



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PROPUESTA DE UN MODELO DINÁMICO DISCRETO DE LA
VÍA FA/BRCA DE REPARACIÓN DE DAÑO AL DNA:
CORROBORACIÓN EXPERIMENTAL EN CÉLULAS AF-A
EXPUESTAS A MMC

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

TUTOR INVITADO: DR. LUIS A. MENDOZA SIERRA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **RODRÍGUEZ CÓMEZ ALFREDO DE JESÚS** con número de cuenta **405087615**, con la tesis titulada **"PROPUESTA DE UN MODELO DINÁMICO DISCRETO DE LA VÍA FA/BRCA DE REPARACIÓN DEL DAÑO AL DNA: CORROBORACIÓN EXPERIMENTAL EN CÉLULAS AF-A EXPUESTAS A MMC"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**:

Presidente: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Vocal: DR. PEDRO EDUARDO MIRAMONTES VIDAL
Secretario: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
Suplente: DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de mayo de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS I

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto con la beca No. 239877

A la Dra. Sara Frías: gracias por compartir tu genialidad, tu inteligencia, astucia y responsabilidad social y científica. Por dejarme ser, proponer, errar y avanzar. Porque el mundo de las preguntas que esperan respuesta nos aguarda.

Al Dr. Luis Mendoza: gracias por aceptar y confiar en este neófito distraído para compartir sus conocimientos. Gracias a usted he aprendido mucho y mi vida científica tiene un nuevo enfoque.

A la Dra. Rosana Pelayo: gracias por toda la paciencia que me ha tenido, por sus aportaciones tan valiosas en beneficio de este proyecto y por sus palabras de aliento. Seguimos adelante.

Al Dr. Mario Altamirano: gracias por todo el apoyo durante este proceso y por sus observaciones.

A la Dra. Patricia Ostrosky: gracias por darme siempre un espacio y por confiar en mi y en este trabajo. Su confianza no será defraudada.

Al Dr. Pedro Miramontes: gracias por aceptar la revisión de este trabajo, por confiar en él y por sus paciencia.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS II

A la Dra. Leda Torres: gracias por toda tu PACIENCIA, entrega y pasión por la ciencia. Por transmitirme toda tu alegría y por ser mi cómplice. Sin ti esta tesis no hubiera sido posible.

Al M. en C. David Sosa: gracias porque esta tesis contiene mucho de ti y de nuestras tardes de discusión acalorada.

A las Dra. Edith Cortes Barberena y la Dra. Rocio Ortiz: gracias por abrirme las puertas de su laboratorio en la UAM Iztapalapa y permitirme realizar el análisis por citometría de flujo que se presenta en este trabajo. Su apoyo fue fundamental

A la Dra. Ana Maria Salazar y la Q.F.B. Monserrat Sordo: gracias por compartirme su conocimiento y corregir mis errores metodológicos en la técnica de bloqueo de la citocinesis. Su apoyo, comentarios y críticas han sido invaluable.

A la Dra. Cristina Revilla: gracias por tu ojo vigilante, tus consejos y nuestros desayunos apresurados en los que me compartes toda tu experiencia. Esos desayunos deben seguir.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio, Silvia (Chivis), MaryPaz, Luz, Armando, Oscar, Bertha y Sandra: gracias por su paciencia y por sus enseñanzas de todos los días.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá por absolutamente TODO. Hemos dado un paso más y lo hemos logrado juntos.

A “El Chato”, que aunque ya no está aquí me sigue “echando un ojo”.

A mis hermanas y hermanos porque estamos más unidos que nunca y nos tenemos para siempre aún a pesar de las adversidades. Los amo: Cassandra, Tere, Melissa, Rafa, Elena, Chary, Rosita.

A Felipe por tus ojos de gato (lo demás lo sabes).

A toda la NENIZA (y no tan nenes) ¡Por favor no perdamos el toque de Midas! (estricto orden alfabético): Adriana, Brenda, César, Diana, Eunice, Erika, Julieta, Karol, Marisol, Moisés, Netzi, Óscar, Silvy. Disfruten mientras son nenes porque después serán la MOMIZA! Y a Uli por poner la casa pa’ la pachanga .

A la tía Ana Joaquina por su apoyo incondicional y por darme mis jaladas de orejas.

A mis profesores favoritos que llevo en el corazón: Leticia Bastida “La maestra Lety” y Salvador Sánchez “ El Wero”, pero no le digan a los demás.

A TODOS MIS PROFESORES EN EL AULA Y FUERA DE ELLA. GRACIAS

P.D. Me encanta la sección de agradecimientos

**DEDICADO A LA MEMORIA DE "EL CHATO" Y DE "DOÑA FELICITAS"
GRACIAS POR SUS GENES**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	8
I.1. La Anemia de Fanconi	8
I.2. La clínica de la anemia de Fanconi	9
I.3. Fenotipo celular en anemia de Fanconi	15
I.4. Correlación fenotipo-genotipo	15
I.5. Funcionamiento de la vía FA/BRCA	16
I.6. La biología de sistemas y los modelos Booleanos	21
I.7. Antecedentes directos	24
II. JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
III. METODOLOGÍA	28
III.1 Construcción de la red de señalización de la vía FA/BRCA	28
III.2 La vía FA/BRCA como un sistema dinámico discreto	29
III.3 Metodología de la fase experimental	31
III.3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	31
III.3.2 Diseño experimental	31
III.3.3 Citometría de flujo para detección de células en mitosis y detección de las proteínas DNAPKcs y CHK1	34
III.3.4 Bloqueo de la Citocinesis con Citocalasina B	36
III.3.5 Análisis estadístico	36
IV. RESULTADOS	37
IV.1 Reglas lógicas para el funcionamiento del MB de la vía FA/BRCA	37
IV.2 La red FA/BRCA	42
IV.3 Dinámica del modelo de red de la vía FA/BRCA para un pulso de daño	49
IV.4. Dinámica del modelo de red de la vía FA/BRCA mutante en FAcCore para un pulso de daño	51
IV.5 Dinámica del modelo de red de la vía FA/BRCA para daño constante	52
IV. 6 Resultados Experimentales	55
IV.6.1 Activación de la cinasa DNA-PKcs en las líneas celulares VU-817 y NL49 en presencia de MMC	55
IV.6.3 Evaluación de entrada y salida de mitosis en las líneas celulares VU-817 Y NL-49 en presencia de MMC	61
V. DISCUSIÓN	65
V.1 La red regulatoria de la vía FA/BRCA	66
V.1.1 La generación de DSBs durante la reparación de un ICL se asegura mediante la actividad de endonucleasas alternas a la vía FA/BRCA	66
V.1.2 Durante la reparación de un DSB generado a partir de un ICL la exonucleasa MRN actúa en ausencia de las vías FA/BRCA y NHEJ.	67
V.1.3 La enzima desubiquitinadora USP1 es regulada directa o indirectamente por FANCM	68
V.1.4 El proceso de <i>Checkpoint Recovery</i> es crítico para la regulación de la vía FA/BRCA.	69
V.2 El modelo dinámico discreto	69
V.2.1 Dinámica del modelo en ausencia de daño en el DNA	69
V.2.2 Dinámica del modelo durante la reparación de un DSB, un ADD y un ICL	70
V.2.3 Dinámica de las mutantes de la vía FA/BRCA	71
V.3 Evaluación experimental del comportamiento dinámico de la red mutante para FAcCore en células AF- A	72
V.3.1 En condiciones basales la cinasa DNA-PKcs está constitutivamente activa en las células AF-A.	72
V.3.2 Actividad elevada de la DNA-PKcs cuando el daño por MMC es constante	74
V.3.3 El <i>Checkpoint</i> de integridad del DNA se inactiva en las células AF-A a pesar de la presencia de daño en el material genético	75
VI CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS	79
ANEXOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. EL DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES AF SE HACE EXPONENDO SUS LINFOCITOS T A MMC O DEB.....	18
Figura 2. LA VÍA FA/BRCA.....	26
Figura 3. METAFASES CON AC GENERADAS POR LA MMC Y LA HU EN CÉLULAS NORMALES Y AF-A.....	31
Figura 4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
Figura 5. RED DE INTERACCIONES PROPUESTA PARA LA VÍA FA/BRCA.....	48
Figure 6. REGULACIÓN DE LA RED FA/BRCA.....	49
Figura 7. GRUPO 1 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO.....	51
Figura 8. GRUPO 2 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO.....	52
Figura 9. GRUPO 3 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO.....	53
Figura 10. GRUPO 4 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO.....	54
Figura 11. SIMULACIONES CON EL MB PARA LA REPARACIÓN DE: A) UN ENLACE COVALENTE CRUZADO; B) UNA RUPTURA DE DOBLE HEBRA; C) UN ADUCTO EN EL DNA.....	55
Figura 12. SIMULACIONES CON EL MB PARA LA GENERACIÓN BASAL (PULSO ÚNICO) DE ENLACES COVALENTES CRUZADOS EN A) CONDICIONES SILVESTRES Y B) LA MUTANTE NULA DE FACORE.....	57
Figura 13. SIMULACIONES CON EL MB PARA UN ESTÍMULO CONSTANTE DE ENLACES COVALENTES CRUZADOS EN A) CONDICIONES SILVESTRES Y B) LA MUTANTE NULA DE FACORE.....	59
Figura 14. LAS CÉLULAS AF-A TIENEN UNA FOSFORILACIÓN ELEVADA DE LA CINASA DNA-PKcs EN CONDICIONES BASALES Y AL SER TRATADAS CON MMC.....	62
Figura 15. LA MÁXIMA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA DNA-PKcs OCURRE EN LA FASE G2/M DEL CICLO CELULAR Y A LAS 18 HORAS DE INICIADO EL TRATAMIENTO CON MMC.....	63
Figura 16. LA ACUMULACIÓN DE LAS CÉLULAS AF-A EN LA FASE G2/M SE VUELVE MÁS EVIDENTE ANTE EL TRATAMIENTO CON MMC.....	65
Figura 17. LA CINASA SEÑALIZADORA DE DAÑO CHK1 SE ACTIVA EN LAS CÉLULAS AF-A INDICANDO QUE EL <i>CHECKPOINT</i> DE G2/M SE ACTIVA APROPIADAMENTE.....	66
Figura 18. PORCENTAJE DE CÉLULAS EN MITOSIS EN LAS LÍNEAS VU-817 Y NL-49 ANTE EL TRATAMIENTO CON MMC.....	68
Figura 19. LA PRESENCIA DE CÉLULAS BINUCLEADAS Y TETRANUCLEADAS EN LAS CÉLULAS AF-A INDICA LA ACTIVACIÓN DEL <i>CHECKPOINT RECOVERY</i> A PESAR DEL DAÑO AL DNA.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. GENES INVOLUCRADOS EN LA ANEMIA DE FANCONI.....	8
Tabla 2. REGLAS LÓGICAS PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL MB DE LA VÍA FA/BRCA.....	39

ABREVIATURAS

AF: anemia de Fanconi
FA/BRCA: Vía de Anemia de Fanconi y Cáncer de mama
AC: aberraciones cromosómicas
ICL: enlace covalente cruzado (del inglés, *Interstrand-CrossLink*)
DEB: diepoxibutano
MMC: mitomicina C
AA: anemia aplásica
SMD: síndrome mielodisplásico
LMA: leucemia mieloide aguda
G2/M: fase G2 y fase M del ciclo celular
EBV: virus de Epstein-Barr
IL-6: Interleucina 6
ROS: especies reactivas de Oxígeno (del inglés, *Reactive Oxygen Species*)
HU: Hidroxiurea
TNF α : factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor alfa*)
IFN γ : Interferon gamma
FAcore: complejo central AF
DSB: Ruptura de doble hebra (del inglés, *Double Strand Break*)
ADD: Aducto en el DNA
NHEJ: Unión de extremos no homólogos (del inglés *Non- Homologous End-Joining*)
HRR: Reparación por recombinación homóloga (del inglés *Homologous Recombination Repair*)
ssDNA: hebra sencilla de DNA (del inglés *single strand DNA*)
RPA: proteína de replicación A (del inglés, *Replication Protein A*)
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular (del inglés, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
TLS: síntesis translesión
USP1: proteasa específica de ubiquitinas (del inglés, *Ubiquitin Specific Protease*)
MB: modelo booleano
RPR: reparación postreplicativa
MPF: factor promotor de la mitosis
MN: mononucleada
BN: binucleada
PN: polinucleada
NER: reparación por escisión de nucleótidos (del inglés, *Nucleotide Excision Repair*)
CHKREC: del inglés *Checkpoint Recovery*
CCP: atractor de progresión del ciclo celular (del inglés, *Cell cycle progression attractor*)
CCA: atractor de arresto del ciclo celular (del inglés, *Cell Cycle Arrest Attractor*)
ICHs: intercambio de cromátidas hermanas
CDK: Cinasa Dependiente de Ciclina (del inglés, *Cyclin dependent Kinase*)

RESUMEN

La vía FA/BRCA repara los enlaces covalentes cruzados en el DNA. Las mutaciones en esta vía producen anemia de Fanconi, un síndrome con herencia recesiva que presenta inestabilidad genómica espontánea e hipersensibilidad a agentes inductores de enlaces covalentes cruzados como la Mitomicina C. A pesar del daño en el DNA, las células con anemia de Fanconi progresan en el ciclo celular, esto indicaría que la deficiencia en la vía FA/BRCA también afecta el funcionamiento de los puntos de monitoreo de la integridad del DNA y que las células con anemia de Fanconi podrían procesar los enlaces covalentes cruzados usando vías alternas de reparación, aunque estos procesos no sean completamente libres de error.

Dada la complejidad del proceso de reparación de los enlaces covalentes cruzados, en este trabajo se desarrolló un modelo computacional de tipo Booleano para generar predicciones que nos ayudaran a comprender el funcionamiento de la vía FA/BRCA y sus mutantes.

Para obtener el modelo se siguieron los siguientes pasos: 1) Se analizó la literatura científica internacional y se obtuvo la información relevante sobre la vía FA/BRCA y las vías de reparación relacionadas con ella; 2) se construyó la red más simple posible que incorporara toda la información; 3) usando los operadores lógicos AND, OR y NOT se desarrolló una regla lógica para describir las condiciones necesarias para que cada componente o nodo se active; 4) se hicieron simulaciones computacionales del modelo desarrollado usando el programa BoolNet; 5) se evaluó si el modelo reproducía apropiadamente el conocimiento científico sobre la vía FA/BRCA y finalmente, 6) se usó el modelo para hacer predicciones del comportamiento de la red cuando existen mutantes nulas y de sobre-expresión, en donde un nodo específico está siempre apagado o siempre encendido respectivamente.

Las simulaciones in silico con este modelo nos proponen que, en ausencia de una vía FA/BRCA funcional, las células AF-A:

1. Recurrirían a endonucleasas alternas de reparación para generar rupturas de doble hebra en el DNA.
2. No son totalmente deficientes en la reparación de las rupturas de doble hebra y podrían activar procesos alternos de reparación recurriendo a la acción combinada de la unión de extremos no homólogos y la reparación por recombinación homóloga.
3. Podrían continuar con su ciclo celular, aún a pesar de la presencia de rupturas de doble hebra sin reparar, activando un mecanismo conocido como *Checkpoint Recovery*.

Experimentalmente se abordaron parcialmente las propuestas no. 2 y 3 en las líneas linfoblastoides AF-A VU817 proveniente de un paciente con anemia de Fanconi y NL49 proveniente de un individuo normal, expuestas a Mitomicina C. Para la propuesta no. 2 se evaluó por citometría de flujo la presencia de la proteína DNA-PKcs fosforilada, la cual es la proteína crítica en la reparación por Unión de extremos no homólogos. Las simulaciones computacionales y los resultados experimentales coinciden en que la unión de extremos no homólogos puede ser la principal vía alterna de reparación de daño al DNA en células AF-A.

Para la propuesta no. 3: a) se evaluaron la entrada y salida de mitosis por medio de la detección de células binucleadas y tetranucleadas utilizando un ensayo de bloqueo de la citocinesis asociada a la detección del anticuerpo MPM2 que identifica células en mitosis y b) se evaluó por citometría de flujo la presencia de la proteína CHK1 fosforilada, la cual está involucrada en la detención del ciclo celular en presencia de daño al DNA. Tanto el modelo como nuestra aproximación experimental coinciden en que a pesar de que las células AF-A activan eficientemente a CHK1 y se acumulan en fase G2 debido a la gran cantidad de daño en su DNA, una parte de ellas son capaces de dividirse y proseguir con el ciclo celular.

ABSTRACT

The FA/BRCA pathway is committed to repair DNA interstrand-crosslinks. Mutations in the genes coding for this pathway cause Fanconi anemia, an autosomic recessive syndrome that shows spontaneous genomic instability and hypersensitivity to interstrand crosslinking agents, such as mitomycin C.

Despite the presence of DNA damage, Fanconi anemia cells are able to progress throughout the cell cycle, indicating that the FA/BRCA pathway deficiency also affects the function of the DNA integrity checkpoints and that Fanconi anemia cells could process the DNA interstrand-crosslinks by using alternative DNA repair pathways, although these alternative processes are not completely error free.

Given the complexity of the DNA interstrand crosslink repair process, in this work we have developed a Boolean network model of the FA/BRCA pathway to generate some predictions that would be useful in the understanding of the pathway and its mutants.

To obtain the model the next steps have been followed: 1) The FA/BRCA and related pathways literature has been thoroughly analyzed and the relevant information has been obtained; 2) the simplest network containing all the information has been reconstructed; 3) the logic operators AND, OR and NOT have been used to develop an equation that describes the necessary condition for each node or component to be activate; 4) the program BoolNet has been used to perform computational simulations of the model; 5) it was determined if the model reproduces appropriately the current scientific knowledge about the FA/BRCA pathway; and finally, 6) the model was used to generate predictions about the network behavior when a specific node is permanently down-regulated or over-activated.

The *in silico* simulations with the model suggest that, in absence of a functional FA/BRCA pathway; Fanconi anemia cells:

1) Are able to activate alternative DNA endonucleasas to generate DNA double strand breaks.

2) Are not totally inefficient in the double strand break repair process an could activate alternative DNA repair processes, such as the combined action of the Non-homologous end-joining pathway and the homologous recombination repair pathway.

3) Could continue throughout the cell cycle, even with unrepaired DNA double strand breaks, activating the mechanism known as *Checkpoint Recovery*.

Proposals No. 2 and 3 were partially addressed in the lymphoblastoid cell lines AF-A VU817 and NL-49 exposed to mitomycin C. To validate proposal no. 2, the presence of the phosphorylated DNA-PKcs protein was evaluated by flow cytometry, this protein is critical in the non-homologous end-joining pathway. Experimental results and simulations concur that the non- homologous end-joining pathway is the main alternative DNA repair pathway in Fanconi anemia A cells.

To validate proposal No. 3 the presence of the phosphorylated CHK1 protein was evaluated, this protein is involved in the cell cycle arrest when the DNA has been damaged. Moreover, the entrance and exit from mitosis has been evaluated by using the MPM2 antibody and a cytokinesis block essay. Both the model and our experimental approach concur that despite that FA-A cells efficiently activate the CHK1 protein and accumulate on the G2 phase of the cell cycle due to the large amount of DNA damage, they are still able to divide and proceed throughout the cell cycle.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La Anemia de Fanconi

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad monogénica autosómica recesiva o ligada al cromosoma X que presenta heterogeneidad genética (Tabla 1) y fenotípica, se caracteriza por diversas malformaciones congénitas del sistema esquelético sobre todo radiales, pancitopenia progresiva, aberraciones cromosómicas (AC) espontáneas y predisposición a diferentes tipos de cáncer como leucemia mieloide aguda y tumores sólidos, principalmente cáncer de cabeza y cuello y tumores ginecológicos. Aunque el diagnóstico de la enfermedad es complicado debido a la variabilidad fenotípica de los pacientes, el estudio de las AC generadas por agentes inductores de enlaces covalentes cruzados (ICL, por sus siglas en inglés: *insterstrand-crosslink*), como el diepoxibutano (DEB) y la mitomicina C (MMC), se ha convertido en la principal herramienta diagnóstica de la enfermedad, ya que las células AF son ineficientes en la reparación de las lesiones provocadas por estos agentes (Frías et al., 1984; Carnevale y Frías, 1985; Frías et al., 1986; Esmer et al., 2004).

Tabla 1. GENES INVOLUCRADOS EN LA ANEMIA DE FANCONI

Grupo de complementación y gen mutado	Alias	Localización cromosómica	Función molecular
FANCA		16q24.3	Complejo FAcCore
FANCB		Xp22.2	Complejo FAcCore
FANCC		9q22.32	Complejo FAcCore
FANCD1	BRCA2	13q13.1	Recombinación homóloga
FANCD2		3q25.3	Sustrato del complejo FAcCore, Actividad exonucleasa
FANCE		6p21.31	Interactúa con FANCD2
FANCF		11p14.3	Complejo FAcCore
FANCG		9p13.3	Complejo FAcCore
FANCI		15q26.1	Sustrato del complejo FAcCore
FANCI	BRIP1/BACH1	17q23.2	Resolución de estructuras de cuádruples G
FANCL		2p16.1	Complejo FAcCore. Ligasa E3 de ubiquitinas
FANCN	PALB2	16p12.2	Recombinación homóloga
FANCM		14q21.2	Complejo FAcCore. Helicasa/Translocasa
FANCO	RAD51C	17q22	Recombinación homóloga/Parálogo de RAD51
FANCP	SLX4	16p13.3	Resolvasa de intermediarios de Holliday. Organizadora de endonucleasas

I.2. La clínica de la anemia de Fanconi (Fanconi anemia guidelines for diagnosis and management, 3a Ed. 2008).

Fenotipo Clínico

A continuación se muestran en orden de frecuencia las malformaciones congénitas más frecuentes en la AF, sin embargo al menos un 25% de los pacientes con AF presentan pocas o ningunas de estas características (Alter; 2003):

Piel: hiperpigmentación generalizada; manchas café con leche; zonas hiperpigmentadas

Microsomia: talla baja

Extremidades superiores:

Pulgares: ausentes o hipoplásicos, bífidos, rudimentarios, pendiendo de un hilo, trifalángico

Radios: ausentes o hipoplásicos (solamente con pulgares normales), ausentes o pulso débil.

Manos: eminencia tenar hipoplásica, primer metacarpo ausente

Cúbito: displásico

Gónadas:

Hombres: hipogenitalismo, testículos ocultos, hipospadias, microfalosomía

Mujeres: hipogenitalismo, útero dividido, menstruaciones anormales

Esqueleto:

Cabeza y cara: microcefalia, micrognatia, trigonocefalia

Cuello: Sprengel, Klippel-Feil

Espina dorsal: espina bífida, costillas anormales

Ojos: pequeños, juntos, estrabismo, pliegues epicánticos, cataratas, astigmatismo

Oídos: sordera (conductiva usualmente), forma anormal, atresia, oído medio anormal

Renales: ectópicos o pélvicos, anormales, de herradura, hipoplásicos o displásicos, ausentes, hidronefrosis o hidrouréter

Tracto gastrointestinal: atresia (esófago, duodeno, yeyuno), ano no perforado, fístula traqueo-esofágica

Extremidades inferiores:

Pies: sindactilia de los dedos, dedos anormales

Piernas: dislocación congénita de la cadera

Cardiopulmonar: diferentes defectos estructurales cardíacos congénitos.

Hematología

Los pacientes con AF pueden presentar anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), citopenias simples sin ninguna otra explicación o glóbulos rojos macrocíticos sin ninguna otra explicación. Usualmente la AA es el primer evento adverso en pacientes con AF y ocurre a una edad promedio de 8 a 10 años. La leucemia se desarrolla principalmente en los adolescentes y adultos jóvenes, mientras que los tumores sólidos comienzan a aparecer a partir de los 20 años (Alter, 2003; Rosenberg et al., 2003; Rosenberg et al., 2004; Rosenberg et al., 2007).

El riesgo relativo de LMA en pacientes con AF comparado con la población general es 800 veces mayor y la edad media de presentación es de 13 años con un rango de <1 a 50 años de edad. Se desconoce la frecuencia de SMD, y la relación temporal entre el SMD y la LMA no es muy clara. Sin embargo, debe descartarse AF en pacientes niños o jóvenes adultos con SMD o LMA (Alter, 2003; Rosenberg et al., 2003; Rosenberg et al., 2004; Rosenberg et al., 2007).

Tumores sólidos

Los pacientes con AF presentan un riesgo muy elevado (de cientos a miles de veces mayor que la población general) de desarrollar tumores sólidos a muy temprana edad, entre los que se incluyen tumores de cabeza, cuello y carcinoma de células escamosas, así como tumores del hígado. El riesgo de carcinoma de

células escamosas es aún mayor en los pacientes que recibieron un trasplante de médula ósea. Aproximadamente un 25% de los pacientes AF reportados con cáncer no estaban conscientes de su enfermedad hasta el desarrollo del cáncer o por complicaciones durante el tratamiento de su neoplasia (Alter, 2003; Rosenberg et al., 2003; Rosenberg et al., 2005).

Indicaciones para diagnosticar AF

Definitivas:

- Hermano con AF
- Anemia aplásica
- Defectos congénitos característicos, en particular uno o más en radios o pulgares; anomalías de la estructura renal; microftalmia; microcefalia; manchas café con leche; características de VACTERL-H tales como fístula traqueo-esofágica; ano no perforado y las mencionadas anteriormente.
- Rupturas cromosómicas espontáneas
- SMD primario (desde muy joven)
- LMA primario (desde muy joven)
- Sensibilidad inusual a la quimioterapia o radioterapia
- Cáncer típico de AF pero a una edad atípica, como Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello a <50 años de edad, Cáncer cervical <30 años de edad, Cáncer anal/vulvar <40 años de edad.
- Antecedentes familiares consistentes con AF o cáncer (por ejemplo, cáncer de mama).

A considerar:

- Citopenias simples
- Macrocitosis inexplicable por deficiencia de vitamina B12 o de folatos
- Tumores de hígado sin antecedentes de alcoholismo o hepatitis
- Falla ovárica prematura <30 años de edad
- Reserva ovárica disminuida <30 años de edad
- Tumor cerebral <5 años de edad
- Tumor de Wilms <4 años de edad

- Incremento de Hb sin explicación alguna
- Infertilidad
- Adenomas hepáticos o hepatomas sin antecedentes de alcoholismo o hepatitis

Las combinaciones de características anteriores indican descartar AF.

Análisis de laboratorio para el diagnóstico de la AF

El examen de diagnóstico clásico involucra la detección de AC en las células sanguíneas periféricas del paciente después de cultivarlas con un mitógeno de células T y un agente inductor de ICLs, como el DEB o la MMC. Normalmente se analizan entre 20 y 100 células y el resultado se expresa como porcentaje de aberraciones o bien frecuencia de aberraciones por célula, así como el porcentaje de células con AC (Alter, 2007).

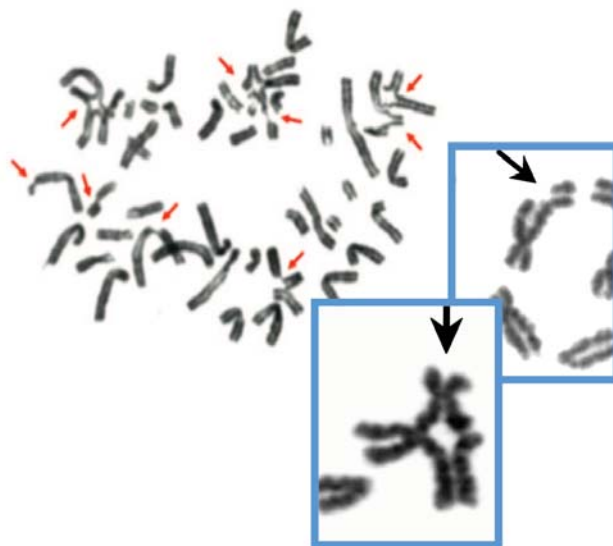


Figura 1. El diagnóstico de los pacientes AF se hace exponiendo sus linfocitos T a MMC o DEB. Si el resultado es positivo sus metafases tendrán una cantidad de aberraciones cromosómicas 5-10 veces mayor que en los individuos normales, tal y como se observa en la imagen. En el acercamiento se vé una ruptura cromatídica y una figura de intercambio radial de tipo tetrarradio en la cual están involucrados dos cromosomas.

Si el resultado del análisis de sangre es normal, pero aún se sospecha de AF, debe realizarse una biopsia de piel para obtener fibroblastos y llevar a cabo el análisis de AC con el fin de evaluar la presencia de un probable mosaico somático (la presencia simultánea de células normales y con la mutación AF).

Aproximadamente entre el 10 al 20% de los pacientes con AF muestran resultados que sugieren la presencia de un mosaico hematopoyético. En estos casos, conocer el porcentaje de células con AC puede resultar más útil que el análisis de rupturas por célula, debido a que se presentan pocas células con rupturas y por lo tanto el número de rupturas por células podría caer dentro del rango normal (Alter, 2007).

Citometría de flujo

Una característica distintiva de la AF es la acumulación de células en fase G2/M del ciclo celular, lo cual se puede evidenciar realizando un análisis por citometría de flujo de las células del paciente. La citometría de flujo examina la cinética del ciclo celular y puede detectar la proporción de células que han sido arrestadas en G2/M después del cultivo con un agente inductor de ICLs. En comparación con el resultado de análisis de AC, la citometría de flujo examina miles de células, es menos subjetiva y requiere menos intervención humana, sin embargo necesita de instrumentos muy sofisticados. Usualmente, este examen se lleva cabo en un laboratorio especializado y no se utiliza tanto como el análisis citogenético, que se considera el estándar de oro.

Los cultivos de fibroblastos son útiles para pacientes con sospecha de un mosaicismo somático hematopoyético, para pacientes que recibieron transfusiones recientes o un trasplante exitoso de médula ósea. También se puede hacer diagnóstico prenatal usando vellosidades coriónicas o células del líquido amniótico. Las células de AF frecuentemente crecen deficientemente, lo que podría ser la primera pista de que el paciente podría tener AF.

Análisis por Western Blot de FANCD2

Después del daño al DNA, el complejo de proteínas conocido como FAcore (A, B, C, E, F, G, I, L y M), ubiquitina a la proteína FANCD2, formando una proteína mas grande (D2-L), que puede distinguirse de la forma pequeña no ubiquitinada (D2-S) en un western blot usando un anticuerpo específico contra FANCD2. Sin embargo, se usa generalmente como una herramienta de investigación. En los pacientes AF cuyo defecto genético esta río abajo de FANCD2 el western blot de FANCD2 no detecta a la proteína ubiquitinada (Shimamura et al., 2002).

Análisis de complementación

Los linfocitos, linfoblastos inmortalizados con el virus de Epstein-Barr (EBV) o fibroblastos de un paciente pueden cultivarse con retrovirus que introducen genes FANC normales en las células del paciente, lo que conduce a la corrección del fenotipo celular. Este examen está limitado por la disponibilidad de DNA clonado de genotipos AF conocidos y se lleva a cabo en un número muy limitado de laboratorios de investigación.

Detección de mutaciones

La determinación de la mutación específica en los genes AF es complicada debido a que no se han detectado mutaciones recurrentes para la mayoría de los genes. Se realiza en laboratorios con una competencia técnica específica, requiere de la amplificación, secuenciación y detección de grandes segmentos de DNA. Muchos laboratorios detectan el grupo de complementación antes de la secuenciación, mientras que otros recurren primero a la secuenciación de los genes candidatos. El examen de mutación generalmente no se usa para diagnóstico sino para confirmar casos conocidos y en estudios de familias para determinar el estado de portador o afectado (Ameziane et al., 2008).

I.3. Fenotipo celular en anemia de Fanconi

Además de la sensibilidad característica a los agentes inductores de ICLs y el arresto característico de la fase G2 (Dutrillaux et al., 1982), otras características celulares de la enfermedad incluyen (Roselli et al., 1992; Joenje y Oostra, 1983; Joenje y Patel, 2001; Frias et al., 1996):

- Disminución de la tasa de proliferación al contacto con la MMC.
- Producción baja de Interleucina 6 (IL-6).
- Hipersensibilidad al oxígeno, en especial a las especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Hipersensibilidad a la hidroxiurea (HU).
- Acortamiento de telómeros.
- Aparición de alteraciones cromosómicas clonales en médula ósea tales como la monosomía 7, ganancias en el brazo largo del cromosoma 1 y ganancias en el brazo largo del cromosoma 3.
- Activación aparentemente normal de foci de RAD51, una proteína clave en la reparación por recombinación homóloga (excepto en los grupos FA-D1 y FA-N).
- Fenotipo pro-apoptótico. El fallo en la médula ósea de estos pacientes se ha relacionado con la producción excesiva de citocinas mielosupresoras como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o el Interferón gama (IFN γ).
- Activación normal de los puntos de monitoreo de la integridad del DNA y de la vía de p53.

I.4. Correlación fenotipo-genotipo

El curso clínico de la enfermedad varía mucho entre pacientes e incluso entre familias, por lo que existe una relación fenotipo-genotipo muy débil. La aparición de anomalías hematológicas y la sobrevida a largo plazo aparentemente dependen de factores adicionales, tales como el número y severidad de infecciones, estado nutricional y acceso a servicios médicos de calidad.

Los estudios hechos con los grupos más frecuentes (FA-A, FA-C y FA-G) no han encontrado diferencias en la edad de presentación de la anemia aplásica, sin embargo la manifestación de la citopenia fue más severa entre los pacientes que correspondían al grupo G. Además los pacientes pertenecientes al grupo FA-G podrían desarrollar LMA o SMD más temprano que los pacientes de otros grupos de complementación. Las malformaciones congénitas son similares y en igual medida entre los grupos FA-A y FA-G, pero menos severas que en los pacientes FA-C.

En otros estudios se ha encontrado que los pacientes del grupo FA-D2 muestran un mayor número de malformaciones congénitas, la pancitopenia se desarrolla a una edad más corta y requieren trasplantes de células troncales hematopoyéticas muy pronto. El fenotipo más severo se ha identificado en los pacientes portadores de mutaciones en FANCD1/BRCA2 o FANCN/PALB2, los cuales fallecen debido al desarrollo de neoplasias como el tumor de Wilms, Meduloblastoma o leucemias, los cuales pueden ocurrir incluso antes que la pancitopenia (Neveling et al.,2009).

El curso clínico moderado de la enfermedad puede deberse a mutaciones que permiten el mantenimiento de cierta función proteica o a la presencia de mosaicismo somático hematopoyético. Dichas reversiones somáticas generalmente ocurren en pacientes heterocigotos compuestos y dependiendo de los linajes afectados, pueden conducir a una mejora sustancial del paciente. Además, el fondo genético de cada paciente puede tener repercusiones importantes en la progresión de su enfermedad.

I.5. Funcionamiento de la vía FA/BRCA

La AF se origina debido a la deficiencia constitutiva de la vía FA/BRCA, la cual repara los ICLs inducidos en el DNA por los aldehídos, el DEB o la MMC. Los estudios moleculares en células AF y normales han demostrado que existen al menos 15 genes/proteínas involucrados en la enfermedad, los cuales forman parte de un complejo sistema de señalización y reparación de daño al DNA. No todos los genes involucrados en la vía FA/BRCA han sido detectados como causantes

de la AF. Sin embargo, la vía aún está siendo descrita y el conocimiento actual permite hacer la siguiente descripción de la vía (Figura 2).

Un ICL es capaz de arrestar la síntesis del DNA y activar a la vía FA/BRCA (de Winter and Joenje, 2009) mediante el complejo formado por las proteínas FANCM/FAAP24, el cual reconoce la distorsión en la molécula de DNA causada por el ICL y recluta al complejo central AF (FAcore) (Gari et al., 2008), dicho complejo posee actividad ligadora de ubiquitinas y monoubiquitina al complejo FANCD2FANCI (Kim et al., 2011). El complejo FANCD2FANCI monoubiquitinado recluta a la nucleasa FAN1 con actividad 5' endonucleasa (MacKay et al., 2010; Smogorzewska et al., 2010). Además, otras nucleasas como MUS81/EME1 (MUS81) con actividad 3' endonucleasa se reclutan en el sitio del daño (Hanada et al., 2006). De este modo, las endonucleasas reclutadas con ayuda de las proteínas AF generarán incisiones en ambos lados del ICL para dar origen a dos intermediarios de reparación: una ruptura de doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés: *Double Strand Break*) y a un aducto (ADD).

La endonucleasa XPF/ERCC1 también ha sido vinculada con la vía FA/BRCA y podría suplir la función de FAN1, pues también posee actividad de endonucleasa 5' (Bhagwat et al., 2009). De este modo la generación de DSBs está asegurada y la fosforilación de la histona H2AX señalará la región con daño (Rogakou et al., 1998).

Se ha propuesto recientemente que durante la reparación de un DSB las proteínas de la vía FA/BRCA son capaces de bloquear la acción de una vía alterna conocida como unión de extremos no homólogos (NHEJ, por *Non-Homologous End-Joining*) y de este modo podría prevenir que el DNA se repare inapropiadamente (Pace et al., 2010). De acuerdo con esto, la vía FA/BRCA podría dirigir la reparación de DSBs para que sean reparados siempre por recombinación homóloga (HRR, por *Homologous Recombination Repair*).

Los resultados experimentales de Pace y cols en el 2010, sugieren que dicho direccionamiento se lograría gracias a que la proteína FANCD2 posee actividad de

exonucleasa 3' a 5' y modificaría directamente el DSB para generar una hebra sencilla de DNA (ssDNA, del inglés *single strand DNA*) con extremos 5' libres, la cual promovería la HRR. Probablemente, durante el proceso de reparación de un ICL la actividad exonucleasa de FANCD2 tiene preferencia sobre otras exonucleasas implicadas en la HRR, como el complejo MRN (Bekker-Jensen et al., 2006; Trujillo et al., 1998).

Una vez que se ha generado la ssDNA y se ha recubierto con la proteína de Replicación A (RPA, por Replication Protein A), el complejo FANCD2FANCI inicia el reclutamiento de proteínas implicadas en la HRR (Taniguchi et al., 2002), como BRCA1 (Bekker-Jensen et al., 2006), FANCN (Xia et al., 2007), FANCD1 (San Filippo et al., 2006), FANCI (Gong et al., 2010) y el complejo RAD51 (San Filippo et al., 2006), lo cual facilita la reparación libre de error.

El ADD generado por la acción de las endonucleasas puede ser sobrepasado por el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por Proliferating Cell Nuclear Antigen) y las polimerasas de síntesis translesión (TLS) para ser reparado por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Chang and Cimprich, 2009; Garg et al., 2005). Finalmente, la Proteasa Específica de Ubiquitinas (USP1, por Ubiquitin Specific Protease), inactivará al complejo FANCD2FANCI y a PCNA por deubiquitinación, apagando el proceso (Huang and D'Andrea, 2006; Niimi et al., 2008).

Se ha propuesto que si el sitio del DSB se ocupa por las proteínas KU, se activará la vía de NHEJ mediada por el complejo Artemisa-DNAPKcs (Kim et al., 2005, Lieber, 2010). La vía FA/BRCA se encarga de bloquear dicho mecanismo alternativo y disminuye la propensión a error durante la reparación del DNA (Pace et al., 2010).

La vía FA/BRCA interactúa con las proteínas del punto de monitoreo de la integridad del DNA, como la cinasa ATR (por Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related) y su cinasa efectora CHK1 (Checkpoint Kinase 1), ambas requeridas para la activación de la vía FA/BRCA. ATR y CHK1 fosforilan muchas proteínas de la vía FA/BRCA y proteínas asociadas tales como FANCA, FANCE (Kee and

D'Andrea, 2010), FANCD2, FANCI (Pichierri et al., 2004), H2AX (Ward and Cheng, 2001) y BRCA1 (Tibbetts et al., 2000). Las cinasas DNAPKcs y ATM comparten blancos de fosforilación con ATR y se ha propuesto que pueden interactuarse unas a otras o reemplazarse en sus funciones (Kim et al., 2005; Traven and Heierhorst, 2005).

Finalmente, cuando el DNA ha sido reparado, el proceso conocido como *Checkpoint Recovery* inactiva a las proteínas de los puntos de monitoreo y el ciclo celular progresa. Este proceso incluye principalmente proteínas con actividad fosfatasa como WIP1, el complejo PLK1 y Ciclinas como la Ciclina tipo B (Bassermann and Pagano, 2010).

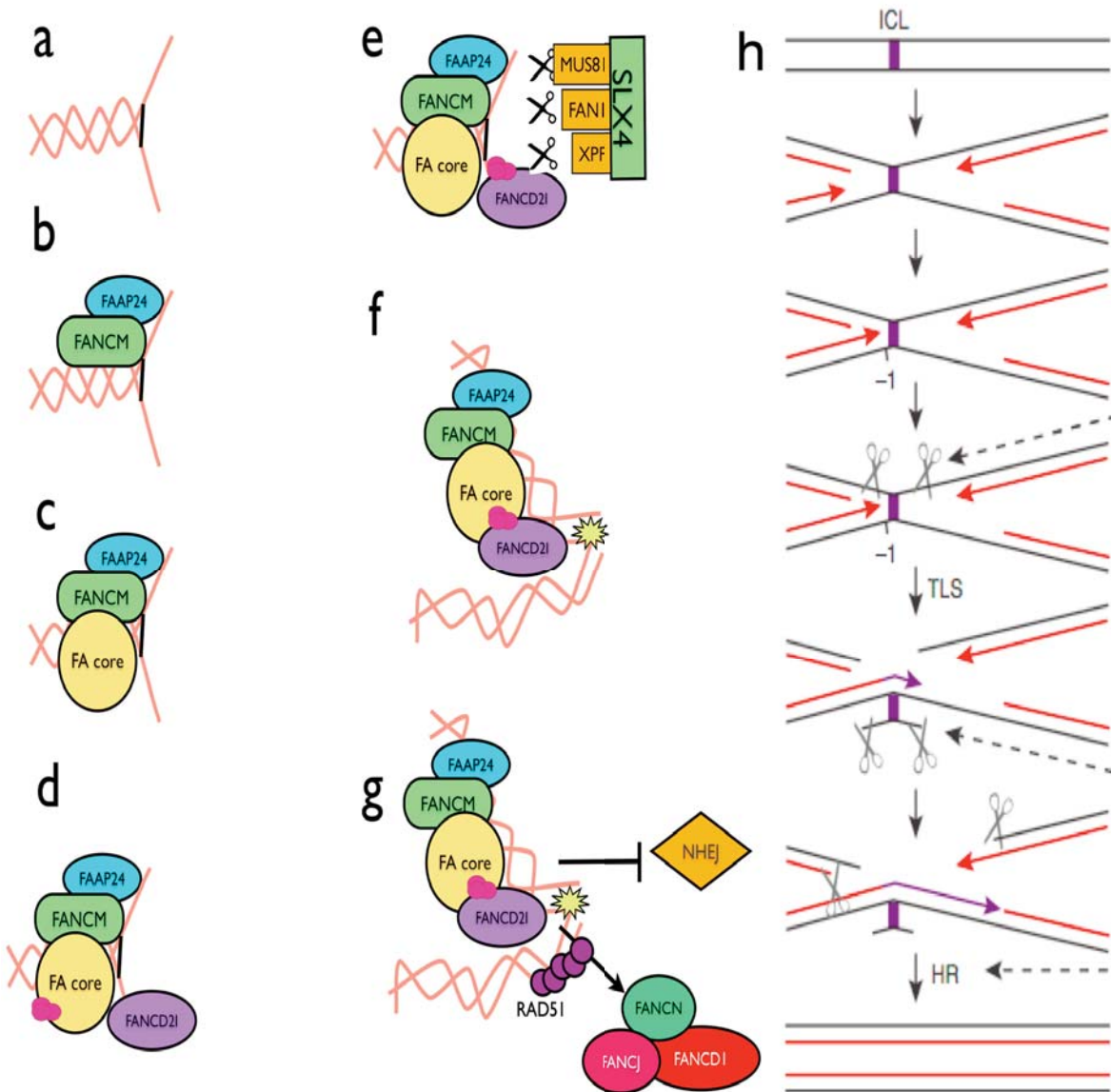


Figura 2. La vía FA/BRCA. a) Un ICL detiene el avance de la horquilla de replicación. **b)** El complejo FANCM-FAAP24 detecta el ICL. **c)** Reclutamiento del FAcore. **d)** Reclutamiento del complejo FANCD21. **e)** El FAcore monoubiquitina al complejo FANCD21 y permite el reclutamiento de diversas endonucleasas. **f)** Generación de un DSB y un ADD. **g)** Las proteínas FA inhiben la actividad de las proteínas de NHEJ y conducen la reparación del DSB a la HRR mediada por las proteínas RAD51, FANCN, FANCI y FANCD1. **h)** Esquematación del proceso de reparación del ICL (Tomado de Huang y D'Andrea, 2010).

I.6. La biología de sistemas y los modelos Booleanos

Una de las ambiciones más grandes de la comunidad científica ha sido, desde hace mucho, el entendimiento preciso de la complicada red de interacciones que controlan la expresión génica y las cascadas de señalización molecular intracelulares. Al tiempo que los investigadores descubren los componentes y la conectividad de estas redes, ha sido posible estudiar su comportamiento dinámico como un todo y descubrir cual es el papel específico de cada uno de sus componentes. Sin embargo, la información ha crecido aceleradamente y se ha hecho necesario el uso de modelos computacionales para entender las propiedades dinámicas de estas redes, e incluso ahora se pueden hacer predicciones sobre su comportamiento o estructura.

La necesidad de entender la regulación génica a nivel sistémico se ha incrementado debido a la enorme cantidad de información generada desde los inicios de la investigación a nivel genómico y con los sistemas de generación masiva de información, como los microarreglos y la secuenciación masiva. Por lo tanto, la construcción de modelos de redes de regulación genética y molecular que sean capaces de incorporar toda esta información de manera concisa y precisa tendrá grandes repercusiones en el entendimiento de las deficiencias moleculares que subyacen las enfermedades y en la búsqueda de medicamentos y tratamiento efectivos. Debido a esto el desarrollo de modelos matemáticos ha recibido gran impulso para describir las interacciones complejas entre los genes y sus reguladores (Xiao, 2009).

Estos enfoques se basan en que el funcionamiento de una célula o de una unidad de organización biológica mayor puede comprenderse si es conceptualizada como un sistema de elementos que interactúan. Sin embargo, esta aproximación a nivel sistémico requiere que se cumplan ciertos requisitos, como: 1) se deben conocer la identidad de los componentes que constituyen el sistema biológico de interés; 2) se deben conocer las interacciones entre todos estos componentes; y 3) se debe conocer, al menos parcialmente, el comportamiento dinámico de estos componentes (es decir, conocer como cambian su abundancia o actividad con

respecto al tiempo en varias condiciones). Finalmente esta información puede ser integrada en un modelo computacional que no solo debe ser consistente con el conocimiento actual del sistema de estudio, sino que además debe de proveer nuevas ideas y predicciones, tales como el comportamiento del sistema en condiciones que no han sido exploradas previamente (Albert, 2007).

Existen dos enfoques bien definidos para inferir y modelar la conectividad de los nodos en las redes de regulación. La aproximación top-down, que usa datos obtenidos a partir de tecnologías de generación masiva de datos, como microarreglos, para identificar nodos candidatos y proponer las interacciones entre ellos o la aproximación bottom-up, que incorpora únicamente datos experimentales detallados, con corroboración de la relación directa entre los nodos de la red o el tipo de interacción entre dichos componentes. Por lo tanto la topología de las redes inferidas con la segunda aproximación es muy certera.

Los modelos dinámicos discretos o modelos Booleanos (MB), que corresponden a la aproximación bottom-up, intentan representar la interacción de los nodos de la red (genes, proteínas o moléculas) por medio de reglas lógicas matemáticas que indican como cambia el estado de cada nodo en respuesta a los cambios en los estados de sus reguladores. Dichos nodos pueden tomar dos posibles valores, 0 o 1 (OFF/ON), que representan a su vez los estados: inactivo/activo, ausente/presente, no transcrito/ transcrito. Asimismo, las interacciones activadoras o inhibitorias se representan en las funciones lógicas, utilizando los conectores AND, OR y NOT y sus combinaciones (Assman y Albert, 2009).

La característica cualitativa básica de un sistema dinámico, como los MB, es el número y el tipo de comportamientos asintóticos diferentes que se pueden encontrar, llamados atractores. Todas las condiciones iniciales que llegan a un determinado atractor constituyen su cuenca de atracción e intuitivamente se considera que cuando un atractor tiene una cuenca de atracción grande, el fenotipo que le corresponde se presentará con más frecuencia que el fenotipo correspondiente a un atractor con una cuenca de atracción más pequeña, aunque esto no ha sido demostrado. Una secuencia de estados conectados por

transiciones (estados transitorios) constituyen las trayectorias del sistema (Albert, 2007).

Un MB que captura apropiadamente el comportamiento observado experimentalmente permite al investigador identificar los cambios en el comportamiento del sistema debidos a perturbaciones e identificar condiciones en las que la dinámica de las variables es cualitativamente similar. Idealmente un buen modelo debe de tener un nivel bajo de incertidumbre en sus interacciones, ecuaciones y parámetros usados; debe ser relativamente fácil de construir o ejecutar; debe ser sencillo y elegante; sus predicciones deben ser altamente precisas; preferentemente debe ser un modelo lo suficientemente general como para poder aplicarse a un gran número de sistemas; y debe ser robusto, es decir, insensible a pequeños cambios (Albert, 2007).

En conclusión, los MB han demostrado ser una aproximación muy importante dentro del modelado de redes de regulación, pues en ellos se capturan las características fundamentales de la regulación génica o proteica, son conceptualmente simples y no requieren datos cuantitativos, y su estructura basada en reglas lógicas posee significados físicos y biológicos (Xiao, 2009).

Los MB han sido usados para modelar una gran variedad de procesos, entre ellos se pueden mencionar: el control genético de la morfogénesis floral en *Arabidopsis thaliana* (Mendoza et al., 1999), el proceso de diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Mendoza, 2006), el control del ciclo celular de los mamíferos (Fauré et al., 2006), y el proceso de sobrevivencia de las células malignas en leucemia (Zhang et al., 2009).

Debido a lo anterior, un MB de la vía FA/BRCA reparadora de ICLs puede ser de gran utilidad para realizar predicciones sobre el comportamiento celular en AF. Como ya ha sido mencionado, las células AF son altamente sensibles al daño generado en su DNA por el tratamiento con MMC, y muchas de ellas activan los mecanismos apoptóticos de muerte celular, sin embargo otra proporción de la población celular es capaz de proseguir en el ciclo celular a pesar de tener gran

cantidad de daño cromosómico. Esta tolerancia al daño podría estar mediada por vías alternas de reparación y de supervivencia celular independientes total o parcialmente de la vía FA/BRCA, por lo que el sistema de estudio adquiere mayor complejidad para ser entendido.

Para abordar este problema, en este trabajo se ha desarrollado el primer MB aplicado al estudio de la AF. Se ha analizado de modo integral la vía FA/BRCA y las vías de reparación relacionadas con ella, para generar predicciones sobre su supervivencia celular y tolerancia al daño al DNA y obtener así un MB de la vía FA/BRCA. Asimismo, se ha seleccionado al grupo AF-A para hacer algunas corroboraciones experimentales cualitativas de las predicciones obtenidas con el MB.

I.7. Antecedentes directos

La AF puede considerarse como un modelo de gran valor para investigar los mecanismos involucrados en la reparación del DNA; principalmente cuando la célula se enfrenta a horquillas de replicación arrestadas durante la fase de Síntesis del DNA. Esta reparación puede llevarse a cabo no solo en fase S del ciclo celular, sino también en la fase G2 mediante un proceso conocido como Reparación Postreplicativa del DNA (RPR), sin embargo en este proceso de reparación la vía FA/BRCA aún no ha sido vinculada.

Martínez et al. (2008) y Molina et al. (en proceso) han demostrado que las células AF son capaces de llegar a metafase con gran cantidad de daño cromosómico (Figura 3) sin activar los mecanismos apoptóticos de muerte celular. Dicho hallazgo evidencia que existe una conexión muy importante entre la reparación de los ICLs mediada por la vía FA/BRCA y la progresión del ciclo celular, pues aunque las células con daño irreparable deben activar los procesos apoptóticos esto no ocurre en la población celular entera y un gran número de células son capaces de ignorar los puntos de control del ciclo celular y continúan dividiéndose.

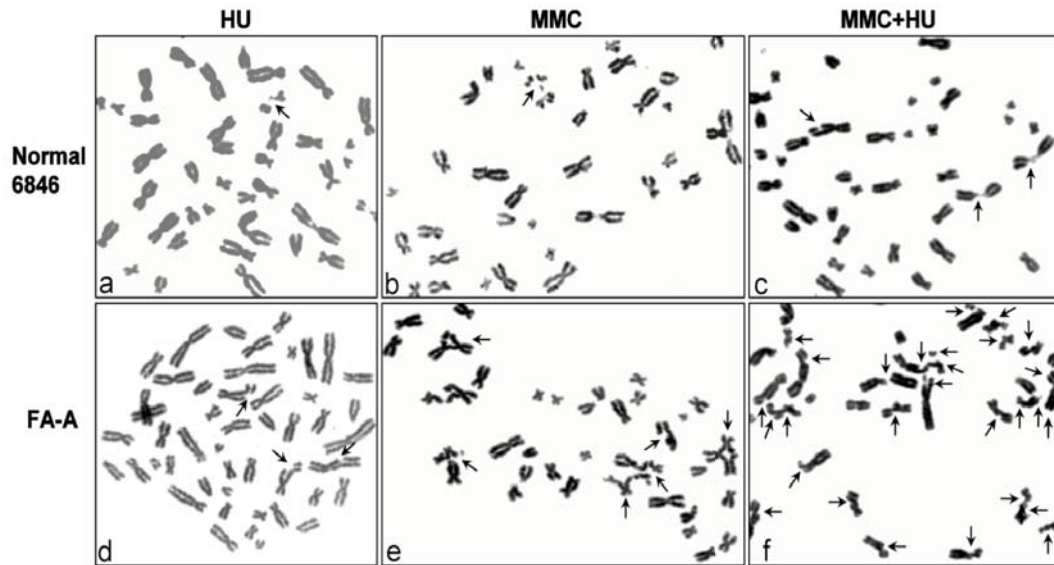


Figura 3. Metafasas con AC generadas por la MMC y la HU en células normales y AF-A. Se puede observar que la HU y la MMC generan un mayor número de AC en las células AF-A que en las células NL-6846. El efecto se observa con el doble tratamiento (MMC+HU 3 horas antes de la mitosis. Imagen tomada de Molina y cols (*en proceso*).

II. JUSTIFICACIÓN

La AF ha ganado relevancia como un modelo para investigar los mecanismos por medio de los cuales una célula puede enfrentar el daño generado por los ICLs en su DNA. Se sabe que las células AF comparadas con las células normales son altamente sensibles a los agentes alquilantes bifuncionales, como la MMC. Sin embargo, a ciertas dosis de MMC no todas las células con daño mueren y se pueden observar en mitosis con gran cantidad de AC y figuras de intercambio entre cromosomas, los cuales son indicios de reparación del daño, pero del tipo de reparación propensa a error.

Esto podría estar mediado por mecanismos que involucren otras vías de señalización y de reparación del DNA que actúan cuando la vía FA/BRCA es deficiente. El proponer y/o descubrir cuales son estas vías puede ser de gran utilidad no sólo para el entendimiento de la AF, sino también para el estudio de varios tipos de cáncer con fenotipo celular AF como algunos tipos de cáncer de mama y ovario. Lo anterior coloca al estudio de la AF en un contexto científico mucho más amplio de lo que representa la enfermedad por si misma.

HIPÓTESIS

Si las células deficientes en la vía FA/BRCA son capaces de sobrevivir a una gran cantidad de daño en el DNA a pesar de ser deficientes en la reparación de los ICLs, entonces es posible que utilicen mecanismos alternos de sobrevivencia y reparación del daño al DNA propensos a error. Las vías involucradas en este mecanismo podrán conocerse mediante la reconstrucción de un modelo de red Booleana de la vía FA/BRCA y su comportamiento dinámico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Reconstruir la red de regulación de la vía FA/BRCA y construir un MB que describa los cambios de activación de genes y proteínas involucrados en la reparación del daño al DNA, corroborándolo experimentalmente con MMC en células AF-A.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Proponer una red de señalización de la vía FA/BRCA
- ii. Construir un MB de la vía FA/BRCA.
- iii. Evaluar por inmunodetección un grupo de proteínas que resulten de interés a partir de la información que se obtenga del MB.
- iv. Determinar la dinámica del ciclo celular en células deficientes en la vía FA/BRCA, mediante el ensayo de bloqueo de citocinesis con citocalasina B.

III. METODOLOGÍA

III.1 Construcción de la red de señalización de la vía FA/BRCA

Para determinar la conectividad de la red se analizó la literatura científica internacional y se obtuvo la información relevante sobre la vía FA/BRCA y las vías de reparación relacionadas con ella.

Se encontró que al menos 51 proteínas son relevantes para la construcción de la red; sin embargo, algunas de estas proteínas actúan como complejos y en estos casos fueron colapsadas en un nodo funcional único para facilitar el análisis dinámico. De este modo, la red propuesta incluye proteínas de reconocimiento de daño en el DNA, proteínas de los puntos de monitoreo de la integridad del DNA y proteínas reparadoras de daño. Se incorporaron además 3 nodos que representan diferentes tipos de daño: ICL, DSB y ADD.

Las reglas regulatorias o reglas lógicas para cada nodo se desarrollaron describiendo las condiciones necesarias para que cada nodo esté encendido, usando los operadores lógicos AND, OR y NOT (De Jong, 2002, Albert, 2008). De este modo la red quedó compuesta por 28 nodos y 122 interacciones regulatorias, 80 de estas interacciones son positivas y 42 negativas. La red final se dibujó con el programa yEd y se puede ver en la figura 5 (sección de resultados). Las reglas regulatorias desarrolladas y la información usada para su construcción se muestran en la tabla 2 (sección de resultados).

No todas las interacciones que aparecen en la red han sido reportadas en la literatura experimental o aparecen en bases de datos especializadas. De las 122 interacciones regulatorias del modelo, 16 fueron inferidas durante el proceso de modelado para obtener un comportamiento dinámico que reprodujera los datos experimentales. Estas 16 reglas inferidas se consideran predicciones del modelo (ver sección de resultados).

La selección de estas 16 interacciones no reportadas previamente se basó exclusivamente en que el modelo recuperara los atractores observados en la red silvestre y en las redes mutantes y es el conjunto mínimo de interacciones que se encontraron como consistentes con los datos experimentales.

III.2 La vía FA/BRCA como un sistema dinámico discreto

Para poder llevar a cabo simulaciones computacionales, la red reconstruida de la vía FA/BRCA se modeló como un sistema dinámico discreto, específicamente Booleano, donde cada nodo se representa como una variable x que puede tomar el valor de 0 o 1 para representar su estado inactivo o activo, respectivamente. El estado de activación de la red completa se representa por medio de un vector con un conjunto de variables Booleanas x_1, x_2, \dots, x_n donde x_i representa el estado de activación del nodo i .

El estado de activación de cada nodo cambia en tiempos discretos, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$x_i(t + 1) = F_i(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t))$$

donde $x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)$ representan el estado de activación de cada uno de los reguladores del nodo x_i en el tiempo t , y F_i es la función Booleana, también llamada regla lógica, que determina el estado del nodo x_i en el siguiente tiempo, es decir: $x_i(t + 1)$ (De Jong, 2002).

Las reglas lógicas de cada nodo, las cuales indican a sus reguladores, se muestran en la tabla 2. Estas ecuaciones describen un sistema dinámico determinístico con un total de $2^{28} = 268,435,456$ posibles estados de activación.

Usando el programa BoolNet (Mussel et al., 2010) se analizó exhaustivamente el comportamiento dinámico de la red FA/BRCA silvestre, iniciando las simulaciones a partir de todas las condiciones iniciales posibles con un esquema de actualización sincrónico, es decir que todos los componentes del sistema se

actualizan al mismo tiempo, hasta que el sistema alcanzara un patrón de activación periódico, conocido también como atractor.

Después de simular las condiciones silvestres se simularon las mutantes de ganancia o pérdida de función de cada uno de los nodos de la red, fijando la variable correspondiente en 0 o 1, respectivamente. Se obtuvieron los patrones de activación de cada uno de los nodos en cada una de las simulaciones y los atractores finales para cada una de las mutantes.

Se considera que los modelos Booleanos sincrónicos no representan apropiadamente que los procesos biológicos pueden llevarse a cabo en diferentes tiempos, por lo que asumir que todos los eventos se llevan a cabo al mismo tiempo, tal y como lo hace el modelo sincrónico, puede ser una sobresimplificación de los eventos biológicos. Para contrarrestar esto se puede recurrir a un método de actualización asincrónico en el cual, usando como base las mismas reglas lógicas del modelo ya desarrollado, se toman en cuenta diferentes escalas de tiempo, de este modo los nodos se actualizan aleatoriamente en cada iteración o repetición, con lo que se permite que el sistema tome en cuenta todas las escalas de tiempo. Este tipo de actualización lleva a cabo un gran número de réplicas de simulaciones que inician con la misma condición inicial y hace un recuento de los atractores alcanzados desde cada condición inicial y los estados de cada nodo en las diferentes escalas de tiempo (Albert et al., 2008).

Para determinar si los resultados obtenidos con la actualización sincrónica eran confiables, se utilizó un método de actualización asincrónico y se verificó que los atractores y trayectorias se repitieran con los dos métodos de actualización. Sin embargo evaluar de esta manera todos los nodos es computacionalmente muy costoso, de manera que se seleccionaron únicamente la red silvestre y dos mutantes de interés para llevar a cabo este análisis : FAcCore y FANCD1N.

Los patrones de activación de nodos y los atractores obtenidos con las simulaciones del modelo de red de la vía FA/BRCA fueron utilizados para

enfocarnos en la evaluación experimental de tres proteínas y hacer un análisis de progresión del ciclo celular en células AF-A (VU817) y normales (NL-49).

III.3 Metodología de la fase experimental

III.3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se realizaron cultivos de las líneas celulares linfoblastoides AF-A (VU-817) y Normal (NL-49). Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo con medio RPMI 1640 suplementado con: suero fetal de bovino al 10% (inactivado a 56°C por 30 minutos) (GIBCO); L-glutamina al 1%; piruvato de sodio al 1%; aminoácidos no esenciales al 1% y gentamicina 0.5%. Se incubaron a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. Antes de realizar cualquier ensayo se evaluó la viabilidad celular con tinción de azul tripano, la viabilidad debió ser igual o mayor al 95% para continuar con el experimento.

III.3.2 Diseño experimental

De todas las predicciones generadas con el MB se seleccionaron dos para trabajarlas de manera experimental. En estas las simulaciones indican que:

1) las células con mutaciones en alguno de los elementos del complejo FAcCore utilizan a la NHEJ como una vía de reparación alterna a la vía FA/BRCA y de este modo toleran el daño generado en su DNA por los ICLs.

2) las células con mutaciones en FAcCore son capaces de activar el proceso conocido como *Checkpoint Recovery* a pesar de tener cromosomas con rupturas sin reparar.

La primera predicción se abordó utilizando un anticuerpo contra la cinasa DNA-PKcs, proteína clave de la vía de NHEJ y se evaluó su activación en cada una de las fases del ciclo celular mediante Citometría de Flujo usando como contratinción el Ioduro de Propidio, el cual permite detectar la cantidad de DNA presente en cada célula. En este caso, para comprobar la predicción, se esperaba encontrar

un mayor número de células AF VU817 con DNA- PKcs fosforilada en comparación con las células normales NL-49.

Para la segunda predicción se evaluó primero la activación de CHK1, la cual es una de las proteínas clave del *Checkpoint* de G2/M que monitorea la integridad del DNA y no permite la transición hacia mitosis en presencia de daño en el DNA. Su activación se monitoreó por citometría de flujo con un anticuerpo contra la proteína CHK1 fosforilada y se detectó por medio de Ioduro de propidio la fase del ciclo celular en la cual estaba su actividad. En este caso, para comprobar la predicción se esperaba una activación correcta de CHK1 tanto en las células AF-A VU817 como en las células NL-49.

Para estudiar el funcionamiento del *Checkpoint Recovery*, se utilizó una estrategia que determinó si las células que entran a mitosis son capaces de completarla y salir de ella, con lo que se comprobaría que se activó el mecanismo de *Checkpoint Recovery*, que permite a las células salir del bloqueo por daño al DNA. Se evaluó la dinámica de división celular de los cultivos en las diferentes condiciones experimentales. Primero se determinó el número de células que entraban a fase M usando un anticuerpo anti- MPM2, el cual detecta el epítipo MPM2 en todas las proteínas fosforiladas durante la mitosis por el factor promotor de la mitosis (MPF). Además se determinó el número de células que salen de la mitosis usando el ensayo de bloqueo de la citocinesis con Citocalasina B durante 24 o 48 horas consecutivas. Con este ensayo se podría hacer una cuantificación de las células que pasaron por una primera ronda de división completa (binucleadas) y las que pasaron por dos rondas de división completa (tetranucleadas).

En este punto se esperaba que si, como predice el modelo, el *Checkpoint Recovery* se activa anormalmente en las células AF, encontraríamos que la proporción de células que transitan de un ciclo celular al siguiente sería similar entre la línea NL-49 que repara normalmente y AF-A VU817 que presenta DNA no reparado y que sus células deberían quedarse arrestadas.

Para esta parte, todos los experimentos se realizaron sobre cultivos que se sembraron con una densidad de 300,000 cel/mL. Para cada ensayo se estableció un cultivo control sin tratamiento y un cultivo experimental con MMC a una concentración final de 10 ng/ml y los tratamientos se hicieron de acuerdo al esquema de la figura 4.

La inmunodetección de las proteínas DNA-PKcs fosforilada y CHK1 fosforilada se realizó cosechando 300 mil células cada 3 horas a partir de las 15 horas de iniciado el tratamiento con MMC. (ver figura 4C y el protocolo siguiente).

De los diferentes tratamientos se tomaron 300 mil células y se lavaron con PBS dos veces. El botón celular se resuspendió perfectamente y se fijó con etanol al 70% frío. Las células se almacenaron a 4°C durante 24 horas y posteriormente a -20°C hasta el momento de ser marcadas.

Para llevar a cabo el marcaje las células fueron centrifugadas y se retiró el fijador. Se lavaron con 500 µL de PBS1X durante 5 minutos, se centrifugaron por 10 minutos a 2500 rpm y se retiró el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces. Las células se permeabilizaron con 300 µL de PBS1X +Tritón x100 al 0.1% durante 5 minutos. Después se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos y se dieron 2 lavados con PBS1X a 2500 rpm durante 10 minutos para eliminar el Tritón. Después de esto se procedió a preparar el anticuerpo usando el kit Zenon Tricolor Mouse IgG Labeling Kit # 1 de acuerdo con los siguientes pasos:

Para 8 tubos

- Se colocó en un tubo 2 µL del anticuerpo mouse-antiMPM2, mouse- antiCHK1 o mouse-antiDNA-PKcs, según correspondiera.
- Se agregaron 5µL de labelling anti-mouse (marca color verde Alexa-Fluor 488) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregaron 5 µL de blocking reagent y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se diluyó en 188 µL de PBS/NGS 10%.

Se añadieron 25 µL del mix anterior a cada tubo con células y las muestras se dejaron incubando en oscuridad durante 1 hora. Después del periodo de incubación las células se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 rpm dos veces y finalmente fueron resuspendidas en una solución de tinción de yoduro de propidio. Durante la lectura se registraron 20,000 eventos en un citómetro

FACSCan (Beckton Dickinson) y el análisis se hizo en el program CellQuest versión 3.2.1.

III.3.4 Bloqueo de la Citocinesis con Citocalasina B

Para obtener células binucleadas y tetranucleadas se bloqueó la citocinesis de las diferentes líneas celulares exponiéndolas a una concentración final de 3 µg/ml de citocalasina B durante 24 o 48 horas. Los cultivos experimentales fueron expuestos a MMC y se cosecharon 24 horas después de iniciado el tratamiento, o fueron lavados, reincubados con citocalasina B nueva y cosechados 48 horas después de iniciado el tratamiento (ver figura 4A). Se hicieron laminillas de cada uno de los tratamientos, se tiñeron con tinción de Wright y Giemsa, y finalmente se contó el número de células mononucleadas (MN), binucleadas (BN) y polinucleadas (PN) en 500 células (Fenech y Morley, 1985).

III.3.5 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se realizó un análisis de varianza ANOVA y una postprueba de tipo DMS. Se determinó que existía diferencia significativa con una $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV.1 Reglas lógicas para el funcionamiento del MB de la vía FA/BRCA.

Después de hacer el análisis de literatura científica referente a la vía FA/BRCA y a las vías de reparación relacionadas con ella, se generaron las reglas lógicas necesarias para hacer que el MB funcionara apropiadamente. Dichas reglas se muestran en la tabla 2. Además en dicha tabla se encuentran la justificación y referencia de cada una de las reglas lógicas. El texto en **negritas** indica que parte de la regla lógica de funcionamiento del nodo es una predicción generada durante el desarrollo del modelo y que por lo tanto puede ser abordada experimentalmente para su corroboración.

La elaboración de las reglas lógicas booleanas implica el uso de los operadores lógicos OR, AND y NOT. Cuando en la regla lógica de un nodo se encuentra el operador OR, esto implica que dos o más componentes de la red pueden tener el mismo efecto sobre un nodo, como encenderlo o apagarlo; si se encuentra el operador AND, esto quiere decir que se requiere necesariamente de dos o más componentes para que dicho nodo se encienda y por el contrario, el operador NOT implica que cierto componente no debe estar presente para que el nodo se encienda. Por ejemplo, en la regla lógica siguiente:

FAcore = FANCM AND (ATR OR ATM) AND NOT CHKREC

Para que el nodo “FAcore” se encienda, es decir, pase del estado OFF al estado ON, se requiere que esté encendido el nodo de FANCM y a su vez, debe estar encendido el nodo ATR O ATM; además el nodo CHKREC no debe estar activado. Se requieren todas estas condiciones para que el nodo FAcore se active.

En los modelos Booleanos la simplificación de la red de estudio es muy importante para poder llevar a cabo el análisis computacional exhaustivo de los datos, debido a ello varios elementos de la vía FA/BRCA fueron agrupados y se muestran en la siguiente lista (el nodo final en rojo y sus componentes en azul):

- **FANCM:** FANCM, MHF1, MHF2, FAAP24.
- **FACore:** FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FAAP24, FAAP100, UBE2T.
- **MUS81:** MUS81, EME1.
- **XPF:** XPF, ERCC1.
- **FANCD2I:** FANCD2, FANCI.
- **FANCD1N:** FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2.
- **FANCJBRCA1:** FANCI/BRIP1/BACH1, BRCA1.
- **PCNATLS:** PCNA, REV1, Polimerasas de Síntesis Translesión.
- **MRN:** MRE11, RAD50, NBS1.
- **ssDNARPA:** ssDNA, RPA.
- **BRCA1:** BRCA1, BARD1.
- **KU:** KU70, KU80.
- **DNAPK:** Artemisa, DNAPKcs.
- **NHEJ:** Miembros de la familia Pol X (pol μ and λ), complejo ligasa: XLF, XRCC4, and DNA ligase IV
- **ATR:** ATRIP, ATR.
- **CHK1:** CHK1, Claspinga.
- **H2AX:** γ H2AX, MDC1, RNF8.
- **CHKREC:** PLK1, PP2A, PP6, SCF y otras proteínas reguladoras del Checkpoint.

Tabla 2. REGLAS LÓGICAS PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL MB DE LA VÍA FA/BRCA

NODO	REGLA LÓGICA QUE ENCIENDE EL NODO	JUSTIFICACIÓN/REFERENCIA
ICL	ICL AND NOT DSB	El ICL es el nodo de entrada y se considera como una constante. La generación de un DSB durante la reparación del ICL asegura la desaparición del ICL.
FANCM	ICL AND NOT CHKREC	FANCM se activa cuyo la horquilla de replicación del DNA se arresta debido a la presencia de un ICL (Meetei et al., 2005). FANCM se inactiva durante la fase M, cuyo la reparación del DNA se ha completado (Kee et al., 2009).
FAcore	FANCM AND (ATR OR ATM) AND NOT CHKREC	FANCM recluta al complejo central FAcore a la horquilla de replicación arrestada (Kim et al., 2008). ATR o ATM pueden activar por fosforilación algunas de las proteínas del complejo FAcore tales como FANCA y FANCE (Kee y D'Andrea, 2010). La fosforilación de FANCE mediada por CHK1 promueve la degradación de FANCE mediada por ubiquitinas y de este modo podría promover el apagado de la vía FA/BRCA (Wang et al., 2007).
FANCD2I	FAcore AND ((ATM OR ATR) OR (H2AX AND DSB)) AND NOT USP1	FAcore ubiquitina al complejo FANCD2I cuyo ya se encuentra localizado en la cromatina (García-Higuera, 2001). La fosforilación de FANCD2I mediada por ATR o ATM se requiere para que el complejo FANCD2I se mantenga estable (Smogorzewska et al., 2007). La histona H2AX fosforilada promueve la permanencia del complejo FANCD2I en la cromatina (Bogliolo et al., 2007). Los DSBs son procesados por la actividad exonucleasa de FANCD2FANCI (Pace et al., 2008). USP1 desubiquitina e inactiva al complejo FANCD2I, con lo cual se apaga la vía FA/BRCA (Nijman et al., 2005).
MUS81	ICL	MUS81-EME1 es una endonucleasa que promueve la conversión de los ICLs en DSBs durante la fase S del ciclo celular (Hanada et al., 2006)
FANCBRCA1	(ICL OR ssDNARPA) AND (ATM OR ATR)	La proteína FANCB/BRIP1/BRIP1J posee actividad helicasa que abre las hebras del DNA en las proximidades de la región con daño, es reclutada gracias a MLH1 (Peng et al., 2007). FANCB se requiere para la generación de DNA de cadena sencilla y para cargar RPA en situaciones de estrés replicativo, lo cual es un paso necesario para la activación de los checkpoint que monitorean la integridad del DNA (Gong et al., 2010).
XPF	(MUS81 AND NOT FANCM) OR (MUS81 AND p53 AND NOT (FAcore AND FANCD2I AND FAN1))	Se considera que MUS81-EME1 genera la primera incisión en el DNA durante la reparación de un ICL, se ha propuesto que XPF-ERCC1 lleva a cabo la segunda incisión (Bhagwat et al., 2009)
FAN1	MUS81 AND FANCD2I	El complejo FANCD2I recluta a la proteína FAN1, la cual en conjunto con MUS81-EME1 podría facilitar la excisión del ICL (O'Donnell y Durocher, 2010; MacKay et al., 2010; Smogorzewska et al., 2010).
ADD	(ADD OR (MUS81 AND (FAN1 OR XPF))) AND NOT PCNATLS	ADD puede funcionar como un nodo de entrada y ser constante. Alternativamente, MUS81 (Hanada et al., 2006), en conjunto con FAN1 (Smogorzewska et al., 2010) o XPF-ERCC1 (Bhagwat et al., 2009) pueden generar un ADD durante la reparación de un ICL. Dicho ADD es un sustrato para las polimerasas de síntesis translesión propensas a error como Pol ζ (complejo Rev3-Rev7) y Rev1.
DSB	(DSB OR FAN1 OR XPF) AND NOT (NHEJ OR HRR)	DSB puede funcionar como un nodo de entrada y ser constante. Alternativamente, MUS81 (Hanada et al., 2006), en conjunto con FAN1 (Smogorzewska et al., 2010) o XPF-ERCC1 (Bhagwat et al., 2009) pueden generar un DSB durante la reparación de un ICL. Las vías NHEJ y HRR pueden reparar los DSBs (Li y Heyer, 2008; Lieber, 2010).
PCNATLS	(ADD OR (ADD AND FAcore)) AND NOT (USP1 OR FAN1)	Cuyo una horquilla de replicación es arrestada, PCNA es ubiquitinada para promover las vías de tolerancia al daño al DNA (Chang y Cimprich, 2009). La monoubiquitinación de PCNA contribuye al reclutamiento de las polimerasas TLS y puede actuar en presencia o ausencia del complejo FAcore (Mirchandani et al., 2008).
MRN	DSB AND ATM AND NOT ((KU AND FANCD2I) OR RAD51 OR CHKREC)	Los DSBs activan al complejo MRN (Moreno-Herrero, 2005; Trujillo et al., 1998). ATM fosforila a la proteína NBS1 (complejo MRN). De acuerdo con nuestros resultados, KU y FANCD2I o alternativamente RAD51 podrían inhibir la actividad del complejo MRN y las proteínas CHKREC podrían apagar la actividad de MRN
BRCA1	DSB AND (ATM OR CHK2 OR ATR) AND NOT CHKREC	La proteína BRCA1 se recluta a los sitios de los DSBs y es necesaria para su reparación (Becker-Jensen et al., 2006). ATR, ATM, o CHK2 comparten a BRCA1 como un blanco de fosforilación (Greenberg et al., 2006; Traven y Heierhorst, 2005).
ssDNARPA	DSB AND ((FANCD2I AND FANCBRCA1) OR MRN) AND NOT (RAD51 OR KU)	Durante la reparación de un DSB el DNA de cadena sencilla (ssDNA) es recubierto por la proteína RPA (Li y Heyer, 2008). FANCD2I y FANCBRCA1 en conjunto o MRN solamente pueden colaborar en la generación de ssDNARPA. RPA se une inmediatamente al ssDNA y subsecuentemente es reemplazado por RAD51 (Shibata et al., 2011).

TABLA 2. CONTINUACIÓN.

NODO	REGLA LÓGICA QUE ENCIENDE EL NODO	JUSTIFICACIÓN/REFERENCIA
FANCD1N	(ssDNARPA AND BRCA1) OR (FANCD2I AND ssDNARPA) AND NOT CHKREC	FANCD1/BRCA2 permiten que RAD51 utilice a ssDNARPA como un sustrato de recombinación (San Filippo et al., 2006). Inmediatamente después del daño se requiere de BRCA1 para transportar a FANCD1/BRCA2, RAD51 y FANCD1 a los sitios del DNA con daño (Greenberg et al., 2006). La monoubiquitinación de FANCD2 es necesaria para su interacción con FANCD1/BRCA2 (Wang et al., 2004). El complejo FANCD2-BRCA1 y el complejo FANCD2-RAD51 participan en los procesos de recombinación homóloga específicos de la fase S del ciclo celular (Taniguchi et al., 2002). BRCA1 es un regulador río arriba de FANCD1/BRCA2 en respuesta a DNA dañado, y FANCD1/PALB2 es la unión entre BRCA1 y FANCD1/BRCA2 (Zhang et al., 2009). FANCD2 y BRCA2 pueden co-immunoprecipitar en extractos de células humanas, lo cual confirma que dicha interacción ocurre in vivo (Hussain et al., 2003).
RAD51	ssDNARPA AND FANCD1N AND NOT CHKREC	FANCD1/BRCA2 permite la nucleación de RAD51 en el ssDNA recubierto por RPA y actúa como un mediador de la HRR (San Filippo et al., 2006). FANCD1/BRCA2 interactúa física y funcionalmente con RAD51 (Marmorstein et al., 1998). Las mutaciones en la proteína PALB2, la cual interactúa con FANCD1/BRCA2 está asociada con un individuo AF del subtipo FANCD1 (Xia et al., 2007).
HRR	DSB AND RAD51 AND FANCD1N AND BRCA1 AND NOT CHKREC	Los DSBs activan los checkpoints de respuesta al daño al DNA y son reparados por las vías NHEJ y HRR (Kim et al., 2005). BRCA1 y FANCD1/BRCA2 contribuyen a reparar y/o tolerar el daño en el DNA promoviendo el ensamblaje de RAD51 y a su vez están involucrados en la reparación por HRR (Bhattacharyya et al., 2000). FANCD1/BRCA2 se requiere para el ensamblaje de RAD51 y la reparación por HRR in vivo (Yuan et al., 1999).
USP1	((FANCD1N AND FANCD2I) OR PCNATLS) AND NOT FANCM	De acuerdo con nuestros resultados, la activación de USP1 no puede ocurrir a menos que se encuentren activos los complejos FANCD2/FANCD1 y FANCD1/FANCD2, además USP1 no se activará a menos que la proteína FANCM se inactive. USP1 desubiquitina a PCNA, como un mecanismo para evitar la activación inoportuna de las polimerasas de TLS (Huang y D'Andrea, 2006).
KU	DSB AND NOT (MRN OR FANCD2I OR CHKREC)	La primera proteína de la vía NHEJ en unirse al DNA es el heterodímero KU70/KU80 (Kass y Jassin, 2010). Las proteínas KU son bloqueadas por la acción de FANCD2I durante la reparación de un DSB generado a partir de un ICL (Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010). De acuerdo con nuestros resultados MRN puede tener una acción similar sobre KU durante la reparación de los DSBs.
DNAPK	(DSB AND KU) AND NOT CHKREC	KU no forma complejos estables con la proteína DNA-PKcs en ausencia de rupturas de doble hebra (Lieber, 2010; Yaneva et al., 1997).
NHEJ	(DSB AND DNAPK AND XPF AND NOT ((FANCD1N AND FANCD2I) OR CHKREC)) OR ((DSB AND DNAPK AND KU) AND NOT (ATM AND ATR))	La NHEJ ha evolucionado para reparar directamente las DSBs. KU, DNA-PKcs y Artemis son componentes clave de la vía NHEJ (Lieber, 2010). Nuestros resultados sugieren que FANCD1/BRCA1, ssDNARPA y CHKREC o las cinasas ATR y ATM pueden bloquear la reparación por la vía NHEJ, directa o indirectamente.
ATR	(ssDNARPA OR FANCM OR ATM) AND NOT CHKREC	Aunque ssDNARPA puede ser suficiente para localizar al complejo ATR-ATRIP en el DNA, no es suficiente para la activación de ATR. (Cimprich y Cortez, 2008). FANCM y FAAP24 funcionan en la señalización mediada por ATR de modo independiente del complejo FAcore (Collis et al., 2008). La activación de ATR está regulada por ATM en un modo dependiente del ciclo celular, específicamente durante las fases S y G2 (Jazayeri et al., 2006).
ATM	(ATR OR DSB) AND NOT CHKREC	La fosforilación de ATM en la Ser1981, un sitio de autofosforilación, es dependiente de ATR en presencia de horquillas de replicación arrestadas o tratamiento con luz UV (Stiff et al., 2006). La activación de ATM involucra la relajación de la cromatina como consecuencia de la generación de DSBs (Lavin, 2008).
p53	(((ATM AND CHK2) OR (ATR AND CHK1)) OR DNAPK) AND NOT CHKREC	ATM, ATR, DNAPKcs, CHK1 y CHK2 comparten sitios de fosforilación en p53 (Cimprich y Cortez, 2008; Kim et al., 1999; Lee et al., 2007; Shieh et al., 2000; Tibbetts et al., 1999;).
CHK1	(ATM OR ATR OR DNAPK) AND NOT CHKREC	ATM, ATR o DNAPKcs pueden fosforilar y activar a la cinasa CHK1 (Bartek y Lukas, 2007; Kim et al., 1999; Liu et al., 2000; Pichierri y Rosselli, 2004; Traven y Heierhorst, 2005).
CHK2	(ATM OR ATR OR DNAPK) AND NOT CHKREC	ATM, ATR o DNAPKcs pueden fosforilar y activar a la cinasa CHK2 (Carlessi et al., 2010; Traven y Heierhorst, 2005).
H2AX	DSB AND (ATM OR ATR OR DNAPK) AND NOT CHKREC	Uno de los primeros eventos en la respuesta celular a los DSBs es la fosforilación de la Histona H2AX en la Serina139 (Rogakou et al., 1998). ATM, ATR o DNAPKcs pueden fosforilar a la histona H2AX histone (Lavin, 2008; Stiff, 2006; Ward y Chen; 2001). La proteína PP6 puede desfosforilar a la histona H2AX (Douglas et al., 2010).

TABLA 2. CONTINUACIÓN.

NODO	REGLA LÓGICA QUE ENCIENDE EL NODO	JUSTIFICACIÓN/REFERENCIA
CHKREC	((PCNATLS OR NHEJ OR HRR) AND NOT DSB) OR ((NOT ADD) AND (NOT ICL) AND (NOT DSB) AND NOT CHKREC)	Cuyo el ADD, DSB o ICL ha sido reparado las proteínas del Checkpoint Recovery (CHKREC) se activan y apagan a las proteínas de los Checkpoints (Chang y Cimprich, 2009; Lieber, 2010). La cinasa promitótica PLK1, inicia el "Checkpoint recovery" al fosforilar a las proteínas del Checkpoint: Claspin y WEE1, con esto las proteínas serán degradadas por el complejo SCF ^{TrCP} (Bassermann y Pagano, 2009).

IV.2 La red FA/BRCA

En la figura 5 se observa la conectividad de la red FA/BRCA obtenida de acuerdo con las reglas lógicas desarrolladas en este trabajo.

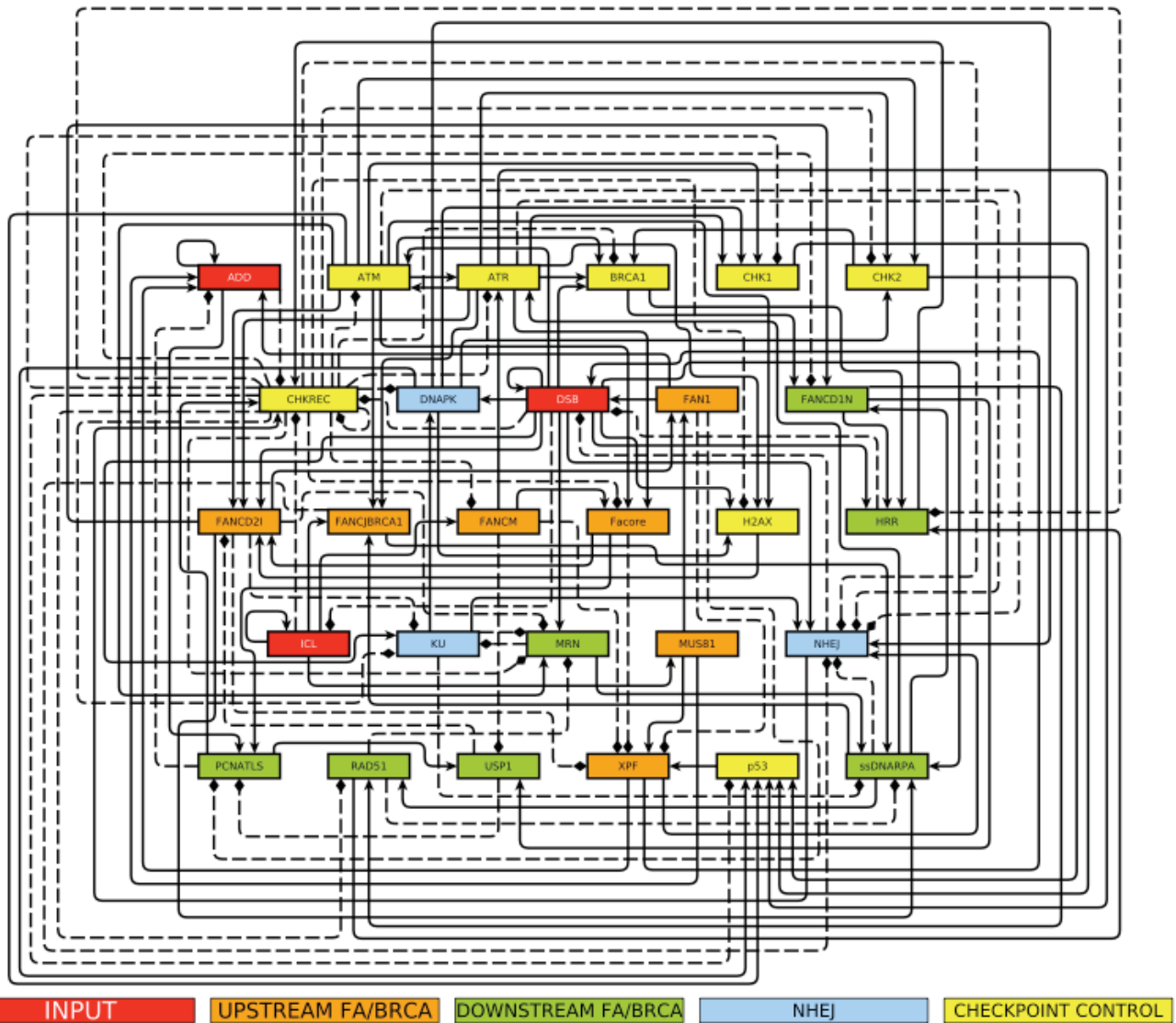


Figura 5. Red de interacciones propuesta para la vía FA/BRCA. La línea continua indica una interacción de activación y la línea punteada indica una interacción de inhibición.

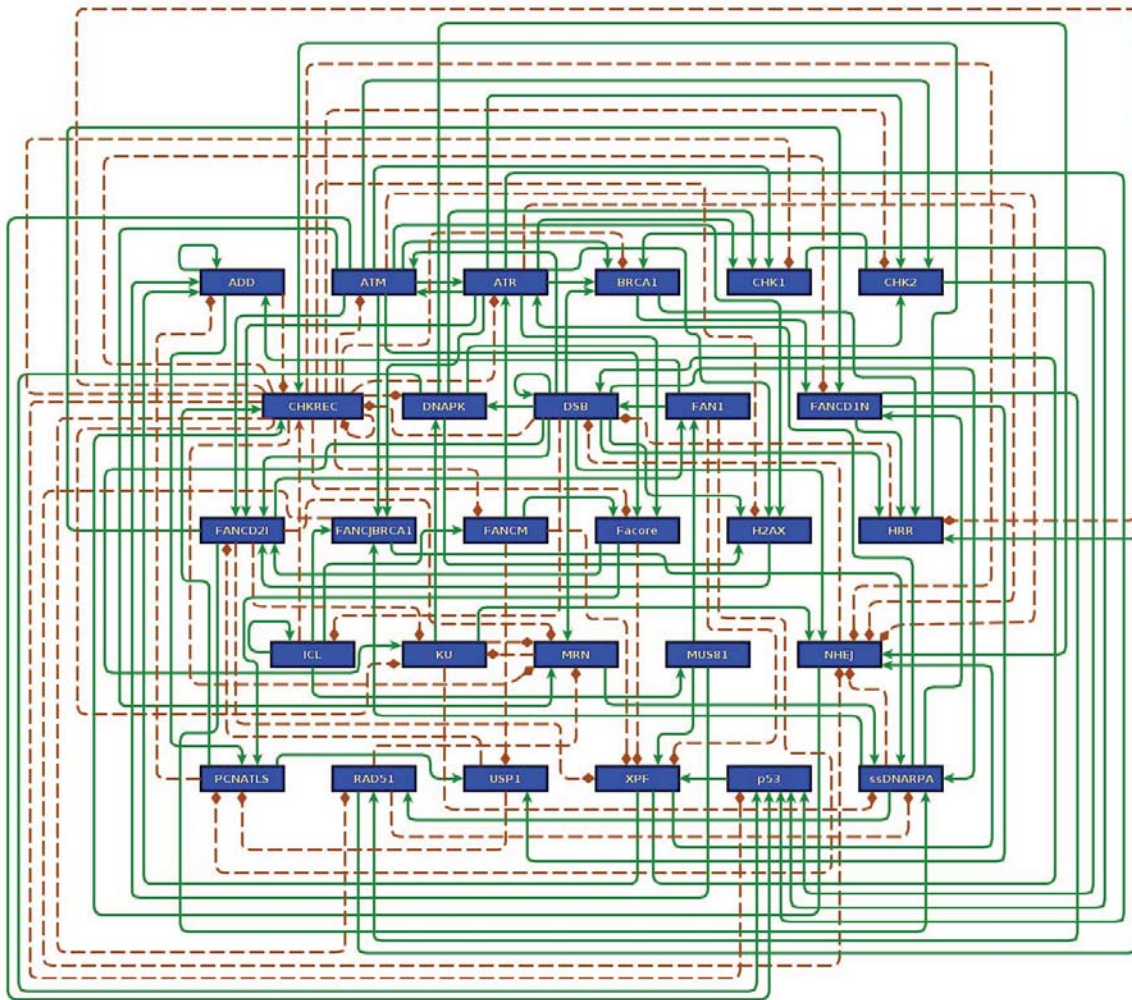


Figure 6. Regulación de la red FA/BRCA. La red inferida en este trabajo está compuesta por 28 nodos y 122 interacciones. Las líneas verdes indican interacciones de activación. Las líneas rojas indican interacciones de inhibición.

Las interacciones regulatorias inferidas durante el proceso de modelado pueden dividirse en cuatro grupos:

1. Regulación positiva de XPF sobre DSB, para asegurar la generación de DSBs durante el proceso de reparación del ICL por la actividad de endonucleasas de DNA alternativas incluso en células deficientes en la vía FA/BRCA (Figura 7).
2. Regulación negativa de FANCD2I, KU, RAD51 y CHKREC sobre MRN, de tal modo que la actividad endonucleasa de MRN actúa en el proceso de reparación de los ICLs sólo en ausencia de las vías FA/BRCA y NHEJ (Figura 8).
3. Regulación positiva de FANCD1N y regulación negativa de FANCM sobre USP1, para indicar que la enzima desubiquitinadora USP1 está directa o indirectamente regulada por la presencia de FANCD1/BRCA2, FANCN y FANCM. (Figura 9).
4. CHKREC regula negativamente los nodos: MRN, BRCA, FANCD1N, RAD51, HRR, DNAPK, NHEJ, ATR, p53 y CHKREC. (Figura 10).

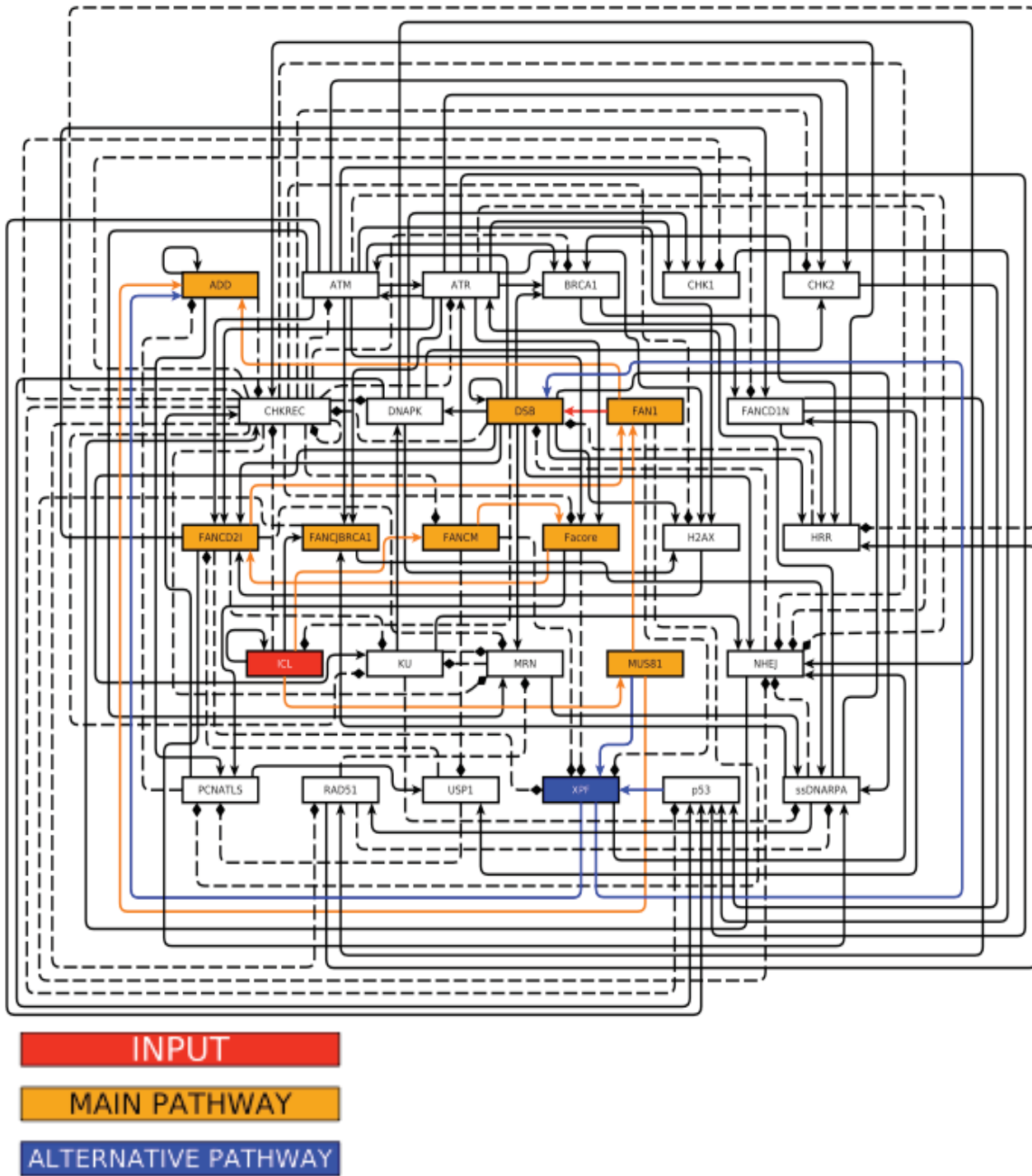


Figura 7. GRUPO 1 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO. XPF podría generar DSBs en ausencia de las endonucleasas de la vía FA/BRCA.

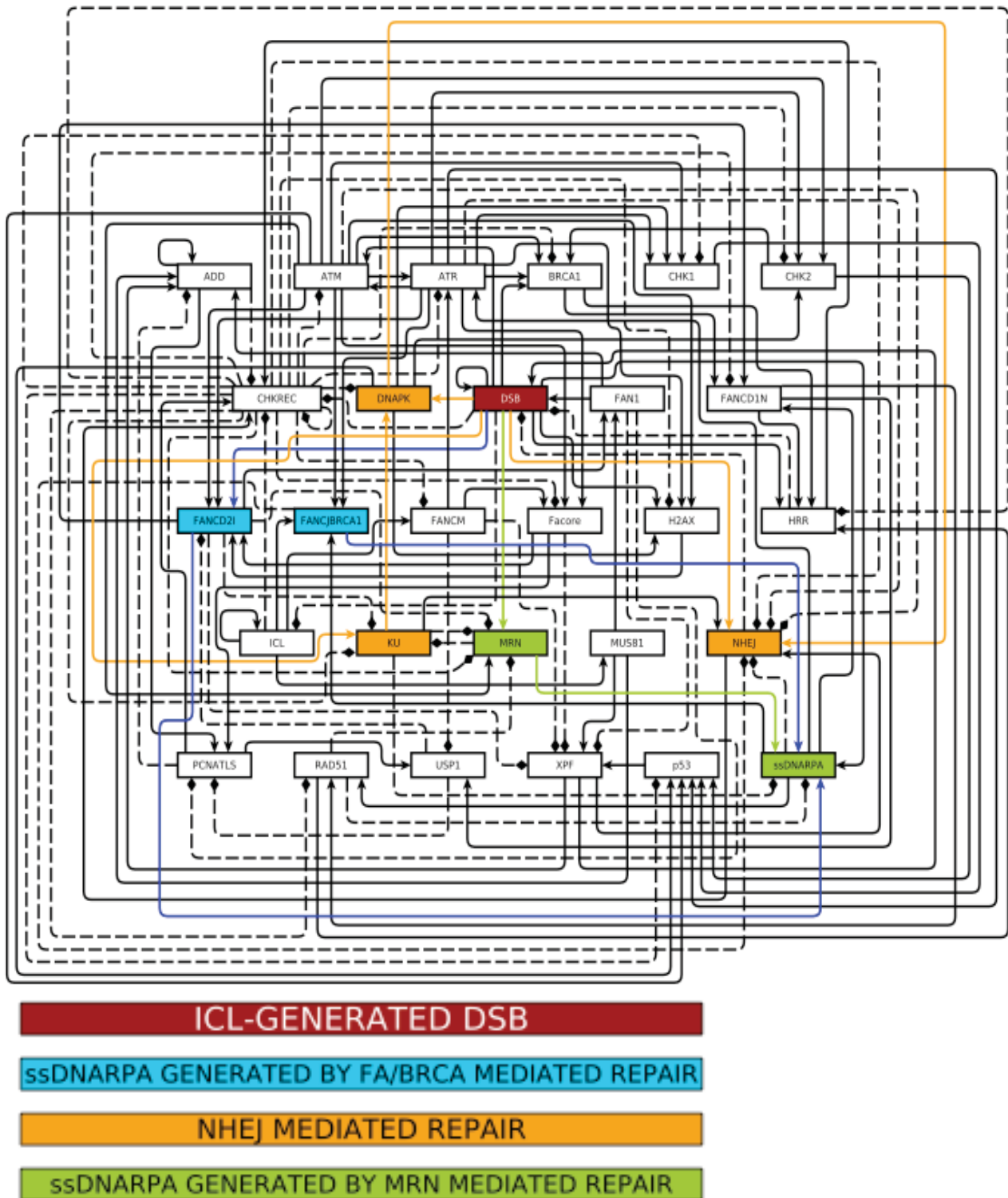
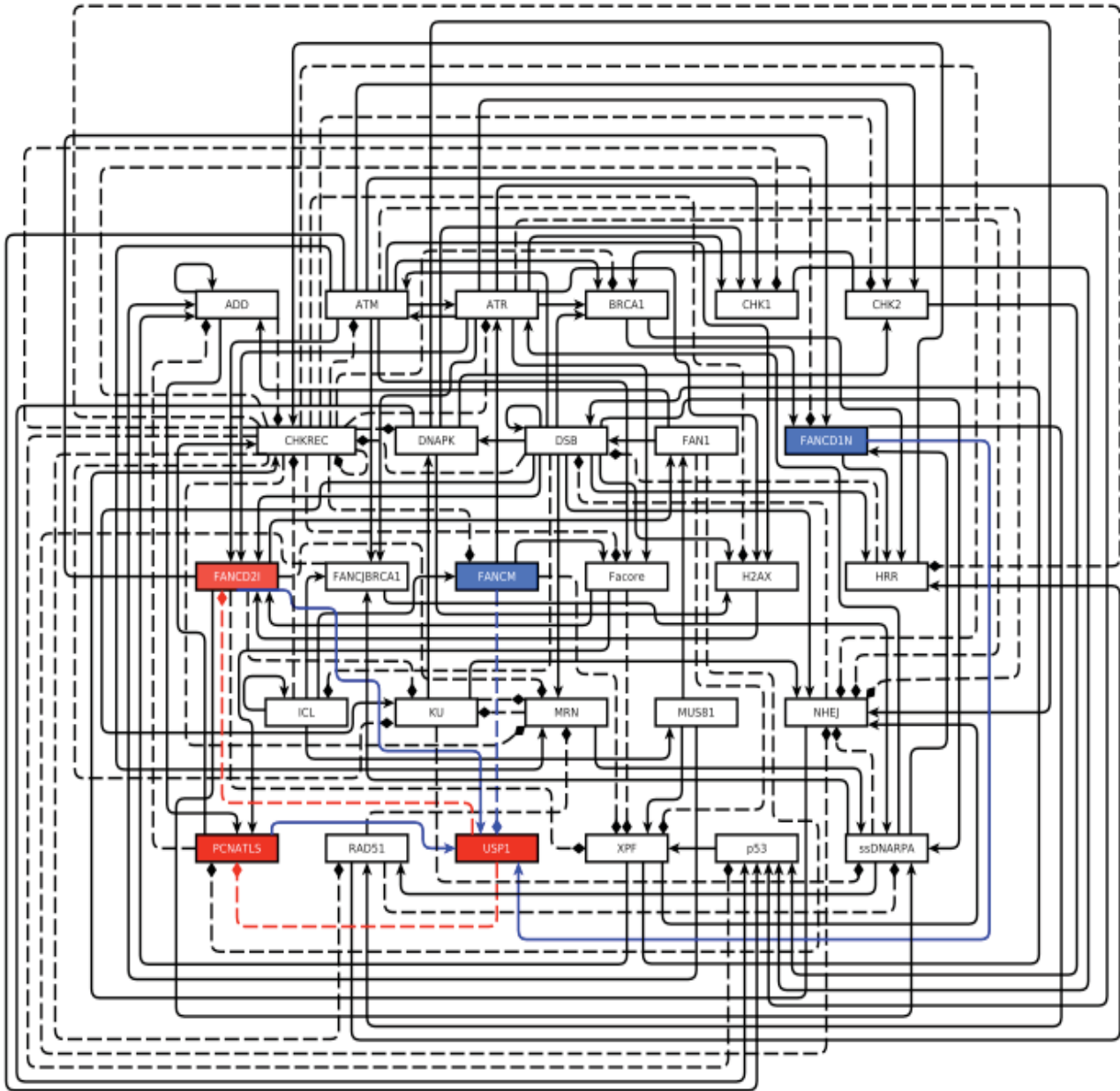


Figura 8. GRUPO 2 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO. MRN podría actuar cuando las vías FA/BRCA y NHEJ no funcionan apropiadamente.



REGULATION BY USP1

REGULATION OVER USP1

Figura 9. GRUPO 3 DE INTERACCIONES REGULATORIAS INFERIDAS EN EL MODELO. USP1 se regula positivamente por FANCD1N y negativamente por FANCM.

IV.3 Dinámica del modelo de red de la vía FA/BRCA para un pulso de daño

Usando el programa BoolNet (Mussel et al, 2010) se simuló el comportamiento dinámico de la red FA/BRCA silvestre para tres diferentes tipos de daño. La figura 11A muestra los resultados para un ICL, 11B para un DSB y 11C para un ADD. El tiempo se muestra en unidades arbitrarias en la columna de la izquierda. El atractor alcanzado tiene un periodo de dos y se indica en gris a la izquierda. Los nodos se agruparon en categorías funcionales de acuerdo con un código de color, esta categoría también se indica en la columna superior.

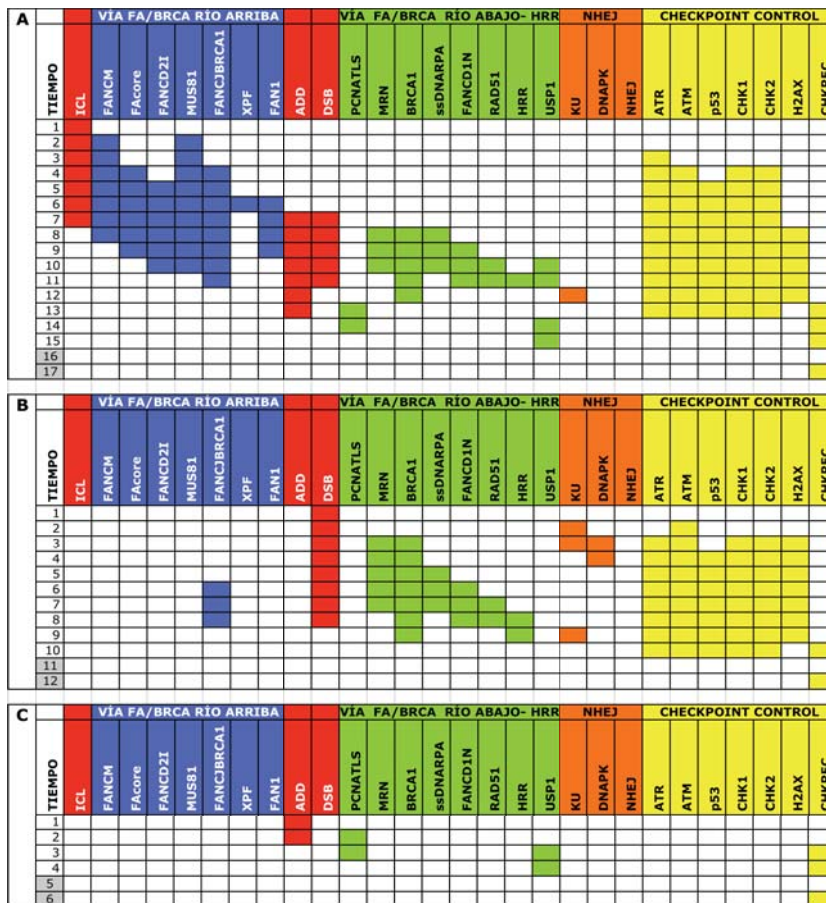


Figura 11. Simulaciones con el MB para la reparación de: A) un enlace covalente cruzado; B) una ruptura de doble hebra; C) un aducto en el DNA.

En 11A debe notarse que la reparación de un ICL requiere de dos intermediarios de reparación, el DSB y el ADD. En todos los casos el atractor alcanzado se ha denominado “Atractor de Progresión del Ciclo Celular (CCP)” y se caracteriza por el apagado de los componentes del control del *Checkpoint* y el encendido cíclico del nodo del CHKREC o *Checkpoint Recovery*, lo cual indica que el daño al DNA ha sido reparado y la célula puede continuar con el ciclo celular.

En la figura 11A la simulación reproduce la reparación de un ICL mediada por la vía FA/BRCA tal y como se conoce hasta el momento. El primer paso incluye la activación de las proteínas río arriba de la vía FA/BRCA y el procesamiento inicial del ICL por medio de endonucleasas de DNA. Enseguida se generan una DSB y un ADD, que serán reparados por la vía FA/BRCA río abajo, la DSB mediante la recombinación homóloga; y el ADD por medio de la Síntesis Translesión y el sistema NER (De Winter and Joenje, 2009, Kee y D’Andrea, 2010). Durante todo el proceso de reparación los nodos de Control de *Checkpoint* se mantienen encendidos, y no se apagan sino hasta que el nodo CHKREC se ha encendido, este nodo se enciende cuando el daño al DNA ha sido reparado, y agrupa proteínas como WIP1, PP2A y PP6, cuya principal función es desfosforilar a las proteínas CHK1, CHK2, ATM, ATR, DNAPKcs y la histona γ H2AX (Fiscella et al., 1997, Douglas et al., 2010, Carlessi et al., 2010).

En la figura 11B, la generación de un DSB activa tanto a la HRR como a la NHEJ, sin embargo el proceso de reparación está mediado por la HRR. Durante el proceso de reparación el Checkpoint se mantiene encendido hasta que el nodo del DSB se apaga.

En la figura 11C se observa que el ADD se repara por PCNATLS, que a su vez es apagado por el nodo USP1.

IV.4. Dinámica del modelo de red de la vía FA/BRCA mutante en FAcore para un pulso de daño

En la figura 12A se observa la simulación de las condiciones silvestres para un pulso de daño. En 12B se observa la simulación hecha para la mutante nula de FAcore, que incluye a la proteína FANCA.

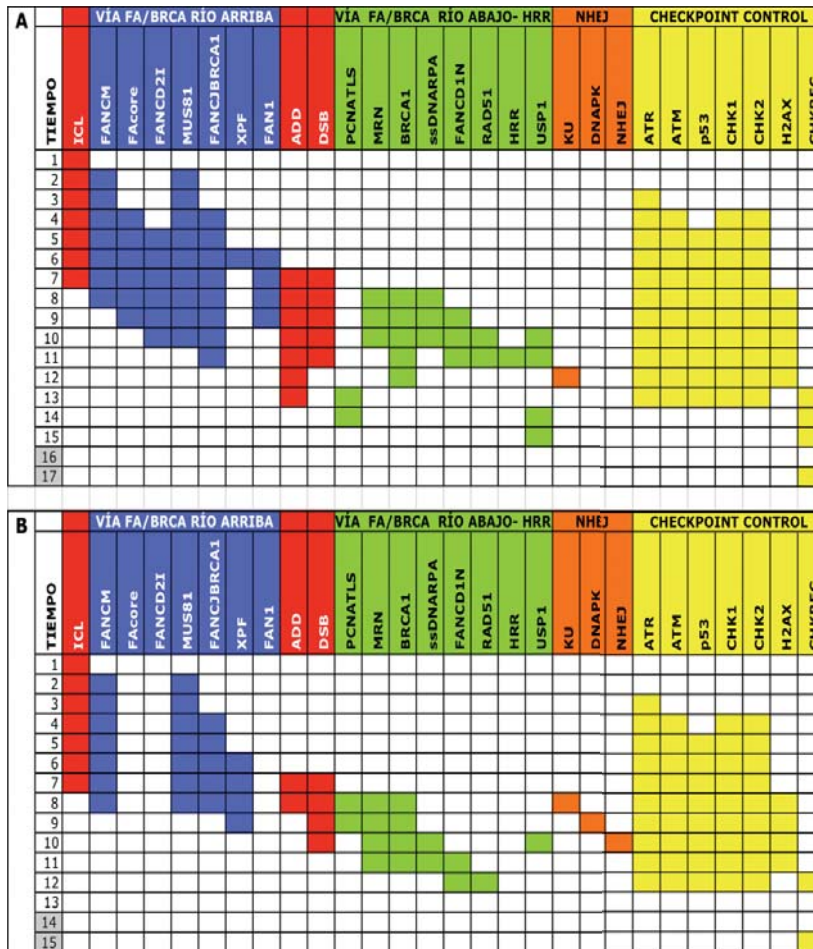


Figura 12. Simulaciones con el MB para la generación basal (pulso único) de enlaces covalentes cruzados en A) condiciones silvestres y B) la mutante nula de FAcore.

En 12B la ausencia de FANCA condiciona que ciertas proteínas importantes río abajo no sean activadas, tales como FANCD2I y FAN1; debido a ello la simulación muestra la activación de vías alternas de reparación para poder llegar finalmente al atractor CCP. Dichas vías alternas incluyen la activación de XPF y la NHEJ, la

primera como endonucleasa generadora de DSBs y la segunda como vía reparadora de DSBs.

Hay que recordar que en la reparación de un ICL es indispensable la generación de una DSB como intermediario de la reparación del DNA (Hanada et al., 2006, Bhagwat et al., 2009, MacKay et al., 2010, Smogorzewska et al., 2010). Las células AF no son deficientes en el procesamiento inicial de los ICLs (Rothfuss y Grompe, 2004), y por lo tanto son capaces de generar las DSBs necesarias para reparar los ICLs. Sin embargo, la reparación de dicho intermediario podría no llevarse a cabo apropiadamente debido a las deficiencias de las células AF y a la actividad constitutiva de las proteínas mediadoras de la NHEJ como primera línea de reparación de DSBs generadas a partir de un ICL. En 12B podemos observar que efectivamente, la NHEJ se activa preferencialmente como vía reparadora de los ICLs generados de modo basal en las células AF.

IV.5 Dinámica del modelo de red de la vía FA/BRCA para daño constante

En la figura 13 se observa una simulación de daño continuo en el DNA, en la cual se dejó encendido constantemente el nodo correspondiente al ICL. En 13A se observa la respuesta de la red silvestre y en 13B la respuesta de la red mutante para FAcure.

En la simulación de la figura 13A la red silvestre tolera el daño al DNA recurriendo principalmente a la vía FA/BRCA y a pesar de que activa a los nodos de KU y DNA-PK, la reparación por NHEJ no se concreta debido a que FA/BRCA bloquea esta opción de reparación. También se observa que los nodos del *Checkpoint* se mantienen encendidos mientras el daño esté presente, sin embargo, se observa un pequeño lapso de apagado de los componentes del *Checkpoint*.

Finalmente, y debido a que el daño se está generando constantemente, la simulación llega al atractor de arresto del ciclo celular (CCA) y no sale de él, sino hasta que el daño en el DNA ha sido reparado.

Por otra parte, en la figura 13B se observa que la red mutante de FAcore con simulación de daño continuo recurre a dos opciones de reparación, tanto la vía NHEJ y la vía de HRR, sin embargo al final también llega a un atractor de tipo CCA, que representa que el sistema se ha detenido debido a la generación y acumulación de daño no reparado.

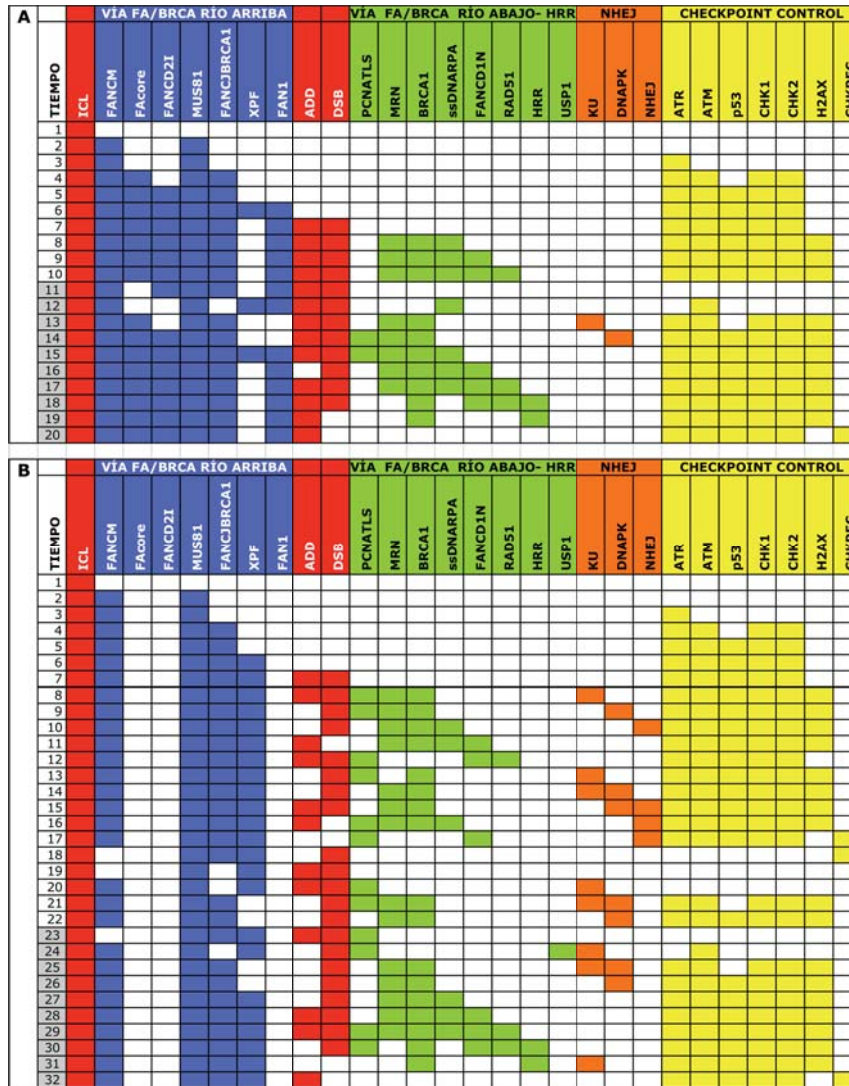


Figura 13. Simulaciones con el MB para un estímulo constante de enlaces covalentes cruzados en A) condiciones silvestres y B) la mutante nula de FAcore.

Se realizaron las simulaciones de todas las mutantes nulas y mutantes con ganancia de función de cada uno de los nodos de la red, los atractores de cada

una de ellas pueden verse en la Información Suplementaria del artículo en la sección de anexos.

Las simulaciones in silico con el modelo de red Booleana de la vía FA/BRCA nos proponen que en ausencia de una vía FA/BRCA funcional, las células AF-A:

1. No son totalmente deficientes en la reparación de los DSBs y podrían activar procesos alternos de reparación recurriendo a la acción combinada de las vías de NHEJ y HRR.
2. Podrían activar el proceso conocido como *Checkpoint Recovery*, el cual inactiva a las proteínas del Checkpoint de la integridad del DNA, a pesar de la presencia de DSBs sin reparar, permitiendo así la progresión del ciclo celular.
3. Recurrirían a endonucleasas alternas de reparación para generar rupturas de doble hebra en el DNA.

IV. 6 Resultados Experimentales

Dos de las principales propuestas en las simulaciones con el MB son:

1) las células con mutaciones en alguno de los elementos del complejo FAcCore utilizan a la NHEJ como una vía de reparación alterna a la vía FA/BRCA y de este modo toleran el daño generado en su DNA por los ICLs (Figuras 12B y 13B).

2) las células con mutaciones en FAcCore son capaces de activar el proceso conocido como Checkpoint Recovery a pesar de tener cromosomas con rupturas sin reparar.

Se recurrió a algunas estrategias experimentales para corroborar si efectivamente estos procesos ocurren en las células correspondientes al subgrupo AF-A de Anemia de Fanconi VU-817, expuestas a MMC, lo cual se representó en el modelo como la presencia de ICL.

IV.6.1 Activación de la cinasa DNA-PKcs en las líneas celulares VU-817 y NL49 en presencia de MMC.

La proteína DNA-PKcs pertenece a la familia de cinasas PIKK y es considerada la reguladora maestra de la vía de NHEJ (Lieber, 2010), por lo tanto conocer su estatus de activación es crucial para comprender los procesos alternos de reparación de daño al DNA llevados a cabo por las células AF. Las simulaciones con el MB muestran que las células AF-A activan a la cinasa DNA-PKcs en condiciones basales y que esta activación aumenta en presencia de ICLs (Figuras 12 y 13).

Para corroborar estas predicciones, se evaluó por citometría de flujo la presencia de la proteína DNA-PKcs fosforilada en las líneas celulares VU-817 y NL-49 tratadas con MMC (Figura 14).

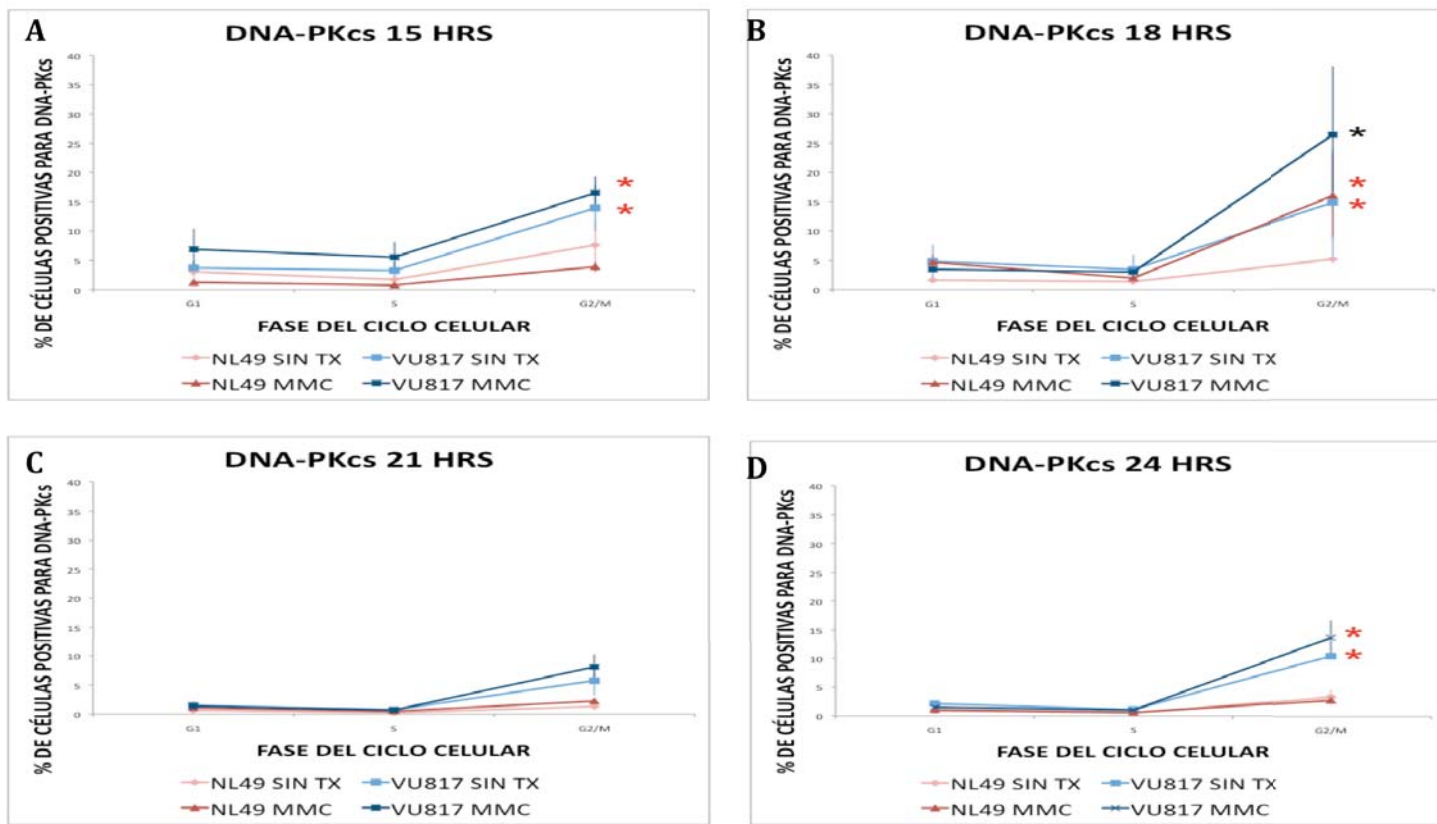


Figura 14. LAS CÉLULAS AF-A TIENEN UNA FOSFORILACIÓN ELEVADA DE LA CINASA DNA-PKcs EN CONDICIONES BASALES Y AL SER TRATADAS CON MMC. Se evaluó la activación de la cinasa DNA-PKcs en las diferentes fases del ciclo celular. Las diferencias se observan en la fase G2/M.

*= Indica el tiempo con significancia estadística al ser comparado con todos los tiempos.

*= Indica los tiempos con significancia estadística al ser comparados con todos los tiempos, sin embargo no muestran significancia estadística al ser comparados entre sí. $p < 0.05$.

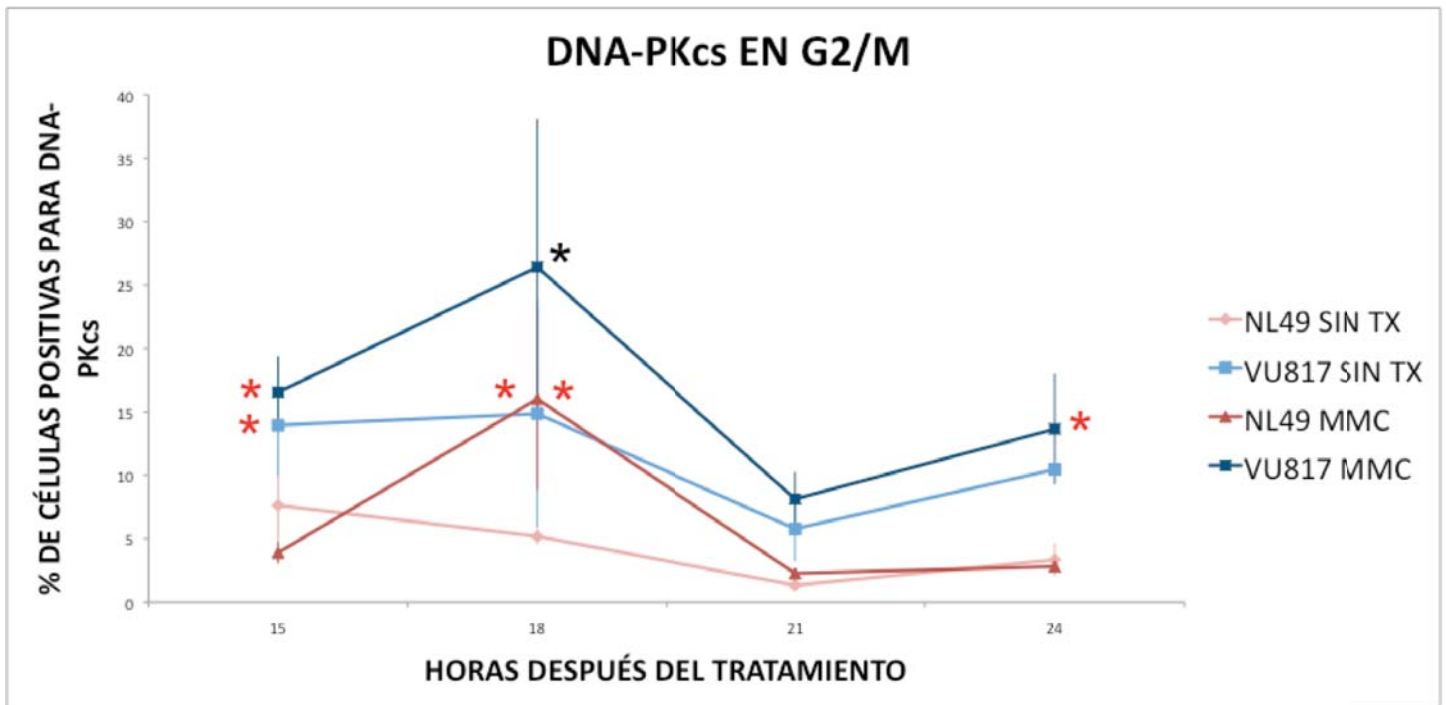


Figura 15. LA MÁXIMA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA DNA-PKcs OCURRE EN LA FASE G2/M DEL CICLO CELULAR Y A LAS 18 HORAS DE INICIADO EL TRATAMIENTO CON MMC.

*= Indica el tiempo con significancia estadística al ser comparado con todos los tiempos.

*= Indica los tiempos con significancia estadística al ser comparados con todos los tiempos, sin embargo no muestran significancia estadística al ser comparados entre sí. $p < 0.05$.

En las figuras 14A-14D se observa que en condiciones basales las células AF-A tienen más proteína DNA-PKcs fosforilada que las células NL-49 y que la activación de esta cinasa aumenta ante el tratamiento con MMC, sobre todo a las 18 horas después del tratamiento. En condiciones basales las células NL-49 tienen niveles bajos de activación de DNA-PKcs y sólo con el tratamiento de MMC alcanzan niveles de activación similares a los niveles basales de la línea VU-817 (ver Figura 14B y Figura 15).

IV.6.2 Funcionamiento de los CHECKPOINTS que detienen la progresión del ciclo celular en las líneas celulares VU-817 Y NL-49.

En las simulaciones se observa que la activación de los *Checkpoints* celulares no está afectada en las células mutantes en el FAcCore, e incluso las proteínas que integran dicho punto de control, tales como CHK1, podrían alcanzar niveles altos de activación en presencia de ICLs, teniendo como consecuencia la acumulación celular en la fase G2/M (Figuras 12 y 13).

Para validar este punto, se evaluó la acumulación de las células VU817 y NL- 49 en las fases S y G2/M del ciclo celular, así como la activación de la proteína cinasa CHK1 en las diferentes condiciones de tratamiento. CHK1 es una proteína que se encuentra río abajo de las cinasas de la familia de PIKK: ATM, ATR y DNA-PKcs; y río arriba de las proteínas involucradas en la decisión de destino celular: p53 y p21, por lo que su activación es importante en el control de la progresión del ciclo celular como miembro del *Checkpoint* de G2/M (Cimprich y Cortes, 2008; Shieh et al., 2000).

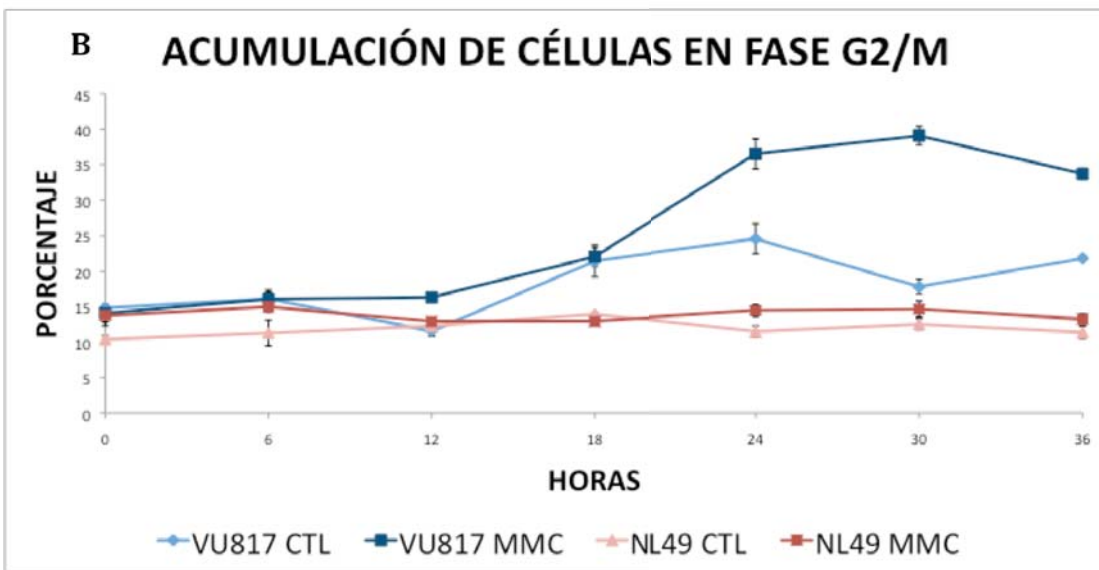
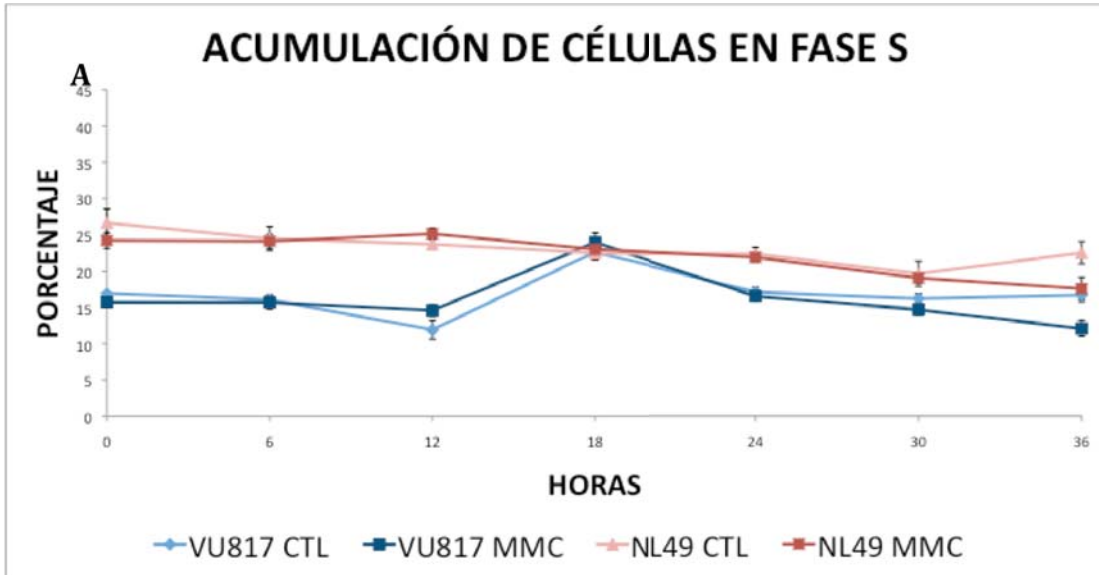


Figura 16. LA ACUMULACIÓN DE LAS CÉLULAS AF-A EN LA FASE G2/M SE VUELVE MÁS EVIDENTE ANTE EL TRATAMIENTO CON MMC. A. Acumulación de Células en fase S. B. Acumulación de células en G2.

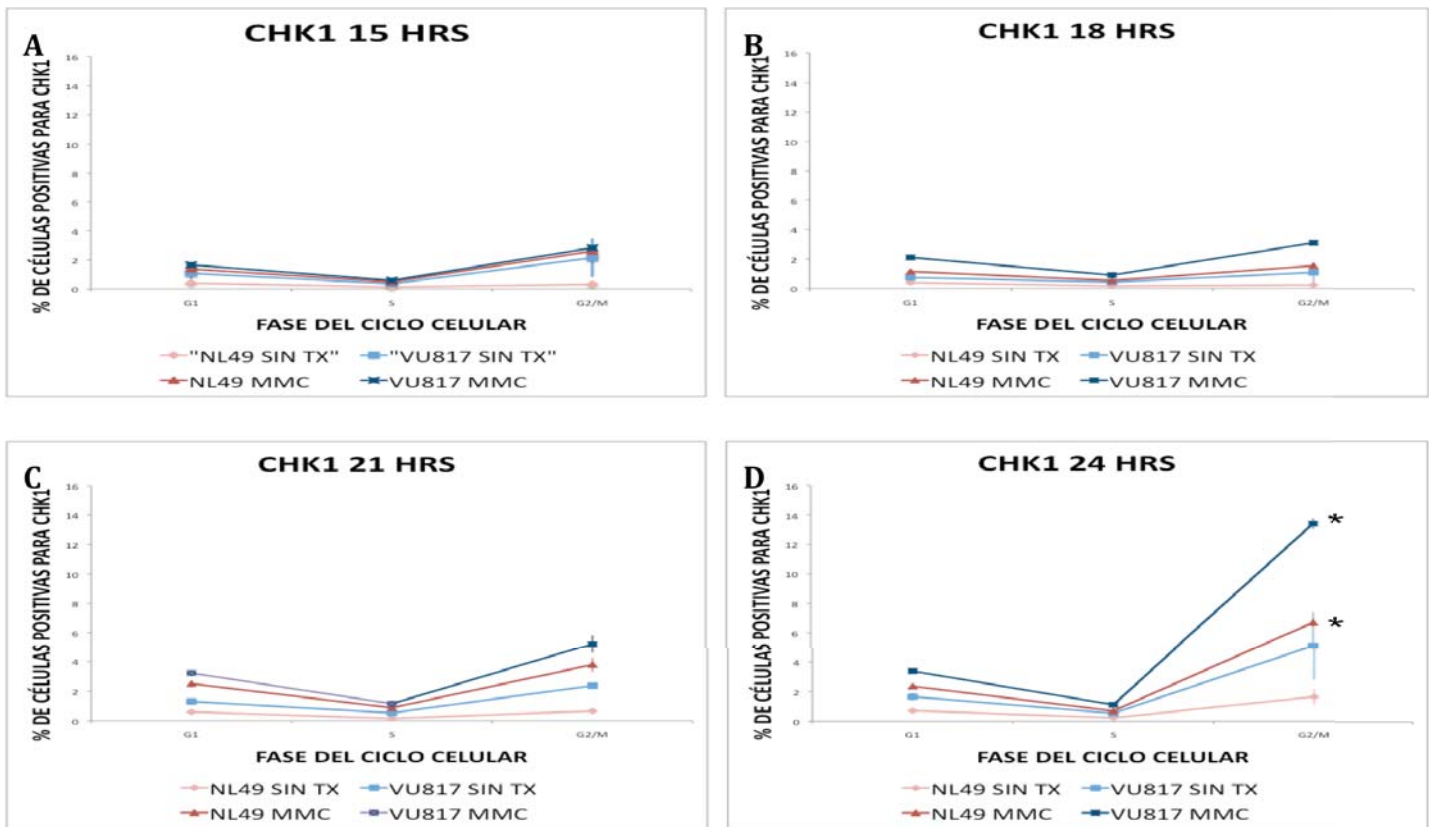


Figura 17. LA CINASA SEÑALIZADORA DE DAÑO CHK1 SE ACTIVA EN LAS CÉLULAS AF-A INDICANDO QUE EL CHECKPOINT DE G2/M SE ACTIVA APROPIADAMENTE. En D se observa que la activación de CHK1 es más evidente en la fase G2/M .

*= Indica el tiempo con significancia estadística al ser comparado con todos los tiempos. $p < 0.05$.

En la figura 16A se observa que no existen diferencias en la acumulación de células en la fase S del ciclo celular. En la figura 16B se observa la acumulación característica de las células AF-A en fase G2/M, la cual es mucho más evidente con el tratamiento de MMC y que correlaciona con el aumento significativo de los niveles de la cinasa CHK1 fosforilada (ver Figura 17D), la cual antes de este punto no mostró cambios en su activación(Figura 17A-C).

IV.6.3 Evaluación de entrada y salida de mitosis en las líneas celulares VU-817 Y NL-49 en presencia de MMC

De acuerdo con las simulaciones del MB las células mutantes en FAcCore son capaces de liberarse del arresto celular activando el proceso conocido como *Checkpoint Recovery* (Figuras 12 y 13). Por lo tanto para corroborar esta predicción, las células VU-817 deberían ser capaces de dividirse a pesar del daño en su DNA.

Para demostrar diferencias en la dinámica de división de los cultivos experimentales establecidos en este proyecto se evaluaron el número de células que entran a mitosis y el número de células que salen de ella. Para saber cuantas células entran en mitosis se obtuvo el porcentaje de células en mitosis cada seis horas durante el tiempo de tratamiento con MMC. Las células en mitosis se identificaron usando el anticuerpo anti-MPM2, que identifica el epítipo fosforilado por el complejo MPF en las proteínas que regulan el proceso mitótico. Por lo tanto las células positivas para dicho marcador pueden considerarse células en mitosis (ver Figura 18).

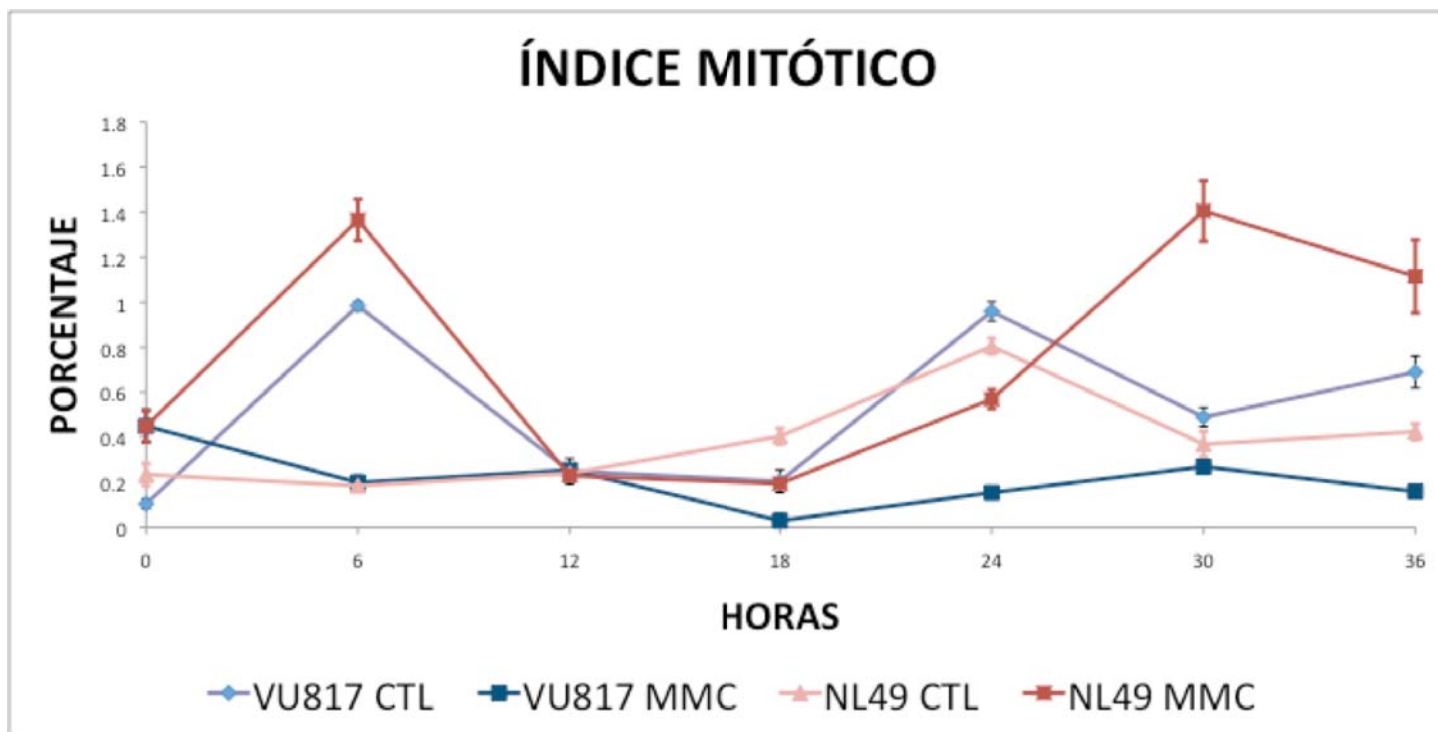


Figura 18. PORCENTAJE DE CÉLULAS EN MITOSIS EN LAS LÍNEAS VU-817 Y NL-49 ANTE EL TRATAMIENTO CON MMC.

En la figura 18 se observa que el número de células VU-817 en mitosis es siempre menor que el número de células NL-49 en mitosis y que además disminuye en presencia de MMC.

Para determinar el número de células que salen de mitosis y llegan a una nueva fase G1 se utilizó el ensayo de bloqueo de la citocinesis con Citocalasina B; este agente impide la citocinesis al unirse al anillo contráctil de actina del surco de división celular durante la mitosis y genera células mononucleadas y binucleadas si continuaron al primer ciclo celular y tetranucleadas si continuaron hasta el segundo ciclo celular. En este experimento se expuso a las células a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ de Citocalasina B durante 24 horas y se contó el número de células mononucleadas, binucleadas y tetranucleadas en un total de 500 células para obtener la dinámica de división de los cultivos.

Se observó que en condiciones sin tratamiento y tratamiento con MMC durante las primeras 24 h no hay diferencias significativas entre las células AF y las células normales, cuando se compara el número de células mononucleadas, binucleadas o tetranucleadas.

Posteriormente los cultivos se lavaron para retirar la MMC y se reincubaron por 24 horas adicionales. En este momento de cosecha se observaron diferencias significativas en la dinámica de división de la línea AF-A VU817, es decir se encontró un número menor de células mononucleadas y un mayor número de células binucleadas y tetranucleadas en comparación con el resto de los tratamientos. Esto sugiere que como se predijo por el MB, las células AF-A encendieron el *Checkpoint recovery* del ciclo celular y continuaron dividiéndose a pesar del daño generado en su DNA por la MMC (ver Figura 19).

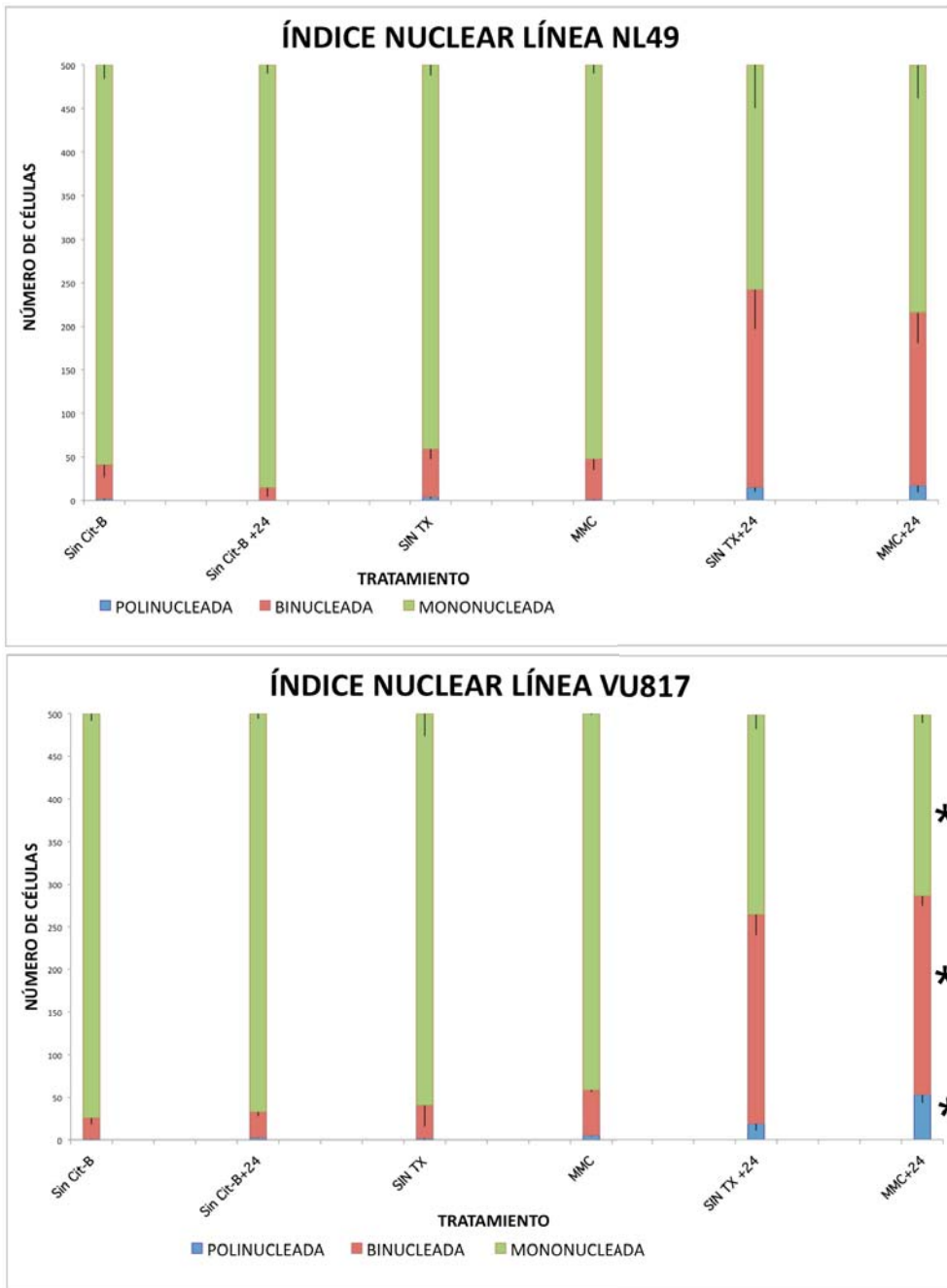


Figura 19. LA PRESENCIA DE CÉLULAS BINUCLEADAS Y TETRANUCLEADAS EN LAS CÉLULAS AF-A INDICA LA ACTIVACIÓN DEL *CHECKPOINT RECOVERY* A PESAR DEL DAÑO AL DNA. Número de células mononucleadas , binucleadas y tetranucleadas en la línea celular NL49 (A) y VU817 (B) ante el tratamiento con MMC.

*= Indica cambios con significancia estadística. $p < 0.05$

V. DISCUSIÓN

La anemia de Fanconi es un síndrome de inestabilidad genómica que ha llamado la atención científica internacional como un excelente modelo celular para estudiar y comprender los mecanismos de reparación que posee la célula humana ante el daño al DNA generado por los ICLs. Los estudios hechos en esta enfermedad han permitido delinear una vía de reparación que esta tomando gran relevancia como punto de convergencia de otras vías de reparación ya bien caracterizadas como la HRR, la síntesis translesión y la vía de NER. La vía FA/BRCA coordina varios de estos sistemas de reparación y a su vez colabora en vigilar y controlar la progresión a lo largo del ciclo celular. La investigación mundial de los últimos diez años ha sido clave para definir los componentes de la vía FA/BRCA. Sin embargo, aún hay huecos por llenar para comprender el funcionamiento de esta vía esencial en los procesos de reparación del daño al DNA y en el desarrollo del sistema hematopoyético.

Debido a las deficiencias severas en la reparación del daño en el DNA, una gran proporción de células AF mueren en cultivo cuando son expuestas a agentes inductores de ICLs, tales como la MMC o el DEB. Sin embargo, algunas de ellas sobreviven con una gran cantidad de lesiones en el DNA no reparadas, que se evidencian en los cromosomas de metafase como un incremento de las rupturas cromatídicas, incremento de figuras radiales que representan la reparación ilegítima del daño (Auerbach, 2009) (ver Figura 1) y una tasa no incrementada de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs), que representan la reparación homóloga que no es propensa a error (Latt et al., 1975).

Todo lo anterior indica que las células AF pueden recurrir a vías alternas de reparación de daño al DNA, las cuales sin embargo, son propensas a error. Debido a lo anterior se decidió desarrollar un modelo de red Booleana de la vía FA/BRCA, que incorporara las interacciones conocidas de las proteínas AF con otras vías que participan en la preservación del genoma, para de este modo predecir proteínas o vías candidatas que medien la sobrevivencia de las células AF cuando son sometidas a estrés genotóxico.

V.1 La red regulatoria de la vía FA/BRCA

La red regulatoria obtenida de la vía FA/BRCA (Figura 5) y las 28 reglas lógicas asociadas a ella (Tabla 2) integran la mayor parte del conocimiento experimental comprobado acerca de la vía FA/BRCA y sus interacciones con otros genes o proteínas involucrados en la reparación y tolerancia de daño genotóxico. Estas ecuaciones describen un sistema dinámico discreto y determinístico con un total de $2^{28} = 268,435,456$ posibles estados de activación que fue analizado exhaustivamente para obtener los atractores del sistema, particularmente cuando se inicia la simulación en presencia de uno de los siguientes tres tipos de daño: ICLs, DSBs o ADDs, bajo condiciones silvestres y mutantes nulas o de sobre-expresión de cada uno de los componentes de la red.

Para que el modelo recuperara las principales características de la vía FA/BRCA, tal y como se conoce hasta el momento, se tuvieron que incluir algunas interacciones inferidas, aún no reportadas en la literatura científica internacional. Estas interacciones constituyen predicciones que requieren investigación adicional para ser validadas y se discuten brevemente a continuación.

V.1.1 La generación de DSBs durante la reparación de un ICL se asegura mediante la actividad de endonucleasas alternas a la vía FA/BRCA

Rothfuss y Grompe (2004) reportaron que los cultivos primarios de células AF-C no son deficientes en la generación de los DSBs necesarios para el procesamiento inicial de los ICLs. Por lo tanto, deben existir endonucleasas alternas que actúen cuando las endonucleasas de la vía FA/BRCA no se activan. Una endonucleasa candidata es XPF/ERCC1 con actividad de endonucleasa 5' (Kuraoka et al., 2000), similar a la actividad de FAN1 (MacKay et al., 2010). De acuerdo con el MB, esta actividad de endonucleasa podría ser promovida por MUS81 en conjunto con SLX4 (FANCP), una proteína coordinadora de endonucleasas descrita recientemente (Crossan et al., 2011; Kim et al., 2011). Otra alternativa obtenida

con el modelo es que XPF/ERCC1 sea activada por una vía dependiente de p53, probablemente como activador de su transcripción.

En condiciones silvestres, la actividad de esta endonucleasa alterna, muy probablemente debe ser inhibida para evitar una posible interferencia con la vía FA/BRCA. En nuestro modelo esta inhibición se lleva a cabo mediante FANCM, FANCD2I y FAN1. Sin embargo, no existe información acerca de alguna inhibición directa o indirecta de las proteínas AF sobre ninguna endonucleasa, por lo que esta hipótesis requiere investigación adicional. Es posible que estas endonucleasas alternas pudieran estar presentes todo el tiempo como vías secundarias de reparación que tienen efecto únicamente cuando la vía FA/BRCA no es funcional.

V.1.2 Durante la reparación de un DSB generado a partir de un ICL la exonucleasa MRN actúa en ausencia de las vías FA/BRCA y NHEJ.

Una serie de hallazgos sugieren que las células AF no son completamente deficientes en la reparación de los DSBs llevada a cabo por la vía de la HRR, y se cree que pueden recurrir a ella por una vía de reparación independiente de la vía FA/BRCA. Entre esta evidencia se puede mencionar que:

- Las células mutantes en los componentes río arriba de la vía FA/BRCA son capaces de generar ICHs cuando son tratadas con MMC (Latt et al., 1975; Wilson et al., 2001). Dado que las ICHs son consideradas el resultado de una HRR con entrecruzamiento, esto significa que este tipo de células son capaces de llevar a cabo una HRR por medio de una vía independiente de FA/BRCA.
- Las células mutantes en los componentes río abajo de la vía FA/BRCA, tales como RAD51 y FANCD1/BRCA2, no son capaces de generar ICHs cuando son expuestas a ICLs (Sonoda et al., 1999; Takata et al., 2001); lo cual indica que tienen menos opciones de reparación que las mutantes río arriba, debido a que en ellas se encuentran afectados los elementos centrales de la HRR.

- El complejo heterotrimérico MRN, con actividad exonucleasa, es capaz de procesar los DSBs generando salientes de DNA que son canalizados al proceso de HRR. En las células normales, la presencia del complejo MRN se considera esencial para la estabilidad de FANCD2 (Roques et al., 2009).
- Pace y colaboradores (2010) han sugerido que FANCD2 posee actividad exonucleasa, por lo tanto, la actividad del complejo MRN podría no ser necesaria para el funcionamiento de la vía FA/BRCA. El mismo grupo encontró además que KU70, una proteína de la vía NHEJ, es capaz de alterar el proceso de reparación del DNA y enviar las DSBs hacia la NHEJ. Ellos observaron además que, las mutantes dobles FANCA^{-/-} KU70^{-/-} son capaces de reparar el daño en el DNA por la vía HRR.

Tomando en cuenta esta información y los resultados del modelo, el primer mecanismo de reparación para un DSB generado a partir de un ICL sería la HRR mediada por la vía FA/BRCA y la segunda opción la NHEJ. Si ambas vías no funcionan, el candidato para iniciar una HRR alternativa y generar las ICHs es el complejo MRN.

El modelo que presentamos indica que la proteína KU y el complejo FANCD2I actúan juntos para inhibir al complejo MRN. Si ambos inhibidores no están presentes, la activación de ATM y la presencia de un DSB son suficientes para activar al complejo MRN. Esto podría explicar porque la reparación del DNA mejora en las mutantes dobles de FANCA/KU70 (Pace et al., 2010). De modo alternativo, otro punto de inhibición sobre MRN podría ser la activación de RAD51 y CHKREC, el cual apagaría la actividad de MRN.

V.1.3 La enzima desubiquitinadora USP1 es regulada directa o indirectamente por FANCM.

A la fecha se sabe que USP1 es capaz de inactivar al complejo FANCD2I (Nijman et al., 2005; Cohn et al., 2009) y a PCNA (Huang y D'Andrea, 2006; Niimi et al., 2008), sin embargo aún no se sabe cual es el mecanismo que activa a USP1. En

el modelo la activación de USP1 se lleva a cabo cuando PCNATLS, o FANCD2I y FANCD1N se activan (Figura 9). También, la activación de USP1 se restringe mientras FANCM se encuentre activo. Este comportamiento asegura que la actividad de la vía FA/BRCA se mantenga hasta que el ICL haya sido procesado.

V.1.4 El proceso de *Checkpoint Recovery* es crítico para la regulación de la vía FA/BRCA.

Durante el proceso de modelado se encontró que para recuperar el comportamiento de la vía FA/BRCA es indispensable una asa de retroalimentación negativa mediada por el nodo del Checkpoint Recovery: CHKREC. Esta asa de retroalimentación incluye 17 interacciones regulatorias, 10 de las cuales no han sido reportadas en la literatura científica, y por lo tanto son predicciones hechas con el presente modelo. La propuesta es que CHKREC es capaz de inactivar 10 nodos: MRN, BRCA1, FANCD1N, RAD51, HRR, DNAPK, NHEJ, ATR, p53 e incluso regularse a si mismo. El proceso del Checkpoint Recovery involucra a varias proteínas capaces de inactivar a proteínas clave del proceso de reparación del DNA y del Checkpoint, con lo cual se permite la progresión del ciclo celular (Bartek y Lukas, 2007; Carlessi et al., 2010; Douglas et al., 2010; Fiscella et al., 1997).

V.2 El modelo dinámico discreto

V.2.1 Dinámica del modelo en ausencia de daño en el DNA

Un aspecto importante de los modelos de red Booleanos es que son capaces de recuperar atractores para el sistema que se está estudiando, dichos atractores representan el fenotipo celular o las condiciones finales en las que se estabiliza una red de señalización.

En condiciones silvestres el MB de la vía FA/BRCA llega a solo al atractor CCP, definido como el *Atractor de Progresión del ciclo celular* y que se caracteriza por la oscilación periódica entre dos estados de la red (Figura 11, específicamente los dos últimos periodos de tiempo en los paneles A-C). Una vez en el atractor CCP

todos los nodos se inactivan, excepto el nodo de CHKREC que oscila entre el estado encendido y apagado. Este atractor de periodo dos puede interpretarse biológicamente como una transición periódica en el ciclo celular que inicia con la activación de las proteínas que liberan el *Checkpoint* de G2/M y una vez que un nuevo ciclo celular ha iniciado, las proteínas del *Checkpoint Recovery* se apagan, para activarse nuevamente solo cuando la célula llega a la fase G2 de un nuevo ciclo celular. Por lo tanto, las proteínas involucradas en este comportamiento cíclico podrían incluir a cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales tienen un comportamiento cíclico (activo/inactivo) que controla la progresión a través del ciclo celular (Bloom y Cross, 2007). Este atractor de periodo dos también se obtuvo cuando la red se analizó con una actualización asincrónica.

V.2.2 Dinámica del modelo durante la reparación de un DSB, un ADD y un ICL

El modelo recupera el orden de activación de proteínas conocido para la reparación de los ICLs, las DSBs y los ADDs (Figura 11A-C). Por ejemplo, cuando se introduce un DSB en el modelo, la red es capaz de repararlo a través de la HRR mediada por MRN (Figura 11B) (Kass y Jasin, 2010); la simulación de un ADD conduce a la activación de la vía de PCNATLS (Chang y Cimprich, 2009), la cual repara el ADD usando la vía de NER (Figura 11C). Finalmente, el modelo es capaz de describir la eliminación de un ICL por medio de la generación de un ADD y un DSB como intermediarios (de Winter y Joenje, 2009) (Figura 11A). Además, la dinámica también muestra la inhibición que tienen las proteínas AF sobre las proteínas de NHEJ (Bunting et al., 2010; Pace et al., 2010), así como la activación de las proteínas del Checkpoint que bloquea la progresión del ciclo celular (Bartek y Lukas, 2007).

En este modelo, el asa de retroalimentación negativa mediada por CHKREC se enciende una vez que el daño ha sido eliminado, entonces la red regresa a su comportamiento normal y llega al atractor CCP. Sin embargo, cuando el daño es generado constantemente, por ejemplo por la persistencia de MMC o DEB, la red alcanza atractores diferentes al CCP.

V.2.3 Dinámica de las mutantes de la vía FA/BRCA

Se usó la red FA/BRCA para estudiar el efecto de encender o apagar ciertos nodos de modo constante, de este modo se simularon diferentes condiciones fisiológicas o mutantes.

Primero se simuló la presencia permanente de daño en el DNA dejando el nodo de ICL siempre encendido. Tal activación constitutiva pretende representar el efecto observado en presencia persistente de agentes químicos como la MMC o el DEB. La figura 13A muestra que en estas circunstancias la red alcanza un atractor de periodo diez caracterizado por la activación persistente de los nodos del Checkpoint, y las vías FA/BRCA y HRR.

Biológicamente, este patrón de activación podría representar que las células están llevando a cabo un proceso de reparación del daño al DNA sin progresar en el ciclo celular. Debido a esta característica, nos referimos a este atractor como el atractor de *Arresto del Ciclo Celular* (CCA). Si la fuente de daño es eliminada, es decir, si el nodo ICL se apaga, el ciclo celular progresa y la simulación llega al atractor CCP.

Después de validar que el modelo reproduce las condiciones silvestres de la vía FA/BRCA, se evaluó el comportamiento dinámico de todas las mutantes de ganancia y pérdida de función (los atractores de todas estas mutantes pueden verse en los anexos de este trabajo).

En lo que respecta a estas mutantes nuestro modelo describe adecuadamente el fenotipo celular, lo que incluye persistencia de DSBs sin reparar, la activación de la vía NHEJ, la activación de RAD51 en las mutantes río arriba, la incapacidad para activar a RAD51 en las mutantes río abajo, y la activación correcta de las proteínas del Checkpoint, lo que conduce al arresto del ciclo celular. Este último punto es relevante debido a que da argumentos en favor de un *Checkpoint* eficiente en G2/M en las células AF (Neveling et al., 2009). Es importante mencionar que todas las mutantes, con excepción de CHKREC

recuperan el atractor CCP, aunque algunas mutantes tienen atractores adicionales con cuencas de atracción más grandes que la del CCP.

V.3 Evaluación experimental del comportamiento dinámico de la red mutante para FAcore en células AF-A.

El modelo celular elegido para este estudio ha sido el grupo AF-A debido a que la mayor parte de los pacientes AF tienen mutaciones bialélicas en el gen FANCA (Auerbach, 2009) y a que la proteína FANCA forma parte del complejo central o complejo FAcore de la vía FA/BRCA. Se llevaron a cabo simulaciones, así como una aproximación experimental para dicha mutante y los resultados se discuten a continuación. Es importante mencionar que en este estudio, aunque no se realizó una corroboración experimental para otras mutantes, sí se llevaron a cabo sus simulaciones, las cuales pueden verse en la sección de Anexos.

V.3.1 En condiciones basales la cinasa DNA-PKcs está constitutivamente activa en las células AF-A.

Hasta el momento no se conoce con exactitud que agentes químicos son los responsables de la generación “espontánea” o natural de ICLs en el DNA. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el acetaldehído, derivado del metabolismo del alcohol y de la dieta y en general los aldehídos podrían ser la principal fuente endógena de ICLs en el organismo si es que no son metabolizados y se acumulan en el organismo (Rosado et al., 2011; Langevin et al., 2011) Incluso se ha demostrado que el formaldehído, un carcinógeno humano ambiental altamente reactivo y que se genera naturalmente en los procesos metabólicos, es capaz de generar daño genotóxico en cultivos celulares expuestos, las células deficientes en la vía FA/BRCA son altamente sensibles a este compuesto (Ridpath et al., 2007).

En los tres trabajos citados se sugiere que los formaldehídos generados de modo natural en el organismo podrían afectar a las células con una tasa alta de proliferación, tales como las células de la médula ósea y también estar involucradas en la aparición temprana de cáncer en los pacientes con AF.

Por lo tanto, la vía FA/BRCA debe tener una actividad basal importante mediando la reparación del daño inducido por los aldehídos, sin embargo, en las células AF la vía FA/BRCA se encuentra suprimida, por lo que deben existir vías alternas de reparación que permitan tolerar los ICLs generados endógenamente en el DNA por los procesos metabólicos.

Debido a lo anterior se abordó la dinámica de la vía FA/BRCA en condiciones basales de generación de daño por ICLs; para ello se simularon pulsos cortos de ICLs para la condición silvestre y la mutante de FAcCore (Figura 12). En este caso el modelo es capaz de simular el procesamiento de un pulso de ICL por medio de la generación de un ADD y un DSB, finalmente el DSB es reparado por la HRR y el sistema alcanza el atractor CCP, donde el daño ha sido eliminado. En esta condición nuestro modelo muestra que en la mutante de FAcCore los DSBs generados son reparados principalmente por la vía de NHEJ y no por medio de la HRR, por lo que las proteínas de la NHEJ deben tener una actividad basal elevada que contrarreste los efectos nocivos del daño endógeno.

Para corroborar el punto anterior se evaluó por citometría de flujo en células NL49 (eficientes en la vía FA/BRCA) y VU817 (células con AF) la activación basal de la proteína DNA-PKcs, principal promotora de la reparación de DSBs por medio de la vía NHEJ (Lieber, 2010). Esta proteína es la cinasa más grande conocida y se activa únicamente cuando se ha unido a los extremos rotos de un DNA de doble cadena, una vez unida, activa su capacidad para fosforilar residuos de serina-treonina y es capaz de autofosforilarse y fosforilar varios sustratos involucrados en la vía de NHEJ. Esta proteína estimula la actividad endonucleolítica de la proteína Artemis y la actividad ligasa del complejo XRCC4-Ligasa IV indispensables para la reparación de los DSBs (Lieber, 2010).

En las figuras 14A-14D se observa que en todos los tiempos evaluados la actividad basal de DNA-PKcs estuvo elevada en las células VU-817 en comparación con las células NL-49, sobre todo durante las fases G1, lo cual es de esperarse tomando en cuenta que en fase G1 no se puede llevar a cabo la HRR

debido a que no hay una hebra homóloga para llevar a cabo un proceso de reparación (Lieber, 2010) y es más evidente en la fase G2, donde a pesar de que existe una hebra homóloga para llevar a cabo la reparación el proceso se ve afectado debido a la falta de la vía FA/BRCA (Figura 15). Por lo que en las células AF la reparación de los DSBs recae principalmente en una vía NHEJ funcional.

Hasta este punto podemos concluir que los resultados experimentales concuerdan con las simulaciones hechas con el MB, en condiciones basales hay más actividad de la cinasa DNA-PKcs en las células VU-817 que en las células NL-49.

V.3.2 Actividad elevada de la DNA-PKcs cuando el daño por MMC es constante

Cuando se simuló un daño constante por ICL para la mutante de FAcCore, el modelo alcanzó un atractor de periodo diez, similar al atractor CCA (Figura 13), se trata de un atractor de arresto del ciclo celular, en el cual los Checkpoints que detienen la progresión del ciclo celular se activan y permiten llevar a cabo la reparación del daño acumulado.

El modelo muestra una diferencia en el mecanismo de reparación, el cual depende de la persistencia del daño en el DNA. Con un pulso de ICL, la NHEJ es la principal vía encargada de reparar el daño, mientras que con ICL constante el modelo indica la activación tanto de la NHEJ y la HRR. Esto es una diferencia muy marcada con la red silvestre, donde la HRR mediada por la vía FA/BRCA es siempre la primera opción de reparación y el tiempo tomado para llevarla a cabo es más corto, 20 pasos en condiciones silvestres contra 32 pasos en la mutante de FAcCore.

Datos recientes han mostrado que una vía FA/BRCA completamente funcional es capaz de bloquear a la vía de NHEJ (Pace et al., 2010); por lo tanto, en las mutantes del FAcCore, las proteínas KU tienen la posibilidad de ocupar los DSBs y dirigir el daño hacia la vía NHEJ. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con dichas observaciones, pues en presencia constante de MMC las

células AF-A VU817 y las células NL-49 activan a la cinasa DNA-PKcs significativamente; sin embargo en las células NL-49 esta elevación de la actividad es transitoria (Figura 14B), mientras que en las células AF-A VU817 esta actividad se mantiene y no disminuye drásticamente como en el caso de las células NL-49, de este modo la cinasa DNA-PKcs podría estar señalizando para que la vía de NHEJ se haga cargo de los DSBs pendientes de reparación. Este mecanismo podría explicar la presencia de las figuras radiales en las metafases de las células AF, donde más de un cromosoma está involucrado en una asociación errónea de reparación.

V.3.3 El *Checkpoint* de integridad del DNA se inactiva en las células AF-A a pesar de la presencia de daño en el material genético

Podría decirse que, la mayor función biológica de los *Checkpoints* de integridad del DNA es permitir que las células reparen el daño generado en su material genético, de tal modo que las células arrestadas eventualmente reiniciarán su ciclo celular.

Las simulaciones en las figuras 12 y 13 indican que la activación de las proteínas del *Checkpoint*: ATR, ATM, CHK1, CHK2 y p53 se lleva a cabo apropiadamente en las células AF-A, tal y como ya ha sido reportado (Heinrich et al., 1998). Del mismo modo los resultados observados en la figura 17 indican que CHK1 se está activando en respuesta al daño en el DNA tanto en las células AF-A VU817 como en las células NL-49 y correlaciona a su vez con el punto de mayor acumulación de células en G2/M (Figura 16B).

Sin embargo, las simulaciones también muestran que la activación del proceso antónimo, el *Checkpoint Recovery*, se está llevando a cabo a pesar de que la reparación del DNA no se ha completado, permitiendo que las células avancen en el ciclo celular con gran cantidad de daño en su DNA, lleguen a mitosis y se dividan; este último evento explicaría la presencia de ICLs, DSBs y ADD no reparados en las células AF que no activaron el proceso apoptótico.

Ciertos trabajos han mostrado que el *Checkpoint Recovery* es un proceso activo que involucra la degradación de la claspina y la cinasa WEE1, la primera es un co-activador de la cinasa CHK1 y la segunda inhibe a las cinasas que permiten la transición de la fase G2 a la fase M, por lo tanto ambos factores están involucrados en el arresto del ciclo celular mientras el DNA está siendo reparado. La degradación de estas proteínas está mediada por el adaptador β -TrcP que conecta a ambas proteínas con el sistema de SCF Ubiquitina-proteosoma. La destrucción de la claspina inactiva a CHK1, con lo cual se acumula la proteína Cdc25A uno de los principales promotores de la mitosis y la destrucción de WEE1 libera a las CDKs que permiten la transición de fase G2 a fase M, con lo cual las células pueden salir de fase G2 y segregar su material genético (Bartek y Lukas, 2007).

Como una aproximación indirecta para determinar la contribución del *Checkpoint Recovery* se llevaron a cabo experimentos de monitoreo de la progresión del ciclo celular en las células NL49 y AF-A VU817 expuestas a MMC. En este caso si las células están entrando a mitosis y dividiéndose, entonces efectivamente están activando el proceso de *Checkpoint Recovery*.

Los resultados de citometría de flujo indican que tal y como es bien conocido, la línea celular AF VU817 presenta a las 24 horas de tratamiento con MMC la acumulación característica de las células AF en fase G2. El análisis de células en mitosis con el anticuerpo anti-MPM2 mostró que en condiciones basales la línea AF-A VU817 muestra un menor número de células en fase M y que incluso disminuye ante el tratamiento con MMC. Esto se podría interpretar como que debido a que con la acumulación de células en la fase G2, un menor número de células estarían entrando a mitosis.

Debido a todas las alteraciones que se presentan en las mutantes para la vía FA/BRCA, se esperaría que el número de células binucleadas y tetranucleadas encontradas en la línea AF-A VU817 fuese menor cuando se les compara con las células NL-49 y los controles sin tratamiento, debido a que hay pocas células en

mitosis (Figura 18). Sin embargo, nuestros resultados indicaron que el número de células binucleadas y tetranucleadas en la línea celular AF-A VU817 no varía a las 24 horas con o sin tratamiento, e incluso es mayor a las 48 horas que el número de células binucleadas y tetranucleadas encontradas en los cultivos de las células NL-49 (Figura 19).

Los datos anteriores sugieren que para que la tasa de división sea similar entre las diferentes líneas celulares y los diferentes tratamientos, a pesar del rezago de las células AF en fase G2, debe existir un mecanismo compensatorio que permita a las células transitar muy rápido por la mitosis para pasar de un ciclo celular al siguiente con la misma tasa de división. Dicho mecanismo podría ser el tránsito muy rápido a través de mitosis, el cual a su vez dependería de la activación del *Checkpoint Recovery* de fase G2 para llevarse a cabo.

Finalmente, es importante mencionar que el modelo presentado puede ser mejorado en el futuro de varios modos; por ejemplo, incorporando nodos, interacciones adicionales o analizando la red como un sistema dinámico estocástico para obtener las probabilidades de que las células utilicen o no una vía alterna de reparación de daño al DNA. Además es importante incorporar las vías apoptóticas de muerte celular, las cuales están altamente relacionadas con los procesos de reparación del daño al DNA y tener un panorama más amplio de los procesos celulares de la enfermedad.

El resto de las predicciones generadas con este MB pueden ser corroboradas posteriormente mediante la elaboración de un nuevo proyecto de investigación y ser de gran utilidad para comprender mejor los mecanismos de reparación mediados por la vía FA/BRCA o por sus vías alternas. El conocimiento adquirido con dichas corroboraciones tendrá implicaciones importantes en el tratamiento de los pacientes con AF, los tumores con un fenotipo celular AF o incluso el tratamiento de ciertos tipos de cáncer resistentes a la quimioterapia.

VI CONCLUSIONES

En este trabajo se ha reconstruido la red de señalización de la vía FA/BRCA, la cual repara los ICLs en el DNA, y se ha implementado como un MB. Usando este modelo se ha estudiado el comportamiento dinámico de la vía FA/BRCA en condiciones silvestres y mutantes para la reparación de tres tipos de daño: los ICLs, los DSBs y los ADDs. En todos los casos el modelo fue capaz de reproducir la dinámica de reparación conocida para cada tipo de daño y a la vez ha sido de utilidad para predecir nuevas interacciones entre los componentes de la vía y para predecir rutas alternas de reparación cuando la vía FA/BRCA no es funcional, como en el caso de la anemia de Fanconi.

Experimentalmente se verificó parcialmente 1) la predicción que proponía a la vía de NHEJ como la principal vía alterna de reparación de daño al DNA en las células AF-A, y se encontró que la cinasa DNA-PKcs, crítica en esta vía, se encuentra activada de modo basal en el células AF-A y que se sobre activa en las células AF-A cuando son expuestas a MMC; y 2) la predicción que proponía que el *Checkpoint Recovery* se enciende incluso en presencia de daño genómico sin reparar, en este caso se demostró que a pesar de la activación de la cinasa CHK1 y la acumulación de células AF-A en la fase G2 del ciclo celular, la dinámica de división de las células AF-A no es diferente de la dinámica de las células normales.

REFERENCIAS

- Adamo, A. et al. (2010). Preventing Nonhomologous End Joining suppresses DNA repair defects of Fanconi Anemia. *Mol. Cell* 39, 25-35.
- Albert, R. (2007). Network Inference, Analysis, and Modeling in Systems Biology. *The Plant Cell* 19: 3327–3338.
- Albert, I. et al (2008). Boolean network simulations for life scientists. *Source Code Biol Med.* 2008 Nov 14;3:16.
- Alter BP. Inherited bone marrow failure syndromes. Nathan DG, Orkin SH, Look AT, Ginsburg D, Eds. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 6a. ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2003. pp 280-365.
- Alter BP. (2003). Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer* 97: 425-440. Alter, BP. (2007). Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology: American Society of Hematology Education Program Book 2007*: 29-39.
- Ameziane, N. et al. (2008). Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening. *Human Mutation* 29: 159-166.
- Auerbach, AD. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat. Res.* 668, 4-10.
- Assman, SM y Albert, R. (2009). Discrete Dynamic Modeling with Asynchronous Update, or How to Model Complex Systems in the Absence of Quantitative Information. *Plant Systems Biology. Methods in Molecular Biology* 553, Parte 2, 207-225.
- Bartek, J., y Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238-245.
- Bassermann, F., y Pagano, M. (2010). Dissecting the role of ubiquitylation in the DNA damage response checkpoint in G2. *Cell Death Differ.* 17, 78-85.
- Bekker-Jensen, S. et al. (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.* 173, 195-206.
- Bhagwat, N. et al. (2009). XPF-ERCC1 Participates in the Fanconi Anemia Pathway of Cross-Link Repair. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6427- 6437.

- Bhattacharyya, A. et al. (2000). The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Is Required for Subnuclear Assembly of Rad51 and Survival following Treatment with the DNA Cross-linking Agent Cisplatin. *J. Biol. Chem.* 275, 23899-23903.
- Bloom, J., y Cross, FR. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 149-160.
- Blunt, T. et al. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 80, 813-823.
- Bogliolo, M. et al. (2007). Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J.* 26, 1340-1351.
- Brown, E.J., y Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 14, 397-402.
- Bunting, SF. et al. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* 141, 243-254.
- Carlessi, L. et al. (2010). A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1213-1223.
- Carnevale, A. y Frias, S. 1985. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin (Mex.)* 37: 31-34.
- Carney, J.P. et al. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.
- Celeste A. et al., (2002). Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* 296, 922-927.
- Chang, DJ, y Cimprich, KA. (2009). DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nature Chem. Biol.* 5, 82-90.
- Chaves, M. et al. (2005). Robustness and fragility of Boolean models for genetic regulatory networks. *J. Theor. Biol.* 235,431-449.

- Christensen, C. et al. (2007). Albert Systems-level insights into cellular regulation: inferring, analysing, and modelling intracellular networks. *IET Syst. Biol.* 1, 61-77.
- Ciccia A. et al.,(2007). Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein that Interacts with FANCM. *Mol. Cell* 25, 331- 343.
- Cimprich, KA., y Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616-127.
- Cohn, MA. et al. (2009). UAF1 Is a Subunit of Multiple Deubiquitinating Enzyme Complexes. *J. Biol. Chem.* 284, 5343-5351.
- Collis, SJ. et al. (2008). FANCM and FAAP24 Function in ATR- Mediated Checkpoint Signaling Independently of the Fanconi Anemia Core Complex. *Mol. Cell* 32, 313-324.
- Crooke, PS., y Parl, FF. (2010). A mathematical model for DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids.* 2010. pii: 352603.
- Crossan, GP. et al. (2011). Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nature Genet.* 43, 147-154.
- Davidich, MI., y Bornholdt, S. (2008). Boolean Network Model Predicts Cell Cycle Sequence of Fission Yeast. *PLoS ONE* 3,e1672.
- De Jong, H. (2002). Modeling and Simulation of Genetic Regulatory Systems: A Literature Review. *J Comput Biol.* 9(1):67-103.
- de Winter, J.P. et al. (1998). The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat. Genet.* 20, 281-283.
- de Winter, J.P. et al., (2000a). Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am. J. Hum.Genet.* 67, 1306-1308.
- de Winter, J.P. et al. (2000b). The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat. Genet.* 24,15-16.
- de Winter, JP. y Joenje, H. (2009). The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat. Res.* 668, 11-19.
- Dodson, G. et al. (2004). DNA Replication Defects, Spontaneous DNA Damage, and ATM-dependent Checkpoint Activation in Replication Protein A-deficient Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 34010-34014.

- Douglas, P. et al. (2010). Protein Phosphatase 6 Interacts with the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit and Dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1368- 1381.
- Dutrillaux, B. et al. (1982). The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Human Genet* 62:327-332.
- Eiler, ME, Frohnmayer D, Frohnmayer L, Larsen K y Owen J. Fanconi anemia guidelines for diagnosis and management, 3ra edición. Ed, Fanconi Anemia Research Fund Inc. Eugene Oregon, 2008. pp 37-52.
- Esmer, MC. et al. (2004). DEB test for Fanconi Anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am J Med Genet* 12A: 35-39.
- Fauré, A. et al. (2006). Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics* 22, e124-e131.
- Fenech, M. y Morley, AA.(1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 147(1-2):29-36.
- Fiscella, M. et al. (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53- dependentmanner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6048-6053.
- Frias, S. et al. (1984). Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin (Mex)* 36: 219-224.
- Frias, S. et al. (1986). Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin (Mex.)* 38: 269-271.
- Frias, S. et al. (1996). Effect of Hydroxyurea and normal plasma on DNA in lymphocytes from Fanconi anemia patients. *Mut Res* 357: 115- 121.
- Fujiwara, Y. et al. (1985). Xeroderma Pigmentosum Groups C and F: Additional Assignments and A Review of the Subjects in Japan. *J. Radiat. Res.* 26, 443-449.
- Garg, P., y Burgers, PM. (2005). Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translation DNA polymerases eta and REV1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18361-18366.
- Garcia-Higuera, I. et al. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular Cell* 7, 249–262.

- Gari, K. et al. (2008) Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16107-16112.
- Gong, Z. et al. (2010). BACH1/FANCI Acts with TopBP1 and Participates Early in DNA Replication Checkpoint Control. *Mol. Cell* 37, 438-446.
- Goodship, J. et al. (2000). Autozygosity mapping of a Seckel syndrome locus to chromosome 3q22.1-q24. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 498-503.
- Greenberg, RA. et al. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.* 20, 34-46.
- Hanada, K. et al. (2006). The structure-specific endonuclease Mus81/Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *EMBO J.* 25, 492125-4932.
- Heinrich, MC. et al. (1998). DNA Cross-Linker-Induced G2/M Arrest in Group C Fanconi Anemia Lymphoblasts Reflects Normal Checkpoint Function. *Blood* 91, 275-287.
- Hinds, P.W. et al. (1990). Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell. Growth Diff.* 1, 571-580.
- Hirano, S. et al. (2005). Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *EMBO J* 24, 418-427.
- Howlett, N.G. et al. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609.
- Huang, TT., and D'Andrea, AD. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 323-334.
- Hussain, S. et al. (2003). Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum. Mol. Genet.* 12:2503-2510.
- Jazayeri, A. et al. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biol.* 8, 37-45.
- Joenje, H. y Oostra, AB. (1983). Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi Anaemia. *Human Genet* 65(2):99- 101.

- Joenje, H. y Patel, KJ. (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Reviews* 2: 446-457.
- Kass, EM., y Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters* 584, 3703-3708.
- Kato, M., et al. (2000). Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.* 45, 133-137.
- Kee, Y. et al. (2009). Regulated degradation of FANCM in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes Dev.* 23, 555-560.
- Kee, Y., y D'Andrea, AD. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* 24,1680- 1694.
- Kennedy, R., et al. (2007). Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *J. Clin. Invest.* 5, 1440-1449.
- Kim, S-T. et al. (1999). Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *J Biol Chem* 274, 37538–37543.
- Kim, J. et al. (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Biol Chem* 170, 341-347.
- Kim, J.M. et al. (2009). Inactivation of Murine Usp1 Results in Genomic Instability and a Fanconi Anemia Phenotype. *Developmental Cell* 16, 314-320.
- Kim, JM. et al. (2008). Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood* 111, 5215-5222.
- Kim, Y. et al. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genet.* 43, 142-143.
- Kim, Y. et al. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genet.* 43, 142-143.
- Kumaravel, S. et al. (1997). Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiPI. *Nature* 389, 187-189.

- Kuraoka, I. et al. (2000). Repair of an Interstrand DNA Cross- link Initiated by ERCC1-XPF Repair/Recombination Nuclease. *J. Biol. Chem.* 275, 26632-26636.
- Langevin, F. et al. (2011). Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *6;475(7354):53-58.*
- Latt, SA. et al. (1975). Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4066-4070.
- Lavin, MF. (2008). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7749- 7758.
- Lee, J. et al. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 Checkpoint Clamp Regulates Interaction of TopBP1 with ATR. *J. Biol. Chem.* 282, 28036- 28044.
- Lee, S.B. et al. (2001). Destabilization of CHK2 by a Missense Mutation Associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Res.* 61, 8062-8067.
- Levitus, M. et al., (2004). Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 103, 2498-2503.
- Levitus, M. et al., (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet.* 37, 934- 935.
- Levrán, O. et al. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 37, 931-933.
- Li, X. y Heyer, W-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research* 18:99-113.
- Li, J., y Stern, DF. (2005). Regulation of CHK2 by DNA- dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 12, 12041-12050.
- Lieber, MR. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181-211.
- Litman, R. et al. (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell.* 8, 255-265.
- Liu, Q. et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14, 1448-1459.

- MacKay, C. et al. (2010). Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2. *Cell* 142, 65-76.
- Marmorstein, LY. et al. (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13869-13874.
- Meetei, A.R. et al. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet* 36, 1219-1224.
- Meetei, A.R. et al., (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 35, 165-170.
- Meetei, AR. et al. (2005). A Human Orthologue of Archaeal DNA Repair Protein Hef is Defective in Fanconi Anemia Complementation Group M. *Nat. Genet.* 37, 958-963.
- Mendoza, L. (2006). A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *BioSystems* 84, 101-114.
- Mendoza, L. et al. (1999). Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics* 15, 593-606.
- Mendoza, L., and Pardo, F. (2010). A robust model to describe the differentiation of T-helper cells. *Theory Biosci.* 129, 283-293.
- Mimori, M. et al. (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* 68, 611- 620.
- Mirchandani, KD. et al. (2008). The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair* 7, 902-911.
- Miyachi, K. et al. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121, 2228-2234.
- Moreno-Herrero, F. et al. (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437, 440-443.
- Müssel, C. et al. (2010). BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* 26, 1378-1380.

- D'Andrea, A. (2010). Susceptibility Pathways in Fanconi's Anemia and Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 362, 1909-1919.
- Neveling, K. et al. (2009). Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat. Res.* 668, 73-91.
- Niimi, A. et al. (2008). Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 16125-16130.
- Nijman, S.M.B. et al. (2005). The Deubiquitinating Enzyme USP1 Regulates the Fanconi Anemia Pathway. *Mol. Cell* 17, 331-339.
- Nomura, Y. et al. (2007). Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication. *Genes Cells* 10, 1111-1122.
- O'Donnell, L. y Durocher, D. (2010). DNA Repair Has a New FAN1 Club. *Molecular Cell* 39,167-169.
- O'Driscoll, M. et al. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* 33, 497-501.
- Pace, P. et al. (2010). Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science* 329, 219-223.
- Peng, M. et al. (2007). The FANCI/MutLa interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *EMBO J.* 26, 3238- 3249.
- Pichierri, P. y Rosselli, F. (2004). The DNA crosslink-induced S- phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* 23, 1178-1187.
- Pronk, J.C. et al. (1995). Localisation of the Fanconi Anemia complementation group A gene to chromosome 16q234.3. *Nat. Genet* 11, 338-340.
- Reeves, W.H., y Stoeber, Z.M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J. Biol. Chem.* 264, 5047-5052.
- Ridpath, J.R. (2007). Cells deficient in the FANCI/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res.* 1;67(23):11117-11122.

- Rogakou, EP. et al. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858-5868.
- Roques, C. et al. (2009). MRE11-RAD50-NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair. *EMBO J.* 28, 2400-2413.
- Rosado, IV. et al. (2011). Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 13;18(12):1432-1434.
- Rosselli, F., et al. (1992). Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. *Hum Genet* 89: 42-48.
- Rosenberg, PS, et al. (2003). Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 101: 822-826.
- Rosenberg, PS, et al (2004). Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood* 2004; 104: 350-355.
- Rosenberg, PS, et al. (2005). Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood* 105: 67-73.
- Rosenberg, PS, et al. (2007). Cancer risks in Fanconi anemia: experience of the German Fanconi Anemia (GEFA) Registry. *Haematologica* 2007; 93: 511-517.
- Rothfuss, A., y Grompe, M. (2004). Repair Kinetics of Genomic Interstrand DNA Cross-Links: Evidence for DNA Double-Strand Break- Dependent Activation of the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 123-134.
- San Filippo, J. et al. (2006). Recombination Mediator and Rad51 Targeting Activities of a Human BRCA2 Polypeptide. *J. Biol. Chem.* 281, 11649-11657.
- Shibata, A. et al. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 30, 1079-1092.
- Shieh, S. et al. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage- inducible sites. *Genes Dev.* 14, 289-300. Shimamura, A. et al. (2002). A novel

diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 100: 4649-4654.

- Siple, J.D. et al. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7515-7519.
- Smogorzewska, A. et al. (2007). Identification of the Fanconi anemia (FANC) I protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for crosslink repair. *Cell* 129, 289-301.
- Smogorzewska, A. et al. (2010). A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. *Mol. Cell* 39, 36-47.
- Sonoda, E. et al. (1999). Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5166-5169.
- Stewart, G.S. et al. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577-587.
- Stiff, T. et al. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 25, 5775-5782.
- Strathdee, C.A. et al. (1992). Evidence for at least four Fanconi Anemia Genes including FACC on chromosome 9. *Nat. Genet* 1, 196- 198.
- Takata, M. et al. (2001). Chromosome Instability and Defective Recombinational Repair in Knockout Mutants of the Five Rad51 Paralogs. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2858-2866.
- Taniguchi, T. et al. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100, 2414-2420.
- Taylor, A.M. et al. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258, 427-429.
- Tibbetts, RS. et al. (1999). A role for ATR in the DNA damage- induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13, 152-157.
- Tibbetts, RS. et al. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14, 2989-3002.

- Timmers, C. et al. (2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell.* 7, 241-248.
- Traven, A., y Heierhorst, J. (2005). SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA- damage-response proteins. *BioEssays* 27, 397-407.
- Trujillo, KM. et al. (1998). Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11 and p95. *J. Biol. Chem.* 273, 21447-21450.
- Tuteja, N., et al. (1994). Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J.* 13, 4991-5001.
- Varon, R. et al. (2007). Nijmegen breakage syndrome (NBS) due to maternal isodisomy of chromosome 8. *Am. J. Med. Genet.* 143A, 92- 94.
- Vaz, F. et al. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genet.* 42, 406-411.
- Wang, SS. et al. (1998). Alterations of the PPP2R1B Gene in Human Lung and Colon Cancer. *Science* 282, 284-287.
- Wang, XZ. et al. (2004). Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5850–5862.
- Wang, XZ. et al. (2007). Chk1-Mediated Phosphorylation of FANCE Is Required for the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3098-3108.
- Ward, I., y Chen, J (2001). Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress *J Biol Chem* 276, 47759-47762.
- Wechsler, T. et al. (2011). Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature* 731, 642- 646.
- Wilson, JB. et al. (2001). The chinese hamster FANCG/XRCC9 mutant NM3 fails to express the monoubiquitinated form of the FANCD2 protein, is hypersensitive to a range of DNA damaging agents and exhibits a normal level of spontaneous chromatid exchange. *Carcinogenesis* 22, 1939-1946.
- Wu, M. et al. (2009). A Dynamic Analysis of IRS-PKR Signaling in Liver Cells: A Discrete Modeling Approach. *PLoS ONE* 4, e8040.

- Xia, B. et al. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genet.* 39, 159-161.
- Xia, B. et al. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genet.* 39, 159-161.
- Xiao, Y. (2009). A Tutorial on Analysis and Simulation of Boolean Gene Regulatory Network Models. *Current Genomics* 10, 511-525.
- Yaneva, M. et al. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 16, 5098-5112.
- Yuan, S-S F. et al. (1999). BRCA is required for ionizing radiation- induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* 59, 3547- 3551.
- Zhang, F. et al. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.* 19, 524-529.
- Zhang, R. et al. (2009). Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 16308- 16313.

ANEXOS

A Boolean network model of the FA/BRCA pathway

Alfredo Rodríguez^{1,2}, David Sosa¹, Leda Torres¹, Bertha Molina¹, Sara Frías^{1,3,*} and Luis Mendoza^{4,*}

¹Laboratorio de Citogenética, Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, ²Posgrado en Ciencias Biológicas, ³Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental and Instituto de Investigaciones Biomédicas and ⁴Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Associate Editor: Martin Bishop

ABSTRACT

Motivation: Fanconi anemia (FA) is a chromosomal instability syndrome originated by inherited mutations that impair the Fanconi Anemia/Breast Cancer (FA/BRCA) pathway, which is committed to the repair of DNA interstrand cross-links (ICLs). The disease displays increased spontaneous chromosomal aberrations and hypersensitivity to agents that create DNA interstrand cross-links. In spite of DNA damage, FA/BRCA-deficient cells are able to progress throughout the cell cycle, probably due to the activity of alternative DNA repair pathways, or due to defects in the checkpoints that monitor DNA integrity.

Results: We propose a Boolean network model of the FA/BRCA pathway, Checkpoint proteins and some alternative DNA repair pathways. To our knowledge, this is the largest network model incorporating a DNA repair pathway. Our model is able to simulate the ICL repair process mediated by the FA/BRCA pathway, the activation of Checkpoint proteins observed by recurrent DNA damage, as well as the repair of DNA double-strand breaks and DNA adducts. We generated a series of simulations for mutants, some of which have never been reported and thus constitute predictions about the function of the FA/BRCA pathway. Finally, our model suggests alternative DNA repair pathways that become active whenever the FA/BRCA pathway is defective.

Contact: sarafrias@yahoo.com; lmendoza@biomedicas.unam.mx

Supplementary information: Supplementary data are available at *Bioinformatics* online.

Received on September 1, 2011; revised on January 13, 2012; accepted on January 16, 2012

1 INTRODUCTION

Fanconi anemia (FA) is a chromosomal instability syndrome characterized by bone marrow failure, congenital abnormalities and an increased risk to develop cancer (D'Andrea, 2010; de Winter and Joenje, 2009). Cells of patients with FA display increased chromosomal aberrations, and are hypersensitive to agents that create DNA interstrand cross-links (ICLs) (Auerbach, 2009). The reported prevalence of FA ranges from 1 to 5 cases per one million persons, while the heterozygous carrier frequency is about one case per 300 persons (although the true frequency is probably higher), with a median age at diagnosis of 6.5–8 years (D'Andrea, 2010). FA

represents a suitable model to study human DNA repair mechanisms and it is gaining relevance because heterozygous carriers have a high risk of developing malignancies such as breast cancer (Neveling *et al.*, 2009).

FA is a genetically heterogeneous disease, caused by mutations in at least one of the 15 distinct genes, namely: FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI/BRIP1/BACH1, FANCL, FANCM, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C and FANCP/SLX4. These genes are involved in the so-called Fanconi Anemia/Breast Cancer (FA/BRCA) pathway, dedicated to the repair of DNA ICLs (de Winter and Joenje, 2009; Kim *et al.*, 2011; Vaz, 2010). Currently, there is no consensus regarding the precise nature of the FA/BRCA pathway, or the network of interactions established with other genes/proteins involved in FA. We hereby propose the regulatory network established among 20 protein complexes that include the aforementioned proteins of the FA/BRCA pathway. Moreover, this network includes nodes to describe the three types of DNA damage commonly observed in FA. We thereafter implement the FA/BRCA network as a discrete dynamical system and study its behavior.

The modeling of regulatory networks of biological interest as discrete dynamical systems is a well-established methodology. Boolean networks, the simplest form of discrete dynamical systems, have been used to model a wide variety of processes such as the genetic control of floral morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* (Mendoza *et al.*, 1999), the differentiation process of T-helper lymphocytes (Mendoza, 2006), the control of the mammalian cell cycle (Fauré *et al.*, 2006) and the surviving process of malignant cells in large granular lymphocyte leukemia (Zhang *et al.*, 2009a), to name a few examples. This type of approach is widely used to study the dynamical behaviour of regulatory networks because of its straightforwardness, robustness and compatibility with published qualitative data (Chaves *et al.*, 2005; Christensen *et al.*, 2007; Davidich and Bornholdt, 2008; Mendoza and Pardo, 2010; Wu *et al.*, 2009).

There are some mathematical models that describe DNA repair, see, for example, Crooke and Parl (2010). However, to our knowledge, the model presented here is the first dynamical system proposed specifically for the FA/BRCA DNA repair pathway. This model is able to reproduce the ICLs repair process mediated by the FA/BRCA pathway, and the repair of double-strand breaks (DSBs) and DNA adducts (ADDs). In order to obtain a dynamical behavior that reproduces the experimental data, we propose the

*To whom correspondence should be addressed.

existence of some interactions not reported in the experimental literature, and therefore they constitute predictions of our model. Specifically, we include the generation of DSBs during ICLs repair by alternative DNA endonucleases, even in FA/BRCA mutants. Second, we propose a rule that enables MRN to act in the absence of FA/BRCA and NHEJ pathways during an ICL-generated DSB repair process. Third, we propose that USP1 is regulated by the activity of FANCM. And fourth, we propose that the Checkpoint Recovery process (CHKREC) negatively regulates 17 nodes of the FA/BRCA pathway.

2 METHODS

2.1 Reconstruction of FA/BRCA network

The experimental literature on FA was thoroughly analyzed, so as to reconstruct the connectivity among key components of the FA/BRCA pathway. Briefly, a DNA ICL is able to arrest the DNA synthesis process; the FANCM/FAAP24 protein complex (FANCM) recognizes the damage and recruits the FA core (FACore) complex (Gari *et al.*, 2008). Then, the FACore complex monoubiquitinates the FANCD2I complex (Kim *et al.*, 2011), which in turn recruits endonucleases such as FAN1 (MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010), XPF/ERCC1 (Bhagwat *et al.*, 2009) and MUS81/EME1 (MUS81) (Hanada *et al.*, 2006) to generate a DSB and a DNA adduct. The FA/BRCA proteins funnel the DSB to be repaired by the homologous recombination repair (HRR) pathway mediated by Breast Cancer 1 (BRCA1) (Bekker-Jensen *et al.*, 2006), FANCN (Xia *et al.*, 2007), FANCD1 (San Filippo *et al.*, 2006), FANCI (Gong *et al.*, 2010) and the RAD51 complex (San Filippo *et al.*, 2006). The blockage of the DNA replication by the presence of an ADD can be bypassed with the help of the proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and translesion synthesis (TLS) polymerases and then repaired by the nucleotide excision repair (NER) proteins (Chang and Cimprich, 2009; Garg *et al.*, 2005). As a final step, the ubiquitin-specific protease 1 (USP1) protein inactivates the FACore complex and PCNA proteins by deubiquitination, turning the signaling process off (Huang and D'Andrea, 2006; Niimi *et al.*, 2008). Finally, it is important to note that the FA/BRCA pathway establishes a cross talk with the ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) Checkpoint protein and its effector kinase, Checkpoint kinase 1 (CHK1), which are required for the activation of the FA/BRCA pathway and cell cycle arrest. The reader may find a more detailed explanation of the whole process in Supplementary Material.

Our proposed network for the FA/BRCA pathway, shown in Figure 1, Supplementary Figure S1 and Supplementary Material (FA_BRCA_network.pdf), incorporates DNA damage recognition proteins, DNA damage Checkpoint proteins and DNA repair effector proteins. At least 51, proteins were found to be relevant for the reconstruction of the network; however, some of these proteins act as functional complexes, and therefore they were collapsed into single functional nodes to facilitate the dynamical analysis. Furthermore, three nodes representing different types of DNA damage were included into the model, namely ICL, DSB and ADD. As a result, the network is made up of 28 nodes and 122 regulatory interactions, 80 of them positive and 42 negative (Fig. 1). The regulatory rules of this network is presented in Table 1. A detailed description of the information used to reconstruct the connectivity and the logical rules of such network can be found as Supplementary Material.

Not all interactions of the FA/BRCA network, as shown in Figure 1, have been reported in the experimental literature or appear in specialized databases. Indeed, while our regulatory network includes some of the elements of the FA/BRCA pathway as included in the KEGG database, our network incorporates more nodes, specifically ATM, CHK1, CHK2 and some pathways like the non-homologous end joining. Because of this characteristic, our network is unique in incorporating a cross talk with alternative DNA repair pathways.

Of the 122 regulatory interactions present in our model, 16 were included so as to obtain a dynamical behavior that reproduce the experimental data. These proposed regulatory interactions are divided into four groups. First, we included a positive interaction of XPF over DSB to ensure the generation of DSBs during ICL repair by the activity of alternative DNA endonucleases even in FA/BRCA-deficient cells. Second, we incorporated negative regulations of MRN from FANCD2I, KU, RAD51 and CHKREC, so that during the ICL-generated DSB repair process the MRN exonuclease acts only in the absence of FA/BRCA and NHEJ pathways. Third, we propose that USP1 is under positive control from FANCD1N, and under negative control from FANCM, to indicate that the USP1 deubiquitinating enzyme is directly or indirectly regulated by the presence of FANCD1/BRCA2, FANCN and FANCM. And fourth, we propose that CHKREC negatively regulates 11 nodes (see Fig. 1, Table 1 and Supplementary Fig. S2). The selection of these 16 unreported interactions was based exclusively in the recovery of the known attractors for the wild type and the mutants. This was the minimal set of new interactions that we found consistent with the experimental data.

2.2 The FA/BRCA network as a discrete dynamical system

We modeled the reconstructed FA/BRCA pathway as a Boolean network, where each node is described by a variable x that takes the value of 0 or 1 to represent its inactive or active state of activation, respectively. The activation state of the whole network is then represented by a vector with the set of Boolean variables x_1, x_2, \dots, x_n , where x_i is the state of activation of the i -th node. The state of activation of each node changes in discrete time steps according to $x_i(t+1) = F_i(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t))$, where $x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)$ is the state of the regulators of node x_i at time t , and F_i is a Boolean function, also called a logical rule, determining the state of node x_i at the next time step. The specific Boolean functions for each node are shown in Table 1. These equations describe a deterministic dynamical system, with a total of $2^{28} = 268435456$ possible activation states. We exhaustively tested the dynamical behavior of the FA/BRCA network by starting the simulations from all possible initial conditions with BoolNet (Müssel *et al.*, 2010) under synchronous updating, until the system reached a stationary pattern of activation, also referred to as an attractor. Finally, to simulate loss- and gain-of-function mutants, the corresponding variable was fixed to 0 or 1, respectively. The file containing the FA/BRCA network in the BoolNet format is available as the Supplementary Material (FA_for_BoolNet.txt).

Given the large number of possible activation states of the FA/BRCA network, it is computationally unfeasible to fully analyze its dynamical behavior using an asynchronous updating. However, it is instructive to compare certain key results under both synchronous and asynchronous updating. Therefore, the attractors of the wild type, FACore null mutant, and FANCD1N null mutant models, were obtained by using BoolNet with asynchronous updating starting from 10000 random initial states.

3 RESULTS AND DISCUSSION

A great proportion of FA cells in culture die when exposed to ICL inducing agents, such as mitomycin C (MMC) or diepoxybutane (DEB), due to severe DNA repair deficiencies. However, some cells survive exhibiting unrepaired DSBs and cytogenetic evidence of erroneous DNA repair such as radial exchange figures and a normal rate of sister chromatid exchanges (SCEs) (Latt *et al.*, 1975). Our aim was to understand the mechanism by which FA cells use alternative DNA repair pathways when exposed to ICL-inducing agents. To accomplish this, we developed a Boolean network model of the FA/BRCA pathway, which incorporates the known interactions of FA proteins with other pathways that participate in the preservation of genome stability. The network has three nodes that can be used as input, so as to model different types of DNA damage signals that

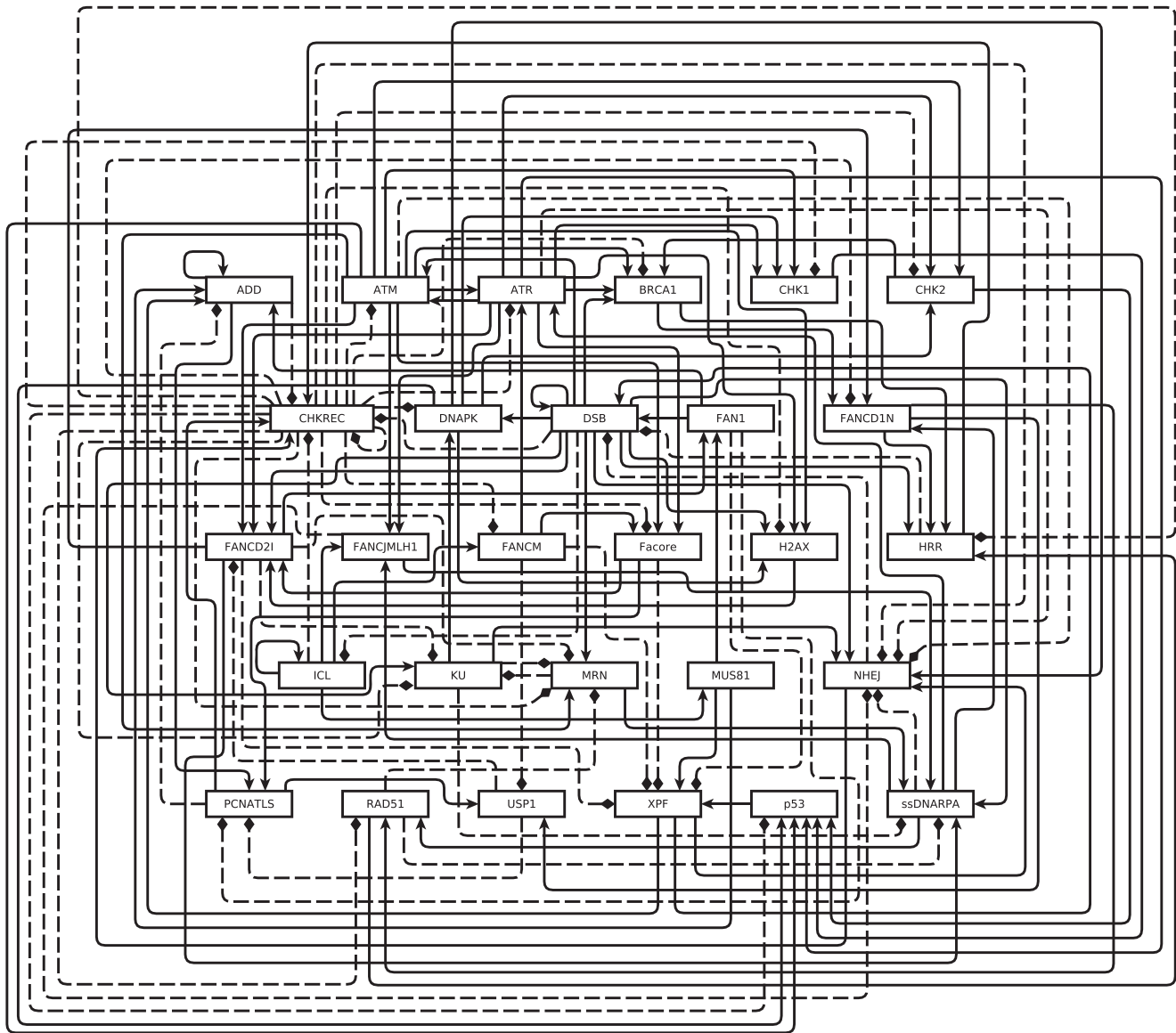


Fig. 1. The FA/BRCA network. Rectangles represent proteins or protein complexes, pointed arrows are positive regulatory interactions, and dashed lines with blunt arrows are negative regulatory interactions.

activate the DNA repair process, namely ICL, DSB and ADD. The reason to include these nodes in the network is that FA cells are highly sensitive to ICLs (D’Andrea, 2010; de Winter and Joenje, 2009), whereas DSBs and ADDs are found during ICLs repair (Kee and D’Andrea, 2010).

3.1 The FA/BRCA network

The reconstructed FA/BRCA regulatory network (Fig. 1) and its associated logical functions (Table 1) integrate the vast majority of experimental knowledge about the FA/BRCA pathway and its interactions with other genes/proteins involved in FA. The resulting discrete dynamical system was exhaustively analyzed so as to obtain the attractors of the system, particularly when starting in the presence of the three types of DNA damage: ICLs, DSBs and

ADDs, under wild type and mutant conditions. With the inclusion of some inferred, but not yet reported, interactions the model recovers the main known features of the wild type FA/BRCA pathway. Since, to our knowledge, there are no published reports about these interactions, they constitute veritable predictions of our model that require additional research in order to be validated.

3.1.1 The generation of DSBs during ICL repair is assured by the activity of FA/BRCA pathway endonucleases It has been reported that primary FA-C cells are not defective in the generation of DSBs during the initial steps of ICL repair (Rothfuss and Grompe, 2004). Since the generation of DSBs during the processing of ICLs is not absolutely abolished in FA, then there must exist alternative endonucleases that become active even when the FA/BRCA pathway

Table 1. Boolean functions for the nodes in the FA/BRCA network

Rules

```

ICL ← ICL ∧ ¬ DSB
FANCM ← ICL ∧ ¬ CHKREC
FAcore ← FANCM ∧ (ATR ∨ ATM) ∧ ¬ CHKREC
FANCD2I ← FAcore ∧ ((ATM ∨ ATR) ∨ (H2AX ∧ DSB)) ∧ ¬ USP1
MUS81 ← ICL
FANCBRCA1 ← (ICL ∨ ssDNARPA) ∧ (ATM ∨ ATR)
XPF ← (MUS81 ∧ ¬ FANCM) ∨ (MUS81 ∧ p53 ∧ ¬ (FAcore ∧ FANCD2I ∧ FAN1))
FAN1 ← MUS81 ∧ FANCD2I
ADD ← (ADD ∨ (MUS81 ∧ (FAN1 ∨ XPF))) ∧ ¬ PCNATLS
DSB ← (DSB ∨ FAN1 ∨ XPF) ∧ ¬ (NHEJ ∨ HRR)
PCNATLS ← (ADD ∨ (ADD ∧ FAcore)) ∧ ¬ (USP1 ∨ FAN1)
MRN ← DSB ∧ ATM ∧ ¬ ((KU ∧ FANCD2I) ∨ RAD51 ∨ CHKREC)
BRCA1 ← DSB ∧ (ATM ∨ CHK2 ∨ ATR) ∧ ¬ CHKREC
ssDNARPA ← DSB ∧ ((FANCD2I ∧ FANCBRCA1) ∨ MRN) ∧ ¬ (RAD51 ∨ KU)
FANCD1N ← (ssDNARPA ∧ BRCA1) ∨ (FANCD2I ∧ ssDNARPA) ∧ ¬ CHKREC
RAD51 ← ssDNARPA ∧ FANCD1N ∧ ¬ CHKREC
HRR ← DSB ∧ RAD51 ∧ FANCD1N ∧ BRCA1 ∧ ¬ CHKREC
USP1 ← ((FANCD1N ∧ FANCD2I) ∨ PCNATLS) ∧ ¬ FANCM
KU ← DSB ∧ ¬ (MRN ∨ FANCD2I ∨ CHKREC)
DNAPK ← (DSB ∧ KU) ∧ ¬ CHKREC
NHEJ ← (DSB ∧ DNAPK ∧ XPF ∧ ¬ ((FANCBRCA1 ∧ ssDNARPA) ∨ CHKREC)) ∨ ((DSB ∧ DNAPK ∧ KU) ∧ ¬ (ATM ∧ ATR))
ATR ← (ssDNARPA ∨ FANCM ∨ ATM) ∧ ¬ CHKREC
ATM ← (ATR ∨ DSB) ∧ ¬ CHKREC
p53 ← (((ATM ∧ CHK2) ∨ (ATR ∧ CHK1)) ∨ DNAPK) ∧ ¬ CHKREC
CHK1 ← (ATM ∨ ATR ∨ DNAPK) ∧ ¬ CHKREC
CHK2 ← (ATM ∨ ATR ∨ DNAPK) ∧ ¬ CHKREC
H2AX ← DSB ∧ (ATM ∨ ATR ∨ DNAPK) ∧ ¬ CHKREC
CHKREC ← ((PCNATLS ∨ NHEJ ∨ HRR) ∧ ¬ DSB) ∨ ((¬ ADD) ∧ (¬ ICL) ∧ (¬ DSB) ∧ ¬ CHKREC)

```

References regarding the literature used for the inference of this rules can be found in the Supplementary Material.

is defective. A likely candidate is XPF/ERCC1 with 5' endonuclease activity (Kuraoka *et al.*, 2000), which has a similar function to FAN1 (MacKay *et al.*, 2010). We hereby propose that the activity of this alternative endonuclease is promoted by MUS81 proteins, very probably in concert with the newly described SLX4 (FANCP) (Crossan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). Alternatively, XPF/ERCC1 might be activated by a p53-dependent pathway. Under wild-type conditions, the activity of this alternative endonuclease must be inhibited in order to avoid a possible interference with the FA/BRCA pathway. In our model, this inhibition was accomplished by the activation of the FANCM or FANCD2I complexes in association with FAN1 (Supplementary Fig. S3). This is an issue that deserves additional research because it does not exist information about any direct or indirect active inhibition of any endonuclease by the FA/BRCA proteins. Very likely, these alternative endonucleases are present as a secondary pathway whose effect becomes evident whenever the FA/BRCA pathway is defective.

3.1.2 During the repair of an ICL-intermediate DSB the MRN exonuclease activity acts in the absence of FA/BRCA and NHEJ pathways When a DSB is generated, proteins of different DNA repair pathways such as HRR and NHEJ surround the region of DNA damage. The co-localization of these proteins is considered as evidence of interaction between both DNA repair pathways (Bekker-Jensen *et al.*, 2006; Kass and Jasin, 2010). Now, the MRN complex, a heterotrimeric complex with exonuclease activity, is able

to process DSBs generating DNA overhangs that are funneled to the HRR process. In normal cells, the presence of the MRN complex is considered as essential for FANCD2 stability (Roques *et al.*, 2009); moreover, recent studies have suggested that FANCD2 also possesses exonuclease activity (Pace *et al.*, 2010). Therefore, the exonuclease activity of the MRN complex may not be necessary when the FA/BRCA pathway functions properly. The same group also found that the KU70, a NHEJ protein, corrupts the DNA repair process and changes the DNA repair choice to the error-prone NHEJ pathway in FA cells. They also observed that the FANCA/KU70 double mutant is able to repair the DNA damage by the HRR pathway. Moreover, a series of reports have shown that cells deficient in the FA/BRCA pathway generate sister chromatid exchanges (SCEs) when treated with MMC (Latt *et al.*, 1975; Wilson *et al.*, 2001). Now, as SCEs are considered a result of HRR with crossing-over, this could mean that FA cells are still able to perform HRR by a FA/BRCA-independent pathway. Interestingly, downstream FA/BRCA pathway mutant cells, such as RAD51 and FANCD1/BRCA2, are not able to generate SCEs when exposed to ICL-inducing agents (Sonoda *et al.*, 1999; Takata *et al.*, 2001).

Taking all the previous information into account, we believe that the MRN complex is a likely candidate to direct the HRR process in the absence of FA/BRCA and NHEJ proteins. According to this, the first mechanism to repair an ICL-intermediate DSB would be the HRR mediated by FA/BRCA and then the NHEJ proteins. If both these pathways are defective, the candidate to initiate an alternative

HRR and generate SCE would be the MRN complex. Our model proposes that KU70 in conjunction with the FANCD2I complex act inhibiting MRN (Supplementary Fig. S4). Then, when the inhibitors are absent, the activation of ATM and the presence of a DSB is enough to activate MRN. This might explain why the DNA repair is improved in FANCA/KU70 double mutants (Pace *et al.*, 2010). Alternatively, a point of inhibition over MRN could be the activation of RAD51 and CHKREC, which would turn the activity of the MRN complex off.

The USP1 deubiquitinating enzyme is directly or indirectly regulated by the presence of FANCM To date, it is known that the USP1 deubiquitinating protein is able to inactivate the FANCD2I complex (Cohn *et al.*, 2009; Nijman *et al.*, 2005) and TLS proteins (Huang and D'Andrea, 2006; Niimi *et al.*, 2008), although it is not yet clear which is the mechanism that activates USP1 itself. In our model, the activation of USP1 cannot occur unless both the FANCD2I and FANCD1N complexes or TLS are active (Supplementary Fig. S5). Also, the activation of USP1 is restricted since it does not occur unless FANCM is turned off. This behavior ensures that the activity of the FA/BRCA pathway continues until the ICL has been processed.

3.1.3 The Checkpoint recovery process is critical for the FA/BRCA pathway regulation We found that negative feedback mediated by the CHKREC is indispensable to obtain the experimentally observed behavior of the FA/BRCA network. In our model, we propose that CHKREC is able to inactivate 10 nodes; namely, MRN, BRCA, FANCD1N, RAD51, HRR, DNAPK, NHEJ, ATR, p53 and CHKREC itself. These 10 out of 17 regulatory interactions of CHKREC are not reported in the experimental literature, they are predictions of our model. It is important to mention that the CHKREC process includes several proteins able to inactivate key DNA repair and Checkpoint proteins allowing the progression of the cell cycle (Bartek and Lukas, 2007; Carlessi *et al.*, 2010; Douglas *et al.*, 2010; Fiscella *et al.*, 1997).

3.2 Dynamics of the FA/BRCA boolean model

3.2.1 Dynamics of the model in the absence of damage The FA/BRCA network model has only one attractor, regardless of the initial state of the network, that we refer to as the cell cycle progression (CCP) attractor, characterized by a periodic oscillation between two network states (Fig. 2, specifically the last two time periods in Panels A–C). This attractor is reached in an average of ~10 time steps from its initial state (see the distribution of values in Supplementary Fig. S6). Once in the CCP attractor all nodes are inactive, except for CHKREC that oscillates between the on and off states. This period-2 attractor can be interpreted biologically as the periodical transition in the cell cycle that starts with the activation of proteins that release the G₂/M Checkpoint, which verifies the DNA integrity and allow the progression of the cell cycle. Once a new cell cycle starts, the CHKREC proteins turn off, only to be active again when the cell reaches the G₂ phase of a new cell cycle. Hence, the proteins involved in this cyclic behavior might include Cyclin-dependent kinases (Cdks), which have an active/inactive transitional behavior controlling the progression through the eukaryotic cell cycle (Bloom and Cross, 2007). Importantly, this period-2 attractor is also obtained if the network is studied with an asynchronous updating.

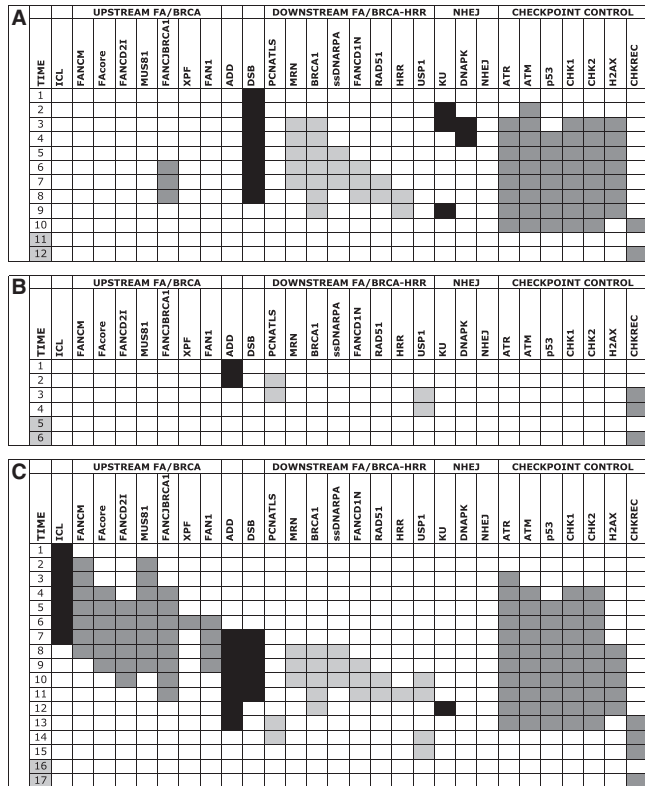


Fig. 2. Dynamical behavior of the FA/BRCA network, simulating the response to three different types of damage. (A) In a DSB damage, DNA is repaired by MRN-mediated HRR. (B) An ADD is repaired by PCNATLS. (C) An ICL is repaired by FA/BRCA pathway via the creation of intermediary DSB and ADD. Time steps in arbitrary units are indicated at the leftmost column. The period-2 attractor of the network is indicated in gray in the time column. Nodes are grouped into functional categories by shades of gray, and also by name at the topmost column.

3.2.2 Dynamics of the model during DSB, ADD and ICL repair The FA/BRCA network recovers the known order of activations leading to the repair of DSBs, ADDs and ICLs. Specifically, when a DSB is introduced in the model (Fig. 2A), the network is able to repair it via the MRN-mediated HRR pathway (Kass and Jasin, 2010). Also, the simulation of an ADD (Fig. 2B) causes the activation of the PCNATLS pathway (Chang and Cimprich, 2009), which repairs the ADD by the mediation of NER. Finally, the FA/BRCA network is able to describe the elimination of an ICL (Fig. 2C) by way of the generation of DSB and ADD intermediates (de Winter and Joenje, 2009). Moreover, the dynamics shown in Figure 2C also includes the recently described inhibition of FA proteins over NHEJ proteins (Bunting *et al.*, 2010; Pace *et al.*, 2010), as well as the activation of the Checkpoint proteins (Bartek and Lukas, 2007).

The cross talk among pathways generate negative feedback loops that create a homeostatic process in the recovering of the system after the DNA damage. In our model, the negative feedback mediated by CHKREC involves NHEJ, MRN, BRCA1, FANCD1N, RAD51, HRR, DNAPK, ATR, p53 and CHKREC itself. Once DNA damages have been eliminated, the network returns to its normal behavior, as represented by the CCP attractor. However, if by any reason the damage is constantly generated, for example by the persistent

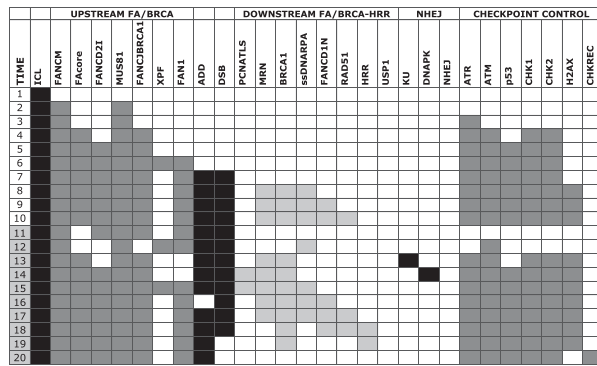


Fig. 3. Dynamical behavior of the FA/BRCA network simulating a persistent ICL damage. The period-10 attractor of the network is indicated in gray in the time column.

presence of MMC or DEB, the network reaches attractors different from the CCP (see further).

3.2.3 Dynamics of mutants of the FA/BRCA network We used the FA/BRCA to study the effects of turning some nodes on or off permanently, thus simulating diverse physiological and mutant conditions. First, we simulated the permanent presence of DNA damage by leaving the ICL node always on. Such a constitutive activation pretends to represent the effect observed when there is a persistent presence of chemicals such as MMC or DEB. Figure 3 (time steps 11–20) shows that under such circumstances the network reaches a period-10 attractor characterized by the persistent activation of Checkpoint, FA/BRCA and HRR pathways. Biologically, this pattern might represent that the cell is performing a DNA repair process without progressing on the cell cycle. Because of this characteristic, we refer to this attractor as the cell cycle arrest (CCA) attractor. If the source of DNA damage is eliminated, i.e. the ICL node is permitted to become inactive, the cell cycle progresses as evidenced by the network reaching the CCP attractor (data not shown).

Following the simulation of the repair of ICLs, DSBs and ADDs, we tested all possible single gain- and loss-of-function mutants and their dynamical behavior (Supplementary Material). Regarding null mutants on the FA/BRCA pathway, our model adequately describes the reported cellular phenotypes including the persistence of unrepaired DSBs, the activation of the NHEJ pathway, the activation of RAD51 in upstream mutants, the inability to activate RAD51 in downstream mutants and the correct activation of Checkpoint proteins that leads to an arrest in CCP. This last point is of relevance, since it argues in favor of a well-conserved G_2/M Checkpoint function of FA/BRCA pathway in mutant cells (Neveling *et al.*, 2009). Interestingly, with the exception of the CHKREC null mutant, every null mutant recovers the CCP attractor, although some mutants also have additional attractors with larger basins (Supplementary Material).

Most FA patients carry an alteration in the FANCA gene (Auerbach, 2009), hence we hereby show the corresponding simulation, which is the constitutive null mutant of FAcore (Fig. 4). The model of the mutant is able to repair the damage simulated by an ICL pulse, thus reaching the CCP attractor (Fig. 4A, time steps 14–15). Noteworthy, the same attractor is recovered by using an asynchronous updating scheme. In this condition, our model

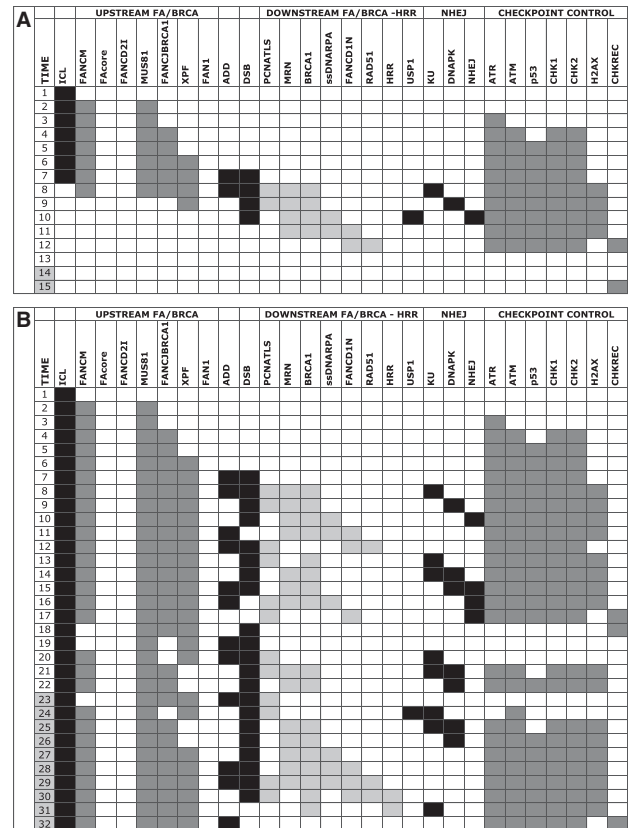


Fig. 4. Simulation of the network with a null mutation in FAcore. (A) A single ICL pulse. (B) A persistent ICL damage.

shows that the NHEJ pathway repaired the DSB generated as an intermediary. Furthermore, when a constant ICL damage was simulated in the FAcore null mutant, the model reaches a period-10 attractor (Fig. 4B, time steps 23–32) somewhat similar to the CCA attractor (Fig. 3). Interestingly, the model shows a difference in the mechanism of repair, depending on the persistence of the damage. With a single ICL pulse, the NHEJ pathway is the main route to repair the damage, whereas with a constant ICL stimulus there is a combined effort among the NHEJ and HRR paths. This is in marked contrast to the wild-type network, where the HRR—by mediation of the FA/BRCA proteins—is always the first option of repair.

With an intact FA/BRCA pathway, the FAcore collaborates in the activation of the FANL1 endonuclease to generate the necessary DSBs to repair an ICL (MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010) (Fig. 2C). However, in FANCA patients the activity of FAcore does not exist, it is therefore instructive to analyze which DNA endonucleases are responsible for the generation of DSBs in this case. According to our model, in the absence of FAcore, the effect could be achieved by the activation of the FANCM protein and the MUS81 and XPF endonucleases (Fig. 4), with the subsequent activation of FANCBRCA1 and Checkpoint proteins, such as ATR and ATM kinases. At this point, an ADD and a DSB are generated, a normal TLS/NER process (part of the PCNATLS node) repairs the ADD, and then the NHEJ pathway or the MRN-mediated HRR could repair the DSB. Recent data have shown that a completely functional FA/BRCA pathway will block the NHEJ pathway (Pace

et al., 2010); therefore in FAcCore mutants, the KU proteins have the possibility to occupy the DSB and direct the DNA lesion to the NHEJ pathway. Additionally, this mechanism could explain the radial exchange figures seen in FA cell metaphases.

The period-10 attractor observed due to a persistent ICL in FAcCore null mutant includes the activation of the HRR pathway, mediated by MRN, BRCA1, ssDNARPA and RAD51 (Fig. 4B). This behaviour could explain the sister chromatid exchanges observed in upstream FA cells, as these SCEs are considered a result of HRR with crossing-over (Hirano et al., 2005). This, in turn, could mean that FA cells are still able to perform HRR by a FA/BRCA-independent pathway. Our model points to MRN as a candidate to direct the HRR process in the absence of some FA proteins.

The simulation in Figure 4B shows that in FAcCore null mutant is possible to observe that the activation of the Checkpoint proteins, namely ATR, ATM, CHK1, CHK2 and p53, is not impaired. This implies that the Checkpoint protein activation in the presence of DNA damage should be normal in FA cells, in concordance with experimental data (Heinrich et al., 1998). However, the simulation shows that the Checkpoint module turns off even when the DNA damage nodes are still active, which may explain the presence of unrepaired ICLs, DSBs and ADDs.

We turn now our attention to a different mutant. It has been demonstrated the involvement of FANCD1/BRCA2 and FANCN/PALB2 in the development of breast cancer. These are molecules that act downstream of the FA/BRCA pathway in the DSB repair mediated by HRR (Xia et al., 2007; Zhang et al., 2009b). Patients carrying FA/BRCA downstream null mutations, such as FANCD1/BRCA2 or FANCN/PALB2, are relatively rare and develop malignant solid tumors earlier in life than FA patients carrying FA/BRCA upstream null mutations (Neveling et al., 2009). This characteristic might be due to the inability to use alternative DNA repair pathways; in fact, cells from these patients are unable to perform sister chromatid exchanges (Sonoda et al., 1999; Takata et al., 2001).

Figure 5 shows the simulations of the null mutation in FANCD1N. In Figure 5A, it can be observed that the attractor reached is characterized by the activation of the Checkpoint proteins with a concomitant absence of HRR and NHEJ activities. Moreover, such attractor is obtained with either synchronous or asynchronous updating schemes. Now, Figure 5B shows the attractor reached under persistent ICL damage. These activation patterns can be interpreted as resulting from an arrest in the cell cycle due to a lack of repair of the DNA damage. If true, this behavior could partially explain the scarcity of patients with mutations in either FANCD1/BRCA2 or FANCN/PALB2 genes. Clearly, those surviving patients presenting these mutations should present alternative mechanisms of DNA repair allowing them to survive.

The clinical manifestations of FA patients are extremely variable, therefore it has been difficult to establish a clear genotype–phenotype correlation. Nonetheless, there are phenotypic differences when comparing patients with FAcCore mutations against those who carry mutations in the downstream genes, as FANCN or FANCD1. Specially the later kind of patients die due to the development of Wilms Tumor or medulloblastoma, which typically occur earlier than pancytopenia, and also have more severe congenital malformations. In our model, it is possible to find a clear difference between null mutants in upstream and downstream nodes. The upstream null mutant shows the activation of alternative DNA repair pathways,

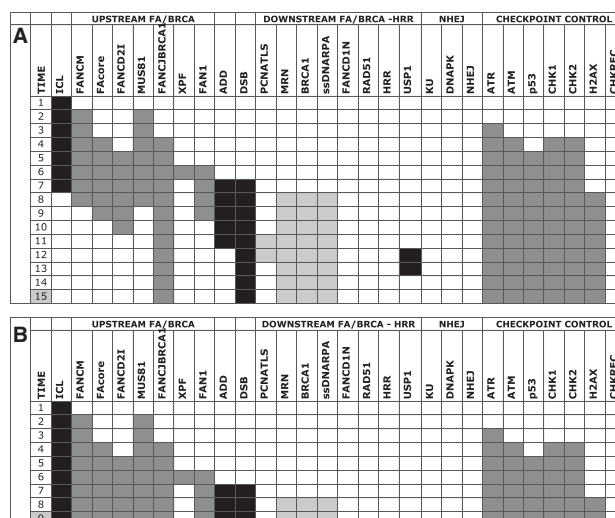


Fig. 5. Simulation of the network with a null mutation in FANCD1N. (A) A single ICL pulse. (B) A persistent ICL damage.

eventually leading to the system to the CCP attractor (Fig. 4 and Supplementary Material). In contrast, the simulations of downstream null mutant show the limited possibilities of DNA repair, leading the system principally to the CCA attractor (Fig. 5 and Supplementary Material). This implies that cells with downstream null mutations have clearly few possibilities of repair, thus eventually causing cell death. It is important to mention the scarcity of patients carrying mutations somewhere in downstream FA/BRCA, probably due to early cell demise concomitant with an irreversible arrest of CCP, as implied by the CCA attractor.

We described in the previous paragraphs the simulation of some variants of the FA/BRCA network that reflect the mutations of certain type of patients, and the response of their cells to certain type of DNA damage, namely ICLs. The reader may refer to the Supplementary Material for an exhaustive presentation of the simulations for all possible single mutants of the FA/BRCA network.

4 CONCLUSION

We presented in this article the reconstruction of the FA/BRCA network, as well as its implementation as a discrete dynamical system, and its behavior under a number of simulated mutations and DNA damages. To our knowledge, this is the first network model incorporating this DNA repair pathway.

We simulated with the model the dynamical behavior leading to alternative routes of DNA repair that might help explain the phenotype of cells obtained from patients with FA. Our simulations strongly suggest that the use of alternative DNA repair pathways help to safeguard the integrity of the genome, although the choice of pathway does not warrant a proper joining of damaged DNA.

While we did not present a formal robustness analysis of the FA/BRCA network, the results shown here are suggestive of a robust system. The recovery of a small number of attractors, all of them with a clear qualitative biological interpretation, even under the systematic alteration of the network to represent loss- and gain-of-function mutations imply that the network has a strong canalizing dynamical behavior. Moreover, 45 out of the possible 56

mutants conserved the wild-type attractor. Now, most simulations were performed using a synchronous update method, which is unrealistic from the biological point of view. However, we tested a number of key network variants, namely the wild type, the FAcore and the FANCD1N null mutants with both synchronous and asynchronous update schemes, obtaining exactly the same attractors. This invariability favors the interpretation that our results are robust, and are not completely determined by the updating methodology used. We are aware that these results are only suggestive about the robustness of the FA/BRCA network, and therefore the issue has to be further studied properly and systematically.

Our model makes a number of very concrete, testable predictions in the form of trajectories and attractors reached under different circumstances. Testing these predictions in the laboratory can help in the understanding of the mechanisms behind the DNA repair process as mediated by the FA/BRCA pathway. Such knowledge has potential implications in the refinement of FA/BRCA and DNA repair related pathways, with the concomitant improvement in the treatment of patients with FA, with tumors with a FA phenotype, or even with chemo-resistant forms of cancer.

The current model will be improved in the future in several ways. The incorporation of more nodes or interactions may refine the model so that it would explain the cellular behavior of rare complementation groups. Also, the analysis of the network as a stochastic dynamical system could generate information about the probability of cells to make use of alternative DNA repair mechanism, and thus improve the chance to survive to DNA damages. Finally, it is worth exploring the incorporation of interactions with apoptotic pathways, which are highly related to the DNA repair process.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Nathan Weinstein, Eugenio Azpeitia, as well as the anonymous reviewers for their valuable comments during the elaboration and correction of this manuscript.

Funding: CONACYT 84259 in part. A.R. received the CONACYT scholarship 239877.

Conflict of Interest: none declared.

REFERENCES

- Auerbach,A.D. (2009) Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat. Res.*, **668**, 4–10.
- Bartek,J. and Lukas,J. (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 238–245.
- Bekker-Jensen,S. *et al.* (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.*, **173**, 195–206.
- Bhagwat,N. *et al.* (2009) XPF-ERCC1 participates in the Fanconi Anemia pathway of cross-link repair. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 6427–6437.
- Bloom,J. and Cross,F.R. (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 149–160.
- Bunting,S.F. *et al.* (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, **141**, 243–254.
- Carlessi,L. *et al.* (2010) A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 1213–1223.
- Chang,D.J. and Cimprich,K.A. (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 82–90.
- Chaves,M. *et al.* (2005) Robustness and fragility of Boolean models for genetic regulatory networks. *J. Theor. Biol.*, **235**, 431–449.
- Christensen,C. *et al.* (2007) Albert systems-level insights into cellular regulation: inferring, analysing, and modelling intracellular networks. *IET Syst. Biol.*, **1**, 61–77.
- Cohn,M.A. *et al.* (2009) UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J. Biol. Chem.*, **284**, 5343–5351.
- Crooke,P.S. and Parl,F.F. (2010) A mathematical model for DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids.*, **2010**, pii: 352603.
- Crossan,G.P. *et al.* (2011) Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat. Genet.*, **43**, 147–154.
- D'Andrea,A. (2010) Susceptibility pathways in Fanconi's Anemia and breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **362**, 1909–1919.
- Davidich,M.I. and Bornholdt,S. (2008) Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. *PLoS One*, **3**, e1672.
- de Winter,J.P. and Joenje,H. (2009) The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat. Res.*, **668**, 11–19.
- Douglas,P. *et al.* (2010) Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1368–1381.
- Fauré,A. *et al.* (2006) Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics*, **22**, e124–e131.
- Fiscella,M. *et al.* (1997) Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 6048–6053.
- Garg,P. and Burgers,P.M. (2005) Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translation DNA polymerases eta and REV1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 18361–18366.
- Gari,K. *et al.* (2008) Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 16107–16112.
- Gong,Z. *et al.* (2010) BACH1/FANCI acts with TopBP1 and participates early in DNA replication checkpoint control. *Mol. Cell*, **37**, 438–446.
- Hanada,K. *et al.* (2006) The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *EMBO J.*, **25**, 4921–4932.
- Heinrich,M.C. *et al.* (1998) DNA cross-linker-induced G₂/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood*, **91**, 275–287.
- Hirano,S. *et al.* (2005) Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *EMBO J.*, **24**, 418–427.
- Huang,T.T. and D'Andrea,A.D. (2006) Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 323–334.
- Kass,E.M. and Jasin,M. (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett.*, **584**, 3703–3708.
- Kee,Y. and D'Andrea,A.D. (2010) Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.*, **24**, 1680–1694.
- Kim,J.M. *et al.* (2008) Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood*, **111**, 5215–5222.
- Kim,Y. *et al.* (2011) Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat. Genet.*, **43**, 142–143.
- Kuraoka,I. *et al.* (2000) Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26632–26636.
- Latt,S.A. *et al.* (1975) Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 4066–4070.
- MacKay,C. *et al.* (2010) Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*, **142**, 65–76.
- Mendoza,L. (2006) A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *BioSystems*, **84**, 101–114.
- Mendoza,L. and Pardo,F. (2010) A robust model to describe the differentiation of T-helper cells. *Theory Biosci.*, **129**, 283–293.
- Mendoza,L. *et al.* (1999) Genetic control of flower morphogenesis in Arabidopsis thaliana: a logical analysis. *Bioinformatics*, **15**, 593–606.
- Müssel,C. *et al.* (2010) BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*, **26**, 1378–1380.
- Neveling,K. *et al.* (2009) Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat. Res.*, **668**, 73–91.
- Niimi,A. *et al.* (2008) Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 16125–16130.
- Nijman,S.M.B. *et al.* (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol. Cell*, **17**, 331–339.
- Pace,P. *et al.* (2010) Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science*, **329**, 219–223.
- Roques,C. *et al.* (2009) MRE11-RAD50-NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair. *EMBO J.*, **28**, 2400–2413.

- Rothfuss,A. and Grompe,M. (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 123–134.
- San Filippo,J. et al. (2006) Recombination mediator and Rad51 targeting activities of a Human BRCA2 polypeptide. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11649–11657.
- Smogorzewska,A. et al. (2010) A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol. Cell*, **39**, 36–47.
- Sonoda,E. et al. (1999) Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5166–5169.
- Takata,M. et al. (2001) Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2858–2866.
- Vaz,F. et al. (2010) Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat. Genet.*, **42**, 406–411.
- Wilson,J.B. et al. (2001) The chinese hamster FANCG/XRCC9 mutant NM3 fails to express the monoubiquitinated form of the FANCD2 protein, is hypersensitive to a range of DNA damaging agents and exhibits a normal level of spontaneous chromatid exchange. *Carcinogenesis*, **22**, 1939–1946.
- Wu,M. et al. (2009) A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: a discrete modeling approach. *PLoS One*, **4**, e8040.
- Xia,B. et al. (2007) Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat. Genet.*, **39**, 159–161.
- Zhang,R. et al. (2009a) Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 16308–16313.
- Zhang,F. et al. (2009b) PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.*, **19**, 524–529.

Supplementary Information: A Boolean network model of the FA/BRCA pathway

Alfredo Rodríguez^{1,2}, David Sosa¹, Leda Torres¹, Bertha Molina¹, Sara Frías^{1,3*}, and Luis Mendoza^{4†}

¹Laboratorio de Citogenética, Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, México.

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

³Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

⁴Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Received on XXXXX; revised on XXXXX; accepted on XXXXX

Associate Editor: XXXXXXX

1 FA/BRCA NETWORK DESCRIPTION

Table 1 presents the regulatory interactions among the nodes constituting the FA/BRCA network, shown in Figure 1 and Supplementary File FA_BRCA_network.pdf. We hereby explain in some detail the published experimental information used to infer the connectivity of the network.

A DNA Interstrand Crosslink (ICL) is able to arrest the DNA synthesis process and thus activate the FA/BRCA pathway (de Winter and Joenje, 2009). Specifically, the FANCM/FAAP24 protein complex (FANCM) recognizes the distortion of the DNA molecule caused by the ICL, and recruits the FA core complex (FAcore) (Gari *et al.*, 2008). Then, the FAcore complex monoubiquitinates the FANCD2I complex (Kim *et al.*, 2008). The monoubiquitinated FANCD2I complex recruits FAN1, which is a 5' endonuclease (MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010). Also, the MUS81/EME1 (MUS81) heterodimer with 3' endonuclease activity is independently recruited (Hanada *et al.*, 2006). As a result, during the ICL repair a one-ended Double Strand Break (DSB) and a DNA adduct (ADD) are generated as byproducts.

If for any reason FAN1 is not activated during the ICL repair process, another 5' endonuclease such as XPF/ERCC1 (XPF, which has also been linked to the FA/BRCA pathway) could replace its function (Bhagwat *et al.*, 2009). In this way the generation of a DSB is assured. After the DSB has been generated, the H2AX histone becomes phosphorylated generating the γ H2AX form, which signals the DNA damage region to be repaired (Rogakou *et al.*, 1998).

It has been recently proposed that during the repair of DSBs the FA/BRCA proteins are able to block the action of the Non-Homologous End-Joining (NHEJ) pathway, thus preventing an aberrant DNA repair (Pace *et al.*, 2010). According with this hypothesis, the FA/BRCA proteins might funnel the DSB to

be repaired by the Homologous Recombination Repair (HRR) pathway. Experimental results (Pace *et al.*, 2010) suggest that this funneling is achieved by direct modification of the DSB by a FANCD2 exonuclease (3' to 5') activity. This, in turn, generates 5' single strand DNA (ssDNA) tails to promote HRR, contrary to a general view that only 3' ssDNA tails can promote HRR. Probably, during an ICL repair the FANCD2 exonuclease activity has preference over other HRR exonucleases, such as the MRN complex (Bekker-Jensen *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 1998), to generate the ssDNA.

Once the ssDNA has been generated and coated with the Replication Protein A (RPA), the FANCD2I complex starts the recruitment of proteins implicated in HRR (Taniguchi *et al.*, 2001), including Breast Cancer 1 (BRCA1) (Bekker-Jensen *et al.*, 2006), FANCN (Xia *et al.*, 2007), FANCD1 (San Filippo *et al.*, 2006), FANCF (Gong *et al.*, 2010) and the RAD51 complex (San Filippo *et al.*, 2006), thus facilitating an error-free repair. The DNA adduct generated by the action of the endonucleases can be bypassed by the Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Translesion synthesis (TLS) polymerases and then be repaired by the Nucleotide Excision Repair (NER) proteins (Chang and Cimprich, 2009; Garg *et al.*, 2005). Finally the Ubiquitin-Specific Protease 1 (USP1) protein inactivates the FANCD2I complex and PCNA proteins by deubiquitination, turning off the whole signaling process (Huang and D'Andrea, 2006; Niimi *et al.*, 2008).

An alternative pathway to the one described above has been proposed; namely, if the DSB site is occupied by the KU proteins, the Artemis-DNAPKcs complex will be activated (Kim *et al.*, 2005) and thus the NHEJ pathway would be preferred (Lieber, 2010). This alternative is an error-prone mechanism, and therefore a functional FA/BRCA pathway would block this choice (Pace *et al.*, 2010).

The FA/BRCA pathway cross talks with the Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related (ATR) checkpoint protein and its effector kinase Checkpoint Kinase 1 (CHK1), both of which are required for the activation of the FA/BRCA pathway induced by damage. ATR and CHK1 phosphorylate multiple FA/BRCA and FA/BRCA-associated

*author for correspondence regarding biological aspects of this work

†author for correspondence regarding modeling aspects of this work

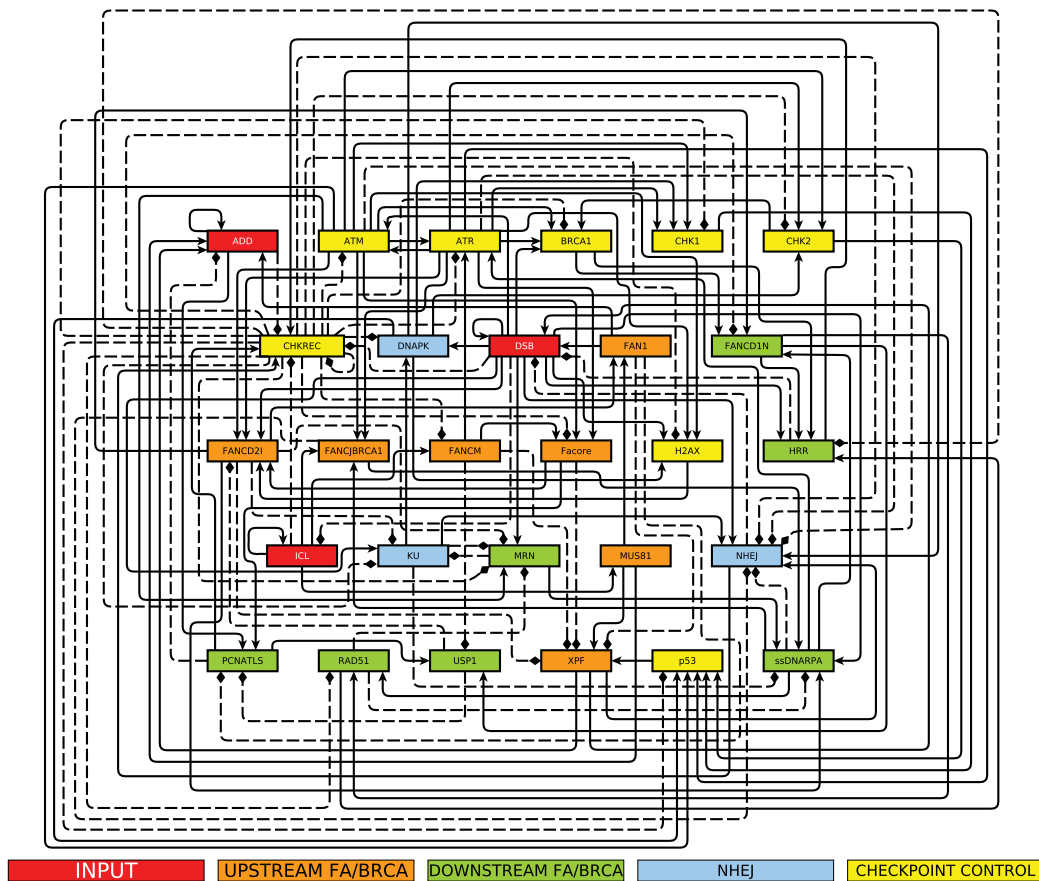


Fig. 1. The FA/BRCA network. Nodes are colored by the functional groups mentioned in the main text.

proteins, including FANCA, FANCE (Kee and D'Andrea, 2010), FANCD2, FANCI (Pichierri *et al.*, 2004), H2AX (Ward and Cheng, 2001) and BRCA1 (Tibbetts *et al.*, 2000). Importantly, the stability and activity of ATR and CHK1 are promoted by the FANCM complex (Collis *et al.*, 2008). Furthermore, the DNA-Activated Protein Kinase (DNAPKs) and Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) kinases share phosphorylation targets with ATR, and it has been proposed that they can cross-activate each other or even replace their respective functions (Kim *et al.*, 2005; Traven and Heierhorst, 2005). When the repair is completed, the Checkpoint recovery (CHKREC) process inactivates the checkpoint proteins, and the cell cycle progresses (Bassermann and Pagano, 2010).

Of the 122 regulatory interactions present in our model, 16 were included so as to obtain a dynamical behavior able to reproduce the experimental data. These proposed regulatory interactions are divided into four groups. First, we included a positive interaction of XPF over DSB to ensure the generation of DSBs during ICL repair by the activity of alternative DNA endonucleases even in FA/BRCA

deficient cells. Second, we incorporated negative regulations of MRN from FANCD2I, KU, RAD51 and CHKREC, so that during the ICL-generated DSB repair process the MRN exonuclease acts only in the absence of FA/BRCA and NHEJ pathways. Third, we propose that USP1 is under positive control from FANCD1N, and under negative control from FANCM, to indicate that the USP1 deubiquitinating enzyme is directly or indirectly regulated by the presence of FANCD1/BRCA2, FANCM and FANCM. And fourth, we propose that CHKREC negatively regulates eleven nodes (see Figure 2). The selection of these 16 unreported interactions was based exclusively in the recovery of the known attractors for the wild type and the mutants. This was the minimal set of new interactions that we found consistent with the experimental data.

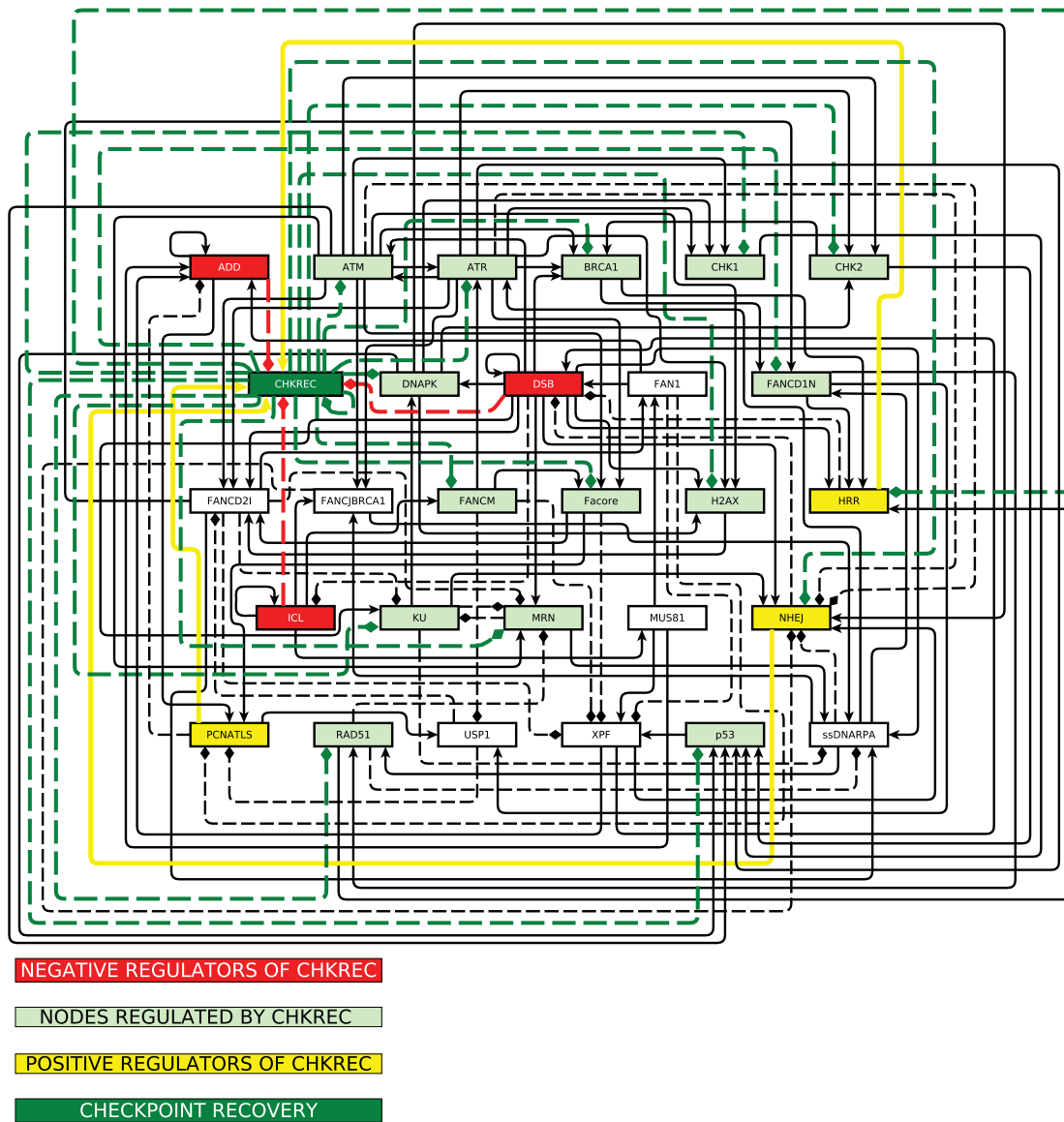


Fig. 2. The Checkpoint Recovery Process (CHKREC) pathway. Negative and positive regulators of CHKREC are indicated in red and yellow, respectively. CHKREC negatively regulates 17 nodes of the FA/BRCA pathway (dark green interactions); ten of these interactions are proposed in this work (see also Table 1 of Supplementary Information).

2 ATTRACTOR OF THE WILD TYPE FA/BRCA MODEL

The wild type FA/BRCA network model has only one attractor, that we refer to as the Cell Cycle Progression (CCP) attractor, characterized by a periodic oscillation between two network states (Figure 6). In the first state, all nodes are inactive, while in the second state only the CHKREC node is active. This period-2 attractor can be interpreted biologically as the periodical transition

in the cell cycle that starts with the activation of proteins that release the G2/M checkpoint, which verifies the DNA integrity and allow the progression of the cell cycle. Once a new cell cycle starts, the CHKREC proteins turn off, only to become active again when the cell reaches the G2 phase of a new cell cycle. The proteins involved in this cyclic behavior might include the Cyclin-Dependent Kinases (CDKs), which have an activate/inactive transitional behavior controlling the progression through the eukaryotic cell cycle (Bloom and Cross, 2007).

Table 1. Boolean functions for the nodes in the FA/BRCA network

Rules	References
$\begin{aligned} & \text{ICL} \leftarrow \text{ICL} \wedge \neg \text{DSB} \\ & \text{FANCM} \leftarrow \text{ICL} \wedge \neg \text{CHKREC} \\ & \text{FAcore} \leftarrow \text{FANCM} \wedge (\text{ATR} \vee \text{ATM}) \wedge \neg \text{CHKREC} \\ & \text{FANCD2I} \leftarrow \text{FAcore} \wedge ((\text{ATM} \vee \text{ATR}) \vee (\text{H2AX} \wedge \text{DSB})) \wedge \neg \text{USP1} \\ & \text{MUS81} \leftarrow \text{ICL} \\ & \text{FANCI/BRCA1} \leftarrow (\text{ICL} \vee \text{ssDNARPA}) \wedge (\text{ATM} \vee \text{ATR}) \\ & \text{XPF} \leftarrow (\text{MUS81} \wedge \neg \text{FANCM}^\dagger) \vee (\text{MUS81} \wedge \text{p53}^\dagger \wedge \neg (\text{FAcore}^\dagger \wedge \text{FANCD2I}^\dagger \wedge \text{FAN1}^\dagger)) \\ & \text{FAN1} \leftarrow \text{MUS81} \wedge \text{FANCD2I} \\ & \text{ADD} \leftarrow (\text{ADD} \vee (\text{MUS81} \wedge (\text{FAN1} \vee \text{XPF}))) \wedge \neg \text{PCNATLS} \\ & \text{DSB} \leftarrow (\text{DSB} \vee \text{FAN1} \vee \text{XPF}) \wedge \neg (\text{NHEJ} \vee \text{HRR}) \\ & \text{PCNATLS} \leftarrow (\text{ADD} \vee (\text{ADD} \wedge \text{FAcore})) \wedge \neg (\text{USP1} \vee \text{FAN1}^\dagger) \\ & \text{MRN} \leftarrow \text{DSB} \wedge \text{ATM} \wedge \neg ((\text{KU}^\dagger \wedge \text{FANCD2I}^\dagger) \vee \text{RAD51}^\dagger \vee \text{CHKREC}^\dagger) \\ & \text{BRCA1} \leftarrow \text{DSB} \wedge (\text{ATM} \vee \text{CHK2} \vee \text{ATR}) \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{ssDNARPA} \leftarrow \text{DSB} \wedge ((\text{FANCD2I} \wedge \text{FANCI/BRCA1}) \vee \text{MRN}) \wedge \neg (\text{RAD51} \vee \text{KU}^\dagger) \\ & \text{FANCD1N} \leftarrow (\text{ssDNARPA} \wedge \text{BRCA1}) \vee (\text{FANCD2I} \wedge \text{ssDNARPA}) \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{RAD51} \leftarrow \text{ssDNARPA} \wedge \text{FANCD1N} \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{HRR} \leftarrow \text{DSB} \wedge \text{RAD51} \wedge \text{FANCD1N} \wedge \text{BRCA1} \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{USP1} \leftarrow ((\text{FANCD1N}^\dagger \wedge \text{FANCD2I}) \vee \text{PCNATLS}) \wedge \neg \text{FANCM}^\dagger \\ & \text{KU} \leftarrow \text{DSB} \wedge \neg (\text{MRN}^\dagger \vee \text{FANCD2I} \vee \text{CHKREC}) \\ & \text{DNAPK} \leftarrow (\text{DSB} \wedge \text{KU}) \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{NHEJ} \leftarrow (\text{DSB} \wedge \text{DNAPK} \wedge \text{XPF}^\dagger \wedge \neg ((\text{FANCI/BRCA1}^\dagger \wedge \text{ssDNARPA}^\dagger) \vee \text{CHKREC}^\dagger)) \vee ((\text{DSB} \wedge \text{DNAPK} \wedge \text{KU}) \wedge \neg (\text{ATM}^\dagger \wedge \text{ATR}^\dagger)) \\ & \text{ATR} \leftarrow (\text{ssDNARPA} \vee \text{FANCM} \vee \text{ATM}) \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{ATM} \leftarrow (\text{ATR} \vee \text{DSB}) \wedge \neg \text{CHKREC} \\ & \text{p53} \leftarrow (((\text{ATM} \wedge \text{CHK2}) \vee (\text{ATR} \wedge \text{CHK1})) \vee \text{DNAPK}) \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger \\ & \text{CHK1} \leftarrow (\text{ATM} \vee \text{ATR} \vee \text{DNAPK}) \wedge \neg \text{CHKREC} \\ & \text{CHK2} \leftarrow (\text{ATM} \vee \text{ATR} \vee \text{DNAPK}) \wedge \neg \text{CHKREC} \\ & \text{H2AX} \leftarrow \text{DSB} \wedge (\text{ATM} \vee \text{ATR} \vee \text{DNAPK}) \wedge \neg \text{CHKREC} \\ & \text{CHKREC} \leftarrow ((\text{PCNATLS} \vee \text{NHEJ} \vee \text{HRR}) \wedge \neg \text{DSB}^\dagger) \vee ((\neg \text{ADD}^\dagger) \wedge (\neg \text{ICL}^\dagger) \wedge (\neg \text{DSB}) \wedge \neg \text{CHKREC}^\dagger) \end{aligned}$	<p>This work</p> <p>Meetei et al., 2005; Kee et al., 2009</p> <p>Kim et al., 2011; Kee and D'Andrea, 2010; Wang et al., 2007</p> <p>Smogorzewska et al., 2007; Bogliolo et al., 2007; Pace et al., 2010</p> <p>Hanada et al., 2006</p> <p>Peng et al., 2007; Gong et al., 2010</p> <p>Bhagwat et al., 2009</p> <p>MacKay et al., 2010; Smogorzewska et al., 2010</p> <p>Hanada et al., 2006; Smogorzewska et al., 2010; Bhagwat et al., 2009</p> <p>Smogorzewska et al., 2010; Bhagwat et al., 2009; Lieber, 2010</p> <p>Chang and Cimprich, 2009; Mirchandani et al., 2008</p> <p>Moreno-Herrero, 2005; Trujillo et al., 1998</p> <p>Becker-Jensen et al., 2006; Greenberg et al., 2006; Tibbets et al., 1999</p> <p>Shibata et al., 2011</p> <p>San Filippo et al., 2006; Greenberg et al., 2006; Zhang et al., 2009b</p> <p>San Filippo et al., 2006; Marmorstein et al., 1998; Xia et al., 2007</p> <p>Bhattacharyya et al., 2000; Yuan et al., 1999</p> <p>Huang and D'Andrea, 2006</p> <p>Kass and Jassin, 2010; Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010</p> <p>Lieber, 2010; Yaneva et al., 1997</p> <p>Lieber, 2010</p> <p>Cimprich and Cortez, 2008; Collis et al., 2008; Jazayeri et al., 2006</p> <p>Stiff et al., 2006; Lavin, 2008</p> <p>Cimprich and Cortez, 2008; Lee et al., 2007; Shieh et al., 2000</p> <p>Bartek and Lukas, 2007; Traven and Heierhorst, 2005</p> <p>Carlessi et al., 2010; Li and Stearn, 2005; Traven and Heierhorst, 2005</p> <p>Lavin, 2008; Douglas et al., 2010</p> <p>Chang and Cimprich, 2009; Lieber, 2010; Basserman and Pagano, 2010</p>

Only some key references are included, full discussion and references can be found in Section 1 of this supplementary Information. [†]The regulatory effects of these nodes were inferred in this work.

		UPSTREAM FA/BRCA								DOWNSTREAM FA/BRCA-HRR								NHEJ				CHECKPOINT CONTROL								
TIME	ICL	FANCI	FAcore	FANCD2I	MUS81	FANCI/BRCA1	XPF	FAN1	ADD	DSB	PCNATLS	MRN	BRCA1	ssDNARPA	FANCD1N	RAD51	HRR	USP1	KU	DNAPK	NHEJ	ATR	ATM	p53	CHK1	CHK2	H2AX	CHKREC		
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 6. Attractor of the FA/BRCA model.

It is important to note that the CCP attractor is the only attractor in the system, we tested all the possible initial states of the system, namely $2^{28} = 268435456$, and all of them lead to such attractor. The distribution of the number of time steps from a given initial state until the system reaches the CCP attractor is shown in Figure 7.

3 ATTRACTORS OF ALL POSSIBLE NULL AND GAIN-OF-FUNCTION MUTANTS OF THE FA/BRCA MODEL

We present from Figure 8 through Figure 63 the complete set of attractors for all possible single loss- or gain-of-function mutants of the FA/BRCA model. We included references wherever there is information to compare the results of our simulations against experimental data. In all cases, our simulations are in agreement with the published data. Those simulations that are not accompanied with references are, to the best of our knowledge, not

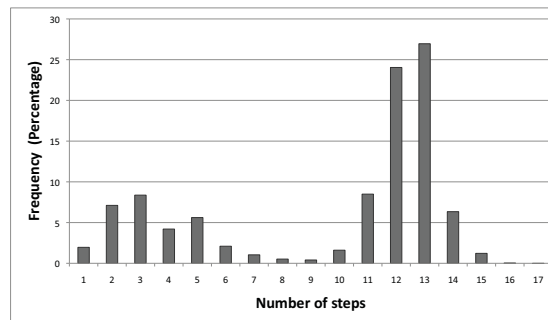


Fig. 7. Distribution of the number of steps from an initial state to its attractor in the wild type FA/BRCA model.

experimentally tested yet. Therefore, such simulations constitute veritable predictions of our model.

There is a total of 56 possible single loss- or gain-of-function mutants. From these, 18 mutants present the same attractor as the wild type system, 27 have the wild type attractor plus new attractors, and only 11 mutants recover only attractors different to the wild type. This information is strongly suggestive about the robustness of the dynamical behavior of the network, given that all mutations have a small number of attractors, and in most cases the wild type attractor is recovered.

From the whole set of results, there are a few worth mentioning. Figure 16 shows that in the MUS81 null mutant one of the attractors shows that the ICL cannot be further processed. Conversely, in the constitutive expression of MUS81 (Figure 17) the CHKREC node

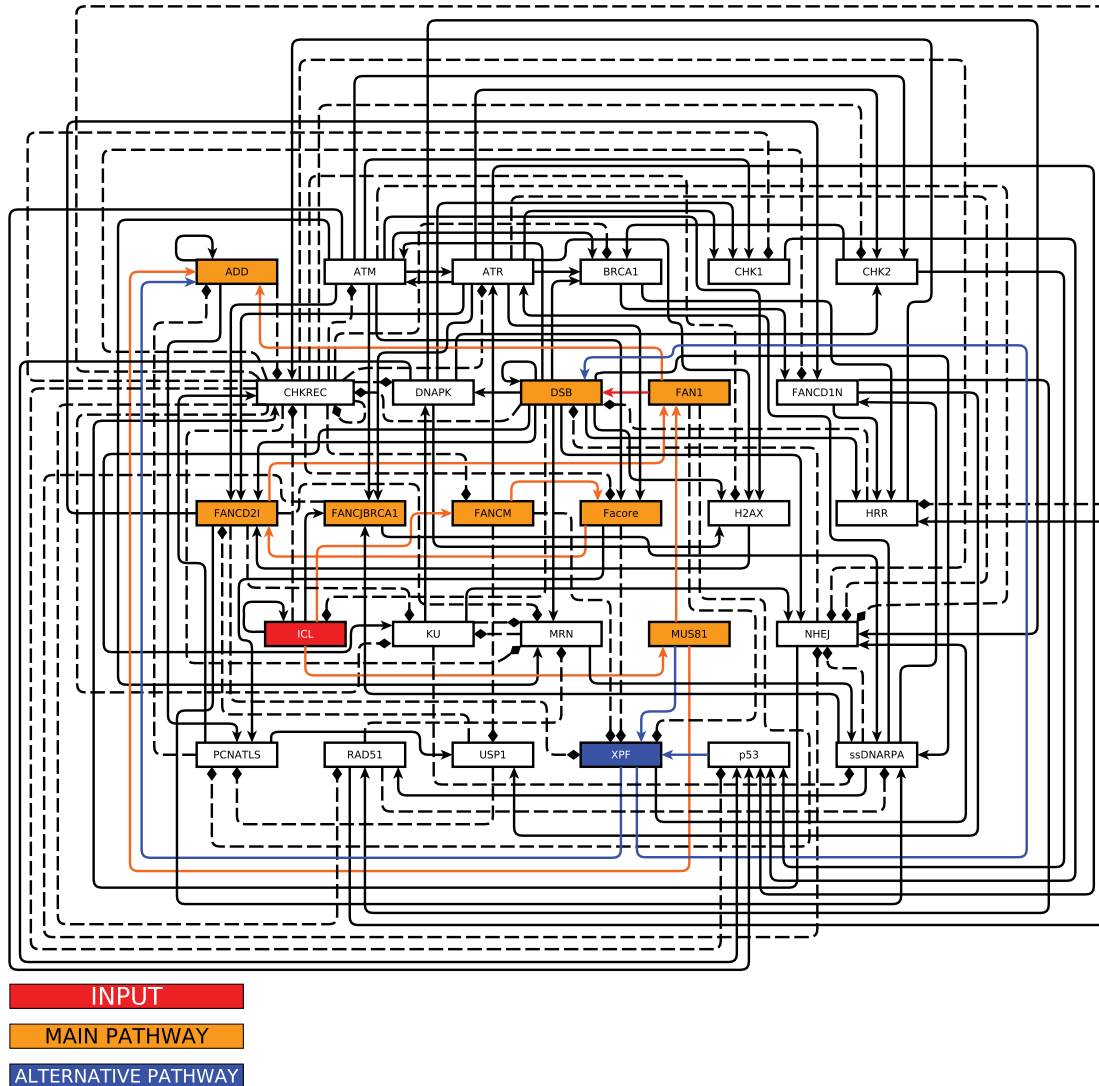


Fig. 3. The generation of DSBs during ICL repair is assured by the activity of FA/BRCA pathway endonucleases. During the S phase, an ICL (red) must be processed to generate DSBs, preferably by the upstream FA/BRCA pathway and its associate endonucleases (orange); however, some alternative pathways (blue) are also able to generate DSBs.

becomes active even though the DSB node is constantly activated due to the endonuclease activity. Also, note that mutants in any of the downstream FA/BRCA nodes show a second attractor, apart from the CCP. These additional attractors share the characteristic of having the checkpoint proteins in an active state as well as the inactivation of crucial DNA repair proteins. Finally, all gain-of function mutations in either the DNA repair proteins or the checkpoint control show that the repair is ensured even in presence of constant DNA damage.

Simulations with FANCM

In this mutant we observe the CCP attractor (see Figure 10), which may be explained by the role of FANCM in the ICL repair process. The FANCM/FAAP24 complex (FANCM) recognizes the ICL and recruits the FA core complex (FAcore). Thus, in the absence of FANCM/FAAP24 the binding of the FAcore to chromatin is reduced and FANCD2I is not efficiently ubiquitinated (Ciccia *et al.*, 2007). However, FANCM deficient cells are not totally defective

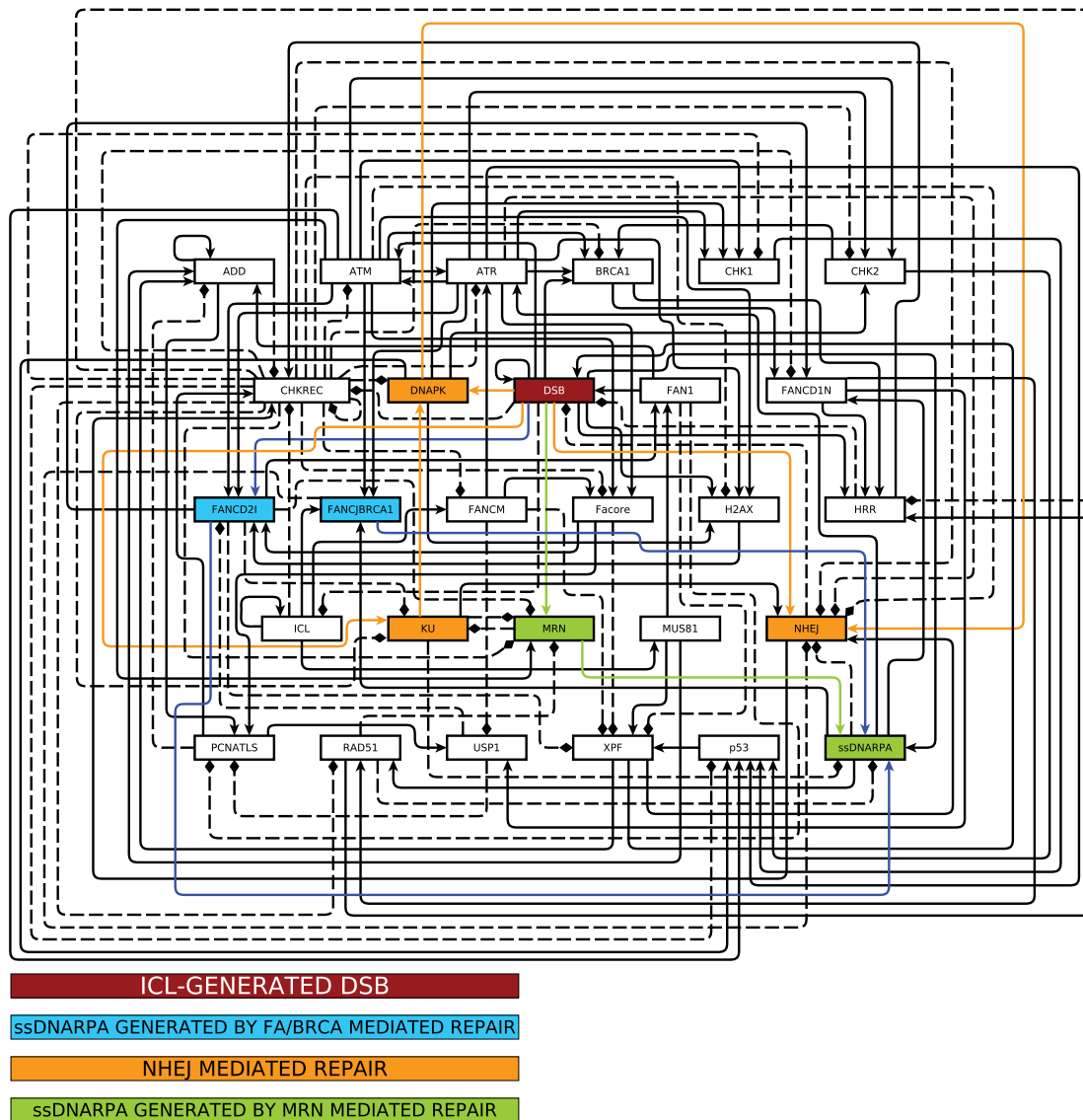


Fig. 4. During the repair of an ICL-intermediate DSB the MRN exonuclease acts in the absence of FA/BRCA and NHEJ pathways. An ICL-intermediate DSB (red) is the likely input for three DNA repair pathways; namely, the downstream FABRCA pathway, the NHEJ pathway, and the HRR pathway mediated by MRN. These pathways are shown in blue, orange and green, respectively.

in HRR, probably because the recruitment of the FA core complex by FANCM to chromatin is not essential for the assembly of the FA core subunits (Kim *et al.*, 2008). Therefore, these cells might survive with the help of alternative mechanisms of surveillance and DNA repair (Kennedy *et al.*, 2007). In any of these scenarios, cells can repair the DNA damage, and thus the cell cycle may continue, as evidenced by the CCP attractor.

Simulations with MUS81

Figure 16 shows the two attractors or phenotypes obtained with a null mutation in MUS81. Here, the basin of attraction of the first is larger than the basin of attraction of the second, and thus the first attractor is reached more frequently. In the first case, the cell has unrepaired DNA damage and cannot progress to the next cell cycle, whereas in the second case we observe the CCP attractor. These two attractor are described experimentally, and the evidence comes from

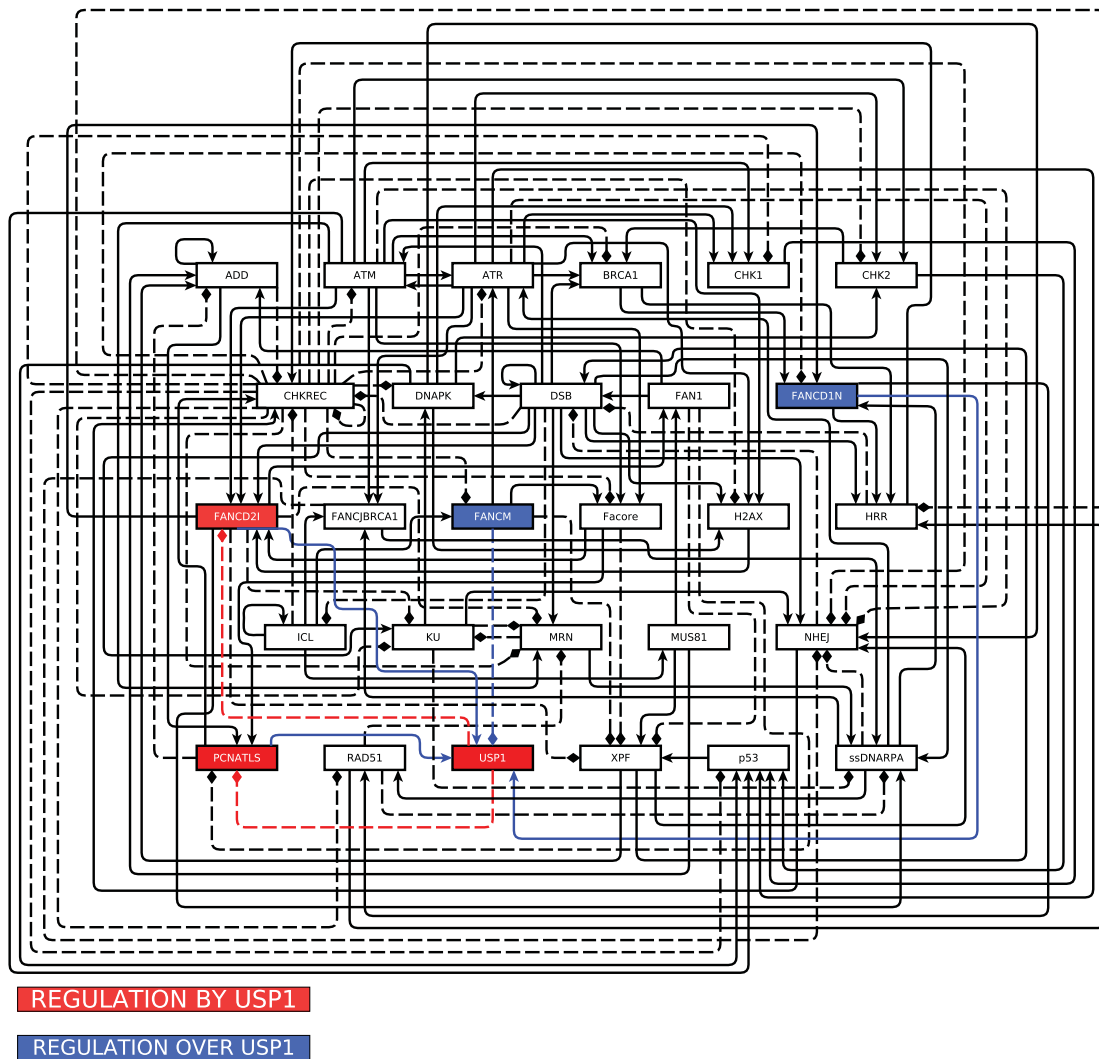


Fig. 5. The USP1 deubiquitinating enzyme is directly or indirectly regulated by the presence of FANCM. The nodes regulating USP1 are shown blue, whilst the nodes regulated by USP1 by deubiquitilation are shown in red.

	UPSTREAM FA/BRCA										DOWNSTREAM FA/BRCA-HRR										CHECKPOINT CONTROL									
TIME	ICL	FANCM	Facore	FANCD21	FANCD1N	FANCBIRCA1	XPF	FAN1	ADD	DSB	PCNATLS	MRN	BRCA1	ssDNARPA	RAD51	MRN	USP1	KU	DNAPK	NHEJ	ATR	ATM	p53	CHK1	CHK2	H2AX	CHKREC			
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Fig. 8. Attractor of the FA/BRCA model with a null mutation in ICL.

studies of MUS81/FANCB double mutants (Nomura *et al.*, 2007), and Mus81^{-/-} mouse embryonic stem cells (Hanada *et al.*, 2006).

MUS81 is involved in the cleavage of a replication fork stalled by an ICL to produce a DSB, thus being an intermediate of ICL repair (Hanada *et al.*, 2006). Therefore, if MUS81 is deficient and the unrepaired ICL persists the cell do not reach the checkpoint recovery and the cell cycle progression is halted. Furthermore, in the second attractor MUS81 and the FA pathway can independently contribute to the repair of collapsed replication forks (Nomura *et*

- Gari, K. *et al.* (2008) Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16107-16112.
- Gong, Z. *et al.* (2010). BACH1/FANCI Acts with TopBP1 and Participates Early in DNA Replication Checkpoint Control. *Mol. Cell* **37**, 438-446.
- Goodship, J. *et al.* (2000). Autozygosity mapping of a Seckel syndrome locus to chromosome 3q22.1-q24. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 498-503.
- Greenberg, RA. *et al.* (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.* **20**, 34-46.
- Hanada, K. *et al.* (2006). The structure-specific endonuclease Mus81/Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *EMBO J.* **25**, 492125-4932.
- Hinds, P.W. *et al.* (1990). Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell. Growth Diff.* **1**, 571-580.
- Howlett, N.G. *et al.* (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **297**, 606-609.
- Huang, TT., and D'Andrea, AD. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 323-334.
- Jazayeri, A. *et al.* (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biol.* **8**, 37-45.
- Kass, EM., and Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters* **584**, 3703-3708.
- Kato, M., *et al.* (2000). Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.* **45**, 133-137.
- Kee, Y. *et al.* (2009). Regulated degradation of FANCM in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes Dev.* **23**, 555-560.
- Kee, Y., and D'Andrea, AD. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* **24**, 1680-1694.
- Kennedy, R., *et al.* (2007). Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *J. Clin. Invest.* **5**, 1440-1449.
- Kim, J. *et al.* (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Biol Chem* **170**, 341-347.
- Kim, JM. *et al.* (2008). Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood* **111**, 5215-5222.
- Kim, J.M. *et al.* (2009). Inactivation of Murine Usp1 Results in Genomic Instability and a Fanconi Anemia Phenotype. *Developmental Cell* **16**, 314-320.
- Kim, Y. *et al.* (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genet.* **43**, 142-143.
- Kumaravel, S. *et al.* (1997). Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature* **389**, 187-189.
- Lavin, MF. (2008). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**, 7749-7758.
- Lee, S.B. *et al.* (2001). Destabilization of CHK2 by a Missense Mutation Associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Res.* **61**, 8062-8067.
- Lee, J. *et al.* (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 Checkpoint Clamp Regulates Interaction of TopBP1 with ATR. *J. Biol. Chem.* **282**, 28036-28044.
- Levitus, M. *et al.*, (2004). Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* **103**, 2498-2503.
- Levitus, M. *et al.*, (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet.* **37**, 934-935.
- Levran, O. *et al.* (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* **37**, 931-933.
- Li, J., and Stern, DF. (2005). Regulation of CHK2 by DNA-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **12**, 12041-12050.
- Lieber, MR. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181-211.
- Litman, R. *et al.* (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell.* **8**, 255-265.
- Liu, Q. *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448-1459.
- MacKay, C. *et al.* (2010). Identification of KIAA1018/FANL1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2. *Cell* **142**, 65-76.
- Marmorstein, LY. *et al.* (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13869-13874.
- Meetei, A.R. *et al.*, (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* **35**, 165-170.
- Meetei, A.R. *et al.* (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet.* **36**, 1219-1224.
- Meetei, AR. *et al.* (2005). A Human Orthologue of Archaeal DNA Repair Protein Hef is Defective in Fanconi Anemia Complementation Group M. *Nat. Genet.* **37**, 958-963.
- Mimori, M. *et al.* (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* **68**, 611-620.
- Mirchandani, KD. *et al.* (2008). The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair* **7**, 902-911.
- Miyachi, K. *et al.* (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* **121**, 2228-2234.
- Moreno-Herrero, F. *et al.* (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* **437**, 440-443.
- Niimi, A. *et al.* (2008). Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16125-16130.
- Nomura, Y. *et al.* (2007). Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication. *Genes Cells* **10**, 1111-1122.
- O'Driscoll, M. *et al.* (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 497-501.
- Pace, P. *et al.* (2010). Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science* **329**, 219-223.
- Peng, M. *et al.* (2007). The FANCI/MutL α interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *EMBO J.*

- 26, 3238-3249.
- Pichierri, P. and Rosselli, F. (2004). The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* **23**, 1178-1187.
- Pronk, J.C. et al. (1995). Localisation of the Fanconi Anemia complementation group A gene to chromosome 16q234.3. *Nat. Genet* **11**, 338-340.
- Reeves, W.H., and Shoeger, Z.M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J. Biol. Chem.* **264**, 5047-5052.
- Rogakou, EP. et al. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858-5868.
- San Filippo, J. et al. (2006). Recombination Mediator and Rad51 Targeting Activities of a Human BRCA2 Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **281**, 11649-11657.
- Shibata, A. et al. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* **30**, 1079-1092.
- Shieh, S. et al. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* **14**, 289-300.
- Sipley, J.D. et al. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7515-7519.
- Smogorzewska, A. et al. (2007). Identification of the Fanconi anemia (FANC) I protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for crosslink repair. *Cell* **129**, 289-301.
- Smogorzewska, A. et al. (2010). A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. *Mol. Cell* **39**, 36-47.
- Stewart, G.S. et al. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **99**, 577-587.
- Stiff, T. et al. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* **25**, 5775-5782.
- Strathdee, C.A. et al. (1992). Evidence for at least four Fanconi Anemia Genes including FACCon chromosome 9. *Nat. Genet* **1**, 196-198.
- Taniguchi, T. et al. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* **100**, 2414-2420.
- Taylor, A.M. et al. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* **258**, 427-429.
- Tibbetts, RS. et al. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* **13**, 152-157.
- Tibbetts, RS. et al. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* **14**, 2989-3002.
- Timmers, C. et al. (2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell.* **7**, 241-248.
- Traven, A., and Heierhorst, J. (2005). SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *BioEssays* **27**, 397-407.
- Trujillo, KM. et al. (1998). Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11 and p95. *J. Biol. Chem.* **273**, 21447-21450.
- Tuteja, N., et al. (1994). Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J.* **13**, 4991-5001.
- Varon, R. et al. (2007). Nijmegen breakage syndrome (NBS) due to maternal isodisomy of chromosome 8. *Am. J. Med. Genet.* **143A**, 92-94.
- Wang, S.S. et al. (1998). Alterations of the PPP2R1B Gene in Human Lung and Colon Cancer. *Science* **282**, 284-287.
- Wang, XZ. et al. (2007). Chk1-Mediated Phosphorylation of FANCE Is Required for the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3098-3108.
- Ward, I., and Chen, J (2001). Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress *J Biol Chem* **276**, 47759-47762.
- Wechsler, T. et al. (2011). Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature* **731**, 642-646.
- Xia, B. et al. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genet.* **39**, 159-161.
- Yaneva, M. et al. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* **16**, 5098-5112.
- Yuan, S-S F. et al. (1999). BRCA is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* **59**, 3547-3551.
- Zhang, R. et al. (2009a). Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16308-16313.
- Zhang, F. et al. (2009b). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.* **19**, 524-529.