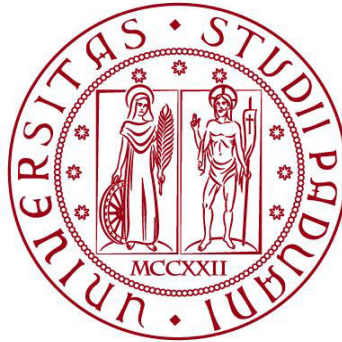


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

## **Impatto dell'accumulo di alterazioni in geni driver e passenger sulla risposta alla terapia con radiazioni**

**Tutor: Prof.ssa Maddalena Mognato  
Dipartimento di Biologia (DiBio)**

**Laureanda: Mariarosaria Spera**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**

## ABSTRACT:

Questo studio si prefigge l'obiettivo di verificare la correlazione fra l'accumulo di mutazioni nei geni driver e passenger e la resistenza alla radioterapia. Per verificare l'effettiva radioresistenza sono stati effettuati test su 59 linee cellulari derivate da 11 organi diversi, consistenti nel misurare la morte cellulare a seguito di radiazioni. Ciò che correla le mutazioni alla radioresistenza è la proporzione delle alterazioni dei geni driver rispetto al totale delle alterazioni riscontrate nelle linee tumorali radioresistenti selezionate dalla "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes"

## 1.STATO DELL'ARTE

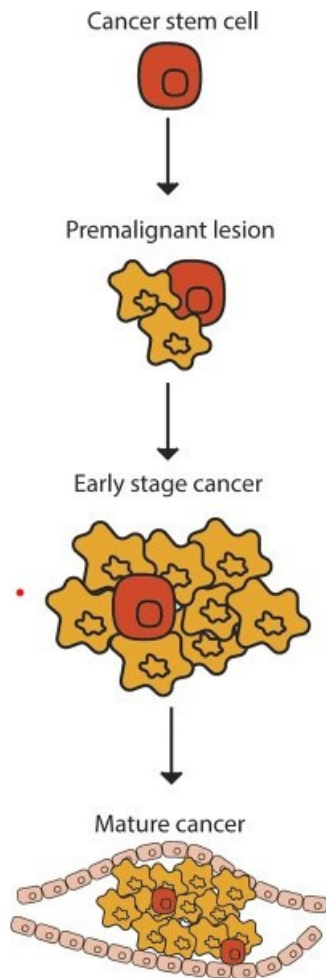
### 1.1. Radioresistenza delle cellule tumorali

Per radioresistenza si intende la capacità di alcune cellule di resistere ai danni lesivi indotti dalle radiazioni ionizzanti (RI), compresi danni diretti al DNA e citotossici associati (arresto proliferativo ed apoptosi) (Busato F et al., 2022). La radioresistenza può essere distinta in intrinseca quando è associata alle caratteristiche molecolari delle cellule tumorali, o acquisita quando deriva da modificazioni del microambiente. Le cellule riescono a sopravvivere alle RI tramite l'attivazione di diversi programmi (detti "firme") di natura genetica, epigenetica o trascrittomica; altri fattori fortemente correlati alla radioresistenza sono il metabolismo, la concentrazione di ossigeno ed il microambiente tumorale. Principalmente le cellule neoplasiche si focalizzano sull'espressione anomala di proteine chiave coinvolte in vari pathways, tra cui il sistema di risposta al danno al DNA (DNA-Damage Response, DDR), sistemi di rimodellamento della cromatina, risposta immunitaria, progressione del ciclo cellulare, transizione EMT, sopravvivenza alla senescenza e mantenimento della staminalità. In particolare, l'immortalità, la si acquisisce inibendo apoptosi e senescenza. Il processivo accorciamento telomerico viene risolto tramite due processi, a volte coesistenti nella medesima popolazione cellulare, definiti come TMM (Telomere Maintenance Mechanism, meccanismo di mantenimento dei telomeri), che viene attuato mediante il ripristino dell'espressione del gene TERT (telomerase reverse transcriptase che, codifica la retrotrascrittasi della telomerasi), ed ALT (allungamento alternativo dei telomeri) che si basa invece su processi di ricombinazione omologa (HR) (De Vitis M et al., 2018). La mutazione di geni oncosoppressori, come TP53 e RB (retinoblastoma), elude altri processi di senescenza. La cellula neoplastica inibisce, inoltre, i processi di autofagia (che si innescano come "risposta" a stress nutritivi) ed apoptosi (richiamati a seguito di stress di entità e durata maggiore). Le cellule neoplasiche hanno ingenti bisogni fisiologici, dovendo far fronte a crescita pressoché illimitata, e devono assicurarsi una corretta e costante fornitura di nutrienti ed ossigeno. I tumori si assicurano l'accesso a queste risorse mediante: angiogenesi (attivazione VEGF, RAS e MYC); interazioni con cellule tumorali, da cui ne derivano rapporti di reciproca influenza;

il mantenimento di un processo infiammatorio prolungato (“tempesta” citochinica e continua produzione di GF); stimolazione dello stroma tumorale (microambiente contenente i fibroblasti associati al tumore o CAFs) a produrre fattori importanti per la proliferazione e la transizione EMT, oltre che importanti per il supporto meccanico e rimodellamento della matrice (secrezione metalloproteasi). Tipicamente il tumore attua, inoltre, uno switch metabolico al fine di favorire i processi di crescita tumorale, a scapito di altri tessuti con accrescimento “normale”. Ricopre un importante ruolo, nel processo tumorigenico, il cosiddetto “effetto Warburg” secondo il quale il tumore tende ad accumulare un ingente quantità di glucosio ed amminoacidi; l’acquisizione di questo comportamento egoistico rende estremamente favorevole un metabolismo di tipo glicolitico, definito come glicolisi aerobica, che va quindi a sostituirsi al “normale” metabolismo cellulare. Il perché, durante la tumorigenesi, venga favorita la glicolisi al ciclo di Krebs è spiegato in diverse ipotesi, prima fra tutti la possibilità di evitare un eccessivo accumulo di prodotti intermedi (coprodotti sia al ciclo di Krebs che dalle cellule in attiva proliferazione) ed evitare così l’innescò di meccanismi regolatori a feedback negativo; il rilascio di grosse quantità di lattato ha come effetto principale la stimolazione delle cellule stromali a creare un ambiente immunosoppressivo, in cui risulta particolarmente favorita l’angiogenesi (Pascale RM et al.,2019).

## 1.2. Caratteristiche genetiche delle cellule tumorali influenzanti la radioresistenza

Le cellule somatiche cancerose differiscono da quelle non cancerose per l’instabilità genomica e l’immortalità (Pontieri GM et al., 2019). L’acquisizione di un fenotipo trasformato a partire da una cellula normale è quindi un graduale, lento e complesso processo che prevede l’accumulo di mutazioni genetiche ed alterazioni epigenetiche che permettano alla cellula di evadere i “normali” meccanismi di controllo (omeostasi cellulare) coinvolti nell’eliminazione del tessuto aberrante (immortalità) e di rendere la proliferazione indipendente dallo stimolo proliferativo ricevuto. Nonostante l’enorme eterogeneità genetica, è possibile identificare un certo numero di “caratteristiche (mutate) comuni” a tutte le neoplasie, sebbene vengano acquisite in tempi e distribuzioni spaziali diverse. I meccanismi attraverso i quali le cellule tumorali riescono a “conquistare” le suddette caratteristiche comprendono una vasta rosa di eventi cellulari, tra cui: secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule stromali del cancro (microambiente); rendere le membrane estremamente responsive, incrementando l’espressione dei recettori per i fattori di crescita; produzione di



“molecole chiave” per i processi proliferativi; disattivazione dei meccanismi inibitori della proliferazione incontrollata.

Il principale “punto di partenza” del processo neoplastico, definito come processo multi-step, sono le cellule staminali del cancro (cancer stem cells o CSC, cellule staminali del cancro) (Figura 1) originate a partire da cellule staminali oppure da cellule somatiche differenziate che hanno riacquisito capacità riproduttiva in seguito a trasfezione genica. Le CSC vengono anche dette TPC (tendon progenitor cell o cellule progenitrici tendinee, poiché individuate per la prima volta nei tendini da Bi et al. nel 2007), cioè cellule propagatrici di tumore poiché in grado, se trapiantate, di produrre nuove neoplasie. L’acquisizione dei caratteri “staminali” è alla base dei meccanismi di sopravvivenza delle cellule tumorali. Il processo neoplastico è lento e necessita di una vera e propria “promozione”, che consiste

Figura 1 Progressione neoplastica. Immagine presa da “Stem cells in cancer initiation and progression”. Jeevisha Bajaj et al., 2020.

nell’acquisizione di diverse mutazioni (lesioni preneoplastiche) che culmina in un’iperplasia neoplastica; come prima conseguenza le cellule stromali, comunicanti con la neoplasia, avviano un processo infiammatorio (con relativa attivazione chemiotattica da parte di diverse citochine pro-infiammatorie e diversi segnali di crescita, importanti nei processi di risposta a danno cellulare esteso). A questa fase segue la “progressione” che consiste nell’accumulo di ulteriori mutazioni e caratteristiche importanti per la conversione delle neoplasie “benigne” in neoplasie “maligne” (Figura 2). Ovviamente, l’acquisizione di continue mutazioni può essere considerato un evento di forte

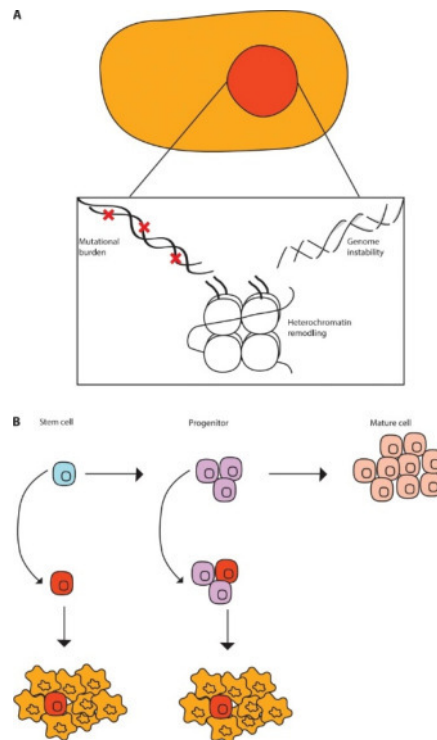


Figura 2 L’accumulo di mutazioni e l’attivazione di programmi epigenetici sono i principali promotori del processo di differenziazione delle cellule tumorali. Immagine presa da “Stem cells in cancer initiation and progression”. Jeevisha Bajaj et al., 2020.

instabilità genomica che, in condizioni fisiologiche, viene selezionato negativamente dai processi di riparazione del DNA e dall'aumentato rischio, per la cellula mutata, di acquisire mutazioni sfavorevoli alla propria sopravvivenza ma, come nel caso della tumorigenesi, l'acquisizione di un vantaggio proliferativo determina l'aumento delle capacità di sopravvivenza di quella particolare cellula, la quale darà sicuramente origine ad una popolazione clonale selezionata positivamente nel contesto cellulare fisiologico analizzato. A questo proposito bisogna definire con precisione gli "attori" coinvolti in queste prime fasi di questo processo multi-step: in primis si definisce "driver" (conduttore) un gene, la cui mutazione, ha una certa rilevanza nel processo tumorigenico ed è, pertanto, soggetto a forti pressioni evolutive; mentre si definisce "passenger" (passeggero) un gene la cui mutazione non è direttamente "influyente" nel processo tumorigenico meno soggetta, perciò, ai processi di selezione genetica. Da un punto di vista temporale si distinguono le initiating mutations (mutazioni importanti per l'inizializzazione del processo e, pertanto, importanti nelle fasi precoci del processo) e le cooperating mutations (che sovengono nelle fasi tardive); la cronologia delle mutazioni coinvolte influenza ampiamente lo sviluppo delle patologie neoplasiche. Le neoplasie sono caratterizzate da eterogeneità genetica intra-tumorale ed inter-tumorale e ciò contribuisce ad aumentare la difficoltà diagnostica nell'individuazione degli hot-spot mutati nella progettazione di terapie individuali. Questa eterogeneità si riscontra anche a livello di singolo tessuto neoplasico, in quanto, durante tutto il processo neoplasico, ciascuna cellula figlia potrà "decidere" se mantenere la capacità clonogena della cellula staminale madre (CSC) o se andare in contro a differenziazione (TAC o transit amplifying cells, cellule di amplificazione in transizione), la capacità proliferativa diminuisce all'aumentare dei cicli riproduttivi e le cellule cancerose si specializzano sempre di più, fino a divenire cellule differenziate terminali non proliferanti e non clonogene. La capacità di formare metastasi è unica delle cellule CSC, in quanto uniche capaci di iniziare il processo cancerogenico a partire da tessuto sano. Fattore importantissimo nella formazione di metastasi è il processo di transizione epitelio-mesenchimale (epithelial-mesenchymal transition o EMT) che comporta la perdita delle caratteristiche tipiche delle cellule epiteliali e l'acquisizione delle caratteristiche tipiche delle cellule mesenchimali, in particolare riguarda l'acquisizione di caratteristiche morfologiche, funzionali e trascrizionali differenti, con conseguente perdita dei marcatori fenotipici epiteliali e l'acquisizione dei marcatori fenotipici mesenchimali. La transizione EMT determina l'acquisizione del carattere invasivo tipico di un processo metastatico ed è mediata da una serie di citochine, fattori di trascrizione ed altri mediatori; questi segnali pro-EMT

vengono rilasciati soprattutto dalle cellule stromali (Figura 3)(cellule cancerose che entrano in contatto con fattori di crescita e sopravvivenza, sequestrati alla matrice, a formare il microambiente tumorale)e, in particolare, in condizioni di ipossia (che spinge il tumore a ricercare migliore apporto di ossigeno e nutrienti). L'ottenimento di comportamento migratorio avviene mediante modificazioni morfologiche e perdita dell'adesività intercellulare (ad esempio la sostituzione dell'E-caderina, importante per l'adesione cellula-cellula, con l'N-caderina è

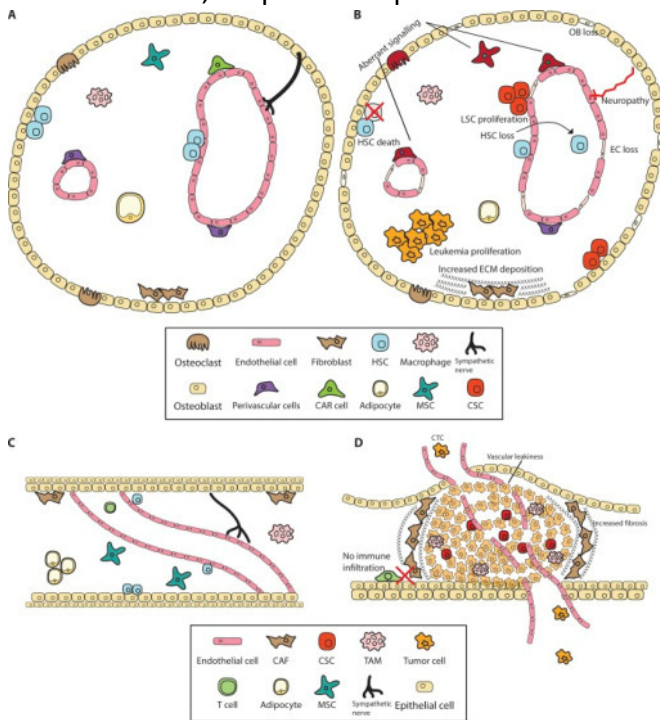


Figura 3 Principali componenti del microambiente tumorale e principali conseguenze della transizione EMT (g) Immagine presa da "Stem cells in cancer initiation and progression". Jeevisha Bajaj et al., 2020.

considerato l'evento critico per l'acquisizione dell'invasività).

La progressione del cancro è controllata temporalmente e spazialmente da diversi fattori di trascrizione, programmi genetici e modificazioni epigenetiche. In particolare, le cellule cancerose possono rimanere

in stato di quiescenza per anni, prima di riattivarsi a seguito di stimoli proliferazione; il principale fattore di trascrizione coinvolto è NANOG, capace di dedifferenziare i fibroblasti, entrando direttamente nel nucleo. A contribuire nella

modulazione neoplastica vi sono notevoli fattori epigenetici con funzioni strettamente correlate: regolatori epigenetici, modificatori ed effettori. A "raccolgere" gli stimoli ambientali e trasdurli sono i regolatori epigenetici, questi influenzano direttamente la localizzazione dei modificatori e possono favorire, indirettamente, la riprogrammazione della cromatina a seguito di alterazioni geniche accumulate nella propria sequenza nucleotidica; alternativamente sono coinvolti anche nella riorganizzazione strutturale dei siti enhancer e come conseguenza possono portare alla stabilizzazione di un tipo cellulare tumorale o alla promozione dell'eterogeneità cellulare. I modificatori epigenetici sono coinvolti soprattutto nelle modificazioni post-traduzionali degli istoni e nella regolazione dei livelli di metilazione del DNA (DNA methyltransferase o DNMT, DNA metiltransferasi), può trattarsi di writers (scrittori) o readers (lettori) coinvolti nel rimodellamento della cromatina. Il ruolo principale degli effettori, attivati dai modificatori, è quello di condurre la cellula tumorale verso una condizione più "staminale", aumentando l'eterogeneità cellulare; questa funzione si traduce

nella maggior parte dei casi nella redistribuzione delle regioni eterocromatiche coinvolte nella repressione stabile dei geni attivi durante lo sviluppo. Vi sono, in particolare, tre tipologie diverse di instabilità: MIN (instabilità a livello di sequenza nucleotidica) caratterizzata dalla presenza di microsatelliti altamente sensibili ad errori replicativi; modificazioni epigenetiche, che riguardano soprattutto l'alterazione dei livelli di metilazione ed acetilazione (deregolazione oncosoppressori ed iper-regolazione di oncogeni); CIN (instabilità cromosomica) classificata in base al "grado di instabilità" (che va da una situazione diploide all'acquisizione di un cariotipo instabile), di particolare importanza sono la condizione poliploide, eteroploide e la presenza di cromosomi dicentrici, fortemente instabili, caratterizzati da un loop di tentate riparazioni del danno al DNA che non trovano risoluzione (e con conseguente amplificazione genica degli oncogeni).

## 2.APPROCCIO SPERIMENTALE

Lo scopo dell'articolo è quello di chiarire la relazione fra l'accumulo di mutazioni nei geni driver e passenger e la manifestazione di radioresistenza.

Al fine di valutare l'insuccesso delle terapie con IR, nell'articolo è stata valutata in primis la sopravvivenza clonogenica di 59 linee cellulari tumorali: 52 linee da tumori solidi NCI-60 del National Cancer Institute Drug Developmental Program e 7 linee cellulari del Japanese Collection of Research Bioresources Cell. Le linee cellulari sono state mantenute a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, in DMEM integrato con FBS al 10%, L-glutammina 2 mM, streptomycina e penicillina. Gli esperimenti sono stati condotti evitando protocolli con un numero di step superiori a 25, per garantire l'integrità dei campioni. I dati genomici relativi alle alterazioni somatiche sono stati acquisiti dal progetto COSMIC cell line v. 80 (<http://cancer.sanger.ac.uk>), questo studio si focalizza su mutazioni nucleotidiche (sostituzioni, inserzioni o delezioni) e variazioni del numero di copie (CNV o copy number variation, variazione del numero di copie) classificate come "patogene" in base all'analisi funzionale condotta tramite l'utilizzo dei modelli di Markov nascosti. Il saggio di sopravvivenza clonogenica è stato condotto prelevando le cellule dopo trattamento proteolitico con tripsina, nella fase esponenziale della loro curva di crescita (per essere sicuri di avere cellule correttamente ciclanti) e ne è stato contato il titolo iniziale. La sospensione cellulare è poi stata sottoposta ad irradiazione mediante l'irradiatore Cs-137  $\gamma$  (Gammacell<sup>®</sup> 40 Exactor); le cellule sono state sottoposte a dosi singole di 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 Gy, la dose massima utilizzata è stata di 12 Gy, che è stata somministrata soltanto alle linee cellulari radioresistenti. La semina dopo l'irraggiamento è stata eseguita in duplicato in piastre da 60 mm, in modo da consentire la formazione di 20-100 colonie per piastra, è stato eseguito un successivo conteggio dopo 12-18 giorni e le misurazioni sono state ripetute 2-4 volte per ciascuna linea cellulare. È stato utilizzato un modello lineare-quadratico standard per stimare la relazione dose-

risposta e in questo caso specifico, per l'adattamento della curva, è stato utilizzato un modello di regressione lineare ad effetti misti. Sono stati valutati contemporaneamente gli effetti fissi, dovuti alle varie dosi di radiazioni, e gli effetti casuali, dovuti a varianza fra le linee cellulari e a fluttuazioni causate dalle numerose misurazioni. Il MID o dose di inattivazione media (area sotto la curva dose-sopravvivenza) è stato selezionato come valore adeguato a stimare la radiosensibilità cellulare (Fertil B et al., 1984). Le informazioni necessarie all'arricchimento dei dati sono state reperite dalla Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>). Per valutare l'efficienza dei risultati ottenuti, sono stati effettuati test di verifica con i dati del The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), prelevati dal National Cancer Institute Genomic Data Commons (<https://gdc.cancer.gov>) ed il download e preparazione dei dati sono stati effettuati mediante l'utilizzo del pacchetto R TCGAbiolinks. L'algoritmo PolyPhen ha reso possibile l'attribuzione di un punteggio di "gravità" alle varianti nucleotidiche e, per l'esperimento, sono state selezionate soltanto le varianti "probabilmente dannose", con un filtro soglia del numero di copie  $>5$  e  $<0,2$ . Oltre i dati genomici, sono stati presi in considerazione anche altri parametri, come età, stadio della malattia, giorni all'ultimo follow-up, giorni alla morte, stato vitale, modalità di trattamento, dose di radiazioni, sito anatomico della radioterapia e giorni all'inizio della radioterapia. La costruzione di un modello predittivo affidabile si è basata sull'utilizzo di un modello di foresta casuale. Il modello permette la predizione di un esito in base alle caratteristiche genomiche riscontrate del pannello della linea cellulare di cancro. Il modello predittivo è stato poi sottoposto ad una convalida incrociata nidificata, al fine di selezionare le caratteristiche, adattare e valutarne le performance. Sono state attuate, in tutto, 3 convalide nidificate: convalida esterna, convalida interna e convalida su dati già filtrati; per ognuna di queste convalide sono stati contrassegnati un validation set ed un training set. È stato necessario effettuare un filtraggio per l'individuazione delle funzionalità ottimali, la scelta è stata ottimizzata mediante l'assegnazione di un punteggio di "importanza" delle caratteristiche analizzate. Le performance del modello predittivo, così ottenuto, sono state valutate dalla curva della caratteristica operativa del ricevitore (ROC), che mette in relazione la sensibilità e la specificità di un test diagnostico al variare del valore di cut-off (valore soglia). Un ultimo test è stato effettuato utilizzando il modello predittivo ottenuto per prevedere la sopravvivenza attesa per il set di dati TCGA. Mediante t-test è stata verificata la significatività statistica della differenza tra i gruppi appaiati (ipotesi dell'esistenza di interazioni geniche significative), mentre la significatività statistica fra più gruppi è stata testata tramite ANOVA (Analysis of Variance) (confronto tra varianza inter-gruppi e varianza intra-gruppo). L'associazione tra la quantità di alterazioni geniche e la morte cellulare indotta da radiazioni è stata analizzata mediante regressione lineare. I dati relativi al tempo all'evento sono stati tracciati utilizzando il metodo Kaplan-Meier (time-to-event, cioè il tempo necessario affinché un dato evento si verifichi) e l'impatto delle variabili esplicative



sul tempo di sopravvivenza è stato analizzato dal modello stratificato del rischio proporzionale di Cox (analisi del rapporto fra fattore di rischio ed incidenza dell'esito clinico). Il tempo di sopravvivenza globale (OS) è il tempo caratteristico calcolato dalla diagnosi patologica iniziale al momento della morte. In caso di test ripetuti, i risultanti p-i valori sono stati rettificati con il metodo Holm–Bonferroni (riduce la probabilità di accumulare errori in presenza di più ipotesi). In tutte le analisi, il livello di significatività è stato fissato a 0,05. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software statistico R, v. 3.4.3 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)). L'apprendimento automatico dei classificatori forestali casuali è stato eseguito utilizzando il pacchetto caret di R. Come già accennato in precedenza, nel campo della genetica, il pannello di mutazioni che determinano la progressione di un processo neoplastico è estremamente complesso ed affetto da notevole variabilità, pertanto, è poco influente l'individuazione della singola mutazione. La risoluzione la si può trovare nella possibilità di utilizzare metodi statistici per attribuire un "ordine di priorità" ai geni mutati e nel calcolo del rapporto fra mutazioni driver (e passenger) ed il totale di alterazioni geniche riscontrate, al fine di fornire un approccio predittivo piuttosto stabile nel monitoraggio della progressione neoplastica. Sebbene sia ancora difficile progettare approcci terapeutici individuali, è possibile fornire delle predizioni che possano evitare d'intraprendere percorsi terapeutici inefficaci, aumentando così le probabilità di sopravvivenza dell'individuo affetto.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1. Risultati

Attraverso test di formazione di colonie standard è stato possibile misurare la morte cellulare indotta da radiazioni e stimare così la radioresistenza delle varie linee cellulari (wildtype o tipo selvatico, e mutanti). È stato scelto il MID come parametro per la stima della radiosensibilità, in quanto si è dimostrato clinicamente rilevabile e stabile, meno soggetto ad errori sperimentali. In generale, il MID ha evidenziato forti correlazioni fra frazione di sopravvivenza a 2-8 Gy e valore  $\alpha$  (che stima la letalità per dose singola, proporzionale alla dose somministrata). Come mostrato dai valori MID ottenuti, vi è elevata varianza genica intercellulare; in particolare, cellule di melanoma e glioma, hanno mostrato

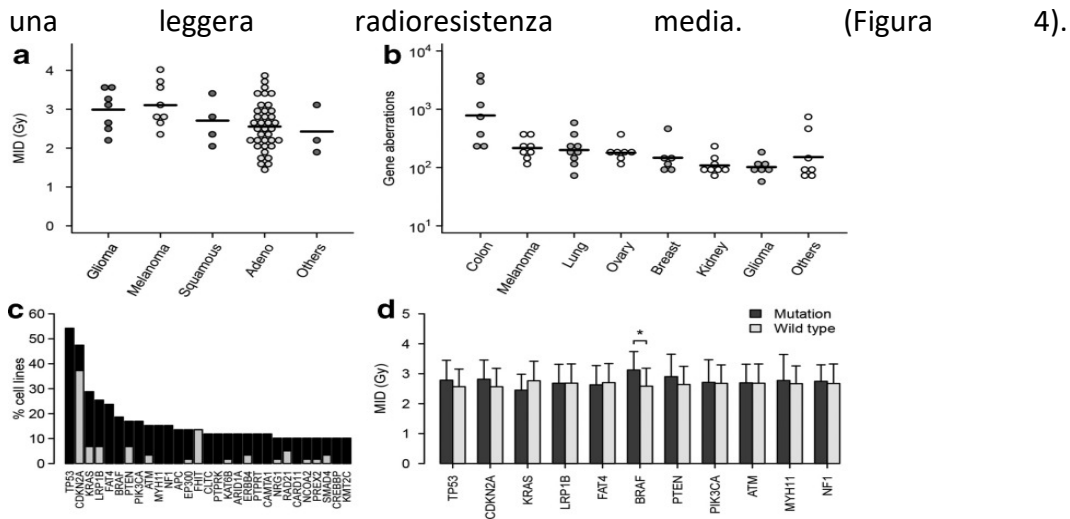


Figura 4 Nella figura vengono illustrate (a) la correlazione fra la dose media di inattivazione ed il tipo cellulare; (b) in questo caso ci si focalizza sull'individuazione di differenze fra i vari siti primari di tumore; (c) la frequenza di alterazioni geniche nelle linee cellulari per gene; (d) correlazione fra MID e linea cellulare mutata o wildtype in ciascun gene in esame.

Non sono state, però, riscontrate differenze statisticamente rilevanti fra i MID dei vari siti d'organo e dei vari campioni istologici. Il numero di aberrazioni geniche varia molto in base ai siti di cancro primario, ma la frequenza totale di alterazioni (mutazioni e CNV) ha evidenziato la presenza di "alterazioni preferenziali", condivise da molte linee cellulari (TP53, CDKN2A, KRAS, LRP1B, ecc.). La maggior parte delle alterazioni geniche sono state riscontrate nei tumori del colon e le linee cellulari coinvolte presentavano per lo più carenze nei sistemi di riparazione dei mismatch e mutazioni nella DNA polimerasi  $\epsilon$ . Nei gliomi, invece, sono state riscontrate un numero relativamente basso di alterazioni. Dei sopracitati hotspot di mutazione, sembrerebbe avere una certa associazione con un fenotipo maggiormente radioresistente unicamente le linee cellulari che presentano mutazioni nel gene BRAF, anche se queste evidenze risultano non più così tanto significative dopo l'aggiustamento per test multipli. In quest'articolo, infatti, si cerca di dimostrare come non vi sia una vera e propria dipendenza tra singola mutazione e radioresistenza, bensì il focus si sposta nell'attribuire un significato predittivo al rapporto tra alterazioni in geni driver e passenger e mutazioni totali. Caratteristica fondamentale dei tumori è quella di riuscire ad adattarsi facilmente a qualsiasi cambiamento ambientale tramite l'aumento dell'instabilità genetica che li accomuna, motivo per il quale si adattano facilmente ai trattamenti chemioterapici. Sebbene la cellula, per divenire immortale, cerchi di bloccare l'apoptosi (mantenimento integrità membrana mitocondriale esterna, blocco della via estrinseca e blocco delle caspasi terminali), sono stati riscontrati casi in cui i tumori riattivano i processi apoptotici al fine di facilitare il processo neoplasico (attivazione fosfolipasi A2, secrezione sostanze segnale polarizzanti verso i macrofagi, attivazione endonucleasi G). In particolare, la riattivazione di

endonucleasi è spesso causa di rotture del DNA a doppio filamento (DNA double-strand break o DSB), il suddetto danno sarà rilevato dai meccanismi di riparazione, che tenteranno di riparare il DNA per ricombinazione, la quale rappresenta l'unico e disperato tentativo del tumore di introdurre nuova instabilità, potenzialmente in grado di garantire alla neoplasia l'acquisizione di una nuova resistenza. Pertanto, la manifestazione di radioresistenza può essere anche dovuta a cambiamenti genetici per riparazione dei danni al DNA radioindotti. L'instabilità genetica, pur essendo estremamente rischiosa per il tumore stesso, risulta molto spesso la principale causa dell'accumulo di fenotipi resistenti alle terapie oncologiche. In primis si è tentato di attribuire la radioresistenza all'accumulo di mutazioni in determinati pannelli genici di riferimento; ma il numero di alterazioni genomiche totali non era significativamente correlato al MID. Concentrandosi dapprima sulla correlazione fra il pDriver (proporzione delle alterazioni dei geni driver rispetto alle alterazioni geniche totali) si è cercato di eliminare il "rumore" dei geni non correlati alla radioattività, arricchendo il pannello di geni in esame con l'analisi delle pathway coinvolte tramite la consultazione del database KEGG. A questo set di geni filtrati è stato applicato un modello di foresta casuale per prevedere la radioattività, a partire dai dati di pDriver; il modello è stato ottimizzato per prevedere fenotipi radioresistenti con MID maggiore o uguale a 3 Gy. È stata effettuata un'eliminazione ricorsiva delle caratteristiche per determinare quali fossero le caratteristiche genomiche più significative per i training set ed i validation set. La relazione tra pDriver e MID è mostrata tramite una

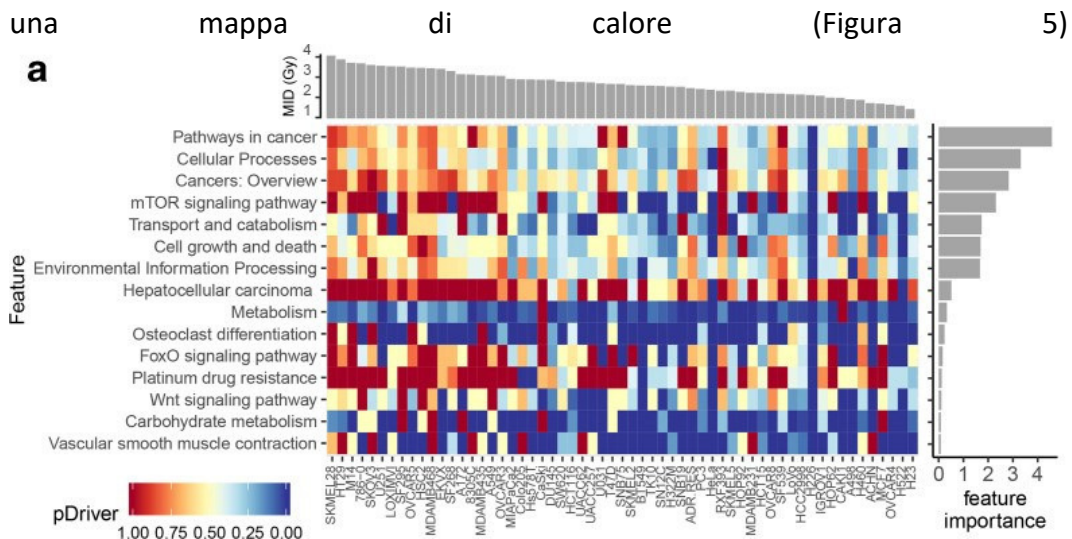
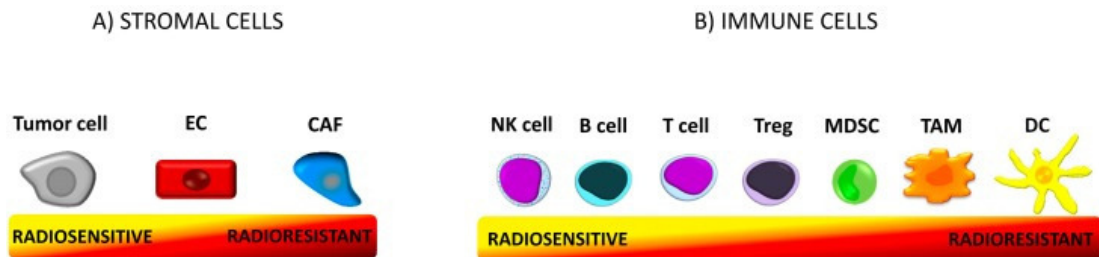


Figura 5 Mappa di calore che mette in relazione il pDriver con il MID

e, da questa, viene evidenziata una stretta correlazione per sette set di geni. Le prestazioni predittive della foresta casuale sono state valutate su set di geni indipendenti, utilizzando le caratteristiche selezionate e filtrate. Un'analisi ROC ha rivelato che il classificatore forestale casuale ha fornito una discriminazione ragionevolmente buona con sensibilità dell'85%, specificità del 73% e AUC di 0,79. Per completezza, è stata valutata l'ipotesi di sostituire il pDriver con due diversi insiemi di caratteristiche alternativi (numero assoluto di alterazioni nei geni

driver nei pannelli genici KEGG e lo stato di mutazione di tutti i geni driver), ma il modello utilizzante il pDriver ha dimostrato prestazioni predittive sostanzialmente migliori rispetto agli altri modelli; è stata inoltre integrato anche il contributo dei geni passenger, accreditati come potenzialmente influenti sul processo di radioresistenza. Sulla base del risultato dell'eliminazione delle caratteristiche ricorsive, il classificatore casuale della foresta è stato finalizzato su tutti i dati di 59 linee cellulari disponibili utilizzando i primi 7 set di geni KEGG. A seconda di pDrivers, l'albero decisionale classifica le 59 celle in classe radiosensibile o radioresistente. Un albero decisionale individuale è stato addestrato utilizzando il 63% delle 59 celle selezionate casualmente (In-Bag), mentre l'albero è stato utilizzato per prevedere le classi per il restante 37% delle 59 celle (Out-Of-Bag). Il punteggio R-score (score di radioresistenza) è stato definito come la frazione di alberi decisionali che votano la classe radioresistente. Punteggi R più elevati ( $>0,3$ ) prevedevano la radioresistenza per i campioni Out-Of-Bag con una sensibilità dell'83% e una specificità dell'89%. Per convalidare l'R-score sono stati utilizzati set di dati TCGA provenienti da ben 12 progetti per vari tipi di tumore solido, per un totale di 5168 pazienti. Il tempo di follow-up è stato di 1,6 anni ed il tasso di OS (overall survival rate o tasso di sopravvivenza globale) variava dal 28% al 100% (sono stati esclusi i pazienti con OS superiore a 95%, poiché ritenuto irrilevante l'impatto della radioresistenza durante in questi tumori durante il periodo di follow-up). Sono stati esclusi 41 pazienti positivi al papilloma virus umano (HPV), che formavano una popolazione distinta caratterizzata da buona prognosi. La valutazione di un possibile impatto del R-score sulla sopravvivenza globale (OS) è stata effettuata tramite l'utilizzo del modello stratificato di Cox. Oltre al R-score, sono stati inclusi due cofattori, considerati fattori di confondimento significativi: l'età e lo stato della malattia. Come fattore di stratificazione è stato incluso il tipo di progetto (i tipi di tumore violavano l'ipotesi di rischio proporzionale); sono state generate diverse funzioni di rischio per ciascun tipo di progetto, dopo aver controllato l'influenza del diverso tipo di progetto. L'ipotesi di dipendenza tra R-score e tipo di progetto è stata rifiutata, pertanto l'hazard ratio (HR) per l'R-score è stato "aggiustato" in base all'influenza dell'età, dello stadio, del tipo di tumore e dello stadio della malattia. L'applicazione di questo modello ha interessato tre categorie di set di dati, classificati in base alla terapia erogata: nessuna radioterapia (No-RT), radioterapia definitiva (Def-RT) e radioterapia palliativa (Pal-RT). Per radioterapia definitiva s'intende una terapia consistente in irraggiamento maggiore o uguale a 45 Gy ai siti primari e/o linfatici locali, nonostante i pazienti Pal-RT abbiano ricevuto terapie RI, non rientrano comunque negli standard dei pazienti Def-RT. Ciò che si è osservato è un R-score più alto in presenza di una sopravvivenza globale peggiore; la radioresistenza è pertanto un importante fattore predittivo di cattiva prognosi. Si nota inoltre che questa correlazione si affievolisce negli stadi avanzati di tumore (impatto maggiore dell'R-score sulla OS degli stadi iniziali), questo probabilmente dato dal forte impatto che la radioterapia ha nelle fasi in cui le cellule tumorali sono più ciclianti, cioè quando il

tumore, essendo nelle fasi iniziali, è per lo più composto da cellule CSC. L'R-score ha scarsa rilevanza nei pazienti Pal-RT.



*Figura 6. Anche all'interno dello stesso preparato istologico tumorale, le cellule cancerose presentano radiosensibilità intrinseca differente. In primis questo è dato dai diversi "comportamenti" ed "esigenze" cellulari, ma gran parte delle differenze sono rappresentate dai meccanismi di regolazione epigenetica, che determinano una vulnerabilità più o meno marcata. Immagine presa da "Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy". Magdalena Jarosz-Biej et al., 2019.*

### 3.2. Discussione

I geni coinvolti nella cancerogenesi vengono convenzionalmente divisi in oncogeni ed oncosoppressori. Gli oncogeni (proto-oncogeni) regolano la crescita cellulare, la proliferazione e le vie pro-sopravvivenza; in generale le alterazioni tumorigeniche che li colpiscono agiscono al fine di promuovere la capacità proliferativa delle cellule coinvolte. Gli oncosoppressori sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA e nell'apoptosi e si parla, convenzionalmente di mutazioni con perdita di funzione (regolativa), atte a promuovere sopravvivenza cellulare e proliferazione incontrollate. Complessivamente, le alterazioni genetiche tumorigeniche sono ritenute potenziali responsabili dell'acquisizione di un fenotipo radioresistente. Sebbene siano molte le mutazioni in singolo gene che sono considerate sufficienti a conferire fenotipo radioresistente, non è stato possibile individuare un marker genico universale per la radioresistenza, a causa dell'elevata eterogeneità dei tessuti neoplastici (inter ed intramolecolare). La radioterapia in sé contribuisce, purtroppo, all'accumulo di instabilità genica a causa dei numerosi danni al DNA

radioindotti

(principalmente

DDB)

(Figura

7)

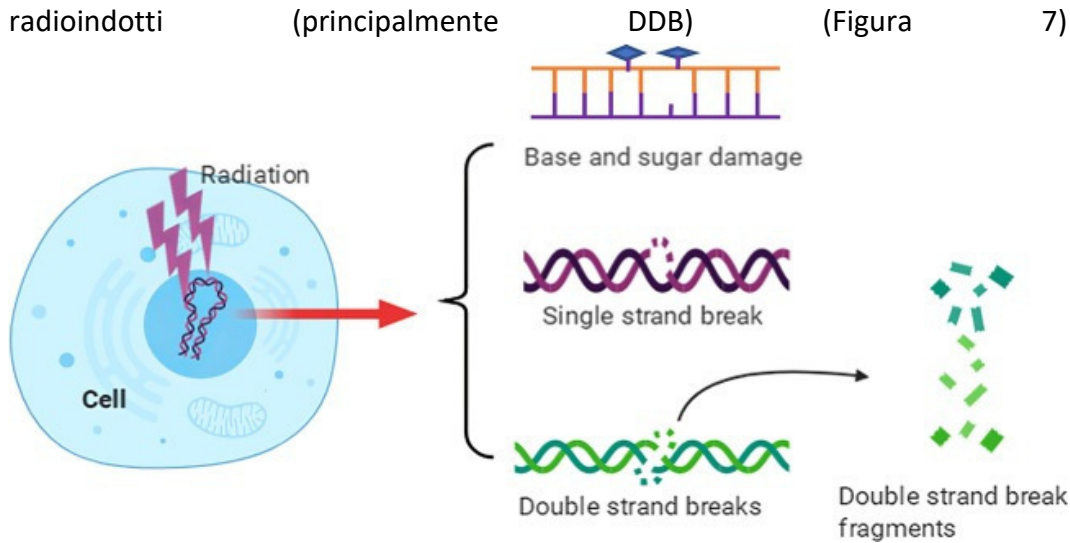


Figura 7 Il danno indotto da RI al DNA consta principalmente nella formazione di rotture a doppio, singolo filamento o, semplicemente, nell'eliminazione di uno zucchero o di una base. Immagine presa da "DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer". Rui-Xue Huang et al., 2020.

e coinvolge più vie di segnalazione (a differenza degli agenti terapeutici mirati). Un altro fattore rilevante è l'interazione genica osservabile tra due mutazioni. Se le due mutazioni interessano pathways diverse, il loro effetto può essere additivo; nel caso interessino la medesima pathway, o pathways strettamente correlate, l'effetto può essere sinergico. Contrariamente, le mutazioni possono essere causa di ridondanza o possono avere azioni antagonistiche e, in casi estremi, avere effetto letale. Analizzando l'intero genoma si è però arrivati alla conclusione che gli effetti antagonisti e sinergici sembrano sommarsi algebricamente; pertanto, è stato possibile utilizzare, in questo studio, una semplice formula algebrica, assumendo che gli effetti mutazionali di ciascun gene fossero additivi. Sebbene sembri controproducente l'accumulo di mutazioni deleterie, probabilmente l'estrema capacità di sopravvivenza delle cellule tumorali è data anche dall'estremo potenziamento proliferativo che consente, all'intera massa tumorale, di sacrificare anche una certa porzione di cellule che, avendo accumulato una quantità estrema di mutazioni letali, incorre a morte cellulare (deficit o citotossicità). Mentre i geni driver sono soggetti a stretta pressione evolutiva, i geni passenger sono liberi di accumulare mutazioni. Presi singolarmente, gli effetti deleteri dei geni passenger, hanno un impatto deleterio molto minore a quello dei geni driver, ma la loro additività può comunque portare alla letalità o influenzare negativamente la progressione del cancro. L'azione principale dei passenger sui driver è di tipo regolativo e sono spesso coinvolti nella modulazione di specifiche regioni costituzionalmente caratterizzate da significatività funzionale (funzionalmente attive). Altro fenomeno che si associa, con estrema probabilità, al processo di radioresistenza, sono gli effetti indiretti

dovuti al processo di letalità collaterale. Questo processo è dovuto alla delezione di geni passenger adiacenti ai locus di driver deleti in omozigosi; i passenger deleti “collateralmente” possono essere causa di vulnerabilità (potenziali target terapeutici) o possono portare all’acquisizione di nuove resistenze. In questo studio è stata dimostrata la validità del MID come valore rappresentativo della radiosensibilità; i principali vantaggi di questo parametro una minor variabilità tra le misurazioni (maggiore riproducibilità), la capacità di rappresentare l’intera curva di sopravvivenza per singolo valore, la capacità di tener conto dei multidosaggi e l’elevata rappresentatività nell’intervallo fra le dosi di 2 Gy e 8 Gy. Ovviamente il primo svantaggio è la scarsa rappresentatività a dosi inferiori a 2 Gy e superiori a 8 Gy. In sostanza, questo studio ha raccolto risultati poco applicabili nei casi di terapia ablativa e regimi di trattamento iperfrazionato. Un altro lato negativo è rappresentato dal flusso con il quale è stato condotto l’esperimento, derivante unicamente da un approccio correlativo e non causativo. Il principale risultato raggiunto è il cosiddetto R-score (convalidato nei set di dati clinici indipendenti) come fattore predittivo affidabile, in grado di predire la prognosi (decorso ed esito) di condizioni patologiche a cui erogare la terapia IR definitiva (R-score più elevati sono stati associati a OS peggiori dopo la terapia definitiva). Questo studio espone anche, però, la necessità di indagare ulteriormente sui possibili fattori confondenti nella relazione parametro genomico-radioresistenza. In conclusione, gli autori confermano di aver individuato un’associazione significativa tra le aberrazioni dell’intero genoma e la reattività alle radiazioni. A causa dell’elevata complessità multifattoriale dell’effetto “radioresistente”, è consigliato un approccio genome wide per prevedere la risposta alla radioterapia attendibile.

### 3.3. Considerazioni personali

In questo breve paragrafo voglio affrontare una questione etica poco considerata negli articoli scientifici a cui ho fatto riferimento, ma che sento il desiderio di riportare. La possibilità di ottenere prognosi attendibili sul possibile esito di una terapia potrebbe portare al perfezionamento delle terapie oncologiche ed evitare possibili recidive, in caso venga individuata una resistenza al trattamento selezionato. Ammetto che l’estrema complessità del processo neoplasico possa condurre, molto spesso, all’individuazione di terapie errate e, a volte, anche debilitanti per il paziente stesso. Ma, a volte, l’invasività e il costo della terapia genica individuale rende questo approccio fruibile soltanto ad una piccola percentuale di pazienti che, molto spesso, vengono lesi anche psicologicamente dalla conoscenza di prognosi negative. Lo scopo di questo paragrafo non è quello di frenare la ricerca scientifica ma, anzi, di sollevare un dilemma poco trattato nel campo dell’etica medica. Una delle problematiche principali dell’indagine genica individuale, tramite mappatura dell’intero genoma, sono gli elevati costi e ciò rende la terapia individuale fruibile solo da una piccola porzione di popolazione. (<https://www.who.int/health-topics/palliative-care>) In secondo luogo, un



approccio genetico individuale necessita di una valutazione psicologica approfondita del paziente, che potrebbe entrare in stato di confusione o, nel peggiore dei casi, incorrere in stati depressivi gravi, piuttosto deleteri per la guarigione del paziente.

#### 4.BIBLIOGRAFIA

- Pascale RM, Feo F. Elementi di oncologia molecolare. Padova: Piccin Nuova Libreria S.p.A. 2019.
- Pontieri GM, Mainiero F, Minasi R, Sorice M. Patologia Generale e Fisiopatologia Generale. Tomo I. VI Edizione. Padova: Piccin Nuova Libreria S.p.A. 2019.
- Busato F, Khouzai BE, Mognato M. Biological Mechanisms to Reduce Radioresistance and Increase the Efficacy of Radiotherapy: State of the Art. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 6;23(18):10211. doi: 10.3390/ijms231810211. PMID: 36142122; PMCID: PMC9499172.
- De Vitis M, Berardinelli F, Sgura A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 18;19(2):606. doi: 10.3390/ijms19020606. PMID: 29463031; PMCID: PMC5855828.
- Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res.* 1984 Jul;99(1):73-84. PMID: 6739728.
- Bajaj J, Diaz E, Reya T. Stem cells in cancer initiation and progression. *J Cell Biol.* 2020 Jan 6;219(1):e201911053. doi: 10.1083/jcb.201911053. PMID: 31874116; PMCID: PMC7039188.
- Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 29;20(13):3212. doi: 10.3390/ijms20133212. PMID: 31261963; PMCID: PMC6650939.
- Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 May 1;5(1):60. doi: 10.1038/s41392-020-0150-x. PMID: 32355263; PMCID: PMC7192953.
- World Health Organization. WHO's cancer pain ladder for adults. 2018. [www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/](http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/)
- Dai GC, Li YJ, Chen MH, Lu PP, Rui YF. Tendon stem/progenitor cell ageing: Modulation and rejuvenation. *World J Stem Cells.* 2019 Sep 26;11(9):677-692. doi: 10.4252/wjsc.v11.i9.677. PMID: 31616543; PMCID: PMC6789185.



Received:  
17 July 2019Revised:  
20 January 2020Accepted:  
06 February 2020<https://doi.org/10.1259/bjr.20190625>

Cite this article as:

Seo Y, Tamari K, Takahashi Y, Minami K, Isohashi F, Suzuki O, et al. Impact of accumulated alterations in driver and passenger genes on response to radiation therapy. *Br J Radiol* 2020; **93**: 20190625.

## FULL PAPER

# Impact of accumulated alterations in driver and passenger genes on response to radiation therapy

**YUJI SEO, KEISUKE TAMARI, YUTAKA TAKAHASHI, KAZUMASA MINAMI, FUMIAKI ISOHASHI, OSAMU SUZUKI, IORI SUMIDA and KAZUHIKO OGAWA**

Department of Radiation Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka, Japan

Address correspondence to: Dr Yuji Seo  
E-mail: [seo@radonc.med.osaka-u.ac.jp](mailto:seo@radonc.med.osaka-u.ac.jp)

**Objective:** Although various single genetic factors have been shown to affect radiosensitivity, high-throughput DNA sequencing analyses have revealed complex genomic landscapes in many cancer types. The aim of this study is to elucidate the association between accumulated alterations in driver and passenger genes and radiation therapy response.

**Methods:** We used 59 human solid cancer cell lines derived from 11 organ sites. Radiation-induced cell death was measured using a standard colony-forming assay delivered as a single dose ranging from 0 to 12 Gy. Comprehensive genomic data for the cell lines were acquired from the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer v. 80. Random forest classifiers were constructed to predict radioresistant phenotypes using genomic features. The Cancer Genome Atlas data sets were used to evaluate the clinical impact of the genomic feature following radiotherapy.

**Results:** The 59 cancer cell lines harbored either nucleotide variations or copy number variations in a median

of 157 genes per cell. Radiosensitivity of the cancer cells was correlated with neither the number of driver gene mutations nor the number of passenger gene mutations. However, the proportion of driver gene alterations to total gene alterations in gene sets selected from the Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes predicted radioresistant cells with sensitivity of 85% and specificity of 73%. High probability of radioresistance predicted by the model was associated with worse overall survival following definitive radiotherapy in patients of The Cancer Genome Atlas data sets.

**Conclusion:** Cellular radiosensitivity was associated with the proportion of driver to total gene alterations in the selected oncogenic pathways, which may be a biomarker candidate for response to radiation therapy.

**Advances in knowledge:** These findings suggest that accumulated alterations in not only driver genes but also passenger genes affect radiosensitivity.

## INTRODUCTION

Cancer cells exhibit a wide range of intrinsic cellular radiosensitivity. Many studies have revealed that various molecular factors affect response to ionizing radiation, such as gene expression profiles,<sup>1–3</sup> microRNA profiles,<sup>4</sup> and HPV infection status.<sup>5,6</sup> Mutations in oncogenes and tumor suppressor genes have also been shown to affect response to radiation. Multiple studies have shown that mutations in cancer-associated genes, including *TP53*, *CDKN1*, *CDKN2A*, *KRAS*, and *BRAF*, increase tolerance to radiation compared to otherwise isogenic wild-type cells.<sup>7–10</sup>

High-throughput DNA sequencing technology has enabled the systematic study of genetic alterations in cancer. Comprehensive analyses of cancer genomes have revealed the complexity of the genomic landscape in many cancer types.<sup>11</sup> Cancers from the same organ sites or tissues often

show a variety of genomic alterations, conversely cancers from different origins may have similar genomic changes.<sup>12</sup> Cancer cells are genetically unstable due to mutations in caretaker genes and/or oncogene-induced DNA replication stress.<sup>13</sup> This genomic instability frequently results in alterations in other cancer-associated genes and tumor progression. Accumulation of variants in cancer-associated genes may increase tolerance to anti cancer therapy. However, the functional effects of single gene mutations may be variable depending on the molecular context of the downstream pathways,<sup>14</sup> or mutations in other genes. Epistatic gene interactions are attributed to the complexity of cellular systems.<sup>15</sup> Thus, in such a complex network, it is largely unknown how the cumulative effect of cancer-associated gene mutations will influence the response to radiation-induced DNA damage.

Understanding genomic landscapes becomes more complicated as a small number of oncogenic alterations (drivers) usually accompany a larger number of non-oncogenic alterations (passengers). Passenger gene mutations were once thought to be functionally neutral, but recently many of them have been shown to confer deleterious effects to cancer cells.<sup>16</sup> Although there is an abundance of genomic data for the various types of cancer, there is a paucity of data on whether the large number of passenger alterations alter the response to radiation.

To address this question, we analyzed the radiation dose survival curves of 59 cancer cell lines possessing various combinations of driver and passenger gene alterations. In this study, we show that cellular radiation responsiveness is associated with the ratio of driver to passenger mutations in oncogenic pathways. We further test that our proposed genomic parameter also applies to clinical data using The Cancer Genome Atlas (TCGA) data sets. Our data confirm the utility of comprehensive genomic analysis and suggest that the driver:passenger ratio is a promising predictive biomarker of radiation responses.

## METHODS AND MATERIALS

### Cell lines

The NCI-60 cancer cell line panel was obtained from the National Cancer Institute Drug Developmental Program in 2012. We used 52 cell lines that were established from solid tumors; 6 leukemia lines were excluded. One colon cancer cell line (KM12) was excluded because we were unable to obtain reproducible results from clonogenic survival assays. Since gene mutation data for one melanoma line (MALME-3M) was not available in the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) cell line project, MALME-3M was also excluded. We also used seven additional human cancer cell lines obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Ibaraki, Japan). The 59 cell lines used in this study are listed in [Supplementary Material 1](#). All cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, streptomycin, and penicillin in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. All experiments were conducted within approximately 25 passages after initial resuscitation of each cell line.

### Data acquisition of genomic alterations

Somatic gene mutation data for the 59 cell lines were obtained from the COSMIC cell line project v. 80, a comprehensive online database of somatically acquired mutations found in human cancer (<http://cancer.sanger.ac.uk>).<sup>17</sup> The genomic alterations analyzed in this study were nucleotide variations (substitutions, insertions, or deletions) and copy number variations (CNV). The COSMIC project classifies mutations as “pathogenic” or “neutral” according to functional analysis determined through hidden Markov models; this study only included “pathogenic” nucleotide alterations. Both CNV gains and losses were included.

### Clonogenic survival assay

Exponentially growing cells were harvested through trypsinization, and the number of cells was counted. The cell suspension was irradiated using a Cs-137  $\gamma$ -irradiator (Gammacell<sup>®</sup> 40 Exactor) with single doses of 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 10 Gy. For some radioresistant cell lines, 12 Gy was also delivered. The dose

rate was approximately 85 cGy/min. Immediately following irradiation, cells were plated onto duplicate 60 mm dishes at an appropriate cell density to ensure the formation of 20–100 colonies per dish. Cells were allowed to grow for 12–18 days prior to colony counting. Measurements were repeated 2–4 times for each cell line.

A standard linear-quadratic model was used to estimate the radiation dose–response relationship. Curve fitting was performed using a linear mixed-effects regression model. Fixed effects consisted of dose and dose<sup>2</sup>. Random effects consisted of variance between cell lines and variance between repeated measurements. As a measure of cellular radiosensitivity, we utilized mean inactivation dose (MID), the area under the curve of the radiation dose–survival curve.<sup>18</sup> MID was calculated according to equation 1 using the derived  $\alpha$  and  $\beta$ .

$$MID = \int_0^{\infty} e^{-\alpha D - \beta D^2} dD \quad (1)$$

To identify and enrich for genomic alterations relevant for radiation responses, we conducted a pathway analysis using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) release 84.0 (<http://www.genome.jp/kegg>).

### Clinical outcome and genomic data

TCGA data sets were obtained from the National Cancer Institute Genomic Data Commons (<https://gdc.cancer.gov>). Downloading and preparing relevant data for analysis was conducted through TCGAbiolinks.<sup>19</sup> Although TCGA contains data for a wide variety of tumors, this study focused on 12 projects in which radiotherapy was commonly administered as part of the initial treatment. Our analysis included nucleotide variants with “Probably damaging” scores in the PolyPhen algorithm, and we set a copy number variation threshold filter of >5 or <0.2. Clinical data corresponding to the genomic data were retrieved, including age, stage of disease, days to last follow-up, days to death, vital status, treatment modality, radiation dose, anatomical site of radiotherapy, and days to start of radiotherapy. Disease stages were determined according to the AJCC pathological staging system, except for uterine cervical cancers and gliomas. For cervical cancers, FIGO clinical staging was applied. Since the TNM staging system is not used for gliomas, we utilized the radiation therapy oncology group recursive partitioning analysis classification<sup>20,21</sup> as an alternative prognostic factor. Grade 3 and 4 gliomas were classified into Classes 1 to 4 and Classes 3 to 5, respectively. The project “lgg” also included patients with Grade 2 gliomas, which we classified as Class 1 in this study. Since the project “sarc” did not provide clinical and pathological stages, we retrospectively staged each case according to the AJCC staging system, seventh edition, based on the individual pathological factors provided in the data set.

### Random forest model

A random forest was constructed to predict radioresistance by genomic features in the cancer cell line panel. Model fitting, feature selection, and model evaluation was performed by a nested cross-validation. First, the data set of the 59 cell lines

was randomly split into a separate training and test set for the outer cross-validation. The training data were further split into a training subset and a validation set for the inner cross-validation. A recursive feature elimination was performed to select optimal features. Starting with all KEGG gene sets, genomic features were eliminated one by one, and the model with a subset of features was trained on the training subset and its predictive performance was evaluated for the validation set. This process was iterated in the inner 10-fold cross-validation repeated 10 times, and an optimal subset of features was determined. The feature importance score (mean decrease in Gini index) of the best model was recorded at the end of the inner loop. The model trained in the inner cross-validation was used to predict radioresistance for unseen test sets. The process of the entire inner loop was iterated in the outer 10-fold cross-validation repeated 10 times. The feature importance scores were averaged over the outer iterations to determine the importance of each KEGG gene set. The predicted results for the test sets were aggregated over the outer iteration to estimate generalizable predictive performance. The predictive performance was assessed by the receiver operating characteristic (ROC) curve. Lastly, a final random forest model was trained on all available 59 cell data using the features selected by the recursive feature elimination. The final model was then used to predict survival outcomes for TCGA data sets.

### Statistical analysis

The statistical significance of the difference between paired groups was tested by *t*-tests. The statistical significance of the difference between multiple groups was tested by ANOVA. The association between the amount of gene alterations and radiation-induced cell death was analyzed by linear regression. The time to event data were plotted using the Kaplan–Meier method, and the impact of explanatory variables on survival time was analyzed by the stratified Cox proportional hazard model. Overall survival (OS) time was calculated from the initial pathological diagnosis to the time of death. In cases of repeated testing, the resulting *p*-values were adjusted by the Holm–Bonferroni method. In all analyses, the level of significance was set to 0.05. All statistical analyses were conducted using the statistical software R, v. 3.4.3 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)). The machine learning of the random forest classifiers was performed using the caret package of the R.

## RESULTS

### Quantitation of radiosensitivity in cancer cell lines

Radiation-induced cell death was measured using a standard colony-forming assay. The MID was calculated to represent measured survival curves. The derived MID showed strong correlations with survival fractions at 2–8 Gy and a value (Supplementary Material 1). In addition, the MID showed significantly smaller coefficient of variations than other parameters of the survival curves (Supplementary Material 1), indicating that the MID was a clinically relevant and stable parameter less prone to experimental errors. The MID of each cell line is listed in Supplementary Material 1. Large intercellular variation was observed in radiosensitivity. Melanoma and glioma cell lines show a slight tendency toward radiation tolerance compared to the other cell

types (Figure 1A). However, no statistically significant differences were found in the MIDs between organ sites or histological types.

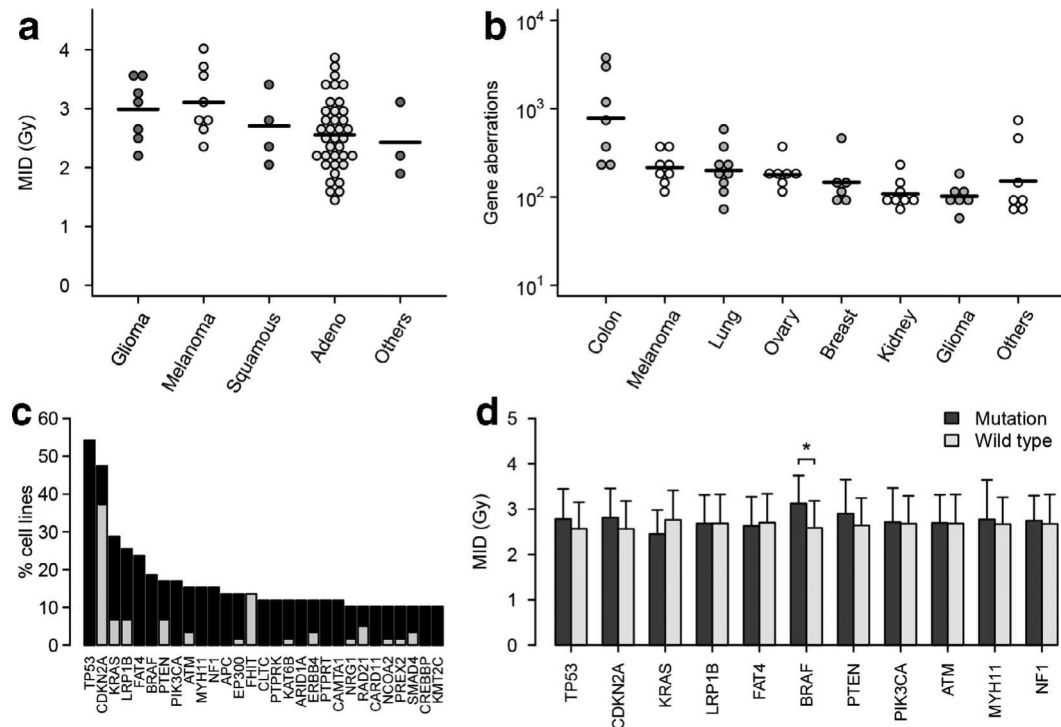
### Characteristics of genomic alterations in the cancer cell lines

The 59 cancer cell lines harbored either nucleotide variants or copy number variations in 9486 genes (median 157 genes per cell [range: 56–3412]). The majority of the alterations were located in passenger genes (total 9083 genes and median 149 genes per cell [range: 53–3252]), while there were 403 alterations in driver genes (median 10 per cell [range: 2–181]). The number of alterations varied by organ site (Figure 1B). Colon cancers showed the largest number of gene alterations. Some of the colorectal cancer cell lines had an extremely high level of mutations. These cell lines (HCT15, HCT116, and HCC2998) had either mismatch repair deficiencies or mutations in DNA polymerase  $\epsilon$ . In contrast, gliomas showed relatively low levels of gene alteration. This was consistent with data from large clinical cohorts.<sup>22,23</sup> Figure 1C shows the most frequently mutated genes in decreasing order, in which more than 5 out of 59 cell lines showed alterations. These frequently mutated genes were all drivers, including well-known genes that potentially influence radiation-induced DNA damage responses. Among the top genes, only cells with *BRAF* mutations show greater radioresistance than cells with wild-type *BRAF* (Figure 1D); however, the difference is modest and not statistically significant after adjusting for multiple testing. Overall, we did not find any single gene alterations with a strong impact on cellular radiosensitivity, most likely due to confounding effects from the various background genomes in each cell line.

### Radiosensitivity and accumulated gene alterations in drivers and passengers

Since no single gene was strongly implicated in radiosensitivity, we assessed whether it instead associated with accumulated genomic alterations. The number of total genomic alterations was not significantly correlated with the MID. The results were also similar when driver genes and passenger genes were analyzed separately (Figure 2A,B). Genomic instability has been shown to be a double-edged sword for cancer cell fitness and progression: it accelerates the accumulation of adaptive drivers, but incurs a harmful passenger load.<sup>16</sup> Excessive chromosomal instability were linked to paradoxical survival outcome in cancer.<sup>24</sup> Therefore, we next focused on the proportion of driver gene alterations to total gene alterations (pDriver). When the pDriver was assessed in whole genome, there was no significant correlation between the pDriver and the MID (Figure 2C). To eliminate noise from genes unrelated with radioresponsiveness and enrich for more informative genes, KEGG pathway analysis was conducted. The KEGG consists of 3 levels of hierarchy with 6 categories in the upper level, 52 subcategories in the middle level, and 324 pathways in the lower level, categorizing genes into biologically relevant groups. The pathways include a median of 5 (range: 0–130) driver genes and 59 (range: 1–1249) passenger genes per pathway. We applied a random forest to predict radioresponsiveness from pDriver in the KEGG gene groups. The model was optimized to predict radioresistant phenotypes with the MID of greater than or equal to 3 Gy (approximately

Figure 1. Radiosensitivity and genomic alterations in 59 cancer cell lines. (a) MID of the 59 cell lines plotted according to histological type. No statistically significant differences were found among the groups. (b) The number of genetic alterations vary among primary cancer sites. (c) The most frequently mutated genes in the 59 cell lines. Black bar, nucleotide variations; Gray bar, copy number variations. (d) Comparison of MIDs between wild-type cells and cells with mutations in the frequently mutated genes (where more than 15% of the cells harbored mutations). Error bars, standard deviation. \*,  $p = 0.02$  ( $t$ -test). MID, mean inactivation dose.



upper one-third of the MID in the 59 cell lines). First, a recursive feature elimination was conducted to determine importance of the genomic features on the training subsets and validation sets. A heatmap in Figure 3A demonstrates the relationship between pDriver and MID in the resulting top-ranked gene sets. The top seven gene sets explained the great majority of feature importance

scores. The pDriver was significantly correlated with the MID in the seven gene sets (Figure 3B). Next, the predictive performance of the random forest using the selected features was evaluated on the independent test sets. An ROC analysis revealed that the random forest classifier provided reasonably good discrimination with sensitivity of 85%, specificity of 73%, and AUC of 0.79

Figure 2. The amounts of genomic alterations and radioresponsiveness in 59 cancer cell lines. There were no statistically significant correlations between MID and (a) the number of mutations in driver genes, (b) the number of mutations in passenger genes, and (c) the proportion of driver gene alterations to total gene alterations. MID, mean inactivation dose.

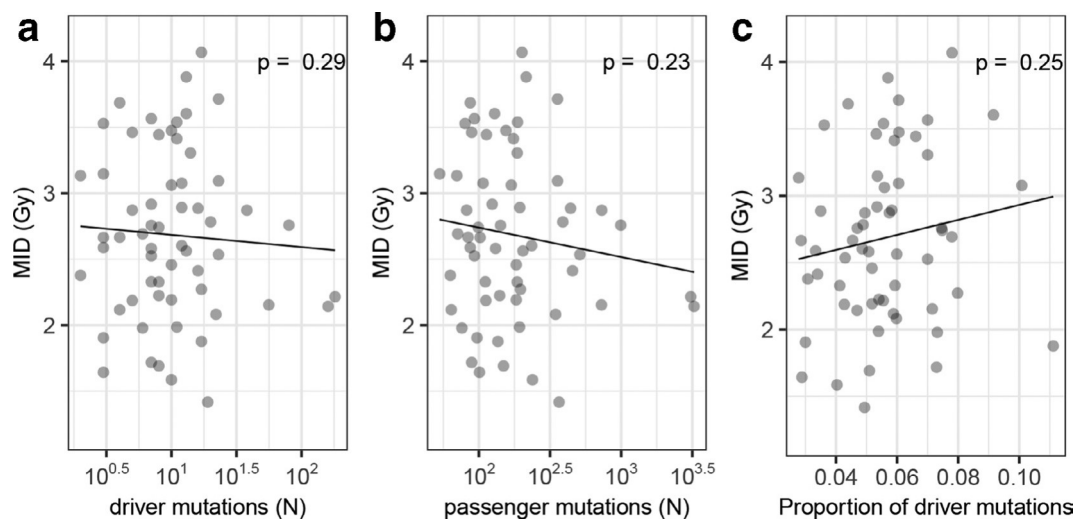
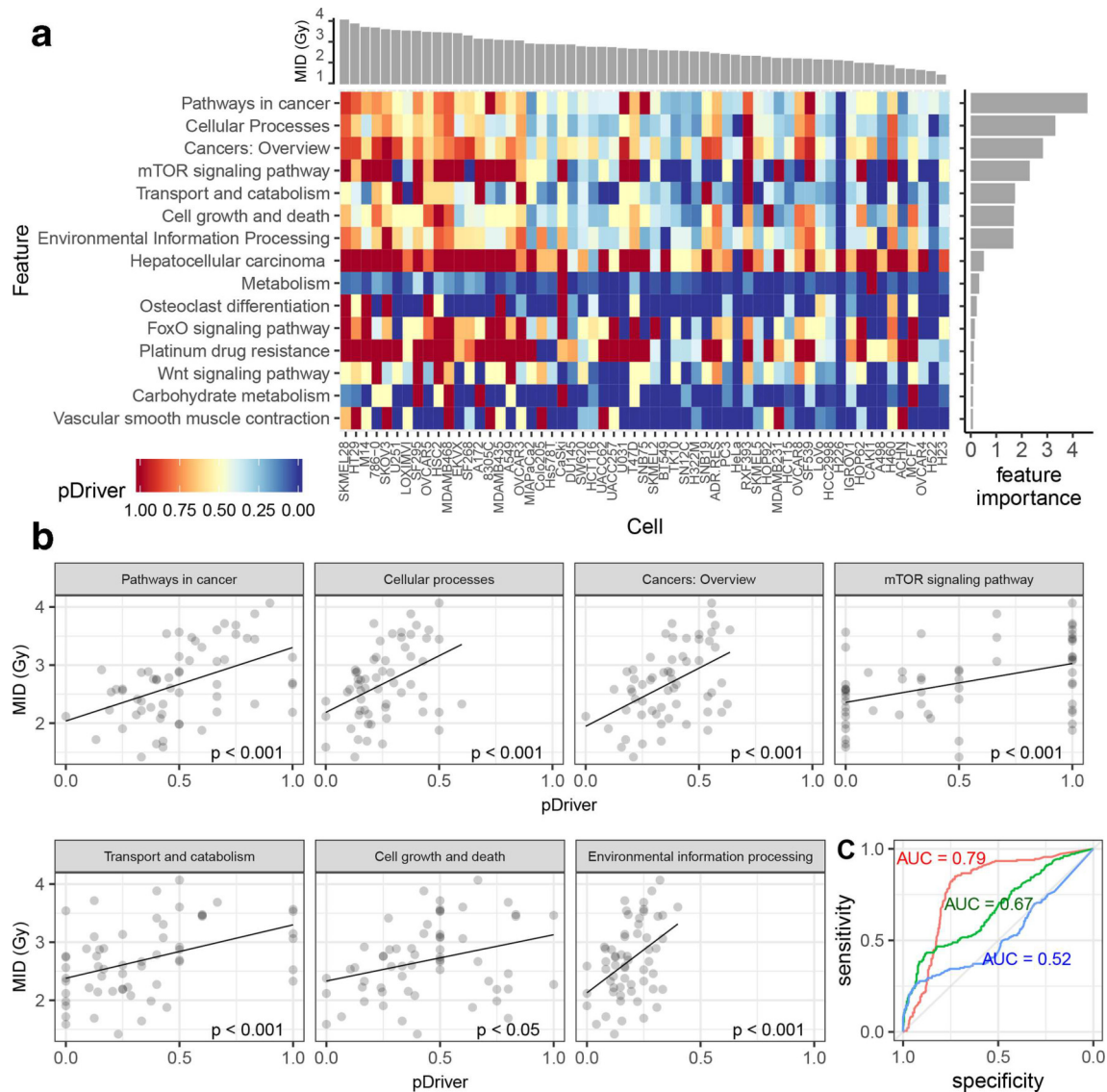




Figure 3. Selection of important genomic features by a recursive feature elimination. (a) A heatmap demonstrates the relationship between the MID and the proportion of driver gene alterations to total gene alterations (pDriver). Color values represents scaled pDriver in the top 15 KEGG gene sets. Barplots on the top show the MID of 59 cancer cell lines. Barplots on the right show feature importance values of the random forest models measured by mean decrease in Gini index. (b) Correlations between pDriver and MID in the top 7 KEGG gene sets. (c) Model performance of the random forest classifier was evaluated on the independent test dataset. The red line is a receiver operating characteristic curve when the pDriver was used as a predictor. For comparison, model performance was similarly evaluated when the number of driver mutations in the KEGG gene sets (green) or the mutation status of all driver genes (blue) were used as predictors. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MIG, mean inactivation doses.

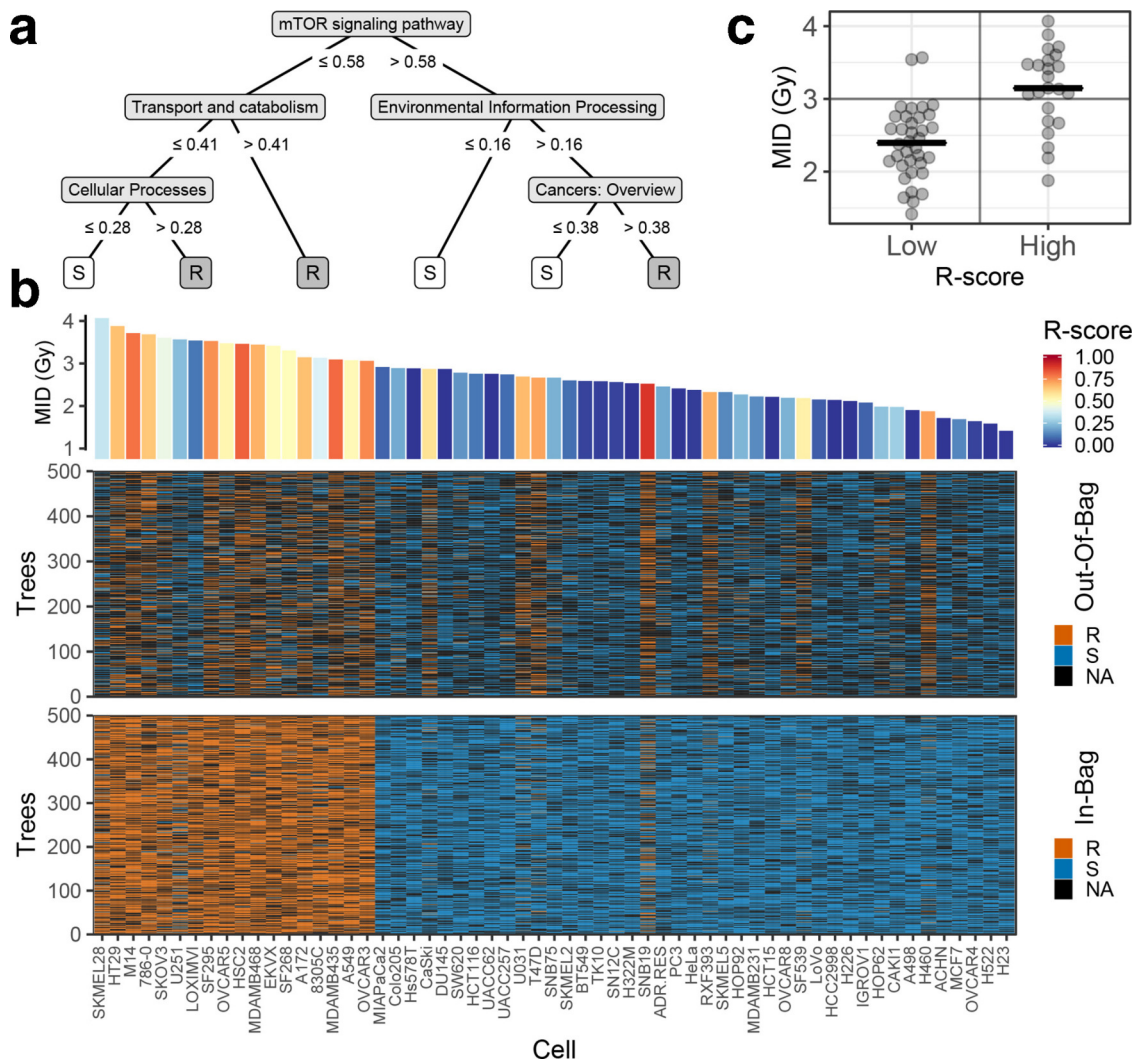


(Figure 3C). For the purpose of comparison, alternative random forest classifiers were also examined using two different types of feature sets: (1) the absolute number of driver gene alterations in the KEGG gene sets; (2) the mutation status (mutant or wild type) of the all driver genes. The model using pDriver showed substantially better predictive performance than the other models using the alternative predictors (Figure 3C), illustrating an importance of incorporating the passenger genes into the model.

Based on the result of the recursive feature elimination, we finalized the random forest classifier on all available 59 cell line data

using the top 7 KEGG gene sets. Figure 4A displays a representative of 500 binary decision trees which constituted the random forest. Depending on pDrivers, the decision tree classifies the 59 cells into either radiosensitive or radioresistant class. An individual decision tree was trained using randomly selected 63% of the 59 cells (In-Bag), while the tree was used to predict classes for the remaining 37% of the 59 cells (Out-Of-Bag) (Figure 4B). The random forest aggregated the votes from the decision trees to determine a final prediction. We defined a radioresistant score (R-score) as the fraction of decision trees voting the radioresistant class. Higher R-scores ( $>0.3$ ) predicted radioresistance for

Figure 4. The final random forest classifier using the selected 7 KEGG gene sets. (a) A representative decision tree of the random forest classifier. Depending on pDrivers, the tree classifies cells into either S (radiosensitive) or R (radioresistant) class. (b) Heatmaps demonstrate predicted classes in 500 individual decision trees (R, radioresistant; S, radiosensitive; NA, not applicable). Each decision tree was built and trained using an average of 63% of the cell data (In-Bag samples). The heatmap on the upper row shows predicted classes on the remaining cell data which were not used to construct each decision tree (Out-Of-Bag samples). The color of barplots on the top represents R-score defined as the fraction of decision trees voting the radioresistant class. (c) Higher R-scores (>0.3) predicted radioresistance with sensitivity of 83% and specificity of 89%. The R-score is defined as the fraction of decision trees voting the radioresistant class. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.



the Out-Of-Bag samples with sensitivity of 83% and specificity of 89% (Figure 4C).

#### R-score and clinical outcome

TCGA data sets were used to validate the R-score, derived from a cell-based assay, for clinical outcomes following radiotherapy. The data sets consisted of 5168 patients in 12 projects for various solid tumor types. The median follow-up time was 1.6 years. The 2-year OS rate of all patients who received radiotherapy ranged from 28 to 100% depending on the tumor type (Supplementary Material 1). The tumor types with greater than 95% OS, including rectal, prostate, and breast cancers, were excluded from further analysis, since any prognostic or predictive factors were unlikely to show an impact on survival in these tumors during the short follow-up periods. In the head and neck squamous

cell carcinoma (hnscc) project, there were 41 patients who were positive for human papilloma virus (HPV) and formed a distinct population with a good prognosis, who were similarly excluded from the analysis. Finally, excluding a further 122 patients with distant metastases, we analyzed the data of 3343 patients from 9 projects (Table 1).

The stratified Cox model was used to examine whether the R-score had an impact on OS. In addition to the R-score, we included age and disease stage as covariates, considering those were significant confounding factors for OS. It was also necessary to add an interaction term between the stage and the R-score to the covariates. Since tumor types violated a proportional hazard assumption, the type of project was incorporated into the model as a stratifying factor. The stratified Cox model allowed different

Table 1. Patient characteristics in 9 TCGA projects

Project	Disease site	RT	N	Stage or Class					Median age (range)	Mean R-score (range)
				1	2	3	4	5		
cesc	Uterine cervix		285	160	66	45	14	NA	46 (20–88)	0.23 (0–0.75)
		Yes	162	78	46	28	10	-		
		No	123	82	20	17	4	-		
esca	Esophagus		165	39	63	63	0	NA	61 (27–90)	0.26 (0–0.82)
		Yes	47	15	18	14	0	-		
		No	118	24	45	49	0	-		
hnsc	Head and neck		472	12	66	90	304	NA	61 (19–90)	0.26 (0–0.87)
		Yes	273	3	21	43	206	-		
		No	199	9	45	47	98	-		
luad	Lung adenocarcinoma		469	282	107	80	0	NA	67 (33–88)	0.19 <sup>a</sup> (0–0.77)
		Yes	88	43	16	29	0	-		
		No	381	239	91	51	0	-		
lusc	Lung squamous cell		483	263	135	85	0	NA	68 (39–90)	0.22 (0–0.86)
		Yes	65	15	22	28	0	-		
		No	418	248	113	57	0	-		
paad	Pancreas		171	18	150	3	0	NA	65 (35–88)	0.27 (0–0.73)
		Yes	41	3	38	0	0	-		
		No	130	15	112	3	0	-		
sarc	Soft tissue		208	47	147	14	0	NA	62 (20–90)	0.19 <sup>b</sup> (0–0.80)
		Yes	59	13	42	4	0	-		
		No	149	34	105	10	0	-		
lgg	Glioma Grade 2–3		499	358	38	36	67	NA	41 (14–87)	0.24 (0–0.74)
		Yes	301	188	29	29	55	-		
		No	198	170	9	7	12	-		
gbm	Glioma Grade 4		591	NA	NA	29	345	217	59 (10–89)	0.26 (0–0.91)
		Yes	440	-	-	27	292	121		
		No	151	-	-	2	53	96		
<b>Total</b>			3343	1179	772	445	730	217	60 (10–90)	0.24 (0–0.91)

RT, radiotherapy. NA, not applicable.

<sup>a</sup>Mean R-score of luad was significantly lower than those of esca, hnsc, paad, lgg, and gbm (adjusted p-value < 0.05).

<sup>b</sup>Mean R-score of sarc was significantly lower than those of hnsc, paad, and gbm (adjusted p-value < 0.05).

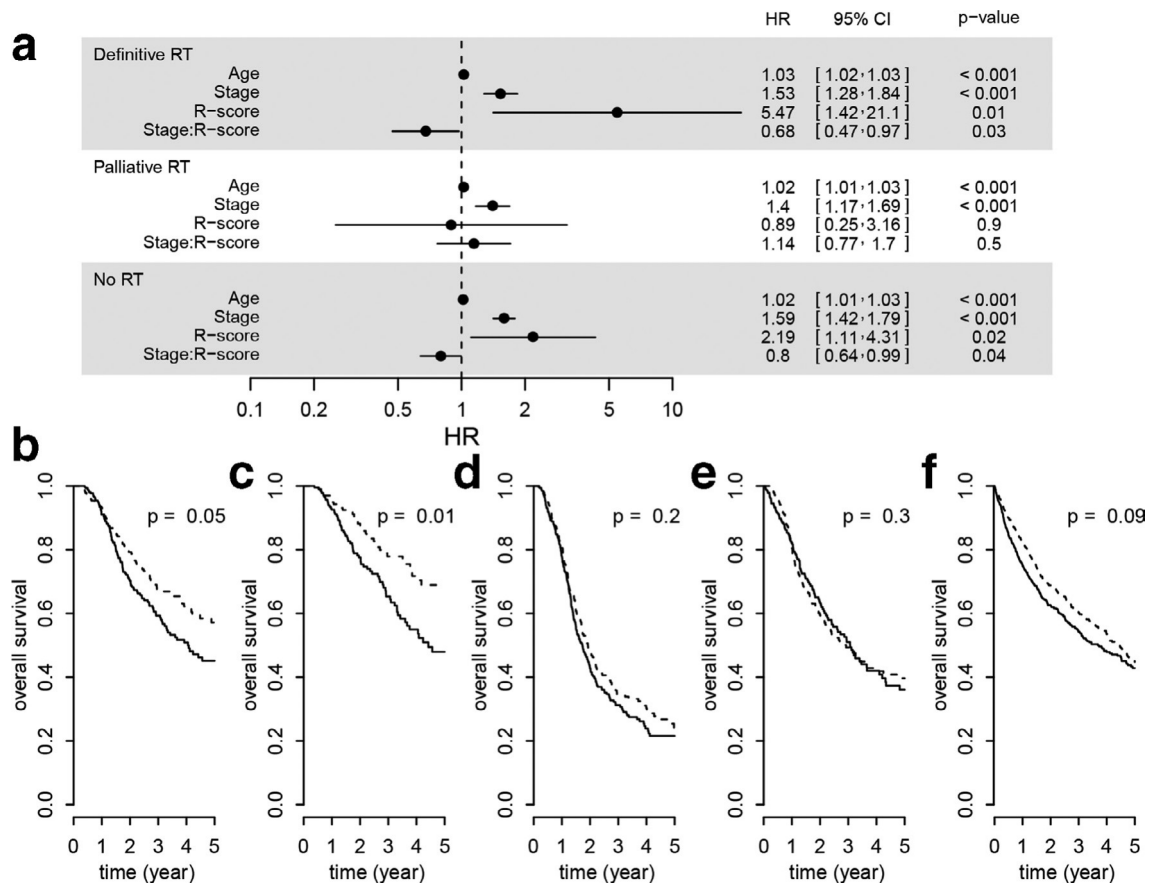
baseline hazard functions for each type of projects and controlled the influence of the different type of projects. The R-score was derived from the cell line experiments across multiple tumor types. Therefore, we did not assume an interaction between the R-score and the type of projects. Accordingly, the model estimated a hazard ratio (HR) for the R-score with adjusting the influence of age, stage, tumor types, and interaction between the stage and the R-score. This model was applied to three dataset categories: No radiotherapy (No-RT), definitive radiotherapy (Def-RT), and palliative radiotherapy (Pal-RT). Def-RT patients received greater than or equal to 45 Gy to the primary sites and/or regional lymphatics as part of their initial treatments. Pal-RT patients were those who received radiotherapy but did not qualify

for the Def-RT group. Figure 5 summarizes the fitting results of the regression model. In the Def-RT group, a higher R-score was associated with significantly worse OS (HR = 5.47). It should also be noted that there was a significant negative interaction between the R-score and the stage (HR = 0.68), probably because local control by radiotherapy would have a greater impact on OS in early stages than advanced stages. A similar result was found in the No-RT group, to a lesser extent. On the other hand, the R-score was not a significant factor in the Pal-RT.

## DISCUSSION

Proto-oncogenes regulate cell growth, proliferation, and pro-survival pathways. Activation of at least one proto-oncogene

Figure 5. Survival time analysis in the clinical outcome datasets of the Cancer Genome Atlas. (a) A stratified Cox model showed that higher R-scores result in worse overall survival in patients who received definitive RT and, to a lesser extent, who did not receive RT. Stage:R-score, interaction term of Stage and R-score. (b–f) Overall survival time plotted by the Kaplan–Meier method according to R-score in subsets of the patients (dashed line, R-score  $\leq$  median vs solid line, R-score  $>$  median). *p*-values were calculated using the stratified Cox model which included the R-score as a covariate and the project type as a stratifying factor. (b) Patients aged  $\leq 50$  (lgg or gbm) or  $\leq 70$  (except for lgg and gbm) who received definitive RT. (c) Patients with Stage 1–3 cancers who received definitive RT. (d) Patients aged  $> 50$  (lgg or gbm) or  $> 70$  (except for lgg and gbm) and/or Stage of  $> 3$  who received definitive RT. (e) Patients who received palliative RT. (f) Patients who received no RT. 95% CI, 95% confidence interval; HR, hazard ratio; RT, radiotherapy.



allele via point mutation, gene amplification, or chromosomal translocation results in signals promoting uncontrolled growth. Tumor suppressor genes are involved in the regulation of the cell cycle, DNA repair, and apoptosis, such that loss-of-function mutations in these genes can also result in altered cell survival and uncontrolled proliferation. Therefore, cancer-associated gene aberrations are generally thought to confer radioresistant cell phenotypes.<sup>10,25</sup> Although it appears contradictory, cell lines with single gene mutations showed no difference in radiosensitivity from wild-type cells (Figure 1). Since the cell lines were not otherwise isogenic, and this was a relative comparison of several cancer-associated genes, these data indicated that no single gene alteration resulted in greater radioresistance than the averaged effect of the other gene alterations. This suggests it would be difficult to use a single gene for a predictive assay, even though the mutation confers a radioresistant phenotype.

Ionizing radiation, unlike targeted therapeutic agents that generally depend on a single druggable gene mutation and pathway,<sup>26</sup>

elicits cellular responses involving multiple signaling pathways through DNA double-strand breaks. Therefore, one would expect radiation research to take advantage of genomewide multiplex analyses. However, there remain unsolved questions in the use of such genomewide data. It is currently unclear to what extent cumulative oncogenic mutations functionally affect one another. If two mutations are located in functionally independent pathways, their mutational impact may be additive. But if two mutations are located in the same pathway, or functionally closely related pathways, the effects of the two mutations may be synergistic. For instance, *APC* inhibits *RAS*-induced activation of the *MAPK* pathway.<sup>27</sup> Thus, inactivating mutations in *APC* may augment the effects of an activating *RAS* mutation. Likewise, transformation by either the *H-ras* or *myc* oncogene induced only modest radioresistance in primary rat embryonic fibroblasts. However, simultaneous transformation with both *H-ras* and *myc* induces a remarkable degree of radioresistance.<sup>28</sup> On the contrary, interactions may be less than additive due to redundancy, or even antagonistic. Notably, certain combinations



may cause synthetic lethal interactions, such as *BRCA1/2* and *PARP1*,<sup>29,30</sup> or *CDH1* and *ROS1*,<sup>31</sup> although viable cancer cells are unlikely to harbor antagonistic mutations that would cause such severe survival disadvantages. Although experimental evidence supports the existence of cooperative mutations, data are currently very limited to specific gene pairs. Meanwhile, quantitative analysis using a systems biology approach has shown that the effects of paired mutations were not significantly different than the sum of the effects from each individual mutation.<sup>32</sup> Therefore, we used a simple algebraic formula in this study, assuming that the mutational effects of each gene were additive.

Cancer-associated gene mutations lead to mutator phenotypes, accumulating a large number of alterations in passenger genes. The significance of the accumulated passenger mutations is not fully understood. However, our data suggest that passenger alterations modulate the functional outcomes of driver mutations and play a significant role in cancer response to radiation. Many passenger gene mutations affect conserved residues and may impair protein functions; however, individual functional changes due to deleterious passenger mutations may be much weaker than those due to driver mutations.<sup>16</sup> Mildly deleterious passenger mutations can evade negative selection, and their accumulation can affect cancer progression. Balance between drivers and passengers is a critical determinant of cancer cell fitness.<sup>33</sup> Other interesting data come from the concept of collateral lethality. The homozygous deletion of tumor suppressor genes frequently accompanies the collateral deletion of passenger genes adjacent to the driver genes on the chromosome. The collaterally deleted passenger genes may not play an important role in oncogenesis, but instead result in cancer-specific vulnerabilities that can be targeted by pharmacological therapies.<sup>34</sup> We speculate that some collaterally deleted genes may also cause susceptibility to radiation therapy to a certain extent.

We utilized the MID as a representative value for cellular radiosensitivity. Several advantages of the MID have been recognized: (1) most importantly, the MID shows smaller variability within subjects between measurements than other parameters. (2) Unlike other survival model parameters such as  $D_0$ ,  $D_q$ ,  $\alpha$ , or  $\beta$ , the MID represents the whole survival curve by the single value. (3) The MID takes into account multiple dose points. This study confirmed that the MID was a stable estimate and less prone to experimental errors. The MID showed strong correlations with survival fractions at the clinically relevant dose range. However, the MID did not represent radiosensitivity well at lower (<2 Gy) or higher (>8 Gy) doses, so that the results in this study may not be applicable for high-dose ablative radiotherapy or hyperfractionated treatment regimens.

A limitation of this study is that the finding was a largely correlative and not necessarily causal link. The derived genomic parameter, R-score, was validated in the independent clinical data sets. Higher R-scores were associated with poorer OS following definitive therapy. However, it remains to be elucidated whether the proposed genomic parameter directly impacted on radiation responsiveness or whether the observed event was due to an indirect association through other confounding factors.

In conclusion, this study demonstrated the significant association between genome-wide aberrations and radiation responsiveness. Our data suggest that comprehensive gene sequencing analysis is a useful and promising approach for predicting radiotherapy response. However, as discussed above, much uncertainty still remains about the functional effects of genome-wide aberrations. Elucidating those relationships and refining models will improve the ability to predict response to radiation therapy.

## FUNDING

This work was supported by KAKENHI (Grant-in-Aids for Scientific Research) (C) 23591839, 24591844, and (B) 17H04263 to YS from the Japan Society for the Promotion of Science.

## REFERENCES

- Amundson SA, Do KT, Vinikoor LC, Lee RA, Koch-Paiz CA, Ahn J, et al. Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National cancer Institute anticancer drug screen. *Cancer Res* 2008; **68**: 415–24. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2120>
- Kim HS, Kim SC, Kim SJ, Park CH, Jeung H-C, Kim YB, et al. Identification of a radiosensitivity signature using integrative metaanalysis of published microarray data for NCI-60 cancer cells. *BMC Genomics* 2012; **13**: 348. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-348>
- Pramana J, Van den Brekel MWM, van Velthuysen M-LF, Wessels LFA, Nuyten DS, Hofland I, et al. Gene expression profiling to predict outcome after chemoradiation in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; **69**: 1544–52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.08.032>
- Mueller A-K, Lindner K, Hummel R, Haier J, Watson DI, Hussey DJ. Micronas and their impact on radiotherapy for cancer. *Radiat Res* 2016; **185**: 668–77. doi: <https://doi.org/10.1667/RR14370.1>
- Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001; **92**: 805–13. doi: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010815\)92:4<805::aid-cnrc1386>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010815)92:4<805::aid-cnrc1386>3.0.co;2-9)
- Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch C-J, Petersen C, et al. Hnscc cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol* 2013; **107**: 242–6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.03.013>
- Cassoni AM. Oncogenes and radiosensitivity. *Eur J Cancer* 1994; **30**: 279–81. doi: [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0959-8049(94)90239-9)
- Ling CC, Endlich B. Radioresistance induced by oncogenic transformation. *Radiat Res* 1989; **120**: 267–79. doi: <https://doi.org/10.2307/3577713>

9. Sklar MD. The Ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science* 1988; **239**: 645–7. doi: <https://doi.org/10.1126/science.3277276>
10. Bristow RG, Benchimol S, Hill RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiation Oncol* 1996; **40**: 197–223. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(96\)01806-3](https://doi.org/10.1016/0167-8140(96)01806-3)
11. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013; **45**: 1127–33. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2762>
12. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; **500**: 415–21. doi: <https://doi.org/10.1038/nature12477>
13. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 220–8. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
14. McBride WH, Dougherty GJ. Radiotherapy for genes that cause cancer. *Nat Med* 1995; **1**: 1215–7. doi: <https://doi.org/10.1038/nm1195-1215>
15. Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 2011; **145**: 30–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.020>
16. McFarland CD, Yaglom JA, Wojtkowiak JW, Scott JG, Morse DL, Sherman MY, et al. The damaging effect of passenger mutations on cancer progression. *Cancer Res* 2017; **77**: 4763–72. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3283-T>
17. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. Cosmic: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(Database issue): D805–11. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1075>
18. Fertl B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res* 1984; **99**: 73–84. doi: <https://doi.org/10.2307/3576448>
19. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. *TCGAbiolinks*: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**: e71. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>
20. Li J, Wang M, Won M, Shaw EG, Coughlin C, Curran WJ, et al. Validation and simplification of the radiation therapy Oncology Group recursive partitioning analysis classification for glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; **81**: 623–30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.06.012>
21. Scott CB, Scarantino C, Urtaun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR, et al. Validation and predictive power of radiation therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; **40**: 51–5. doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(97\)00485-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(97)00485-9)
22. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013; **45**: 1127–33. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2762>
23. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; **500**: 415–21. doi: <https://doi.org/10.1038/nature12477>
24. Birkbak NJ, Eklund AC, Li Q, McClelland SE, Endesfelder D, Tan P, et al. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res* 2011; **71**: 3447–52. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3667>
25. Bristow RG, Hu Q, Jang A, Chung S, Peacock J, Benchimol S, et al. Radioresistant MTP53-expressing rat embryo cell transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 1998; **16**: 1789–802. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201935>
26. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014; **311**: 1998–2006. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741>
27. Park K-S, Jeon SH, Kim S-E, Bahk Y-Y, Holmen SL, Williams BO, et al. Apc inhibits ERK pathway activation and cellular proliferation induced by Ras. *J Cell Sci* 2006; **119**(Pt 5): 819–27. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.02779>
28. McKenna WG, Weiss MC, Bakanaukas VJ, Sandler H, Kelsten ML, Biaglow J, et al. The role of the H-ras oncogene in radiation resistance and metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; **18**: 849–59. doi: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(90\)90407-B](https://doi.org/10.1016/0360-3016(90)90407-B)
29. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; **434**: 917–21. doi: <https://doi.org/10.1038/nature03445>
30. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; **434**: 913–7. doi: <https://doi.org/10.1038/nature03443>
31. Bajrami I, Marlow R, van de Ven M, Brough R, Pemberton HN, Frankum J, et al. E-Cadherin/ROS1 inhibitor synthetic lethality in breast cancer. *Cancer Discov* 2018; **8**: 498–515. doi: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0603>
32. Pant DK, Ghosh A. A systems biology approach for the study of cumulative oncogenes with applications to the MAPK signal transduction pathway. *Biophys Chem* 2006; **119**: 49–60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.09.001>
33. McFarland CD, Mirny LA, Korolev KS. Tug-Of-War between driver and passenger mutations in cancer and other adaptive processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 15138–43. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1404341111>
34. Muller FL, Colla S, Aquilanti E, Manzo VE, Genovese G, Lee J, et al. Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. *Nature* 2012; **488**: 337–42. doi: <https://doi.org/10.1038/nature11331>