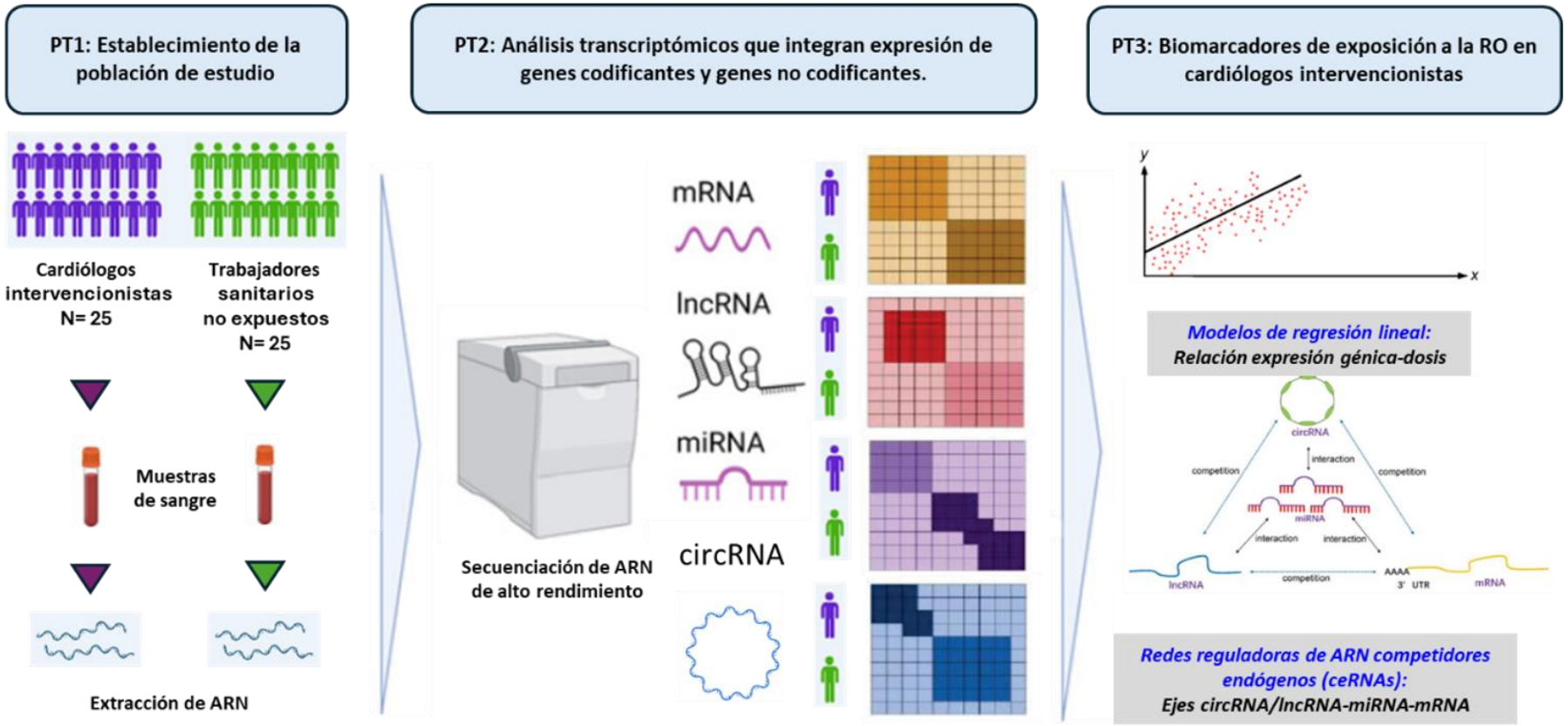


- Partimos de células T obtenidas de donantes sanos de **ambos sexos**, irradiadas a **distintas dosis** y analizadas a **distintos tiempos post-tratamiento.**
- El ARN de estas muestras es sometido a un análisis transcriptómico basado en la secuenciación del RNA de alto rendimiento (RNA-seq).
- Los miRNA diferencialmente expresados serán validados en una cohorte de cardiólogos intervencionistas estratificados por **sexo, edad** e **historial dosimétrico.**
- En esta diapositiva se muestran los resultados de la fase experimental.

Proyecto CARDIORAD

OBJETIVO CARDIORAD

Demostrar la **aplicabilidad** de los **biomarcadores genéticos** de **radiosensibilidad**, investigando la exposición ocupacional a la radiación de cardiólogos intervencionistas mediante un **análisis transcriptómico integrado** de **genes codificantes** y **no codificantes**



La dosimetría personal y la biomonitorización como estrategia conjunta en la evaluación de los efectos de la radiación ocupacional en la cardiología intervencionista

- El proyecto CARDIORAD pretende demostrar la **aplicabilidad** de los **biomarcadores genéticos** de **radiosensibilidad**, investigando la exposición ocupacional a la radiación de cardiólogos intervencionistas mediante un **análisis transcriptómico integrado** de **genes codificantes** y **no codificantes.**
- Se ha organizado en **tres paquetes de trabajo.**

Muchas gracias por su atención