



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**MODELADO DE LA RED DE REGULACIÓN DE LA  
APOPTOSIS EN ANEMIA DE FANCONI**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS  
DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Octubre 2016



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.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
EL MANTENIMIENTO DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA.....	11
LA ANEMIA DE FANCONI (AF).....	15
LA CLÍNICA DE LA AF.....	17
<i>Malformaciones congénitas</i> .....	17
<i>Alteraciones hematológicas</i> .....	18
<i>Predisposición a tumores sólidos</i> .....	19
EL DIAGNÓSTICO DE LA AF.....	20
FENOTIPO CELULAR AF.....	23
CHECKPOINT DEL CICLO CELULAR EN RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA.....	29
CHECKPOINT RECOVERY (CHKREC).....	33
APOPTOSIS INDUCIDA POR DAÑO AL DNA.....	36
MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE FALLA MEDULAR EN LA AF.....	37
LA BIOLOGÍA DE SISTEMAS Y EL MODELADO DE REDES DE REGULACIÓN.....	40
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	<b>48</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>50</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>53</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>54</b>
<b>MÉTODO</b> .....	<b>55</b>
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
MÉTODO DE LA FASE TEÓRICA.....	57
<i>Generación del modelo FA/BRCA SIMPLIFICADO (Rodríguez et al., 2015)</i> .....	57
<i>Análisis del modelo FA-APOPTOSIS como un sistema dinámico continuo</i> .....	65
MÉTODO EXPERIMENTAL LÍNEAS CELULARES.....	69
<i>Cultivos celulares</i> .....	69
<i>Tratamientos</i> .....	69
<i>Extracción de proteínas y Western Blot</i> .....	73
<i>Análisis estadístico</i> .....	77
MÉTODO EXPERIMENTAL CÉLULAS CD34+ CIRCULANTES.....	78
<i>Pacientes, muestras, determinación de inmunofenotipo y aislamiento de células CD34+</i> .....	78
<i>Ensayo de unidades formadoras de colonias</i> .....	78
<i>Ensayos de diferenciación hematopoyética</i> .....	79
<i>Evaluación de la apoptosis y del daño en el DNA</i> .....	80
<i>Análisis estadístico</i> .....	80
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>82</b>
INTERPRETACIÓN DE LOS MODELOS DE RED Y DE LAS SIMULACIONES DE LOS MODELOS.....	82
<i>Representación gráfica de los modelos de red</i> .....	82

<i>Interpretación de las simulaciones con un modelo discreto</i> .....	83
<i>Interpretación de las simulaciones con el modelo continuo</i> .....	84
LA RED FA/BRCA SIMPLIFICADA .....	85
DINÁMICA DEL MB DE LA RED FA/BRCA SIMPLIFICADA.....	86
LA RED FA-CHKREC.....	90
DINÁMICA DEL MB DE LA RED FA-CHKREC WILD TYPE.....	92
DINÁMICA DEL MB FA-CHKREC CON MUTANTES DEL CHECKPOINT O DEL CHKREC.....	94
DINÁMICA DEL MB FA-CHKREC EN LOS MUTANTES DE AF .....	94
LA RED FA-APOPTOSIS .....	103
DINÁMICA DEL MB DE LA RED FA-APOPTOSIS WILD TYPE .....	105
DINÁMICA DEL MB DE LA RED FA-APOPTOSIS EN LOS MUTANTES DE FACORE .....	107
CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CD34+ CIRCULANTES .....	130
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>141</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>158</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>161</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>171</b>

## RESUMEN

La vía FA/BRCA repara los enlaces covalentes cruzados en el DNA. Las mutaciones en esta vía producen anemia de Fanconi (AF), un síndrome con inestabilidad genómica espontánea e hipersensibilidad a agentes inductores de enlaces covalentes cruzados en el DNA, como la Mitomicina C; la AF se considera además el síndrome de falla medular hereditario más común. Actualmente, una de las hipótesis más aceptadas sobre el origen de la falla medular en la AF, es que sus células troncales y progenitoras hematopoyéticas acumulan daño no reparado en su DNA, lo cual conduce a la activación de la apoptosis y al agotamiento de la reserva de células troncales.

La AF también se caracteriza por una predisposición muy elevada al desarrollo de cáncer, sobre todo síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda y cáncer escamoso de cabeza y cuello. Estas características muestran que el funcionamiento correcto de la vía FA/BRCA es indispensable para mantener el equilibrio entre la muerte celular y la supervivencia celular. La AF es un ejemplo muy claro de la pérdida de dicho equilibrio, pues por un lado existe pérdida masiva de células debido a la acumulación de daño no reparado y por el otro, mayor presión de mantenimiento del tejido para las células sobrevivientes.

Debido a lo anterior, el estudio de la toma de decisiones entre la muerte celular por apoptosis o la supervivencia con daño genómico sub-lethal en un contexto hematopoyético y de deficiencia en la reparación del DNA es importante para

desarrollar estrategias que promuevan la hematopoyesis de los pacientes AF y para prevenir la aparición de clonas malignas. Sin embargo, la obtención para investigación de células troncales de médula ósea derivadas de pacientes con AF representa un conflicto ético y metodológico debido a su número escaso. Para sortear dicha dificultad, en este trabajo hemos recurrido a la biología de sistemas y a la búsqueda de mecanismos menos invasivos de obtención de células troncales AF. Este trabajo se dividió en tres etapas.

La primera etapa consistió en generar 3 modelos predictivos computacionales sobre el proceso de decisión entre supervivencia y apoptosis incorporando a la vía de reparación FA/BRCA, el *checkpoint*, el *checkpoint recovery* y la apoptosis. Con estos modelos estudiamos *in silico* el destino de las células AF cuando existe daño en su DNA y predijimos que los componentes del *checkpoint recovery*, como la fosfatasa WIP1, son indispensables para que las células AF se adapten al daño genómico sub-letal.

La segunda etapa consistió en demostrar experimentalmente la predicción de nuestro modelo y encontramos que las células AF tienen actividad basal de los componentes del *CHKREC*, lo cual permite ignorar la presencia de cromosomas rotos y promueve la supervivencia de estas células con daño sub-letal no reparado. Al bloquear químicamente a la fosfatasa WIP1 corroboramos nuestra predicción, pues la tasa de división y la entrada a mitosis de las células AF disminuyó y la apoptosis se incrementó.

La tercera etapa de este proyecto consistió en la búsqueda de fuentes menos invasivas de células troncales en las cuales fuera posible corroborar nuestras predicciones. En esta búsqueda detectamos a las células CD34+ circulantes, las cuales son células troncales y progenitoras hematopoyéticas que han dejado de residir en la médula ósea y que se encuentran en sangre periférica, sin administración de citocinas movilizadoras como el G-CSF. Detectamos que estas células se encuentran en números muy elevados circulando en la sangre periférica de los pacientes con AF, lo cual no había sido descrito en el campo de investigación de la AF, lo que vuelve a nuestro hallazgo muy relevante. Al realizar una caracterización de estas células, observamos que se encuentran en un estado pro-apoptótico, pero no han perdido su capacidad de diferenciación multi-linaje y de formación de colonias hematopoyéticas *in vitro*, lo cual podría deberse a que expresan ciertos componentes del *checkpoint recovery*. La detección de estas células es aún más relevante si se piensa en que constituyen una herramienta para analizar en ellas la toma de decisión del destino de las células troncales con AF y en específico para nuestro trabajo, permitirían validar las predicciones de nuestros modelados computacionales.



## **ABSTRACT**

The FA/BRCA pathway repairs DNA interstrand crosslinks. Mutations in this pathway produce Fanconi anemia (FA), a chromosome instability syndrome with hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents, such as MMC. FA is considered the most frequent bone marrow failure syndrome, which is presumably due to accumulation of unrepaired DNA damage in the hematopoietic stem and progenitor cells and to apoptosis activation in such cells. This behavior leads to withdrawal of the hematopoietic stem cell pool and severe deficiency of every blood cell lineage.

FA is also characterized by predisposition to cancer, mainly myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia and head and neck squamous cell carcinoma. These features show that the correct functioning of the FA/BRCA pathway is critical to preserve the equilibrium between cell death and survival. FA is a clear example in which this equilibrium has been lost, given that accumulation of unrepaired DNA damage conducts to massive cell lost and increased pressure for the remaining cells to preserve the tissue.

Given this background, the study of cell fate decisions between apoptotic cell death or survival with sub-lethal DNA damage in a hematopoietic and DNA repair deficiency contexts is important to develop strategies focused in the promotion of hematopoiesis and prevention of malignant clones emergence. However, the obtainment of FA bone marrow derived cells for research represents an ethical and

methodological concern given their scarcity. To avoid such a difficulty, in this work we have used a Systems biology approach and searched less invasive mechanisms for FA hematopoietic stem cells obtainment. This work has been divided in three stages.

In the first stage, 3 predictive computational models about the cell fate decision process between apoptosis and survival incorporating the FA/BRCA DNA repair pathway, the checkpoint, the checkpoint recovery and apoptosis were developed. By using these models we studied *in silico* the FA cell fate decision when DNA damage is present and predicted that the checkpoint recovery components, such as the WIP1 phosphatase, are necessary for adaptation of FA cells to sub-lethal genomics damage.

The second stage was focused into experimentally demonstrate the prediction of our modeling process. We found that FA cells have an increased basal activity of the *checkpoint recovery* components, which allows for the release of broken chromosomes and promotes the survival of FA cells with unrepaired sub-lethal DNA damage. The chemical inhibition of WIP1 corroborated our prediction, given that the division index and mitotic index diminished in FA cells, and the apoptotic rate increased.

The third stage of this project searched for less invasive sources of hematopoietic stem cells to corroborate our predictions. In this pursuit we detected the circulating CD34+ cells that are hematopoietic stem and progenitor cells that do not reside in

the bone marrow but circulate in the peripheral blood of FA subjects. In the FA context, the presence of circulating CD34+ cells has not been described; therefore our findings are relevant in the field. These cells are in a pro-apoptotic state and they have not lost their multi-lineage differentiation potential or their capability to form colonies *in vitro*, probably due to the expression of certain *checkpoint recovery* genes. The molecular characterization of these cells would allow in the future analyzing the cell fate decision process in FA hematopoietic stem cells and validating the predictions of our computational models.

# INTRODUCCIÓN

## EL MANTENIMIENTO DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA

Cada una de las células que componen el cuerpo humano recibe de decenas a miles de lesiones en su DNA por día (Lindahl and Barnes 2000). Estas lesiones deben ser reparadas o podrían bloquear los procesos normales de replicación del DNA y de transcripción génica. Si estas lesiones no son reparadas o si se reparan de manera incorrecta, conducen a la acumulación de mutaciones o a alteraciones cromosómicas a gran escala que pueden amenazar la viabilidad celular o la funcionalidad del organismo (Jackson and Bartek 2009). Algunas de las lesiones en el DNA pueden aparecer durante los procesos normales del metabolismo del DNA, tales como las bases mal apareadas que se introducen erróneamente en la secuencia de DNA durante el proceso de replicación del material genético (Jackson and Bartek 2009). El daño en el DNA también puede ser producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) que se originan como subproductos de la respiración oxidativa mitocondrial o a través de las reacciones REDOX con agentes ambientales (Valko, Rhodes et al. 2006). Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno también pueden ser producidas por los macrófagos y los neutrófilos en sitios de inflamación y de infección (Kawanishi, Hiraku et al. 2006). Estos compuestos químicos atacan al DNA y conducen a la formación de aductos y enlaces covalentes cruzados entre las dos hebras del DNA (ICLs, *interstrand cross links*); estas lesiones impiden el apareamiento correcto de bases, bloquean la replicación/transcripción, conducen a la pérdida de bases o producen rupturas

de hebra sencilla. Cuando dos rupturas de hebra sencilla se generan en proximidad, o cuando la maquinaria de replicación se encuentra una ruptura de hebra sencilla o ICLs procesados, se pueden formar rupturas de doble hebra (DSB, *double strand break*). Aunque los DSBs no ocurren tan frecuentemente como las otras lesiones mencionadas, son muy tóxicos y difíciles de reparar (Khanna and Jackson 2001).

Para combatir la amenaza que representa el daño en el DNA, las células cuentan con mecanismos para detectar la presencia de lesiones, señalar su presencia y promover su reparación, lo cual se denomina colectivamente como la *respuesta al daño al DNA (DDR, DNA damage response)* (Jackson and Bartek 2009). Dada la gran diversidad de lesiones que pueden aparecer en el DNA, se requiere de múltiples y variados mecanismos distintos de reparación. Mientras que algunas lesiones son revertidas directamente por alguna proteína reparadora, la mayor parte de las lesiones requieren para su reparación de una secuencia de eventos catalíticos mediados por múltiples proteínas (Jackson and Bartek 2009).

En la reparación de bases mal apareadas, la detección de los errores y de las inserciones/delecciones se corrige mediante la incisión de una de las cadenas de DNA seguida por la actividad de una polimerasa y de una ligasa (Jiricny 2006). En el sistema de reparación por escisión de bases (BER), la base dañada se reconoce por una glicosilasa de DNA que media la remoción de la base y es seguida por una nucleasa, una polimerasa y una ligasa que completan el proceso de reparación (David, O'Shea et al. 2007). El sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) reconoce las distorsiones en la doble hélice generadas por

errores en las bases y opera en dos sub-rutas, una que específicamente se encarga de reparar lesiones que bloquean la transcripción de genes y otra que repara el genoma de manera global (Hoeijmakers 2001). Algunas otras lesiones no son reparadas inmediatamente, sino que son sobrepasadas durante la replicación del DNA por polimerasas con requerimientos menos estrictos para el apareamiento de bases que las polimerasas canónicas de replicación del DNA. Estas polimerasas se conocen como polimerasas de síntesis translesión (Loeb and Monnat 2008).

Para la reparación de DSBs se han descrito dos mecanismos principales de reparación: la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) (Lieber 2008) y la reparación por recombinación homóloga (HRR, *homologous recombination repair*) (Filippo, Sung et al. 2008). En la NHEJ, la DSB se reconoce por la proteína KU70/80 que al unirse activa a la cinasa DNA-PKcs, lo cual conduce al reclutamiento y activación de enzimas procesadoras de los extremos del DNA, polimerasas y la DNA Ligasa IV. También existe una ruta de reparación de DSBs que es independiente de KU, y que está menos caracterizada, denominada MMEJ o unión alternativa de extremos y siempre resulta en deleciones. Aunque la NHEJ y la MMEJ son propensas a error, pueden operar en cualquier fase del ciclo celular (McVey and Lee 2008).

La HRR por su parte está restringida a la fase S y G2 del ciclo celular debido a que utiliza a una cromátida hermana como templado para llevar a cabo la reparación correcta del DNA. Aunque existen varias sub-rutas para la HRR, ésta siempre se inicia mediante la resección de los extremos del DSB por el complejo

exonucleasa MRN, compuesto por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 (MRN). El DNA de cadena sencilla generado se recubre por la proteína RPA y posteriormente se intercambia por la recombinasa RAD51. La hebra recubierta por RAD51 tiene la capacidad de invadir el templado no dañado con ayuda de la recombinasa RAD51 e interactuar fuertemente con las regiones de homología al sitio de la ruptura. Después de la acción de polimerasas, nucleasas, helicasas y otros componentes ocurre la ligación del DNA y la resolución de sustrato (Filippo, Sung et al. 2008). La HRR también se utiliza para reiniciar horquillas de replicación arrestadas y colabora en la reparación de ICLs, lo cual requiere a las proteínas de la vía FA/BRCA (este mecanismo se describirá a detalle más adelante) (Kennedy and D'Andrea 2005).

Los genes codificadores de varias de las proteínas mencionadas en los párrafos anteriores se encuentran mutados en varias afecciones humanas conocidas como síndromes de inestabilidad cromosómica, o síndromes de fragilidad cromosómica, y que se presentan en general de forma autosómica recesiva, tales como la ataxia telangiectasia, el síndrome de Nijmegen y la anemia de Fanconi (AF). Mucho de lo que se sabe acerca de los mecanismos de mantenimiento de la estabilidad genómica ha surgido a partir del estudio de estas enfermedades que tienen defectos en la respuesta al daño al DNA. Por lo tanto la investigación básica en estos síndromes es importante para entender los procesos biológicos que han evolucionado para mantener la estabilidad genómica y prevenir la aparición del cáncer.

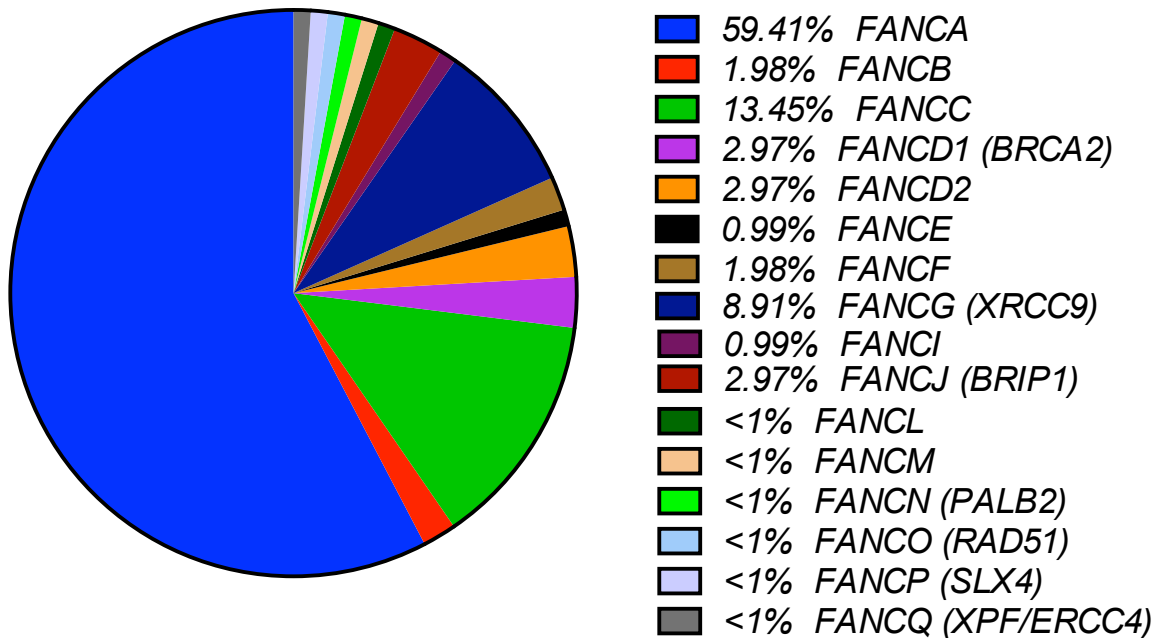
## **LA ANEMIA DE FANCONI (AF)**

Los defectos congénitos en la vía FA/BRCA conducen a la aparición de la anemia de Fanconi (AF). La AF es una enfermedad monogénica autosómica recesiva o ligada al cromosoma X que presenta heterogeneidad genética. A la fecha, se han encontrado 21 genes asociados a la AF; la deficiencia de algunos de estos genes produce un fenotipo claro de AF, mientras que otras mutaciones pueden producir fenotipos que no recuerdan la clínica clásica de la enfermedad (Tabla 1). El fenotipo AF se caracteriza por presentar malformaciones congénitas del sistema esquelético sobre todo radiales, falla progresiva de la médula ósea y predisposición a diferentes tipos de cáncer como leucemia mieloide aguda y tumores sólidos de origen epitelial. Aunque el diagnóstico de la enfermedad es complicado debido a la variabilidad fenotípica de los pacientes, el estudio de las aberraciones cromosómicas (AC) generadas por agentes inductores de ICLs 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 (García de Teresa, Rodríguez et al. 2016).



**Tabla 1. Genes involucrados en la Anemia de Fanconi.**

Tabla 1. Caracterización de Genes y Proteínas FANC				
Grupo de Complementación	Gen mutado	Peso molecular de la proteína (kDa)	Localización Cromosómica	Función
AF-A	<i>FANCA</i>	163	16q24.3	Complejo central
AF-B	<i>FANCB</i>	95	Xp22.31	Complejo central
AF-C	<i>FANCC</i>	63	9q22.3	Complejo central
AF-D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	380	13q12.13	Reclutamiento de RAD51, mediador de la RH
AF-D2	<i>FANCD2</i>	162	3p25.3	Forma un complejo con FANCI, es ubiquitinizado
AF-E	<i>FANCE</i>	60	6p21.22	Complejo central
AF-F	<i>FANCF</i>	42	11p15	Complejo central
AF-G	<i>FANCG/XRCC9</i>	68	9p13	Complejo central
AF-I	<i>FANCI</i>	140	15q25.16	Forma un complejo con FAND2, es ubiquitinizado
AF-J	<i>FANCI/BRIP1</i>	140	17q22-q24	Helicasa
AF-L	<i>FANCL/PHF9</i>	43	2p16.1	Complejo central ubiquitin ligasa
AF-M	<i>FANCM/Hef</i>	250	14q21.3	Helicasa. Localiza el complejo central al ADN
AF-N	<i>FANCN/PALB2</i>	130	16p12.1	Recombinación Homóloga
AF-O	<i>FANCO/RAD51C</i>	42	17q25.1	Recombinación Homóloga
AF-P	<i>FANCP/SLX4</i>	200	16p13.3	Endonucleasa. Potencia al factor E3 SUMO ligasa
AF-Q	<i>FANQ/XPF o ERCC4</i>	101	16p13.12	Endonucleasa
AF-R	<i>FANCR/RAD51</i>	37	15q15.1	Recombinación Homóloga
AF-S	<i>FANCS/BRCA1</i>	207	17q21.31	Recombinación Homóloga con E3 ubiquitin ligasa
AF-T	<i>FANCT/UBE2T</i>	23	1q32.1	Se conjuga con la enzima E2
AF-U	<i>FANCU/XRCC2</i>	32	7q36.1	Recombinación Homóloga
AF-V	<i>FANCV/REV7 o MAD2L2</i>	24	1p36	Síntesis translesión del DNA



**Figura 1. Distribución de las mutaciones en los genes *FANCA*.** El gen *FANCA* es el gen que se encuentra más comúnmente mutado en los pacientes con AF, es seguido por los genes *FANCC* y *FANCG*. Las mutaciones de estos 3 genes incluyen a aproximadamente el 80% de los pacientes con AF. El resto de los grupos se consideran raros.

## LA CLÍNICA DE LA AF

### Malformaciones congénitas

(Tomadas del libro *Fanconi Anemia: Guidelines for diagnosis and Management* Hays L, Frohnmayer D, Frohnmayer L, Guinan E, Kennedy T, Larsen K, editors. *Fanconi Anemia: Guidelines for for Diagnosis y Management. Fourth ed.* Eugene: *Fanconi Anemia Research Fund*; 2014).

Las principales manifestaciones congénitas de la AF incluyen malformaciones renales, malformaciones cardíacas, alteraciones del eje radial y talla baja. Hasta el 25% de los individuos con AF no presentan malformaciones congénitas, sin embargo, el resto nacen con una o más de estas malformaciones, lo cual puede orientar al diagnóstico desde edades muy tempranas.

En piel puede haber hiperpigmentación generalizada, manchas café con leche y

zonas hipo/hiper pigmentadas. Las alteraciones en cabeza y cara incluyen microcefalia, micrognatia, trigonocefalia, microoftalmia, microtia, sordera conductiva y atresia del oído.

En extremidades superiores las alteraciones incluyen ausencia de pulgar, pulgar hipoplásico, bífido, flotante o trifalángico. El radio puede estar ausente o hipoplásico y en manos la eminencia tenar puede ser hipoplásica o con el primer metacarpo ausente. Todas estas alteraciones en miembros superiores pueden ser unilaterales o bilaterales. En extremidades inferiores podemos encontrar sindactilia en los dedos de los pies y dedos anormales, así como dislocación congénita de la cadera.

En órganos internos hay alteraciones renales, gastrointestinales y cardíacas. Las alteraciones renales incluyen riñón ectópico, riñón en herradura, riñones hipoplásicos o displásicos, riñones ausentes, hidronefrosis o hidrouréter. En el tracto gastrointestinal puede presentarse atresia esofágica o duodenal, ano imperforado y fístula traqueo-esofágica. A nivel cardíaco se pueden detectar diferentes defectos estructurales cardíacos congénitos.

Las alteraciones gonadales incluyen en hombres hipogenitalismo, testículos no descendidos, hipospadias y microfalosomía; mientras que en mujeres puede presentarse hipogenitalismo, útero dividido y menstruaciones anormales.

### **Alteraciones hematológicas**

Las manifestaciones hematológicas de los pacientes con AF son de diversos tipos y pueden incluir citopenias simples o glóbulos rojos macrocíticos, anemia aplásica

(AA), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LMA). Usualmente la AA es el primer evento adverso de la AF y ocurre a una edad promedio de 7 años, mientras que el SMD y la LMA se pueden presentar a partir de la adolescencia y en los adultos jóvenes (Alter 2003, Alter, Greene et al. 2003, Rosenberg 2003, Rosenberg, Greene et al. 2003).

El riesgo relativo de desarrollar 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. Dado que el SMD y la LMA son enfermedades propias de la vejez, es indispensable descartar AF en niños o adultos jóvenes con SMD o LMA aunque no tengan antecedentes de AA (Alter 2003, Alter, Greene et al. 2003, Rosenberg 2003, Rosenberg, Greene et al. 2003).

### **Predisposición a tumores sólidos**

Los pacientes con AF presentan un riesgo muy elevado a desarrollar tumores sólidos (TS) en edades muy tempranas. Entre los TS más frecuentes en la población AF se incluyen el carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello y tumores del hígado. El riesgo de carcinoma de células escamosas es aún mayor en los pacientes que recibieron un trasplante de MO; mientras que los tumores de hígado se han asociado con las terapias de andrógenos que reciben los pacientes para promover la hematopoyesis. Aproximadamente el 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, Alter, Greene et al. 2003, Rosenberg 2003, Rosenberg, Greene et al. 2003).

## **EL DIAGNÓSTICO DE LA AF**

Para poder llegar al diagnóstico de la AF se han establecido varias pruebas diagnósticas complementarias entre sí. Estas pruebas se enlistan a continuación:

**Análisis de aberraciones cromosómicas.** Es la prueba diagnóstica estándar para determinar si un sujeto tiene AF. En este ensayo se cuantifica la cantidad de AC en las células de sangre periférica de un paciente después de cultivarlas con un mitógeno de células T y un agente inductor de ICLs como el DEB o la MMC. Se analizan entre 20 y 100 células y se reportan la frecuencia de aberraciones cromosómicas/célula y el porcentaje de células con AC (Auerbach 2009).

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 en este tejido el análisis de AC con el fin de evaluar la presencia de un probable mosaico somático (la presencia simultánea de células normales y células con AF). 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 (Auerbach 2009).

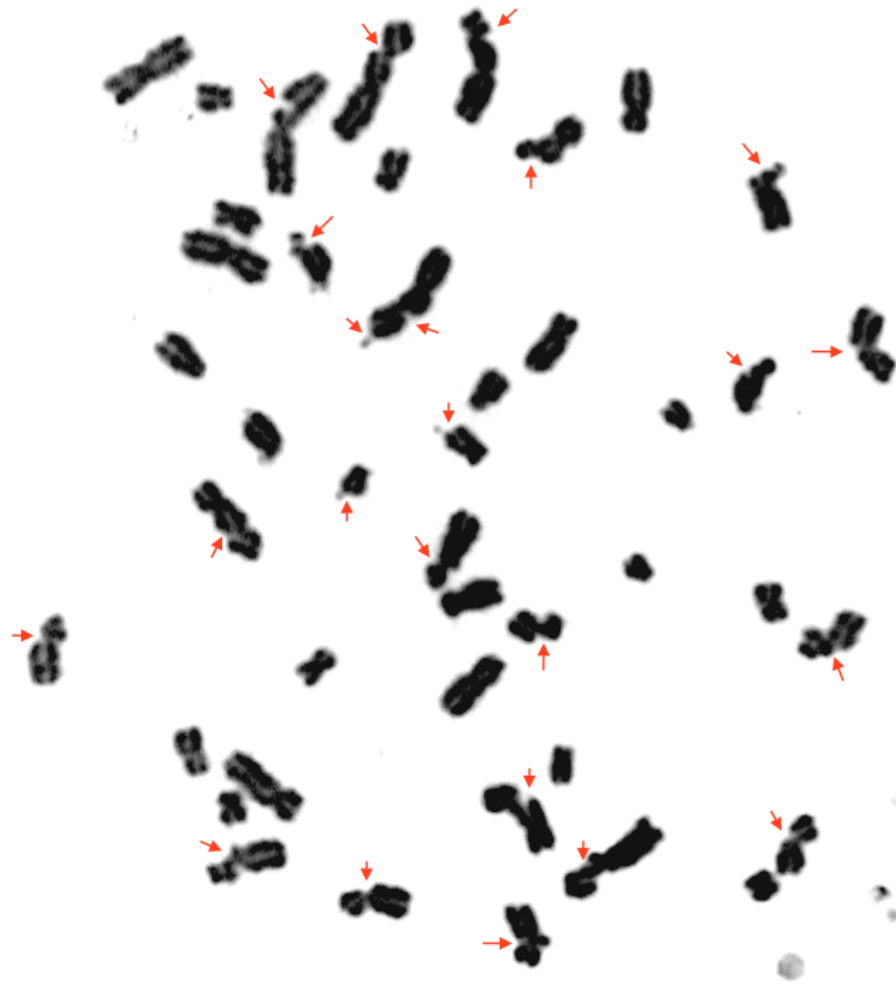
**Citometría de flujo.** Las células AF tienden a acumularse en la fase G2 del ciclo celular y este comportamiento se exagera después del tratamiento con MMC. La citometría de flujo se utiliza para detectar dicha acumulación, para hacerlo las células se tratan con 40 ng/ml de MMC durante tres días, se fijan y posteriormente

se tiñen con Yoduro de propidio. Una vez que las células se han teñido, se leen en un citómetro de flujo y se cuantifica el número de eventos con un contenido sencillo de DNA ( $2n$ ) y con un contenido doble de DNA ( $4n$ ). El primero corresponde a células en la fase G1 del ciclo celular y el segundo a células en la fase G2/M. En este ensayo las células normales no muestra acumulación en G2/M, mientras que en las células AF el número de células en G2/M se incrementa considerablemente. Esto permite discriminar entre sujetos con AF e individuos sanos.

A pesar de que la reparación del DNA es deficiente en las células AF, su *checkpoint* de G2 funciona adecuadamente y bloquea la progresión del ciclo celular. Se considera que dicho bloqueo permite a las células AF activar vías alternas de reparación del daño al DNA, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y disminuir la tasa de daño no reparado. La NHEJ se describirá con detalle más adelante.

**Análisis de monoubiquitinación de FANCD2 por Western Blot.** Después del daño al DNA, el complejo de proteínas río arriba, conocido como FA core (A, B, C, E, F, G, I, L y M), ubiquitina a la proteína FANCD2, formando una proteína más grande (D2-L), que puede distinguirse de la forma más pequeña no ubiquitinada (D2-S) en un Western Blot con un anticuerpo específico contra FANCD2. Cuando en los pacientes AF el defecto genético está río abajo de FANCD2 el Western Blot de FANCD2 no detecta a la proteína ubiquitinada. Esta prueba ayuda a discriminar si un sujeto con AF tiene mutaciones río arriba o río abajo en la vía FA/BRCA.

**Detección de mutaciones.** La determinación de la mutación específica en los genes AF es complicada debido a que existen muy pocas mutaciones génicas recurrentes y a que la mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos para la mayoría de las mutaciones. Para la detección de mutaciones en los genes *FANC* se requiere obtener una muestra del DNA del paciente, seguida por una estrategia combinada consistente en usar MLPA, microarreglos citogenéticos y secuenciación de nueva generación. El análisis de mutaciones generalmente no se usa para diagnóstico de la AF sino para confirmar los casos ya detectados, para establecer el grupo de complementación al que corresponden y en estudios de familias para determinar el estado de portador o afectado (Ameziane, Errami et al. 2008)



**Figura 2. Metafase con aberraciones cromosómicas.** Se muestra un ejemplo clásico de las aberraciones cromosómicas observadas en un paciente AF después de que sus células han sido expuestas a DEB. Las flechas señalan rupturas cromatídicas.

## FENOTIPO CELULAR AF

Además de la sensibilidad característica a los agentes inductores de ICLs y el arresto característico de la fase G2 (Dutrillaux, Aurias et al. 1982), otras características celulares de la enfermedad incluyen.

- Producción baja de Interleucina 6 (IL-6) (Rosselli, Sanceau et al. 1992)
- Hipersensibilidad al oxígeno, en especial a las especies reactivas de oxígeno



(ROS) (Joenje and Oostra 1983).

- Hipersensibilidad a la Hidroxiurea (HU) (Frias, Gomez et al. 1996).
- Acortamiento de telómeros (Leteurtre, Li et al. 1999).
- 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 (Mehta, Harris et al. 2010)
- Fenotipo pro-apoptótico. El fallo en la médula ósea de estos pacientes se ha relacionado con la producción excesiva de citocinas mielosupresoras como el TNF-alfa o el Interferón. (Rosselli, Sanceau et al. 1994)
- Hiperactivación de la vía de p53 y p21 (Ceccaldi, Parmar et al. 2012).

### **LA AF SE DEBE A DEFECTOS HEREDITARIOS EN LA VÍA FA/BRCA, UNA RUTA BIOQUÍMICA CRUCIAL EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA**

La vía FA/BRCA se requiere para la reparación de los enlaces covalentes cruzados que se establecen entre las dos hebras de DNA. Esta vía opera principalmente durante la fase S del ciclo celular y coordina varios pasos para la reparación de un ICL, los cuales incluyen: el reconocimiento del ICL, la incisión del ICL, el *bypass* del aducto generado y la reparación de una DSB por medio de HRR (Kottemann and Smogorzewska 2013). Cuando se reconoce el ICL se activan los *checkpoints* del las fases S y G2 del ciclo celular, lo cual da tiempo para que se lleve a cabo la reparación. Una vez que el daño ha sido reparado el arresto del

ciclo celular se libera gracias al proceso conocido como *CHKREC* y se permite la división celular (van Vugt and Medema 2004). En el caso contrario, cuando el daño en el DNA no es reparable, la célula activa la apoptosis (Roos and Kaina 2006). Estos procesos se describen a continuación y se explica como están interconectados

El ICL se reconoce inicialmente por la proteína FANCM, la cual se fosforila por la cinasa ATR, en complejo con las proteínas FAAP24, MHF1 y MHF2 (Gari, Decaillet et al. 2008). Una vez que FANCM se ha establecido en la cromatina funciona como una plataforma para que el complejo central de AF o *FACore* se una al sitio de la lesión (Kim, Kee et al. 2008), el complejo *FACore* está conformado por 14 proteínas FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, MHF1, MHF2, FAAP20 y FAAP24 y funciona como una ligasa E3 de ubiquitinas capaz de ubiquitinar al complejo FANCD2-I conformado por las proteínas FANCD2 y FANCI (Ceccaldi, Sarangi et al. 2016).

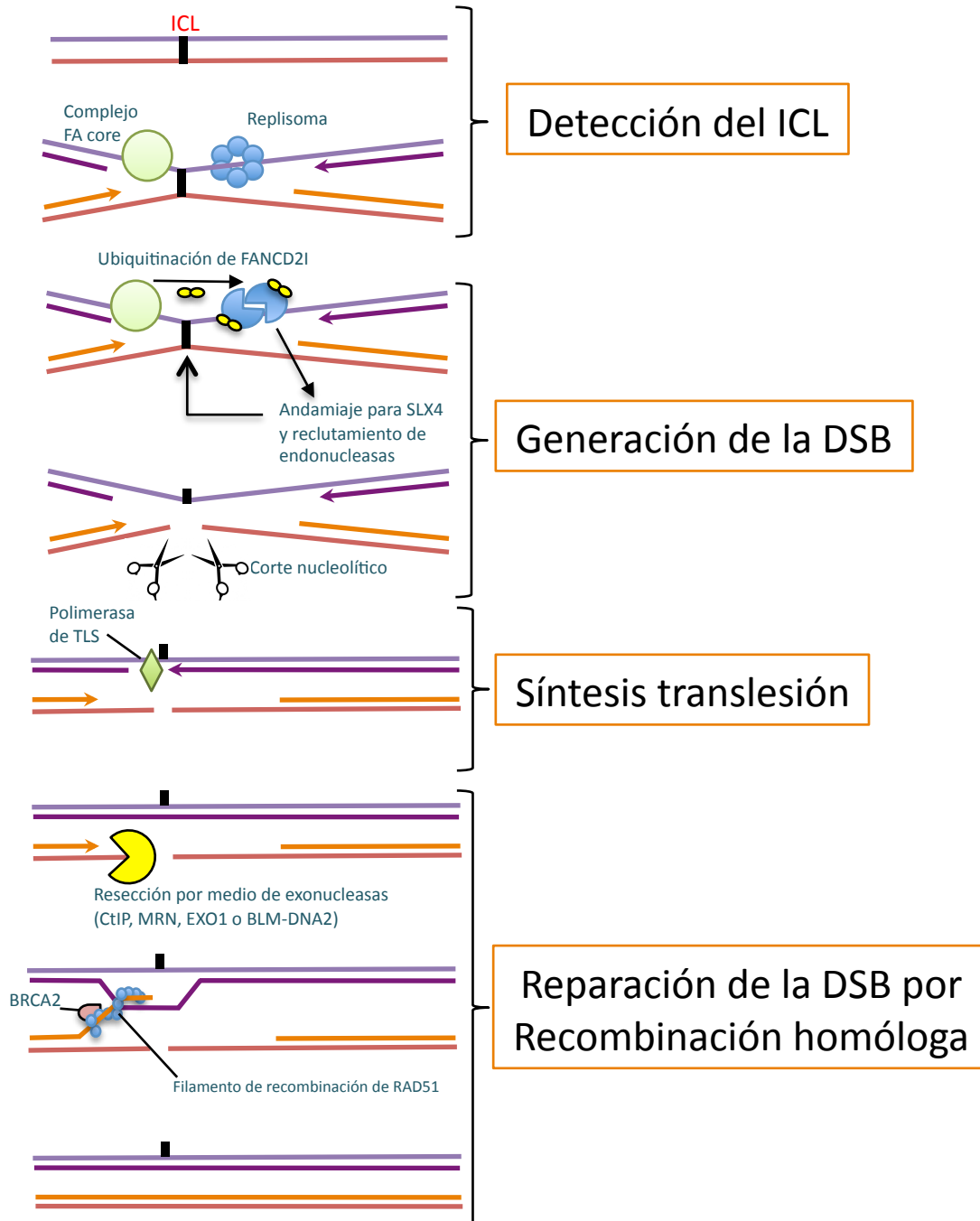
La activación del complejo FANCD2-I requiere dos modificaciones postraduccionales, una de ellas es una fosforilación llevada a cabo por ATR (Andreassen, D'Andrea et al. 2004), y la otra es la ubiquitinación llevada a cabo por el complejo *FACore* y su correspondiente enzima conjugadora de ubiquitinas UBE2T/FANCT (Hira, Yoshida et al. 2015). La monoubiquitinación de FANCD2-I es un proceso que puede ser revertido por la proteína USP1 en asociación con UAF1 (Nijman, Huang et al. 2005). Una vez que FANCD2 ha sido ubiquitinado funciona como un sitio de andamiaje para la proteína SLX4/FANCP (Yamamoto,

Kobayashi et al. 2011). Esta proteína funciona a su vez como un andamiaje adicional para varias endonucleasas específicas de estructura, entre las que se incluye al heterodímero ERCC4/XPF/FANCD1-ERCC1, MUS81-EME1 y SLX1, las cuales son capaces de cortar una hebra, a ambos lados de la lesión y desenganchar el ICL (Douwel, Boonen et al. 2014).

Cuando las endonucleasas desenganchan al ICL se generan un ADD y una DSB. Las polimerasas de síntesis translesión realizan un *bypass* del ADD al incorporar algunos nucleótidos justo enfrente de la lesión, un proceso que se conoce como inserción y posteriormente se realiza la extensión de la hebra naciente; de este modo se asegura la continuidad de la fase S del ciclo celular. Aunque la identidad de la polimerasa se desconoce actualmente, la extensión se sabe que se lleva a cabo por el complejo de síntesis translesión conformado por las proteínas REV1, REV3 y REV7, lo cual conduce al restablecimiento de la doble hélice de DNA. Esta nueva cadena será el templado de recombinación homóloga necesario para llevar a cabo la reparación de la DSB que aún queda sin reparar (McHugh, Sones et al. 2000, Gan, Wittschleben et al. 2008). El ADD que aún está presente será removido posteriormente por el sistema de reparación de NER.

La DSB generada durante el desenganche del ICL se repara por HRR (Knipscheer, Raeschle et al. 2009). Para que la HRR se pueda llevar a cabo se requiere que el DSB sea reseccionado por las exonucleasas de DNA, como el complejo MRN, CtIP y EXO1 (Roques, Coulombe et al. 2009, Murina, von Aesch et al. 2014), este procesamiento genera un saliente 3' de cadena sencilla que es

inmediatamente recubierto por subunidades de la proteína RPA. Las subunidades de RPA son posteriormente sustituidas por la recombinasa RAD51 que en asociación con BRCA2/FANCD1 y PALB2/FANCN promueven la formación del filamento pre-sináptico que es el encargado de llevar a cabo la invasión de la hebra homóloga para realizar la HRR (Taniguchi, Garcia-Higuera et al. 2002, Prakash, Zhang et al. 2015). Otras proteínas que también se requieren para el proceso de recombinación son el parólogo de RAD51 conocido como RAD51C/FANCO (Somyajit, Subramanya et al. 2012) y la proteína BOD1L (Higgs, Reynolds et al. 2015), las cuales son necesarias para la estabilización del nucleofilamento de RAD51 y para llevar a cabo una recombinación homóloga eficiente. FANCI/BRIP1 es una helicasa que se une a BRCA1 y ayuda a RAD51 en su estabilización, pero que lleva a cabo actividades adicionales a la recombinación homóloga (Peng, Litman et al. 2007). Después de la invasión de hebra mediada por RAD51 y la síntesis de reparación, la ligación de los extremos de la ruptura da origen a dos moléculas de DNA íntegras, lo cual completa la reparación del ICL mediada por la vía FA/BRCA.



**Figura 3. Modelo actual del funcionamiento de la vía FA/BRCA.** El ICL es reconocido durante la fase de síntesis del DNA, después de su desenganche se generan un aducto y una ruptura de doble hebra. El aducto es sobrepasado por la síntesis translesión y la ruptura es reparada por medio de recombinación homóloga.

La reparación por HRR es el mecanismo más fidedigno para restablecer la continuidad de la estructura de la molécula de DNA, por lo que durante el proceso

de reparación de los ICLs las proteínas de la vía FA/BRCA bloquean a la unión de extremos no homólogos (NHEJ), y aseguran así que la HRR será el único mecanismo que llevará a cabo la reparación del DSB generado a partir de un ICL. Esta inhibición es importante dado que la NHEJ, a pesar de ser la principal vía de reparación de DSBs a lo largo del ciclo celular, es propensa a error. (Adamo, Collis et al. 2010, Pace, Mosedale et al. 2010, Bunting, Callen et al. 2012, Howard, Yanez et al. 2015)

Cuando la NHEJ toma el control de la reparación de la DSB lo primero que ocurre es que la lesión se reconoce por el heterodímero KU70/KU80 y la proteína 53BP1 (Lieber 2010). KU70/80 aseguran los extremos de la ruptura y 53BP1 reprime la función de las proteínas de HRR, como FANCS/BRCA1 (Bunting, Callen et al. 2010). Ambas proteínas conducen la reparación de la DSB hacia la NHEJ para que sea reparada por ligación directa mediada por la cinasa DNA-PKcs, la nucleasa Artemis y el complejo Ligasa XLF-Lig4 (Lieber 2010).

## **CHECKPOINT DEL CICLO CELULAR EN RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA**

La progresión en el ciclo celular de la fase G2 a la fase M (G2/M) se promueve por el complejo Ciclina B/CDK1, también conocido como el *factor promotor de la mitosis*. La progresión G2/M es altamente vigilada por la célula, probablemente porque es la última oportunidad que la célula tiene para prevenir la transmisión de mutaciones a su progenie. Debido a lo anterior, la actividad de la cinasa CDK1 se

regula a múltiples niveles, pues la activación prematura de la cinasa CDK1 puede causar la entrada prematura a mitosis con consecuencias deletéreas (Lindqvist, Rodriguez-Bravo et al. 2009).

Cuando el DNA ha sido dañado se activa una cascada de bloqueo del complejo Ciclina B/CDK1. En el caso de ICLs, esta cascada de señalización se inicia con la cinasa ATR, continúa con la activación de su blanco de fosforilación CHK1 y culmina con la activación de la proteína p53 (Pichierri and Rosselli 2004)

p53 es una proteína reguladora maestra que cumple varias funciones, entre ellas funciona como un factor de transcripción que controla la expresión de un gran número de genes (Sengupta and Harris 2005, Vousden and Lane 2007, Zhang, Liu et al. 2009). En condiciones basales la cantidad de proteína de p53 se mantiene en niveles bajos a través de un asa de retroalimentación negativa con la ligasa de ubiquitinas MDM2. p53 activa la transcripción de MDM2, la cual a su vez regula negativamente a p53 al promover su ubiquitinación y degradación (Ciliberto, Novak et al. 2005, Batchelor, Mock et al. 2008)

p53 puede escapar de la degradación en varias situaciones de estrés, incluyendo daño en el DNA (Zhang, Liu et al. 2009, Zhang, Liu et al. 2011), cuando los sensores del daño modifican post-traduccionalmente su estructura e interrumpen su interacción con MDM2. Ciertas modificaciones en diferentes sitios de la proteína p53 sirven como un código para el tipo y severidad del daño al DNA, el

cual confiere a su vez especificidad para que p53 reconozca sus diferentes elementos de respuesta en la secuencia promotora de sus genes blanco (Mayo, Seo et al. 2005, Marouco, Garabadgiu et al. 2013). La elección del gen blanco a activar es por lo tanto dependiente de la cantidad de daño (Vousden and Lane 2007).

Las vías más importantes activadas por p53 conducen a la activación de genes involucrados en la reparación del daño al DNA, arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis (Oda, Arakawa et al. 2000, Moroni, Hickman et al. 2001, Nakano and Vousden 2001, Terui, Murakami et al. 2003, Chipuk, Kuwana et al. 2004, Zhan 2005, Marusyk, Wheeler et al. 2007, Rayess, Wang et al. 2012). En el contexto de la AF, donde el daño al DNA es una amenaza constante, la estabilidad de p53 es relevante dado que ha sido observado que p53 se sobre-activa en las células AF, por lo que estas células están permanentemente comprometidas al arresto del ciclo celular o la apoptosis (Ceccaldi, Parmar et al. 2012). p53 puede ser modificado por ATR y por CHK1 en la Ser15 produciendo p53S15 lo que activa la expresión de p21(*CDKN1A*), el principal bloqueador del complejo Ciclina B/CDK1 (Macleod, Sherry et al. 1995, Roninson 2002).

El bloqueo del ciclo celular también puede alcanzarse a través de las cinasas WEE1 y MYT1, las cuales inhiben directamente la formación del complejo Ciclina B/CDK1 al fosforilar a los residuos Thr14 y Tyr15 de la CDK1 (Watanabe, Arai et al. 2004); estas fosforilaciones pueden ser removidas por la fosfatasa CDC25



(Sanchez, Wong et al. 1997). Durante el *checkpoint* de la fase G2/M la actividad de la familia de fosfatasas CDC25 se reduce mientras la función de WEE1 se incrementa para prevenir la entrada a mitosis (van Vugt, Gardino et al. 2010).

Otros niveles de regulación sobre el complejo Ciclina B/CDK1 consisten en mantener bajos los niveles de la ciclina B durante la fase G1 del ciclo celular e incrementarlos gradualmente durante la fase G2, justo antes de que la célula necesite la actividad de CDK1 para promover la entrada a mitosis. Un nivel adicional de regulación es la inhibición directa que las cinasas WEE1 y MYT1 ejercen sobre CDK1 al fosforilar a los residuos de Thr-14 y Tyr-15. La remoción de estas modificaciones inhibitorias está controlada por miembros de la familia de fosfatasas CDC25, lo cual conduce a una activación rápida del complejo de Ciclina B/CDK1. Finalmente, la activación inicial de Ciclina B/CDK1 estimula la actividad de CDC25 e inactiva a WEE1, creando dos asas de retroalimentación, que resultan en un *switch* de activación de CDK1 (van Vugt, Gardino et al. 2010).

La activación de los puntos de monitoreo de la integridad del DNA en G2 conduce a un incremento en la actividad de WEE1 así como a la degradación de CDC25A (Mailand, Podtelejnikov et al. 2002), inhibición de CDC25B (Goldstone, Pavey et al. 2001) y secuestro en el citoplasma de CDC25C (Sanchez, Wong et al. 1997), todo lo cual contribuye a mantener la actividad de CDK1 en niveles bajos y prevenir la entrada a mitosis.

## CHECKPOINT RECOVERY (*CHKREC*)

Cuando el proceso de reparación del DNA se ha completado, los *checkpoints* se inactivan y la célula se divide. Varias fosfatasas y cinasas inactivan a los componentes del *checkpoint* y promueven la división celular (Batchelor, Mock et al. 2008, Shaltiel, Aprelia et al. 2014).

El complejo Ciclina B/CDK1 se reactiva gracias a la actividad de la familia de fosfatasas CDC25. Entre las cinasas que controlan el *CHKREC* se encuentra PLK1, cinasa que fosforila a varios componentes del checkpoint y componentes de la maquinaria de reparación del DNA, estas fosforilaciones funcionan como un marcaje para su degradación por parte del sistema  $\beta$ TrCP-ubiquitin proteosoma (Seki, Coppinger et al. 2008, van Vugt, Gardino et al. 2010).

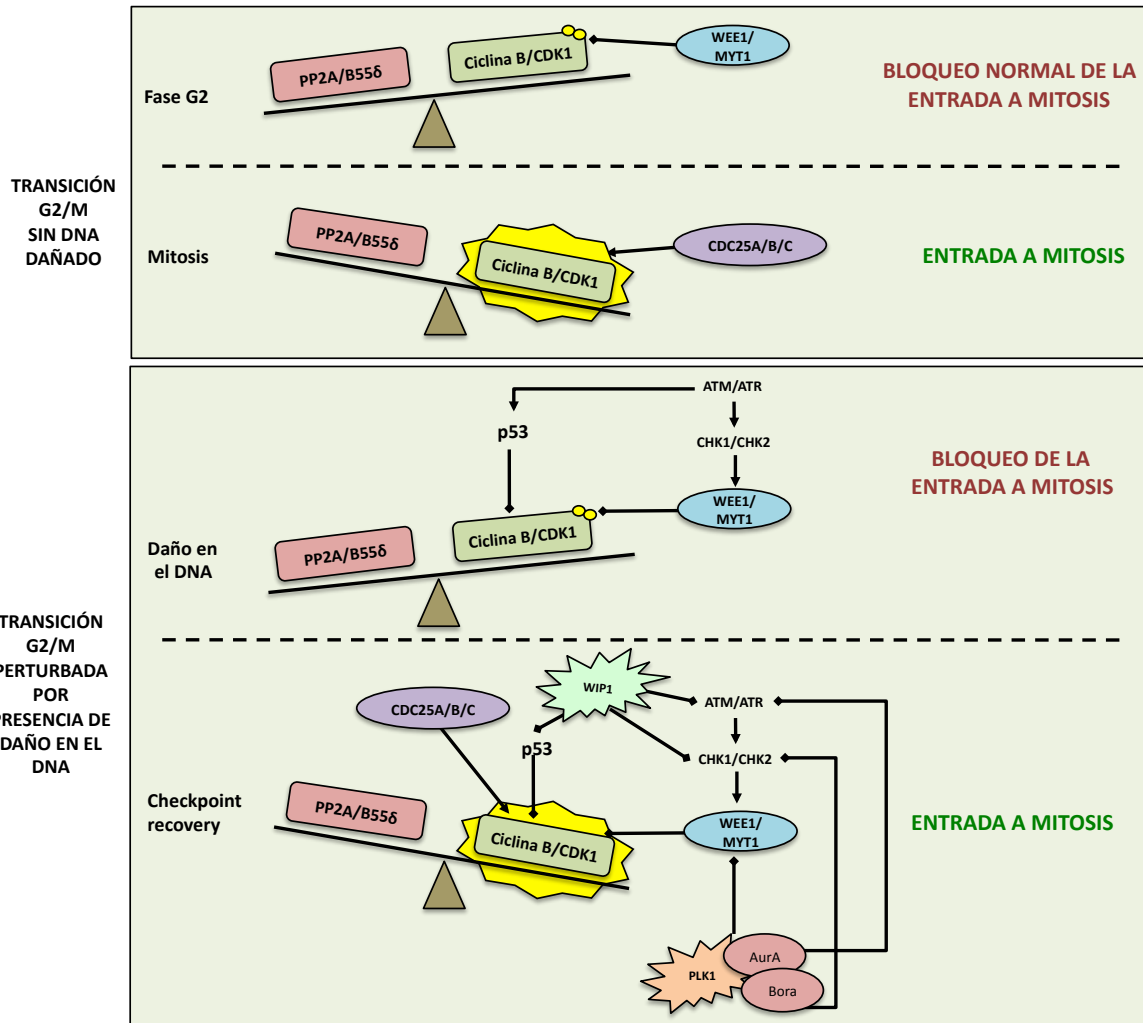
Entre los blancos de PLK1 se puede incluir a WEE1, Claspina, 53BP1, CHK2 y p53. Durante el *CHKREC*, PLK1 y sus activadores río arriba Aurora A y Bora se vuelven esenciales para re-entrar en el ciclo celular. Durante el *CHKREC* las células dependen de la actividad de PLK1, el cual hace blanco tanto de WEE1 como de Claspina (un cofactor esencial de CHK1) para enviarlos a degradación proteosomal (Mamely, van Vugt et al. 2006) (Watanabe, Arai et al. 2004, Mailand, Bekker-Jensen et al. 2006), (Peschiaroli, Dorrello et al. 2006). PLK1 también promueve la translocación nuclear de CDC25C (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi et al. 2002) e inhibe directamente a CHK2 y a 53BP1 (van Vugt, Gardino et al. 2010).

De manera interesante, la actividad de PLK1 es redundante cuando la entrada a mitosis no ha sufrido perturbaciones, pero se vuelve esencial para el CHKREC cuando el DNA ha sido dañado. La actividad de PLK1 se mantiene en niveles bajos después de la inducción de daño al DNA y alcanza su máxima activación durante el *CHKREC* (Smits, Klompaker et al. 2000). PLK1 se activa por la cinasa Aurora A en complejo con la proteína adaptadora Bora y es esencial para el CHKREC (Toczyski, Galgoczy et al. 1997). Se ha reportado que además del papel crítico que PLK1 tiene para el *CHKREC*, su homólogo en levadura es indispensable para la adaptación a daño irreparable (Vidanes, Sweeney et al. 2010); sin embargo, no se sabe si estas funciones también se encuentran en organismos multicelulares.

Aunque PLK1 es esencial para el CHKREC, no es suficiente, lo cual indica que existen mecanismos adicionales de control de la transición G2/M. Dado que las cascadas de respuesta al daño recaen primordialmente en cinasas que fosforilan sustratos múltiples, las fosfatasas se encargan de regular negativamente estas modificaciones y pueden colaborar en el apagado del *checkpoint* y promover la entrada a fase M. En mamíferos, varias fosfatasas participan en la inhibición de la DDR, entre estas, WIP1 juega un papel central porque reconoce de manera específica el motivo p(S/T)Q fosforilado por las cinasas ATR/ATM, lo cual le permite desfosforilar de manera eficiente a varios de los componentes de la DDR (Lu, Nguyen et al. 2008).

Aunque WIP1 desfosforila muchos blancos, quizá su blanco más relevante sea p53. La presencia de WIP1 contrarresta la función de p53 como un represor transcripcional de los factores inductores de mitosis y permite que los niveles de ciclina B y de PLK1 se mantengan en niveles apropiados para cuando sea tiempo de activar al CHKREC (Lindqvist, de Bruijn et al. 2009). WIP1 puede regular a p53 desfosforilando directamente a p53S15 y activando a la ligasa MDM2, la cual ubiquitina a p53, lo cual lo convierte en un blanco de degradación del proteosoma (Lu, Ma et al. 2007). WIP1 adicionalmente desfosforila a la histona  $\gamma$ H2AX (Cha, Lowe et al. 2010) y a las cinasas ATM (Lu, Nguyen et al. 2005) y CHK2 (Oliva-Trastoy, Berthouaud et al. 2007) con lo cual inactiva al *checkpoint*. Otras fosfatasas que colaboran con WIP1 son las fosfatasas PP2A-B55 (Mochida, Ikeo et al. 2009), PP4 y PP6 (Shaltiel, Aprelia et al. 2014).

De lo anteriormente expuesto es evidente que mantener controlada la transición entre el arresto y el re-inicio del ciclo celular es crítico dado que si este proceso falla se puede permitir la transición G2/M a células con DNA no reparado.



**Figura 4. Modelo de la transición G2/M y del funcionamiento del CHKREC.** Durante la fase G2 del ciclo celular el complejo Ciclina B/CDK1 se mantiene inactivado por las cinasas WEE1 y MYT1, para transitar a fase M, FOXM1 y CDC25 deben activar a este complejo. En caso de existir daño en el DNA, la transición a M es más estricta gracias a la actividad de CHK1/2 y de p53. Cuando el daño ha sido reparado, WIP1 y PLK1 toman el control e inactivan a los inhibidores del complejo Ciclina B/CDK1, esto permite la entrada a fase M (Imagen modificada a partir de Medema y Macurek, 2011).

## APOPTOSIS INDUCIDA POR DAÑO AL DNA

Además de activar genes cruciales para el arresto del ciclo celular como p21 (Macleod, Sherry et al. 1995), 14-3-3s (Aitken 2006) y GADD45 (Zhan 2005), el factor transcripcional p53 puede responder al daño genotóxico activando la

expresión de genes pro-apoptóticos como *PIG3*, *NOXA* (Terui, Murakami et al. 2003), *PUMA* (Nakano and Vousden 2001), *APAF1* (Moroni, Hickman et al. 2001), *FAS* (Owenschaub, Zhang et al. 1995) y *BAX* (Chipuk, Kuwana et al. 2004). Esto se logra cuando p53 es fosforilado en la posición Ser46, lo cual produce p53S46 (Mayo, Seo et al. 2005).

La fosforilación de este sitio activa la transcripción de genes relacionados con la apoptosis, mientras que mutaciones en este mismo sitio conducen a una disminución en la tasa de apoptosis inducida por p53 pero no influyen sobre la capacidad de arresto después de la inducción de daño en el DNA (Mayo, Seo et al. 2005). p53 inicia la apoptosis activando la expresión de varios componentes de la maquinaria apoptótica, lo cual es seguido de la permeabilización de la membrana mitocondrial y activación masiva de caspasas (Sengupta and Harris 2005, Vousden and Lane 2007). La actividad de las caspasas puede revertirse por las proteínas que inhiben a la apoptosis conocidas como IAPs (Deveraux, Takahashi et al. 1997, Deveraux, Roy et al. 1998).

## **MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE FALLA MEDULAR EN LA AF**

Los pacientes con AF tienen un riesgo muy elevado de desarrollar falla medular, lo cual conduce a pancitopenia durante la infancia y puede conducir a SMD durante la juventud. Actualmente el trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas es la mejor terapia para tratar estas manifestaciones de la enfermedad (Alter 2003, Alter, Greene et al. 2003, Rosenberg, Greene et al.

2003).

Aunque es claro que los defectos en la reparación del DNA son los causantes de la falla medular en la AF, se desconoce el mecanismo celular exacto por el cual estos defectos son capaces de afectar tan profundamente a las células troncales hematopoyéticas, que son las encargadas de mantener una médula ósea con producción adecuada de células sanguíneas (Garaycochea and Patel 2014, Ceccaldi, Sarangi et al. 2016).

Entre los agentes aceleradores de la falla medular se ha propuesto al alcohol y los aldehídos, los cuales son fuentes importantes de daño en el DNA, pues pueden formar aductos e ICLs en el material genético (Langevin, Crossan et al. 2011, Rosado, Langevin et al. 2011, Garaycochea, Crossan et al. 2012, Hira, Yabe et al. 2013). Se ha observado que estos agentes inducen falla medular en un modelo de ratón doble mutante *Fancd2<sup>-/-</sup>Aldh2<sup>-/-</sup>*, estos ratones tienen AF y son incapaces de metabolizar apropiadamente los aldehídos (Langevin, Crossan et al. 2011). Además, ciertas variants alélicas del gen *ALDH2* en la población humana japonesa se han asociado con una mayor predisposición a la pancitopenia (Hira, Yabe et al. 2013). En trabajos de otros grupos ha reportado que las células de los pacientes AF acumulan daño no reparado en su DNA y que activan la apoptosis en respuesta a hiper-activación de la vía de p53 y de p21 (Ceccaldi, Parmar et al. 2012), lo cual podría afectar el proceso hematopoyético desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Tulpule, Lensch et al. 2010).

Las células troncales hematopoyéticas expresan en su superficie el marcador

conocido como CD34, el cual no se encuentra en células terminalmente diferenciadas. De manera notable, la presencia de un cierto número de células CD34+ circulantes es relevante fisiológicamente para que pueda ocurrir hematopoyesis extramedular y además se ha observado que dichas células son capaces de reparar tejidos dañados (Cohen, Cheng et al. 2013). Sin embargo, el número total de células CD34+ circulantes podría alterarse en ciertas condiciones que estresen a la médula ósea (Heidt, Sager et al. 2014) y activen su liberación (Lapidot and Kollet 2010). Ciertas citocinas y mediadores de la inflamación podrían incrementar el número de células CD34+ circulantes (Bendall and Bradstock 2014); en adultos con SMD se han asociado niveles elevados de células CD34+ circulantes con una supervivencia global reducida y progresión de la enfermedad hacia AML (Fuchigami, Mori et al. 2000, Barosi, Viarengo et al. 2001, Cesana, Klersy et al. 2008).

Cada vez que una célula troncal hematopoyética entra a ciclo celular para generar una célula hija y una nueva célula troncal hematopoyética debe desprenderse de su nicho hematopoyético (Geiger, Koehler et al. 2007, Papayannopoulou and Scadden 2008). En condiciones de daño excesivo en el DNA, se ha propuesto que las células troncales podrían ser empujadas a diferenciarse aceleradamente, y esto podría conducir al agotamiento del *pool* hematopoyético (Wang, Sun et al. 2014, Walter, Lier et al. 2015). Este desprendimiento constante de células CD34+ que no son capaces de retenerse en su nicho hematopoyético podría generar un incremento en el número de células troncales hematopoyéticas circulando en sangre.



El desprendimiento de células CD34+ de su nicho hematopoyético también ha sido asociado con el envejecimiento, el cual es visto como un facilitador de su movilización en el torrente sanguíneo (Geiger, de Haan et al. 2013). En respuesta a la citocina GCS-F, las células troncales hematopoyéticas envejecidas se movilizan con mayor facilidad que las células troncales jóvenes, lo cual sugiere que la movilización de las células troncales asociada a envejecimiento se debe ya sea a un defecto intrínseco de la célula troncal hematopoyética que afecta su capacidad de adherirse apropiadamente a su nicho, o la incapacidad del nicho para retener a las células troncales hematopoyéticas (Geiger, Koehler et al. 2007). El envejecimiento está asociado además con acumulación de daño en el DNA (Beerman, Seita et al. 2014), así como con un microambiente inflamatorio en la médula ósea (Schuettpeitz and Link 2013). La acumulación de daño, la inflamación y la predisposición a SMD son características típicas de la AF, por lo tanto un desprendimiento acelerado de las células CD34+ de su nicho parecería plausible en los pacientes con AF.

En la AF no se ha demostrado el desprendimiento de células CD34+ de su nicho hematopoyético o su presencia en sangre periférica, por lo que de encontrarlas, aportaría conocimiento a la biología de la AF y adicionalmente, estas células CD34+ serían un modelo celular apropiado para estudiar los mecanismos que conducen a falla medular, los mecanismos apoptóticos y los mecanismos de resistencia a daño en el DNA no reparado.

## **LA BIOLOGÍA DE SISTEMAS Y EL MODELADO DE REDES DE REGULACIÓN**

Con el crecimiento acelerado de información sobre los sistemas biológicos ahora es necesario utilizar modelos computacionales para entender las propiedades dinámicas de dichos sistemas. Afortunadamente, las herramientas computacionales actuales nos han acercado más al punto en el que ya es posible estudiar la complicada red de interacciones que controlan la expresión génica y las cascadas de señalización intracelulares a través de modelos computacionales que integran una gran cantidad de conocimiento. Podemos además, estudiar el comportamiento dinámico de una red de regulación como un todo, sin tener que estudiar cada uno de sus componentes por separado y con esto podemos conocer las propiedades emergentes del sistema, las cuales permanecerían ocultas si se recurriera al estudio aislado de cada uno de los componentes de dicho sistema.

Actualmente el modelado de redes de regulación genética y molecular permite incorporar toda esta información de manera concisa y tiene un potencial muy alto para predecir blancos de medicamentos y para estudiar las deficiencias moleculares que subyacen ciertas enfermedades. Debido a esto, el desarrollo de modelos matemáticos que describen las interacciones complejas entre los genes y sus reguladores es un área creciente en la investigación que está recibiendo un gran impulso (Xiao 2009).

Dichos modelos matemáticos se basan en el hecho de que el funcionamiento de una célula o de una unidad de organización biológica puede estudiarse si se conceptualiza o entiende como un sistema de elementos que interactúan con ciertas reglas y patrones. Esta aproximación matemática integra en un modelo computacional el conocimiento actual del sistema que se está estudiando y puede

proveer nuevas ideas y predicciones sobre el sistema de estudio (Albert 2007). Sin embargo, entre las limitaciones de estos modelos se encuentra su esencia reduccionista, con lo cual ciertas interacciones importantes podrían llegar a perderse en búsqueda de la simplicidad.

Para poder construir uno de estos modelos matemáticos es necesario que se cumplan ciertos requisitos, como: 1) conocer la identidad de los componentes que constituyen el sistema biológico que se quiere modelar; 2) 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); y 3) conocer las interacciones entre todos estos componentes.

Una vez que se tiene la certeza de que nuestro sistema de interés tiene las características deseables para ser modelado, se puede recurrir a dos aproximaciones de modelado bien definidas. La primera aproximación se conoce como *top-down* y usa datos obtenidos a partir de tecnologías de generación masiva de datos, como microarreglos o secuenciación de nueva generación, para identificar nodos candidatos y proponer las interacciones entre ellos; la segunda aproximación se conoce como *bottom-up*, e 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. La topología, o forma/estructura, de las redes inferidas con la segunda aproximación es muy certera.

Dentro de la aproximación *bottom-up* se puede incluir a los modelos dinámicos discretos o Modelos Booleanos (MB), los cuales estudian las interacciones de los nodos de la red (genes, proteínas o moléculas) a través de reglas lógicas matemáticas que indican como cambia el estado de activación de cada nodo en respuesta a los cambios en los estados de sus reguladores positivos y negativos. Dichos nodos pueden tomar dos posibles valores de activación: 1 o 0 (ON/OFF), que representan a su vez a los estados: activo/inactivo, presente/ausente, transcrito/no transcrito. Las reglas de activación de cada uno de estos nodos se escriben utilizando los conectores lógicos AND, OR y NOT (Assmann and Albert 2009). AND se utiliza cuando más de un componente se requiere para la activación del nodo de interés, OR se utiliza para indicar que puede requerirse de uno u otro componente y NOT se utiliza para indicar una inhibición.

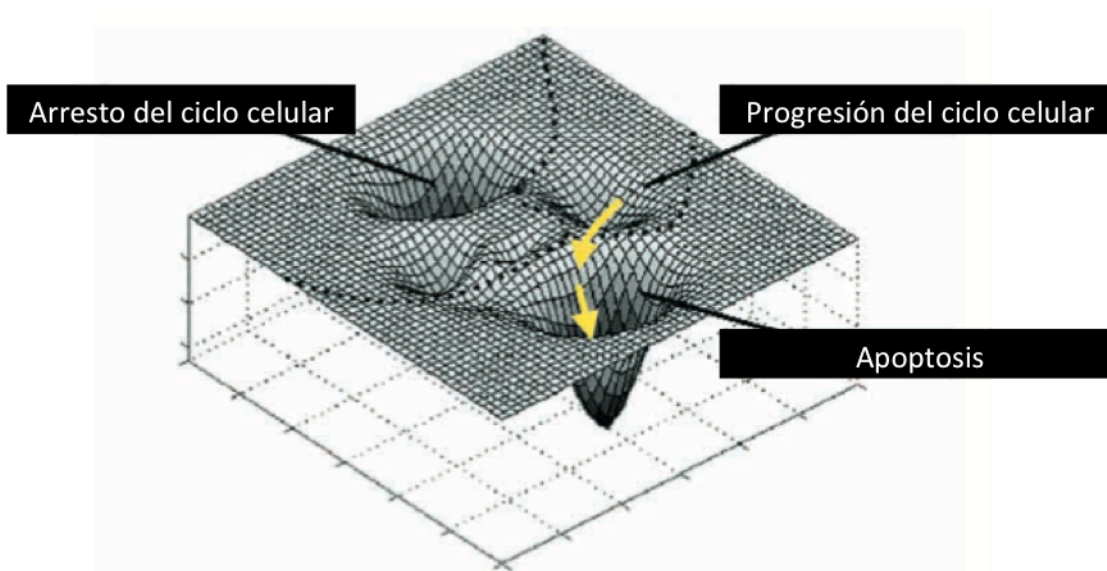
La característica cualitativa básica y más atractiva de un MB es el número y el tipo de atractores que se pueden encontrar durante el proceso de modelado. Las simulaciones con estos modelos siempre tienen un estado inicial y llegan a un determinado atractor o estado estable del sistema, que es aquella combinación de estados de activación de nodos en los que el sistema de estudio se estabiliza. Todos los estados iniciales que conducen al mismo atractor se conocen como la cuenca de atracción de dicho atractor, mientras que la secuencia de estados conectados por transiciones (estados transitorios) a partir de un estado inicial hasta llegar a un estado estable, se consideran las trayectorias del sistema o los caminos para llegar al atractor (Albert 2007).

Un MB que captura apropiadamente el comportamiento observado

experimentalmente permite al investigador identificar cambios en el comportamiento del sistema debido a perturbaciones e identificar condiciones en las que la dinámica del sistema se modifica. Esto incluye, cambios en el número y tipo de atractores obtenidos o cambios en las trayectorias para llegar a un determinado atractor.

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; 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, no requieren datos cuantitativos y su estructura basada en reglas lógicas posee significado físico y biológico (Xiao 2009).



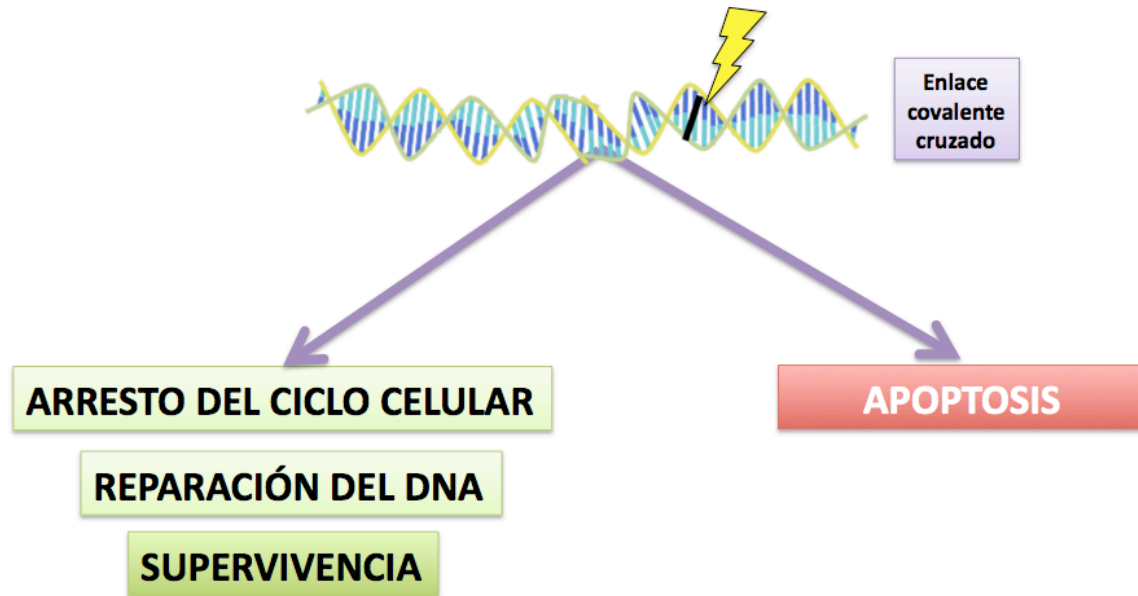
**Figura 5. Representación hipotética del paisaje de atractores a los que puede llegar una célula después de recibir daño en su DNA.** Cada posición en el plano XY corresponde a un estado de la red, y el eje vertical Z representa la distancia entre un estado específico de la red y un atractor. Los estados de una red pueden no ser estables, por lo que el sistema se dirigirá hacia un estado estable, conocido también como atractor. En este caso en particular, los puntos más profundos de los valles representan los destinos celulares, las flechas amarillas indican el camino que la célula toma para llegar, en este caso, al atractor de la apoptosis. Las cuencas de atracción de estos estados estables se pueden apreciar fácilmente en esta imagen como las laderas que conducen a los puntos más profundos de los valles, estas laderas representan las cuencas de atracción de un estado estable (Imagen modifica de (Ingber 2003).

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, Thieffry et al. 1999), el proceso de diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Mendoza 2006), el control del ciclo celular de los mamíferos (Faure, Naldi et al. 2006), el proceso de sobrevivencia de las células malignas en leucemia (Zhang, Shah et al. 2008, Zhang, Loughran et al. 2010) y más recientemente se han modelado la viabilidad de las mutantes de *S. pombe* (Davidich and Bornholdt 2013) y la determinación del sexo gonadal en humanos (Rios, Frias et al. 2015).

Debido a lo anterior, un MB del proceso de decisión celular en respuesta a daño del tipo ICL puede ser de gran utilidad para realizar predicciones sobre el comportamiento de las células AF; estas predicciones pueden funcionar como hipótesis de trabajo experimental. 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 (Figura 6). Esta tolerancia al daño podría estar mediada por vías alternas de reparación y de sobrevivencia celular independientes total o parcialmente de la vía FA/BRCA, lo cual implica cambios en los atractores del sistema o en las trayectorias para llegar a un determinado atractor, como la muerte celular o la supervivencia para continuar el ciclo celular. Con todo esto, el sistema de estudio adquiere mayor complejidad para ser entendido.

Para abordar este problema, en este trabajo se han desarrollado una serie de MB enfocados en el estudio de la toma de decisiones en las células AF después de haber recibido daño en su DNA. Se ha analizado de modo integral la vía FA/BRCA y como puede estar conectada con los procesos apoptótico y de sobrevivencia, para generar predicciones sobre los mecanismos de tolerancia cuando el DNA esta dañado. En este trabajo, se ha seleccionado al grupo AF-A, para hacer algunas corroboraciones experimentales cualitativas de las predicciones obtenidas con nuestros MB, debido a que el 65% de los pacientes AF, pertenecen a este grupo. El grupo FA-A tiene mutaciones en el gen *FANCA* y en nuestros modelos

está representado dentro del nodo FAcCore.



**Figura 6. Probables rutas de respuesta al daño en el DNA.** Cuando una célula enfrenta daño en su material genético tiene dos opciones, si el daño es tolerable y reparable recurre al arresto del ciclo celular, lo repara y continúa con su ciclo celular; en cambio cuando el daño no es reparable se activa la apoptosis.



## **ANTECEDENTES DIRECTOS**

Nuestro grupo de trabajo es experto en el estudio citogenético y molecular de la AF y nos hemos dedicado a tratar de entender las consecuencias del daño genotóxico en sus células. Ahora estamos interesados en obtener una aproximación global sobre las consecuencias de este defecto de la reparación del DNA y hemos abordado su estudio por medio de la Biología de sistemas, lo cual nos ha permitido acoplar herramientas computacionales y experimentales para obtener predicciones que a su vez pueden considerarse nuevas hipótesis de trabajo para el laboratorio. La generación de estas hipótesis computacionales nos ha permitido enfocar nuestra investigación en ciertas rutas o proteínas específicas.

El primer ejemplo de un MB para la vía FA/BRCA ha sido desarrollado por nuestro grupo de trabajo (Rodriguez, Sosa et al. 2012), con este MB hemos obtenido predicciones sobre las posibles vías alternas de reparación y tolerancia al daño al DNA en las células con AF, nos ha permitido también enfocar nuestro trabajo experimental y hemos encontrado que la liberación del arresto de G2, es muy importante en la tolerancia que pueden tener las células AF al DNA dañado y sin reparar.

Nuestros resultados han corroborado que las células con AF se arrestan en la fase G2 del ciclo celular después de ser tratadas con agentes inductores de ICLs, sin embargo eventualmente pueden ser liberadas de este arresto y dividirse con una

gran cantidad de daño no reparado. Hasta la fecha se considera que los puntos de bloqueo del ciclo celular o *checkpoints*, funcionan apropiadamente en las células con AF, sin embargo no se sabe como es que estos puntos de bloqueo pueden ser ignorados, permitiendo que la célula finalmente se divida a pesar del daño.

Es posible que la activación del *CHKREC* mediado por la activación de las proteínas WIP1, Ciclina A2, Ciclina B1 y PLK1, este implicada en el escape del bloqueo; el *CHKREC* podría mediar la sobrevivencia de células con daño en el DNA sin reparar, lo cual es crucial no sólo en la AF sino en el progreso de la carcinogénesis. La otra cara de la moneda es el proceso apoptótico, las células con daño en su DNA que no activan el *CHKREC* o un proceso similar, podrían entrar en apoptosis mediada por el factor transcripcional p53. Sin embargo, aún se sabe muy poco sobre cómo la vía FA/BRCA está involucrada en este proceso de decisión.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios moleculares de la falla medular en la AF han sido limitados y la relación entre la vía FA/BRCA y la decisión celular entre sobrevivencia y apoptosis ha sido muy poco estudiada debido a que:

a) los modelos animales experimentales no reproducen adecuadamente el fenotipo de la AF.

b) el material celular derivado de sangre periférica y de médula ósea de los pacientes con AF es insuficiente, por lo que se convierte en un serio problema de laboratorio trabajar con pocas células, o bien en un problema ético obtener una mayor cantidad de material biológico de pacientes pancitopénicos para investigación.

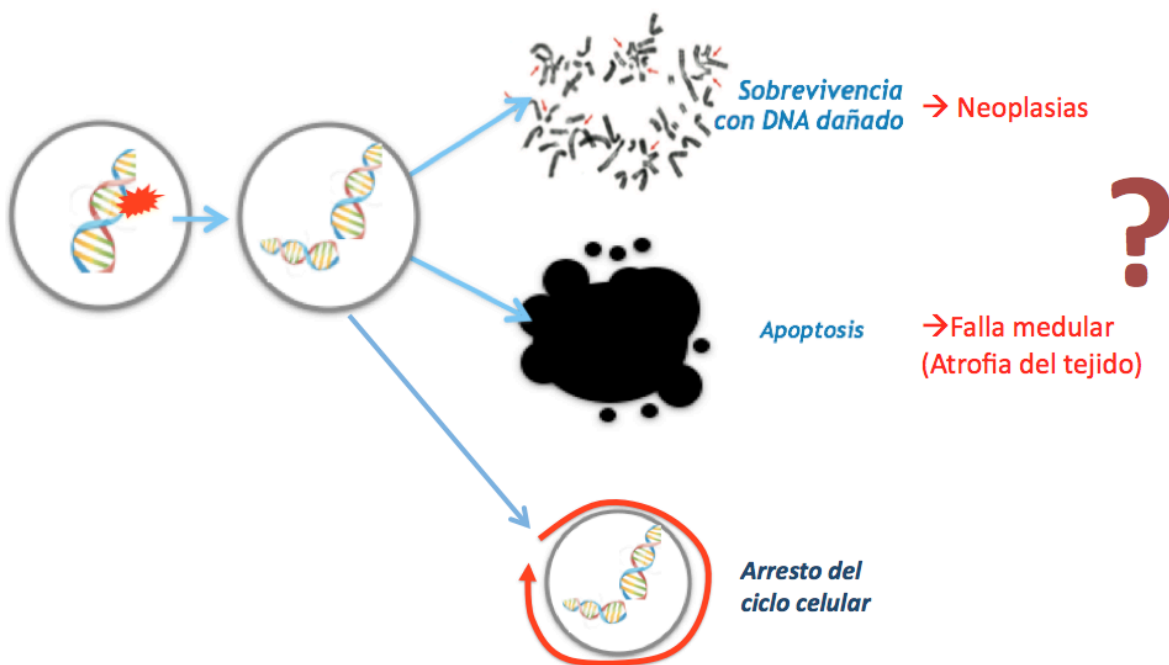
c) los procesos de daño y reparación del DNA así como de apoptosis son sumamente amplios y complejos y aún más cuando se estudia su interacción.

Por lo anterior consideramos que apoyarse en la generación de modelos predictivos computacionales, será de gran utilidad para obtener predicciones experimentalmente verificables sobre el proceso apoptótico en la pancitopenia de la AF y de tolerancia al daño en el DNA en el proceso de inestabilidad genómica y cáncer. De este modo nuestros modelos nos permitirán enfocar nuestra

investigación y optimizar el trabajo de laboratorio para aportar conocimiento sobre la decisión de las células hematopoyéticas AF entre la muerte celular dependiente del daño en el DNA y la supervivencia celular con inestabilidad genómica.

## JUSTIFICACIÓN

Se sabe que las células normales pueden conservar un genoma sano gracias a sus mecanismos de detección y respuesta al daño, tales como la reparación del DNA y la apoptosis. Ambos mecanismos están íntimamente relacionados por lo que la interrupción de su comunicación puede conducir a que las células sobrevivan con daño genómico sub-lethal o a la activación masiva de la apoptosis. Aunque cierto de nivel de tolerancia al daño podría no implicar el desarrollo de una enfermedad, la recurrencia de dicho evento, como en la AF, puede permitir el desarrollo de cáncer, mientras que la apoptosis masiva puede conducir a atrofia tisular (Figura 7).



**Figura 7. El fenotipo AF se debe a la toma de decisiones celulares en respuesta al daño, esto puede ser estudiado mediante el modelado de redes de regulación.** Modelar la red de regulación que conecta a la vía FA/BRCA con la respuesta al daño y el destino celular nos permitirá estudiar los procesos que regulan la toma de decisiones celulares cuando el DNA ha sido dañado y no es reparable.

Debido a esto la AF, una mutante natural, es un excelente modelo biológico para estudiar la conexión entre la reparación de los ICLs en el DNA y las vías que conducen a la muerte celular en diferentes estirpes celulares, incluido el hematopoyético. Por lo tanto, su estudio no sólo generará información útil para entender la biología de la AF, sino también para entender los procesos normales de detección y respuesta al daño, así como la hematopoyesis normal y patológica.

La aproximación por biología de sistemas permite combinar a la biología computacional y el trabajo experimental para entender el fenómeno biológico que nos interesa, en este caso la reparación del DNA asociado a muerte o sobrevida celular y su relación con la hematopoyesis.

## **HIPÓTESIS**

**HIPÓTESIS EXPERIMENTAL No. 1:** Los componentes del CHKREC están activos en las células AF y generan un umbral de tolerancia que les permite dividirse con daño no reparado

**HIPÓTESIS EXPERIMENTAL No. 2:** las células AF requieren de WIP1, un componente central del CHKREC, para sobrevivir al daño no reparado.

## OBJETIVO GENERAL

Utilizar una aproximación por Biología de sistemas para estudiar el proceso de decisión celular en respuesta a daño al DNA en células normales y células con fenotipo AF.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Generar el modelo predictivo computacional FA-APOPTOSIS para estudiar el proceso de decisión celular entre supervivencia y apoptosis en respuesta a daño al DNA.
- 2) Corroborar *in vitro* las predicciones generadas con el modelo FA-APOPTOSIS sobre el proceso de decisión celular entre supervivencia y apoptosis, en células linfoblastoides con fenotipo AF y daño en el DNA.
- 3) Determinar la presencia de células CD34+ circulantes en pacientes con AF y analizar *in vitro* sus características basales y de respuesta de daño al DNA en el proceso de la hematopoyesis (o en el proceso de diferenciación hematopoyética)

# MÉTODO

## ***DISEÑO EXPERIMENTAL***

1. Para alcanzar el **1er objetivo específico** se analizó exhaustivamente la literatura científica internacional referente a la vía FA/BRCA, el CHKREC y la apoptosis. Se generaron tres MB para analizar la conexión entre estos procesos. Primero se simplificó el modelo FA/BRCA (Rodriguez, Sosa et al. 2012) y se obtuvo el modelo FA/BRCA *simplificado* (Rodriguez, Torres et al. 2015); posteriormente se generó el modelo FA-CHKREC, el cual incorporó a la vía FA/BRCA y el CHKREC para estudiar el proceso de adaptación de las células AF al daño y finalmente se desarrolló el modelo FA-APOPTOSIS para estudiar el proceso de toma de decisión entre supervivencia y muerte celular después de que las células AF han sido expuestas a daño en el DNA. Con los diferentes modelos se realizaron simulaciones con iteración exhaustiva de diferentes condiciones de exposición a ICLs en la red *wild type* y en diferentes mutantes nulas. Esto permitió la generación de predicciones sobre el comportamiento de las células AF.
2. Para alcanzar el **segundo objetivo específico** se estudió en las líneas celulares linfoblastoides NL49, NL53 (vía FA/BRCA funcional) y VU817 (*FANCA*<sup>-/-</sup>) una de las predicciones obtenidas en el proceso de modelado. Entre las predicciones relevantes encontramos que la fosfatasa WIP1, un



componente del CHKREC, es necesaria para la supervivencia de las células AF con daño no reparado, por lo que su inhibición activaría la apoptosis en estas células. Primero se evaluó la respuesta de las células a diferentes concentraciones del inductor de ICLs MMC y se cuantificó la activación de la apoptosis y la capacidad de supervivencia al daño no reparado en el DNA. Posteriormente se seleccionó una dosis que permitiera la supervivencia de las células AF con daño no reparado y se inhibió en estas condiciones a la fosfatasa WIP1 para determinar si su bloqueo activa la apoptosis de las células AF. Aunque esta inhibición ya ha sido reportada previamente en otros tipos celulares, no se ha reportado en el contexto de la AF.

3. Para alcanzar el **3er. objetivo específico** se determinó por citometría de flujo la cantidad de células CD34+ en la sangre periférica de los pacientes con AF, dichas células se aislaron y se determinaron *in vitro* sus potenciales de proliferación y de diferenciación, así como su estatus con respecto a apoptosis y daño en el DNA. Además se evaluó el perfil de expresión génica en respuesta al daño mediante arreglos de PCR de la vía de p53 y la estructura de su genoma mediante microarreglos de citogenética.

## **MÉTODO DE LA FASE TEÓRICA**

### **Generación del modelo *FA/BRCA SIMPLIFICADO* (Rodríguez *et al.*, 2015)**

Inicialmente se simplificó manualmente el modelo de red de la vía FA/BRCA publicado por nuestro grupo de trabajo (Rodríguez, Sosa *et al.* 2012). Para hacerlo se reorganizaron los 28 nodos y 122 interacciones de la red original, lo cual resultó en un modelo determinístico con 15 nodos y 66 interacciones. Esta simplificación redujo ampliamente el trabajo computacional y a la vez mantuvo el comportamiento dinámico cualitativo de la red FA/BRCA original. La simplificación se llevo a cabo colapsando en un único nodo a los componentes de la red que comparten funciones o que pertenecen a una misma vía. Se tuvo cuidado de preservar las categorías funcionales importantes de la red y en mantener el comportamiento de la red silvestre y mutante. Las modificaciones y simplificaciones pueden verse en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Reglas lógicas del modelo *FA/BRCA SIMPLIFICADO* en versión Booleana**

<b>ICL</b> = ICL & ! DSB
<b>FAcore</b> = ICL & (ATR   ATM) & ! CHKREC
<b>FANCD2I</b> = FAcore & ((ATR   ATM)   ((ATR   ATM) & DSB)) & ! CHKREC
<b>NUC1</b> = ICL & FANCD2I
<b>NUC2</b> = (ICL & (ATR   ATM) & ! (FAcore & FANCD2I))   (ICL & NUC1 & P53 & !(FAcore & FANCD2I))
<b>ADD</b> = (NUC1   NUC2   (NUC1 & NUC2)) & ! (TLS)
<b>DSB</b> = (NUC1   NUC2) & ! (NHEJ   FAHRR   HRR2)
<b>TLS</b> = (ADD   (ADD & FAcore)) & ! (CHKREC)
<b>FAHRR</b> = DSB & FANCD2I & ! (NHEJ   CHKREC)
<b>HRR2</b> = (DSB & NUC2 & NHEJ & ICL & ! (FAHRR   CHKREC))   (DSB & NUC2 & TLS & ! (NHEJ   FAHRR   CHKREC))
<b>NHEJ</b> = (DSB & NUC2 & ! (FAHRR   HRR2   CHKREC))
<b>ATR</b> = (ICL   ATM) & ! CHKREC
<b>ATM</b> = (ATR   DSB) & ! CHKREC   FAcore
<b>P53</b> = ((ATR   ATM)   NHEJ) & ! CHKREC
<b>CHKREC</b> = ((TLS   NHEJ   FAHRR   HRR2) & ! DSB)   ((!ADD) & (! ICL) & (!DSB) & ! (CHKREC))

## **Generación del modelo *FA-CHKREC* para estudiar el proceso de adaptación al daño en el DNA**

La red FA/BRCA simplificada sirvió como un esqueleto de inicio para generar dos MB nuevos. El primero se generó para estudiar el proceso de adaptación al daño al DNA en las células AF, el cual parece en principio estar mediado por el *checkpoint recovery*. El segundo modelo se generó para estudiar el proceso de decisión celular entre supervivencia y apoptosis en las células después de la inducción de daño en el DNA.

Para generar el modelo FA-CHKREC se analizó la literatura experimental referente a la DDR y la regulación del *CHKREC*. La información relevante fue incorporada al MB FA/BRCA simplificado. Varias interacciones fueron re-escritas y varios nodos añadidos para tener una mejor resolución de la DDR y el *CHKREC* en un mismo modelo. En total se añadieron 14 nodos nuevos, incluyendo RNF4, KU-53BP1, PARP1, WEE1, MYT1 y PP2A-B55; 18 interacciones fueron inferidas, la síntesis translesión se obvió para mantener simplificado al modelo y más importante, el nodo *CHKREC* de los modelos previos se descompuso en sus componentes relevantes: PLK1, WIP1, CDC25, CDK1-AurA y CyclinB-CDK1. Las modificaciones más importantes con respecto al modelo simplificado se pueden observar en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Reglas lógicas del MB FA-CHKREC en versión Booleana**

<p><b>ICL</b>= ICL &amp; ! (NUC1   NUC2)</p> <p><b>FAcore</b>= ICL &amp; ! (RNF4 &amp; PLK1   (FAcore &amp; ! ATR))</p> <p><b>FANCD2I</b>= FAcore &amp; (ATM   ATR) &amp; ! FANCD2I</p> <p><b>NUC1</b>= ((ICL &amp; FANCD2I)   (DSB &amp; PARP1))</p> <p><b>RNF4</b>= ICL &amp; ! FAcore</p> <p><b>NUC2</b>= ICL &amp; RNF4 &amp; PLK1 &amp; ! (HRR/DSB   NUC1)</p> <p><b>DSB</b>= (DSB   (ICL &amp; NUC2)) &amp; ! (NHEJ   NUC1)</p> <p><b>PARP1</b>= (HRR/DSB   DSB) &amp; gH2AX &amp; ! KU/53BP1</p> <p><b>HRR/DSB</b>= (HRR/DSB   ((ICL   DSB) &amp; NUC1)) &amp; ! HRR</p> <p><b>HRR</b>= HRR/DSB &amp; gH2AX &amp; ATM &amp; ! (Cyclin B/CDK1 &amp; PLK1)</p> <p><b>KU/53BP1</b>= DSB &amp; ! PARP1</p> <p><b>NHEJ</b>= KU/53BP1 &amp; DSB &amp; ATM &amp; ! (Cyclin B/CDK1 &amp; PLK1)</p> <p><b>gH2AX</b>= (DSB   HRR/DSB) &amp; (ATM   ATR   gH2AX   KU/53BP1) &amp; ! (WIP1 &amp; PP2A/B55)</p> <p><b>ATR</b>= (ICL   ATM) &amp; ! (WIP1   (PLK1 &amp; KU/53BP1))</p> <p><b>ATM</b>= (DSB   HRR/DSB   ATR   NUC1   FAcore) &amp; ! (WIP1   PP2A/B55   (PLK1 &amp; KU/53BP1))</p> <p><b>MYT1</b>= (ATM   ATR) &amp; ! (CDC25   Cyclin B/CDK1   PLK1)</p> <p><b>WEE1</b>= (ATM   ATR   PP2A/B55 &amp; ! (CDC25   Cyclin B/CDK1   PLK1))</p> <p><b>p53</b>= (ATM   ATR) &amp; ! (WIP1 &amp; (PLK1   CDK1/AurA/Bora))</p> <p><b>p21</b>= p53</p> <p><b>PP2A/B55</b>= (ATM   ATR) &amp; ! Cyclin B/CDK1</p> <p><b>WIP1</b>= p53</p> <p><b>CDK1/AurA/Bora</b>= Cyclin B/CDK1   CDC25   ! (p21 &amp; PP2A/B55) &amp; ! (WEE1   MYT1   ATM   ATR)</p> <p><b>PLK1</b>= Cyclin B/CDK1   (ICL &amp; ATR &amp; ! FAcore)   ((CDK1/AurA/Bora) &amp; ! (MYT1   WEE1   ATR   ATM))</p> <p><b>CDC25</b>= Cyclin B/CDK1   (PLK1 &amp; (Cyclin B/CDK1   CDK1/AurA/Bora) &amp; ! ((WEE1   MYT1) &amp; (PP2A/B55   ATM   ATR)))</p> <p><b>Cyclin B/CDK1</b>= Cyclin B/CDK1   ((CDC25 &amp; PLK1 &amp; CDK1/AurA/Bora) &amp; ! p21</p>
---

## **Generación del modelo *FA-APOPTOSIS* para estudiar la toma de decisión entre supervivencia y apoptosis**

La literatura experimental referente a la vía FA/BRCA, el *CHKREC* y la apoptosis inducida por daño en el DNA mediada por p53 fue analizada para reproducir la conectividad entre todos estos procesos en el modelo FA-APOPTOSIS. Para generar este modelo se utilizó el modelo FA-*CHKREC* como base y se incluyeron los nodos que regulan la apoptosis en un modo dependiente de p53 incluyendo a MDM2, el principal regulador negativo de p53; las variantes de p53 conocidas como p53a (p53 arrester o p53S15), p53k (p53 killer o p53S46); los elementos de respuesta a p53a se condensaron en el nodo p53aRE y los elementos de respuesta p53k se condensaron en el nodo p53kRE, se añadió también el nodo de la caspasa 3 (CASP3) y a las proteínas inhibitorias de la apoptosis (nodo IAP), que funcionan como reguladores negativos de las caspasas. Se incluyeron además a los nodos TNFalfa y p38MAPK, los cuales están sobre activados en las células AF y podrían mediar la activación de la apoptosis por vía extrínseca.

De este modo la red FA-APOPTOSIS condensa los procesos de respuesta al daño al DNA cuando la célula es expuesta a ICLs, incluyendo el reconocimiento del daño, las proteínas reparadoras del DNA, el *checkpoint* de G2/M, el *CHKREC* y las proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas. Ciertas interacciones en la red FA-APOPTOSIS no aparecen reportadas en la literatura experimental dado que fueron incluidas para obtener un comportamiento dinámico que reproduzca la evidencia experimental actual y que pueden conformar nuevas hipótesis de

trabajo. La selección de estas interacciones se basó en recuperar los atractores conocidos actualmente para la red *wild type* y para las redes mutantes y fueron el número mínimo de interacciones necesarias para obtener resultados consistentes con los datos experimentales actuales. Las reglas lógicas de este modelo se pueden ver en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Reglas lógicas del modelo FA-APOPTOSIS en versión Booleana**

<p><b>ICL</b>= ICL &amp; ! (Nuc1   Nuc2)</p> <p><b>FAcore</b>= ICL &amp; ! (RNF4 &amp; PIk1)   FAcore &amp; ! (ATR   <b>CASP3</b>)</p> <p><b>FANCD2I</b>= (FAcore &amp; (ATR   ATM))</p> <p><b>Nuc1</b>= (ICL &amp; FANCD2I) &amp; ! (Nuc1)</p> <p><b>RNF4</b>= ICL &amp; ! FAcore</p> <p><b>Nuc2</b>= ICL &amp; RNF4 &amp; (ATR   ATM   p53) &amp; ! ((FAcore &amp; FANCD2I)   Nuc1)</p> <p><b>ADD</b>= (ADD   Nuc1   Nuc2) &amp; ! (TLS)</p> <p><b>DSB</b>= ((DSB   Nuc1   Nuc2) &amp; ! (NHEJ   FAhrr   HRR2))   ((Nuc1   Nuc2) &amp; ICL &amp; ! (<b>p38MAPK</b>))</p> <p><b>TLS</b>= ADD &amp; ! PIk1</p> <p><b>FAhrr</b>= ((DSB &amp; FANCD2I) &amp; ! (<b>p38MAPK</b>   <b>CASP3</b>))   ((DSB &amp; (ATR   ATM) &amp; FAcore &amp; FANCD2I) &amp; ! ((NHEJ &amp; <b>PIk1</b>)   <b>CASP3</b>   <b>TNFa</b>))</p> <p><b>HRR2</b>= (DSB) &amp; ! (FAhrr   NHEJ   <b>CycB/CDK1</b>   <b>TNFa</b>)</p> <p><b>NHEJ</b>= (((DSB &amp; Nuc2) &amp; ! ((FAcore &amp; FANCD2I)   (DSB &amp; (ATR   ATM) &amp; FAhrr)))   ((DSB &amp; (ATM   ATR)) &amp; ! FANCD2I))</p> <p><b>TNFa</b>= (ATR   ATM) &amp; ! (FANCD2I   FAhrr   <b>CycB/CDK1</b>)</p> <p><b>p38MAPK</b>= TNFa &amp; ! CASP3</p> <p><b>ATR</b>= (ICL   ATM) &amp; ! (<b>Wip1</b>   (<b>PIk1</b> &amp; NHEJ)   <b>CASP3</b>)</p> <p><b>ATM</b>= (ATR   DSB) &amp; ! (<b>Wip1</b>   (<b>PIk1</b> &amp; NHEJ)   <b>CASP3</b>)   FAcore</p> <p><b>p53</b>= (ATR   ATM   NHEJ   <b>p38MAPK</b>) &amp; ! (Wip1 &amp; MDM2)</p> <p><b>MDM2</b>= p53 &amp; ! (<b>CASP3</b>   <b>CycB/CDK1</b>)</p> <p><b>p53a</b>= ((p53   p53a) &amp; (ATR   ATM)) &amp; ! (Wip1   p53k)</p> <p><b>p21</b>= <b>CASP3</b>   p53a</p> <p><b>p53aRE</b>= <b>CASP3</b>   (p53a   p21) &amp; ! (<b>CycB/CDK1</b>)</p> <p><b>p53k</b>= CASP3   (((p53   p53k) &amp; (ICL   DSB) &amp; (NHEJ   FAhrr) &amp; p53aRE)   (ICL &amp; FAcore &amp; FANCD2I &amp; Nuc1 &amp; ADD &amp; DSB &amp; ATM &amp; ATR &amp; p53aRE &amp; TLS &amp; MDM2)   ((p53   p53k) &amp; (p53kRE) &amp; ICL &amp; p53aRE))   (ICL &amp; FAcore &amp; Nuc1 &amp; RNF4 &amp; ADD &amp; DSB &amp; TLS &amp; HRR2 &amp; ATR &amp; ATM &amp; p53</p> <p><b>p53kRE</b>= CASP3   (p53k &amp; (DSB   ADD   ICL))</p> <p><b>CASP3</b>= (p53kRE   TNFa) &amp; ! IAP</p> <p><b>IAP</b>= ! (p53kRE)</p> <p><b>Wip1</b>= p53aRE &amp; p53a</p> <p><b>CDK1/AurA/Bora</b>= CycB/CDK1   CDC25   ! (p21) &amp; ! (p53aRE   ATM   ATR)</p> <p><b>PIk1</b>= CycB/CDK1   (ICL &amp; ATR &amp; ! <b>FAcore</b>)   ((CDK1/AurA/Bora) &amp; ! (p53aRE   ATR   ATM))</p> <p><b>CDC25</b>= CycB/CDK1   (PIk1 &amp; (CycB/CDK1   CDK1/AurA/Bora) &amp; ! ((<b>p53aRE</b>) &amp; (ATM   ATR)))</p> <p><b>CycB/CDK1</b>= CycB/CDK1 &amp; ! (<b>CASP3</b>)   (CDC25 &amp; PIk1 &amp; CDK1/AurA/Bora) &amp; ! p21</p>
---



## **Análisis de los modelos *FA/BRCA simplificado*, *FA-CHKREC* y *FA-APOPTOSIS* como sistemas dinámicos discretos**

Las simulaciones en cada uno de los modelos se llevaron a cabo generando todas las posibles combinaciones de ganancias o pérdidas de función de cada uno de los modelos de manera sincrónica. Estas simulaciones se llevaron a cabo dejando permanentemente en cero el nodo de interés. En la red silvestre y en las mutantes se simuló además la respuesta a los ICLs, simulando dos condiciones biológicamente relevantes, una exposición breve a ICLs, la cual debe ser reparada rápido y eficientemente por la vía FA/BRCA; y se simuló además una exposición permanente al agente inductor de daño, lo cual es más difícil de reparar dada la acumulación de daño y la saturación de la vía de reparación. Se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de todas las posibles trayectorias y atractores del sistema.

Para poder llevar a cabo simulaciones computacionales cada nodo se representa como una variable  $x_i$  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  $x_1(t)$ ,  $x_2(t)$ , ...,  $x_n(t)$  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 activación de cada nodo para cada uno de los modelos, las cuales indican a sus reguladores, se muestran en las Tablas 2-4.

El comportamiento dinámico de los distintos modelos se analizó exhaustivamente usando el programa BoolNet (Muessel, Hopfensitz et al. 2010). Las simulaciones se iniciaron 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 alcanza 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 a 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.

### **Análisis del modelo *FA-APOPTOSIS* como un sistema dinámico continuo**

Para la versión continua del modelo FA-APOPTOSIS se utilizó la metodología de SQUAD (*Standardized Qualitative Dynamical Systems Method* (Mendoza y Xenarios, 2006), el cual fue desarrollado para traducir automáticamente la topología de un

modelo discreto hacia un sistema dinámico continuo y estudiar su comportamiento. SQUAD permite modelar al sistema en estudio como una serie de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas, las cuales describen la activación del nodo  $x_i$  usando la siguiente ecuación:

$$\frac{dx_i}{dt} = \frac{-e^{0.5h_i} + e^{h_i\omega_i}}{(1 - e^{0.5h_i})(1 + e^{h_i(\omega_i - 0.5)})} - \lambda_i x_i$$

El segundo miembro de la ecuación está compuesto por dos partes, una función sigmoide que describe la tasa de producción del componente  $x_i$  y un término lineal que describe la tasa de decaimiento del nodo  $x_i$ . El parámetro  $h$  representa la intensidad con la que el nodo  $x_i$  es estimulado por sus activadores y el parámetro  $\lambda$  representa la tasa de degradación del nodo  $x_i$ . Para este estudio el valor de  $h$  se estableció en 10 y el de  $\lambda$  en 1 para todos los nodos.

La función sigmoide en SQUAD está construida de tal manera que siempre pasará por los puntos (0,0), (0.5,0.5) y (1,1) del plano para cualquier valor positivo de  $h$ . Cuando  $h$  tiene un valor grande, por ejemplo 100 o mayor, la curva es muy parecida a una *step function*; para valores intermedios de  $h$  (alrededor de 50) la función es similar a una curva logística; y cuando  $h$  se acerca a 0 la curva es casi una línea recta. El comportamiento de esta curva permite estudiar la influencia de diferentes curvas de respuesta sobre el comportamiento global de la red al cambiar sólo un parámetro, mientras que al mismo tiempo permite hacer

comparaciones directas con la versión discreta del modelo debido a que la función sigmoide siempre pasará por los 3 puntos fijos especificados.

Finalmente, el parámetro  $\omega$  de la ecuación es la forma continua, usando lógica difusa, de las reglas lógicas usadas en el modelo FA-APOPTOSIS. Cada nodo en el modelo FA-APOPTOSIS tiene su propio valor  $\omega$ . Las  $\omega$ s del modelo FA-APOPTOSIS se pueden observar en la **Tabla 5**. Para obtener los atractores de la versión continua del modelo en condiciones *wild type* y mutantes el modelo se analizó iniciando a partir de 10,000 condiciones iniciales al azar.

Los patrones de activación de nodos y los atractores obtenidos con las simulaciones de los diferentes modelos fueron utilizados para enfocarnos en la evaluación experimental en las células AF-A (VU817) y normales (NL-53).

**Tabla 5. Valores de  $\omega$  utilizados para analizar el modelo FA-APOPTOSIS en su versión continua utilizando SQUAD**

$\omega_{ICL} = \min(ICL, 1 - \max(Nuc1, Nuc2))$
$\omega_{FAcore} = \min(ICL, 1 - \max(\min(RNF4, Plk1), \min(FAcore, 1 - ATR), CASP3))$
$\omega_{FANCD2I} = \min(FAcore, \max(ATR, ATM))$
$\omega_{Nuc1} = \min(ICL, FANCD2I, 1 - Nuc1)$
$\omega_{RNF4} = \min(ICL, 1 - FAcore)$
$\omega_{Nuc2} = \min(ICL, RNF4, \max(ATR, ATM, p53), 1 - \max(\min(FAcore, FANCD2I), Nuc1))$
$\omega_{ADD} = \min(\max(ADD, Nuc1, Nuc2), 1 - TLS)$
$\omega_{DSB} = \max(\min(\max(DSB, Nuc1, Nuc2), 1 - \max(NHEJ, FAhrr, HRR2)), \min(\max(Nuc1, Nuc2), ICL, 1 - p38MAPK))$
$\omega_{TLS} = \min(ADD, 1 - Plk1)$
$\omega_{FAhrr} = \max(\min(DSB, FANCD2I, 1 - \max(p38MAPK, CASP3)), \min(\min(DSB, \max(ATR, ATM), FAcore, FANCD2I), 1 - \max(\min(NHEJ, Plk1), CASP3, TNFa)))$
$\omega_{HRR2} = \min(DSB, 1 - \max(FAhrr, NHEJ, CycBCDK1, TNFa))$
$\omega_{NHEJ} = \max(\min(DSB, Nuc2, 1 - \max(\min(FAcore, FANCD2I), \min(DSB, FAhrr, \max(ATM, ATR))))), \min(DSB, 1 - FANCD2I, \max(ATM, ATR)))$
$\omega_{TNFa} = \min(\max(ATM, ATR), \max(FANCD2I, FAhrr, CycBCDK1))$
$\omega_{p38MAPK} = \min(TNFa, 1 - CASP3)$
$\omega_{ATR} = \min(\max(ICL, ATM), 1 - \max(Wip1, CASP3, \min(Plk1, NHEJ)))$
$\omega_{ATM} = \max(\min(\max(ATR, DSB), 1 - \max(Wip1, CASP3, \min(Plk1, NHEJ))), FAcore)$
$\omega_{p53} = \min(\max(ATR, ATM, NHEJ, p38MAPK), 1 - \max(Wip1, p53k))$
$\omega_{MDM2} = \min(p53, 1 - \max(CASP3, CycBCDK1))$
$\omega_{p53a} = \min(\min(\max(p53, p53a), \max(ATR, ATM)), 1 - \max(Wip1, p53k))$
$\omega_{p21} = \max(CASP3, p53a)$
$\omega_{p53aRE} = \max(CASP3, \min(\max(p53a, p21), CycBCDK1))$
$\omega_{p53k} = \max(CASP3, \max(\min(\max(p53, p53k), \max(ICL, DSB), \max(NHEJ, FAhrr), p53aRE), \min(ICL, FAcore, FANCD2I, Nuc1, ADD, DSB, ATM, ATR, p53aRE, TLS, MDM2), \min(\max(p53, p53k), p53kRE, ICL, p53aRE))), \min(ICL, FAcore, Nuc1, RNF4, ADD, DSB, TLS, HRR2, ATR, ATM, p53))$
$\omega_{p53kRE} = \max(CASP3, \min(p53k, \max(DSB, ADD, ICL)))$
$\omega_{CASP3} = \min(\max(p53kRE, TNFa), 1 - IAP)$
$\omega_{IAP} = 1 - p53kRE$
$\omega_{Wip1} = \min(p53aRE, p53a)$
$\omega_{CDK1AurABora} = \max(CycBCDK1, CDC25, \min(1 - p21, 1 - \max(p53aRE, ATM, ATR)))$
$\omega_{Plk1} = \max(CycBCDK1, \max(ICL, ATR, 1 - FAcore), \min(CDK1AurABora, 1 - \max(p53aRE, ATR, ATM)))$
$\omega_{CDC25} = \max(CycBCDK1, \min(Plk1, \max(CycBCDK1, CDK1AurABora), 1 - \min(p53aRE, \max(ATM, ATR))))$
$\omega_{CycBCDK1} = \max(\min(CycBCDK1, 1 - CASP3), \min(CDC25, Plk1, CDK1AurABora, 1 - p21))$

## **MÉTODO EXPERIMENTAL LÍNEAS CELULARES**

### **Cultivos celulares**

Se realizaron cultivos de las líneas celulares linfoblastoides AF-A (VU-817) y Normal (NL-53). 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 CO<sub>2</sub> 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. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **Tratamientos**

Para llevar a cabo los experimentos se siguió un esquema de tratamiento de exposición continua a 6 diferentes concentraciones de MMC (4 ng/ml, 10 ng/ml, 40 ng/ml, 100 ng/ml, 400 ng/ml y 1000 ng/ml) o de un pulso de 24 horas a 6 diferentes concentraciones de MMC. Cada 24 horas se cosechó parte del cultivo celular y el resto se lavó y re-incubó con medio de cultivo nuevo seguido de la adición de nueva MMC (en caso de tratarse de un cultivo de exposición continua).

Para los experimentos de inhibición de WIP1 y de PLK1 las células fueron tratadas con una concentración de MMC que permite la división de las células AF con aberraciones cromosómicas (10 ng/ml) y con el inhibidor de WIP1 (CCT007093) o

el inhibidor de PLK1 (BI2536). Cada 24 horas y durante 7 días de cultivo, se realizó una cosecha en la cual se evaluaron distintos parámetros experimentales que dan cuenta de la supervivencia y la muerte de las células AF. Los esquemas de tratamiento pueden verse en las Tablas 6-9.

**Tabla 6. Esquema de tratamiento de exposición a MMC de manera continua**

Concentración de MMC	DIA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 7
Sin tratamiento	MEDIO FRESCO				
4 ng/ml	X	X	X	X	X
10 ng/ml	X	X	X	X	X
40 ng/ml	X	X	X	X	X
100 ng/ml	X	X	X	X	X
400 ng/ml	X	X	X	X	X
1000 ng/ml	X	X	X	X	X

**Tabla 7. Esquema de tratamiento de exposición a MMC durante un pulso de 24 horas**

Concentración de MMC	DIA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 7
Sin tratamiento	MEDIO FRESCO				
4 ng/ml	X	MEDIO FRESCO			
10 ng/ml	X	MEDIO FRESCO			
40 ng/ml	X	MEDIO FRESCO			
100 ng/ml	X	MEDIO FRESCO			
400 ng/ml	X	MEDIO FRESCO			
1000 ng/ml	X	MEDIO FRESCO			

**Tabla 8. Esquema de tratamiento de exposición continua a MMC (10 ng/ml) y de exposición al inhibidor de WIP1 (CCT007093).**

Tratamiento	DIA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 7
Sin tratamiento	MEDIO FRESCO				
MMC	X	X	X	X	X
CCT	X	X	X	X	X
MMC + CCT	X	X	X	X	X

### **Análisis de aberraciones cromosómicas e índice de división nuclear con Citocalasina B**

La cosecha de las células para el análisis de aberraciones cromosómicas se llevó a cabo añadiendo colchicina a una concentración final de 0.1 µg/ml (Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA) una hora antes de realizar la cosecha. Las células se trataron con solución hipotónica durante 30 minutos y posteriormente se fijaron con solución de Carnoy (metanol: ácido acético 3:1). Se prepararon laminillas y se cuantificó la cantidad de rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas y figuras radiales.

Para el ensayo de boqueo de la citocinesis se añadieron 3 µg/ml de Citocalasina B (Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA). Después de la exposición a MMC por 24 h las células fueron lavadas, y re-incubadas con Citocalasina B fresca por otras 24 h



y cosechadas con solución fijadora (metanol:ácido acético 3:1). Se evaluaron 500 células y se cuantificó el número de células mononucleadas, binucleadas y tetranucleadas, así como el número de micronúcleos.

### **Análisis de distribución del ciclo celular, índice mitótico, apoptosis e índice de división celular por citometría de flujo**

Para determinar la cantidad de DNA y la distribución en el ciclo celular las células fueron fijadas con etanol al 70% helado y posteriormente teñidas con yoduro de Propidio.

Para el análisis de marcadores intracelulares las células fueron fijadas con CytoFix CytoPerm (BD) durante 30 minutos, posteriormente lavadas con PermWash buffer (BD). La permeabilización del núcleo se hizo utilizando CytoFix CytoPerm Plus (BD) durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con PermWash buffer. Después de los pasos de fijación las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-H3S10ph (FITC) para determinación del índice mitótico, anti-cleaved PARP (PE) para determinación de índice apoptótico y anti-gamma H2AX (APC), para detección de rupturas de doble hebra en interfase. En estos ensayos el DNA fue teñido con DAPI o con Sytox Green para determinar la distribución en el ciclo celular.

El índice de división celular se obtuvo exponiendo a las células a la molécula fluorescente CFSE (emisión a 488 nm) durante 10 minutos a 37° C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente las células fueron lavadas con medio RPMI helado

suplementado con SFB al 10% y se establecieron los cultivos celulares con las diferentes condiciones experimentales. Al momento de la cosecha las células fueron fijadas con etanol al 70% helado y lavadas con PBS antes de ser adquiridas en el citómetro.

Los experimentos fueron adquiridos en un citómetro FACSCanto (BD), en un citómetro Attune azul-rojo o Attune azul-violeta (Life technologies). Se adquirieron un total de 20,000 eventos por experimento y se analizaron utilizando el software Flow Jo versión 10.

### **Extracción de proteínas y Western Blot**

Las células obtenidas de los cultivos con sus diferentes tratamientos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS. Las células se resuspendieron en *buffer* de lisis de proteínas durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C para obtener el extracto proteico. La concentración de proteínas en los extractos se cuantificó mediante la técnica de Bradford.

Para la inmunodetección en membrana se mezclaron 10 µg de proteína con 3 ul del buffer de carga *NuPAGE LDS sample buffer* y PBS. Esta muestra se desnaturalizó durante 10 min a 70° C y se cargó en un gel *NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel* (Novex Biological). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V constantes en frío hasta que el frente de corrida saliera del gel. Posteriormente, se realizó

transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond Amersham) por transferencia húmeda a 100 V durante 2 horas.

Después de la transferencia, la membrana se lavó con TBS y se colocó en solución de bloqueo de leche descremada al 5% en TBST por 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a detectar durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Los anticuerpos se seleccionaron de acuerdo a las predicciones generadas durante el proceso de modelado y fueron aquellos que resultaron relevantes para el proceso de decisión celular entre apoptosis y supervivencia de las células AF.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la membrana se lavó tres veces con TBST por 10 min a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP: *HRP Anti-mouse IgG* o *HRP Anti-rabbit IgG* según correspondiera, diluido 1:5000 en TBST. Esta incubación se llevó a cabo por 1 hr a temperatura ambiente en agitación suave.

Finalmente, la membrana se reveló usando el *ECL-Western blotting detection reagent* (Amersham) exponiéndola a una película para rayos X (Hyperfilm Amersham). La membrana donde se detectó la proteína de interés se lavó con el *Restore Western Blot Stripping Buffer* durante 15 min en agitación suave para remover los anticuerpos adheridos a la membrana y poder hacer detecciones adicionales de más proteínas de interés en la misma membrana. Como control de carga se detectó a la tubulina utilizando el anticuerpo anti- $\beta$  tubulina (ABCAM, ab6046) diluido 1:1000 en TBST.

El total de anticuerpos utilizados para la detección de proteínas incluye: P-CHK2 (Cell Signaling), H2AX-S139 (Cell Signaling), WEE1 (Abcam), MYT1 (Genetex), Aurora A (Abcam), P-Aurora A (Abcam), PLK1 (Abcam), CDK1-Y15 (Abcam), CDC25B (Genetex), PPM1D (Abcam), p21 (Genetex), H3K56ac (Genetex), p53 7F (Cell Signaling), p53-S15 (Cell Signaling), p53-S20 (Cell Signaling) y p53-S46 (Cell Signaling).

### **Extracción de RNA y análisis de los blancos proapoptóticos y antiapoptóticos de p53 usando arreglos de PCR.**

Se realizó un análisis de expresión génica para los blancos de p53. Para este análisis se utilizó un microarreglo de PCR especialmente diseñado para analizar la vía de p53 (SABiosciences, QIAGEN) en una placa de 96 pozos que contiene los iniciadores de PCR para los RNAm de los genes de la vía de p53. Además de contener los genes de interés este arreglo contiene 5 genes *housekeeping* para normalización de datos, un control de DNA genómico para descartar contaminación con DNA, un control de transcripción reversa y tres controles positivos de PCR que validan que el proceso de PCR se haya llevado a cabo exitosamente.

Una vez transcurrido el experimento de inducción de apoptosis se obtuvo el RNA total a partir de los cultivos celulares con y sin tratamiento. Se lavaron dos veces con PBS/DEPC centrifugando para obtener un botón celular. Todas las muestras

se congelaron individualmente en TRIzol (Invitrogen). Para procesar las muestras se agregó cloroformo de manera proporcional (una quinta parte de la cantidad de trizol) (100  $\mu$ l) y se centrifugó a 14,000 rpm/4°C por 20 min. La solución acuosa se separó y precipitó con isopropanol (250 $\mu$ l) a 4°C toda la noche. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm/4°C por 30 min, el botón (RNA total) se lavó con 1 ml de etanol al 75% en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), se centrifugó nuevamente, se decantó y se dejó secar. Finalmente se disolvió en agua tratada con DEPC (6 a 20  $\mu$ l). Una alícuota del RNA total por muestra se analizó por espectrofotometría en el equipo Nanodrop, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Se utilizó 1 microgramo de RNA total para la reacción de RT para obtener cDNA con el kit RT<sup>2</sup> First Stry, ocupando Oligo dT y oligonucleótidos al azar como primers para la reacción de transcriptasa inversa. El cDNA obtenido fue cuantificado usando el equipo Nanodrop.

El cDNA se mezcló con el Master Mix RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR y se adicionó una muestra de 25  $\mu$ l en cada uno de los pozos de la placa de 96 pozos, la cual contiene los primers específicos para el análisis de un gen diferente por pozo. La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo para PCR en tiempo real ABI-PCR 7000. Al final de los ciclos se calculó el valor Ct de cada gen. Y finalmente se calculó el *fold-change* de la expresión génica usando el método del  $\Delta\Delta$ Ct. El análisis de datos se llevó a cabo en línea en la página de QIAGEN usando el

siguiente *link*: <https://www.qiagen.com/shop/genes-y-pathways/technology-portals/browse-qpcr/qrt-pcr-for-mrna-expression/data-analysis/geneglobe-data-analysis-center/>

El arreglo de PCR utilizado incluye un total de 84 genes de la vía de p53, que participan en la activación de p53 como *ATM*, *ATR*, *BBC3*, *BRCA1*, *CDKN1A*, blancos de p53 como *APAF1*, *BAX*, *BBC3*, *BTG2*, *CASP9* (Apoptosis) , *CCNG1*, *CDC25A*, *CDC25C*, *CDKN1A* (Ciclo celular) *BRCA1*, *BTG2*, *EGFR*, *GADD45A*, *PCNA*, (reparación de DNA) y de respuesta a los blancos como *APAF1*, *BCL2*, *BCL2A1*, *BID*, *BIRC5*, *CASP2* (Apoptosis), *BRCA2*, *MLH1*, *XRCC5* (reparación de DNA).

La distribución de los genes en la placa del arreglo es la siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APAF1	ATM	ATR	BAI1	BAX	BBC3	BCL2	BCL2A1	BID	BIRC5	BRCA1	BRCA2
B	BTG2	CASP2	CASP9	CCNB1	CCNE1	CCNG1	CCNH	CDC25A	CDC25C	CDK1	CDK4	CDKN1A
C	CDKN2A	CHEK1	CHEK2	CRADD	DNMT1	E2F1	E2F3	EGFR	EGR1	EI24	ESR1	FADD
D	FAS	FASLG	FOXO3	GADD45A	GML	HDAC1	HK2	IGF1R	IL6	JUN	KAT2B	KRAS
E	MCL1	MDM2	MDM4	MLH1	MSH2	MYC	MYOD1	NF1	NFKB1	PCNA	PIDD	PPM1D
F	PRC1	PRKCA	PTEN	PTTG1	RB1	RELA	RPRM	SESN2	SIAH1	SIRT1	STAT1	TADA3
G	TNF	TNFRSF10B	TNFRSF10D	TP53	TP53AIP1	TP53BP2	TP63	TP73	TRAF2	TSC1	WT1	XRCC5
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

## Análisis estadístico

Los grupos experimentales se compararon usando una prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey. Una diferencia fue considerada significativa si  $p < 0.05$ .

## **MÉTODO EXPERIMENTAL CÉLULAS CD34+ CIRCULANTES**

### **Pacientes, muestras, determinación de inmunofenotipo y aislamiento de células CD34+.**

Se obtuvieron muestra de 18 pacientes AF mexicanos con diagnóstico positivo de AF mediante la prueba de fragilidad cromosómica de DEB; los pacientes firmaron carta de consentimiento informado para participar en este estudio. Las muestras de controles sanos para comparación se obtuvieron del Hospital Infantil de México Federico Gómez. El estudio fue aprobado por el comité de ética del INP. Se obtuvieron 5 ml de sangre periférica de cada paciente y se aisló el número total de células mononucleares (CMN) usando un gradiente de Ficoll Hypaque. Para el análisis de inmunofenotipo se utilizaron 1000,000 células usando la siguiente mezcla de anticuerpos: a) CD3-APC, CD19-PE; b) CD7-APC, CD56-FITC, CD13-PE; c) CD3-FITC, CD14-PE. La adquisición de datos se llevo a cabo en un citómetro Cyan-ADP (Dako), en un citómetro FACSCalibur (BD) o en un citómetro FACSCanto (BD). El análisis de datos se llevó a cabo en el Software Flow Jo version 10. El número total de CMN se incubó en hielo durante 30 min con el anticuerpo anti CD34+ acoplado a perlas magnéticas y con el reactivo de bloqueo FcR (Miltenyi). Las CMN se lavaron con PBS y se aislaron con un sistema de aislamiento magnético MACS Multistly (Miltenyi). Las fracción obtenida, enriquecida en células CD34+ se distribuyó en los diferentes cultivos celulares descritos a continuación.

### **Ensayo de unidades formadoras de colonias.**

15,000 CMN y 3,000 células CD34+ se sembraron en 500  $\mu$ L de metilcelulosa completa (Stem Cell, Technologies) por duplicado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y el número y tipo de progenitors se cuantificó después de 14 días de cultivo por tres observadores independientes. Cada colonia se clasificó de acuerdo a su tamaño, color y forma.

### **Ensayos de diferenciación hematopoyética.**

Se sembró un total de 60,000 células CD34+ en 200  $\mu$ L de medio alfa-MEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y citocinas específicas para estimular la diferenciación mieloide o linfoide. Para evaluar la diferenciación mieloide se sembró a las células en placas de 96 pozos de fondo redondo suplementadas con las citocinas SCF, GM-CSF, IL-6, IL-3 y FLT3-I (Peprotech). Para evaluar la diferenciación linfoide B/NK se sembró a las células en placas de 96 pozos de fondo plano en co-cultivo con la línea de estroma de ratón MS-5 y el medio fue suplementado con las citocinas FLT-3, SCF, IL-7 y IL-15 (Peprotech). Para evaluar la diferenciación linfoide T se sembró a las células en placas de 96 pozos de fondo plano en co-cultivo con la línea celular derivada de ratón OP9-DL4 y el medio fue suplementado con citocinas. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> hasta la cosecha. Los cultivos mieloides se cosecharon 7 y 14 días después de iniciado el cultivo y el estatus de diferenciación se analizó utilizando la siguiente mezcla de anticuerpos: CD34-APC, CD19-PE, CD3-PE, CD11b-PE, CD14-PE, CD56-PE y GlyA-PE.



Los cultivos linfoides NK/B se cosecharon 14 y 28 días después de iniciado el cultivo y el estatus de diferenciación se analizó con la siguiente mezcla de anticuerpos: CD34-APC, CD19-FITC y CD56-PE.

Los cultivos linfoides T se cosecharon 28 días después de iniciado el cultivo. La adquisición de datos se llevó a cabo en un citómetro Cyan-ADP (Dako), en un citómetro FACSCalibur (BD) o en un citómetro FACSCanto (BD). El análisis de datos se llevó a cabo en el Software Flow Jo 10.

### **Evaluación de la apoptosis y del daño en el DNA.**

La detección del daño en el DNA se realizó en las CMN totales. Las células fueron bloqueadas con SFB durante 15 min e incubadas por 30 min con anti CD34-FITC. La fijación y permeabilización se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del kit *DNA damage, cell proliferation y apoptosis* (BD). Después de la permeabilización del núcleo las células fueron teñidas con los anticuerpos anti-gH2AX y anti-cleaved PARP incluidos en el kit. Durante la adquisición de datos se generaron dos plots, uno para diferenciar células CD34+ y células CD34- y la cantidad de daño y de apoptosis se analizó de manera independiente en ambas fracciones.

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad (La Jolla, CA). La normalidad de los datos se analizó usando la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de D'Agostino-Pearson. La correlación entre las variables continuas se determinó usando las pruebas de Pearson y de Spearman. Los análisis comparativos entre variables categóricas y continuas se determinaron usando

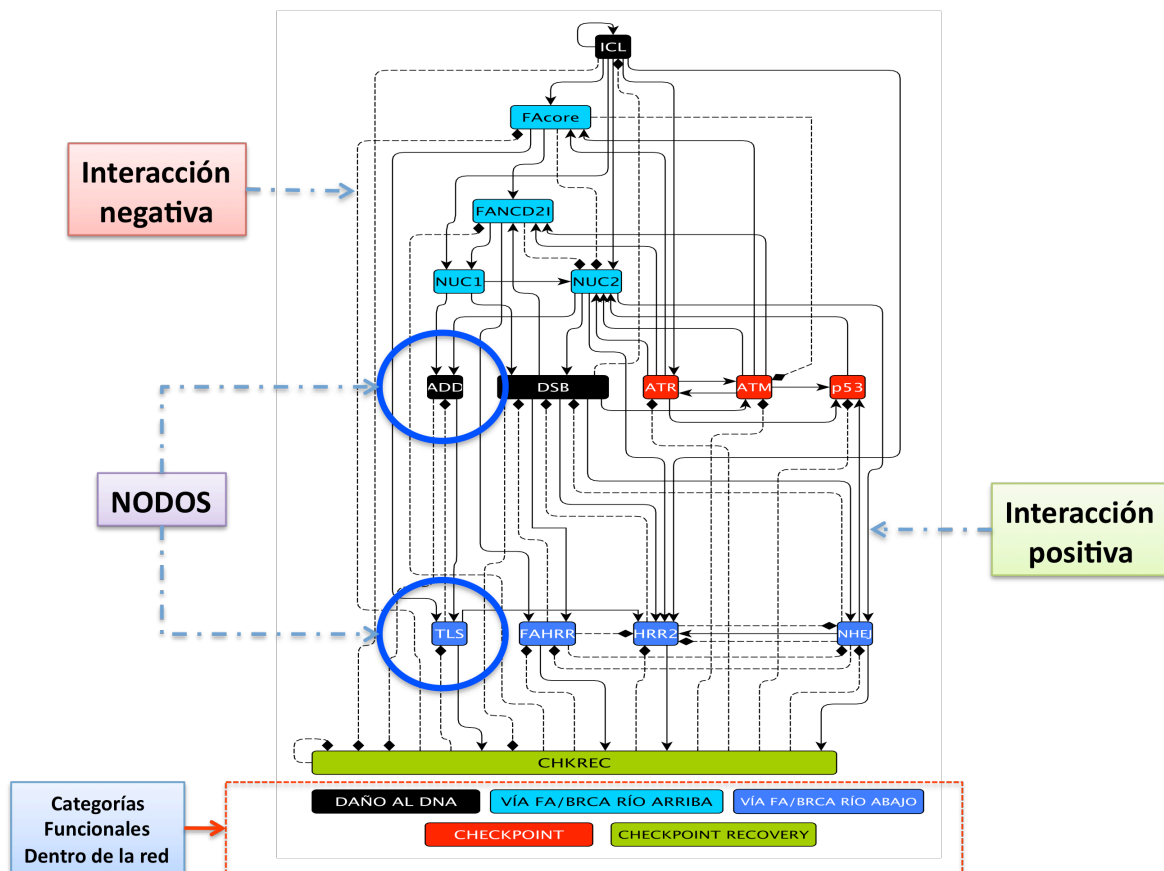
métodos paramétricos (prueba de t para dos muestras independientes con corrección de Welch) o no paramétricos (prueba de U de Mann-Whitney). Para comparaciones múltiples se usó ANOVA con una post-prueba de Tukey o una prueba de Kruskal-Wallis con post-prueba de Dunn's. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo (\*), los valores de  $p < 0.01$  fueron considerados altamente significativos (\*\*) y los valores de  $p < 0.001$  fueron considerados extremadamente significativos (\*\*\*). Todos los datos paramétricos y no paramétricos fueron reportados como media  $\pm$  SD o como la mediana y sus rangos intercuartiles, respectivamente.

# RESULTADOS

## INTERPRETACIÓN DE LOS MODELOS DE RED Y DE LAS SIMULACIONES DE LOS MODELOS

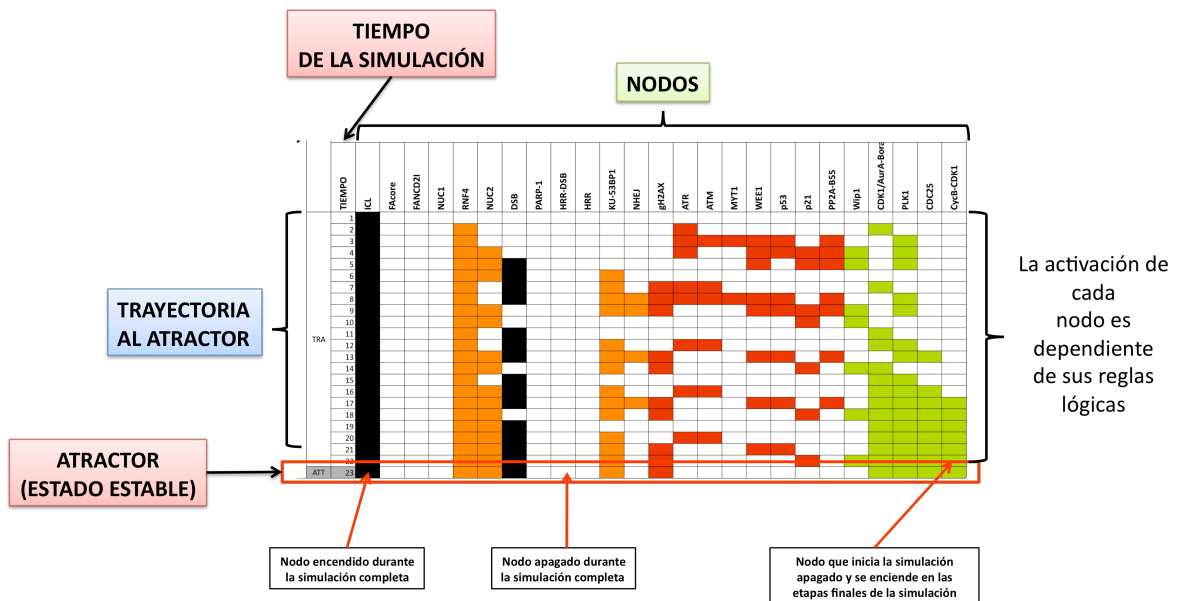
### Representación gráfica de los modelos de red

Los nodos están agrupados en categorías funcionales y se identifican mediante un código de color, el cual se indica en la parte inferior de cada red. Cada rectángulo de la red representa una proteína o un complejo proteico, las flechas continuas indican interacciones de regulación positiva y las flechas discontinuas con punta roma indican interacciones regulatorias negativas.



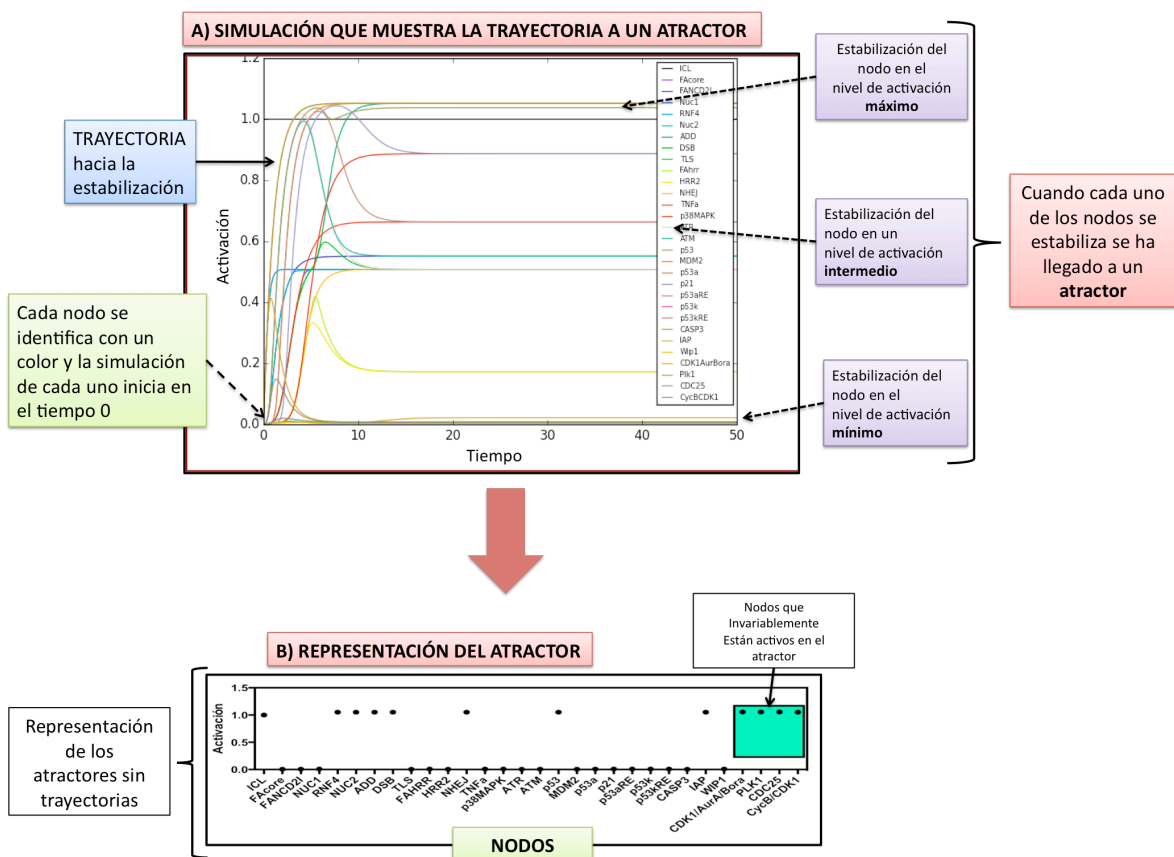
## Interpretación de las simulaciones con un modelo discreto

Los nombres de cada nodo están indicados en la fila superior de cada simulación y están agrupados dentro de una categoría funcional de acuerdo al proceso en el que colaboran. Cuando un nodo adquiere color significa que se ha activado y si está en blanco significa que está inactivo. La columna "TIEMPO" muestra la trayectoria para llegar a un estado estable o atractor (ATT).



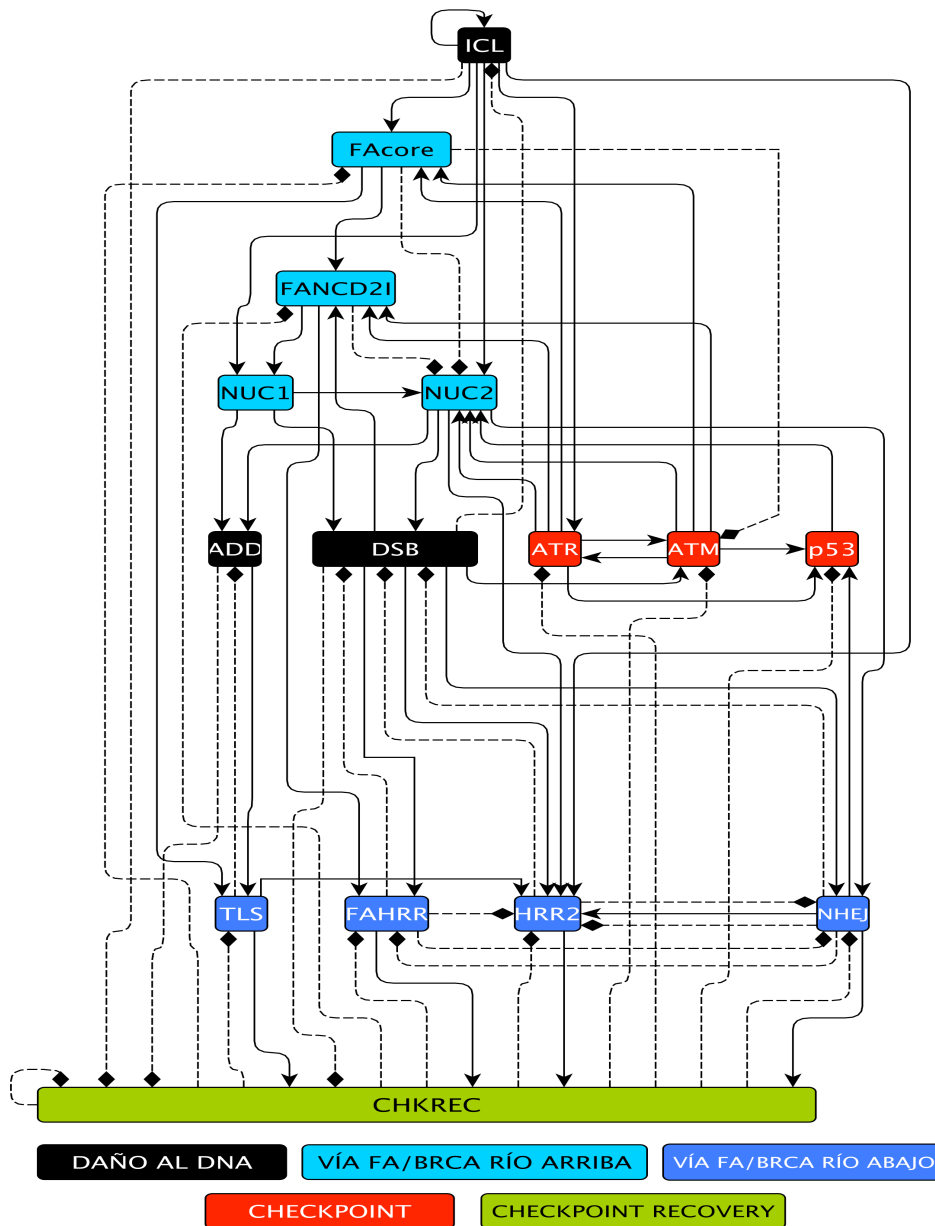
## Interpretación de las simulaciones con el modelo continuo

Las simulaciones con el modelo continuo pueden representarse de dos formas: **(A)** mostrando la cinética de activación de cada nodo hasta llegar a la estabilización en el atractor, o **(B)** mostrando unicamente los nodos activos en el atractor de cada simulación. En este trabajo se optó por la opción **B**, en la cual se muestra en el eje de las x a cada uno de los nodos y en el eje de las y la activación alcanzada en el atractor para cada nodo. En estas ilustraciones se enmarca en un cuadro a color a los nodos cuya activación definen a los atractores estudiados en este trabajo: *apoptosis*, *arresto del ciclo celular* y *progresión del ciclo celular*.



## La red FA/BRCA SIMPLIFICADA

La red FA-CHKREC y sus reglas lógicas asociadas integran de manera simplificada la mayor parte del conocimiento experimental de la vía FA/BRCA y sus interacciones con el *checkpoint* y el *CHKREC*.



(Figura 8. Leyenda en la siguiente página)

**Figura 8. La red de regulación del modelo FA/BRCA SIMPLIFICADO (página anterior).** En respuesta a un ICL, la red FA/BRCA responde bloqueando el ciclo celular a través de las cinasas ATR y ATM y su blanco río abajo p53. Del mismo modo, el complejo central AF (FAcore) se activa y ubiquitina al complejo FANCD21, el cual recluta a endonucleasas de DNA (NUC1 and NUC2). Estas endonucleasas desenganchan el ICL y generan un aducto de DNA (ADD) y una ruptura de doble hebra (DSB). La síntesis translesión se encarga de sobrepasar el ADD mientras que el DSB puede ser reparado ya sea por una recombinación homóloga dependiente de la vía FA/BRCA (FAHRR), una recombinación homóloga independiente de la vía FA/BRCA (HRR2), o por una ruta de reparación propensa a error, en este caso la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Finalmente, predecimos que el nodo CHKREC, compuesto por el programa transcripcional de G2/M y las proteínas del checkpoint recovery, inactivan al checkpoint y a las proteína de reparación del DNA.

### ***Dinámica del MB de la red FA/BRCA SIMPLIFICADA***

Una vez que la reparación del daño al DNA se ha completado la célula activa el proceso de división celular, por lo que al modelar la reparación mediada por la vía FA/BRCA esperamos encontrar este comportamiento. En la Figura 9A vemos que si se modela a la red FA/BRCA y al checkpoint sin tomar en cuenta la existencia del *checkpoint recovery* entonces el sistema no es capaz de inactivar al checkpoint y la célula se queda en un estado de arresto permanente del ciclo celular a pesar de haber reparado el daño. Una vez que el nodo *CHKREC* fue incorporado el sistema es capaz de apagar al checkpoint cuando el daño ha sido reparado (Figura 9B). Esto muestra desde la topología de la red que el nodo *CHKREC* es indispensable como un regulador negativo del *checkpoint* para recapitular el comportamiento celular completo cuando el DNA ha sido dañado.

Una vez teniendo una red completa, se llevaron a cabo simulaciones sincrónicas con el MB simplificado en condiciones *wild type* y de mutaciones en el nodo FAcore. En cada una de las simulaciones se analizó el papel del *CHKREC* y se compararon los resultados entre ambas. Nuestras simulaciones recapitulan dos

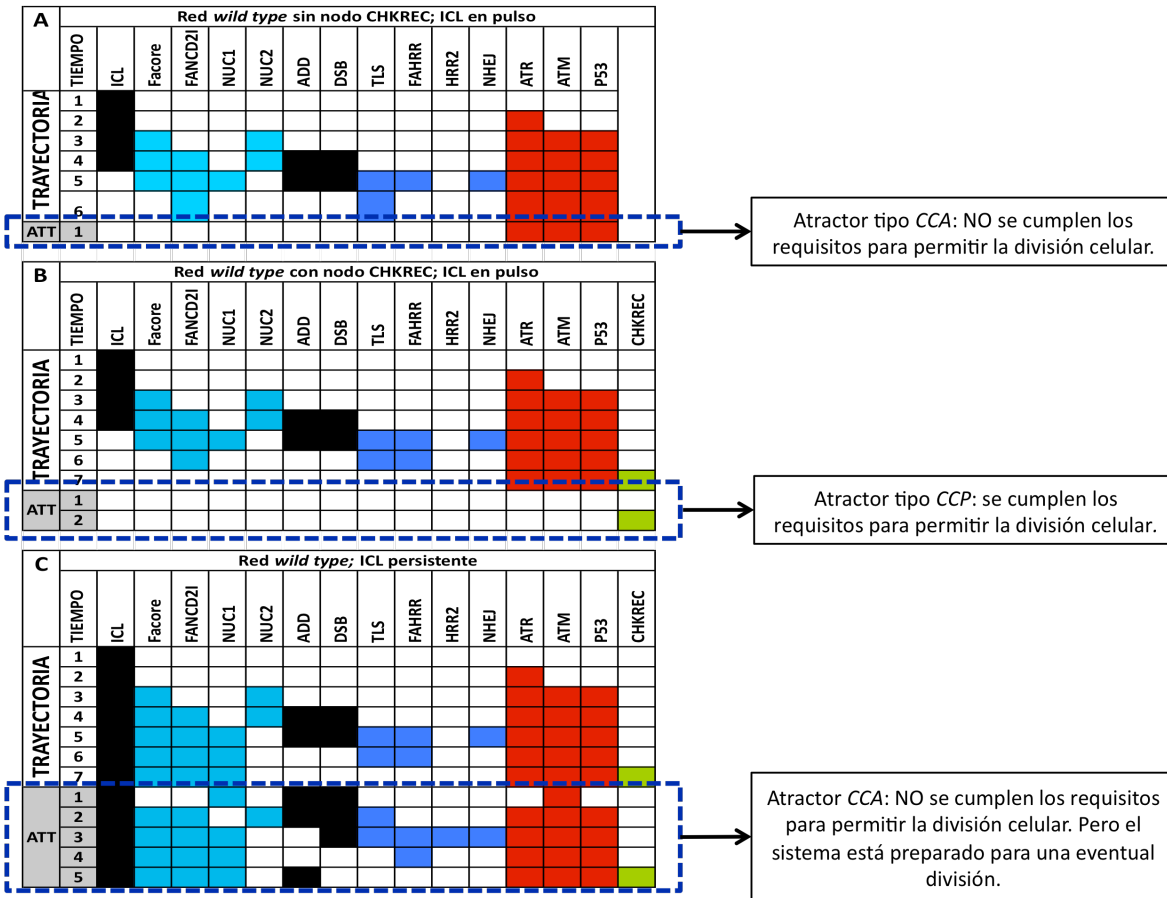
comportamientos celulares relevantes en el campo del daño en el DNA y están representados por dos atractores específicos. Denominamos a estos atractores como **1) el atractor de progresión del ciclo celular (CCP)** y **2) el atractor de arresto del ciclo celular (CCA)**. El atractor CCP se caracteriza por el apagado de cada uno de los componentes del *checkpoint* (ATM, ATR y p53), lo cual está mediada por el nodo del *CHKREC*; la llegada a este atractor implica que se permitirá la división celular. En nuestro modelo la simulación *wild type* y la simulación del mutante de FAcCore alcanzan el atractor de CCP después de un pulso de ICL.

Por otro lado, el atractor CCA representa el arresto del ciclo celular mediado por el *checkpoint* cuando hay persistencia de daño en el DNA y la célula está llevando a cabo procesos de reparación. Una vez que el sistema ha alcanzado el atractor CCA hay activación recurrente de los nodos de reparación del DNA y de los nodos del *checkpoint*, los cuales sin embargo están acompañados por activación intermitente del nodo de *CHKREC*, esto sugiere que la activación del *CHKREC* puede ocurrir mientras la célula está arrestada pero no es suficiente para que la célula se divida a menos que el daño en el DNA haya sido totalmente removido.

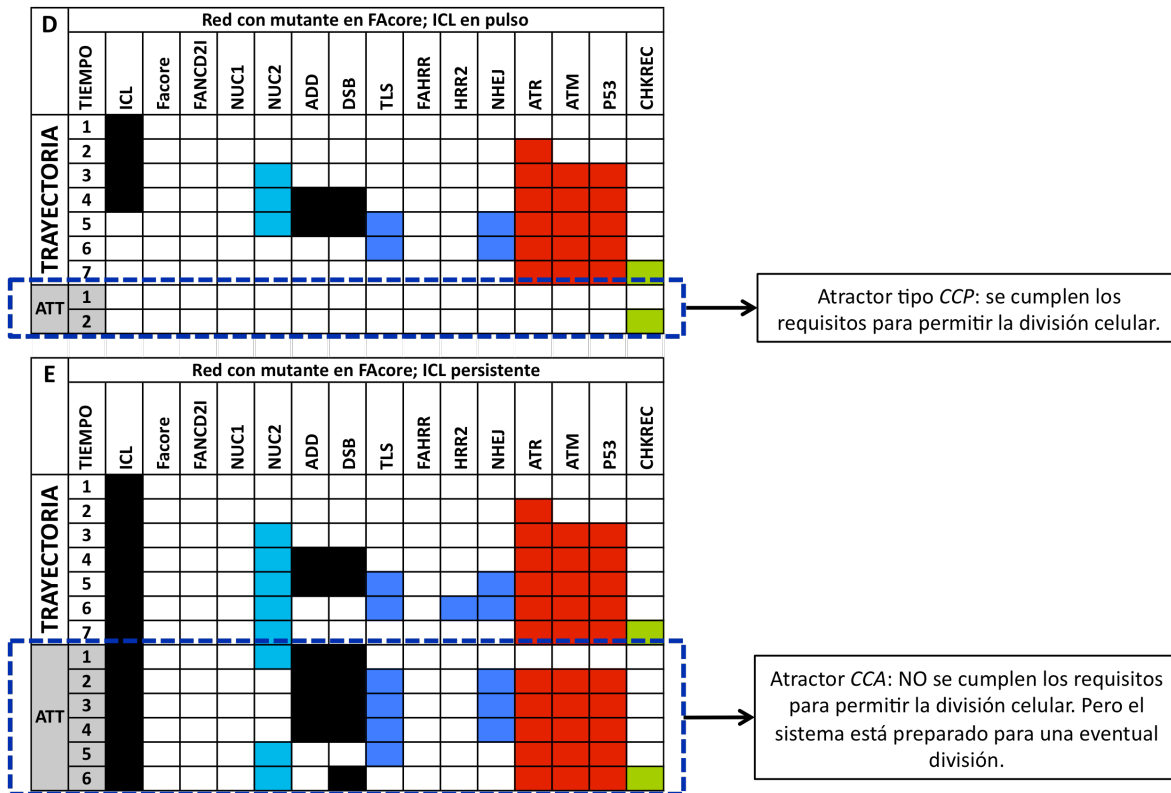
En nuestras simulaciones con el nodo ICL constantemente activado (permanentemente en 1) la simulación *wild type* y la mutante de FAcCore alcanzan un atractor CCA con activación de los nodos de *checkpoint* y del *CHKREC*. En la simulación *wild type* observamos que los componentes del *checkpoint* nunca están completamente apagados en presencia de DSBs o durante el estímulo del



ICL, sin embargo, la mutante de FAcCore tiene estados transitorios en los cuales los DSBs están activos y los componentes del checkpoint están inactivos, lo cual ocurre en respuesta a la activación del *CHKREC* en el paso previo. Este resultado sugiere que las células AF podrían sobrepasar el arresto del ciclo celular con ayuda del *CHKREC*, a pesar de tener daño no reparado.



**Figura 9. Simulaciones con el modelo FA/BRCA SIMPLIFICADO.** (A) La información actual con respecto a la vía FA/BRCA no muestra datos sobre el mecanismo que permite la resolución del checkpoint de G2/M después de la reparación del daño al DNA ni la subsecuente división celular, por lo que la inclusión del nodo *CHKREC*, como un regulador negativo del *checkpoint*, permite explorar los mecanismos detrás de la división celular después de la resolución del *checkpoint*.

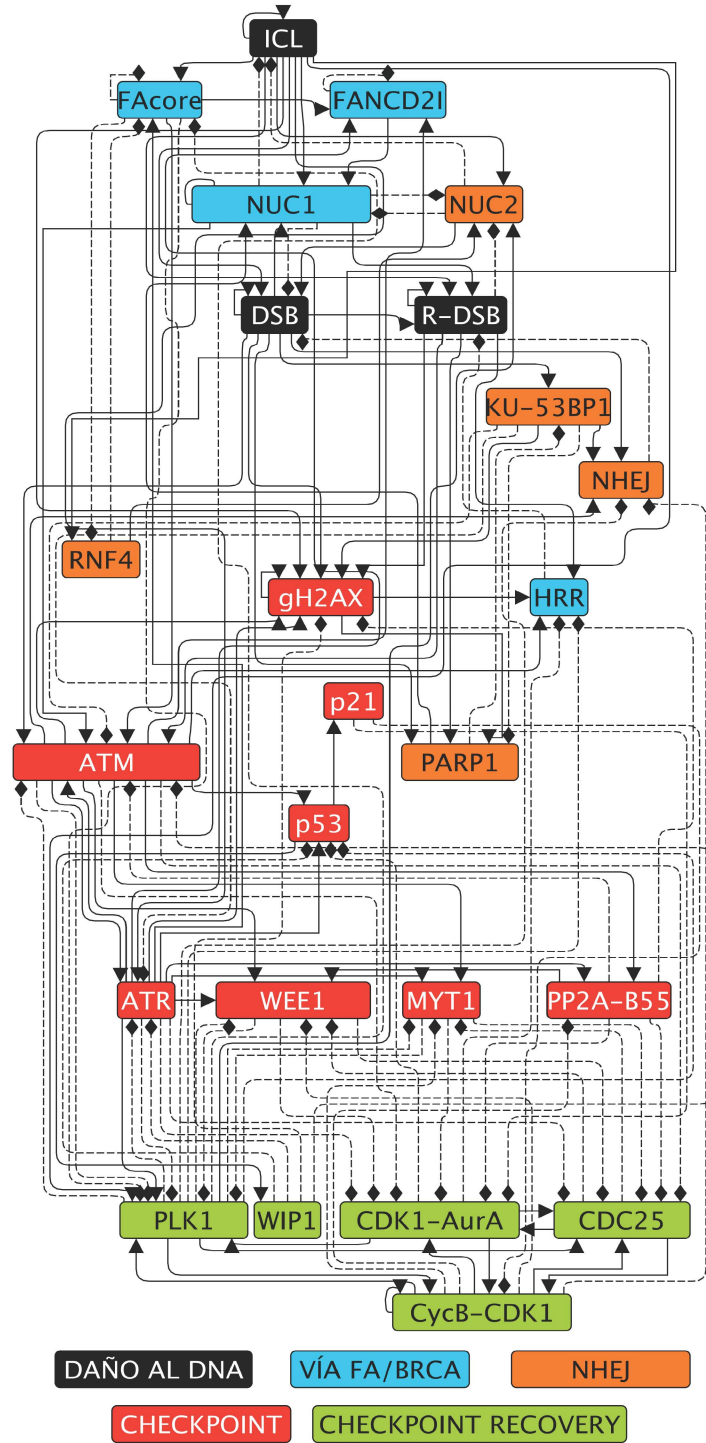


**Figura 9. (Continuación).** (B) En esta simulación las células *wild type* reparan el daño en el DNA a través de la vía FA/BRCA y gracias a la inclusión del nodo CHKREC llegan a un atractor CCP después una vez que el daño ha sido reparado. (C) En respuesta a un ICL persistente, las células *wild type* llegan a un atractor CCA con activación del checkpoint y de los nodos de reparación, el nodo del CHKREC puede activarse eventualmente en este atractor. (D) Las mutantes del FAcore en respuesta a un pulso de ICL activan a la vía de NHEJ para reparar el daño en el DNA y llegar al atractor CCP. (E) En respuesta a un ICL persistente, las mutantes del FAcore activan concomitantemente a los nodos del *checkpoint* y del CHKREC.

Después de percartarnos de que el nodo *CHKREC* es crítico para el funcionamiento de la red decidimos desglosarlo en sus distintos componentes para poder estudiar en detalle a cada uno de ellos y saber que contribución tienen con la tolerancia al daño en el DNA. Ese nuevo modelo se muestra a continuación.

## ***LA RED FA-CHKREC***

La red FA-CHKREC está compuesta por 25 nodos y 123 interacciones regulatorias (69 positivas y 54 negativas). También incluye 18 interacciones inferidas que fueron necesarias para que el modelo recuperara el comportamiento dinámico observado experimentalmente. Dado que no existen reportes acerca de estas interacciones consideramos que se trata de predicciones de nuestro modelo que pueden ser validadas experimentalmente. Dos de estas interacciones son especialmente relevantes para explicar la adaptación al daño en el DNA que se observa en las células con AF. Estas predicciones se presentarán con más detalle.



(Figura 10. Leyenda en la siguiente página)

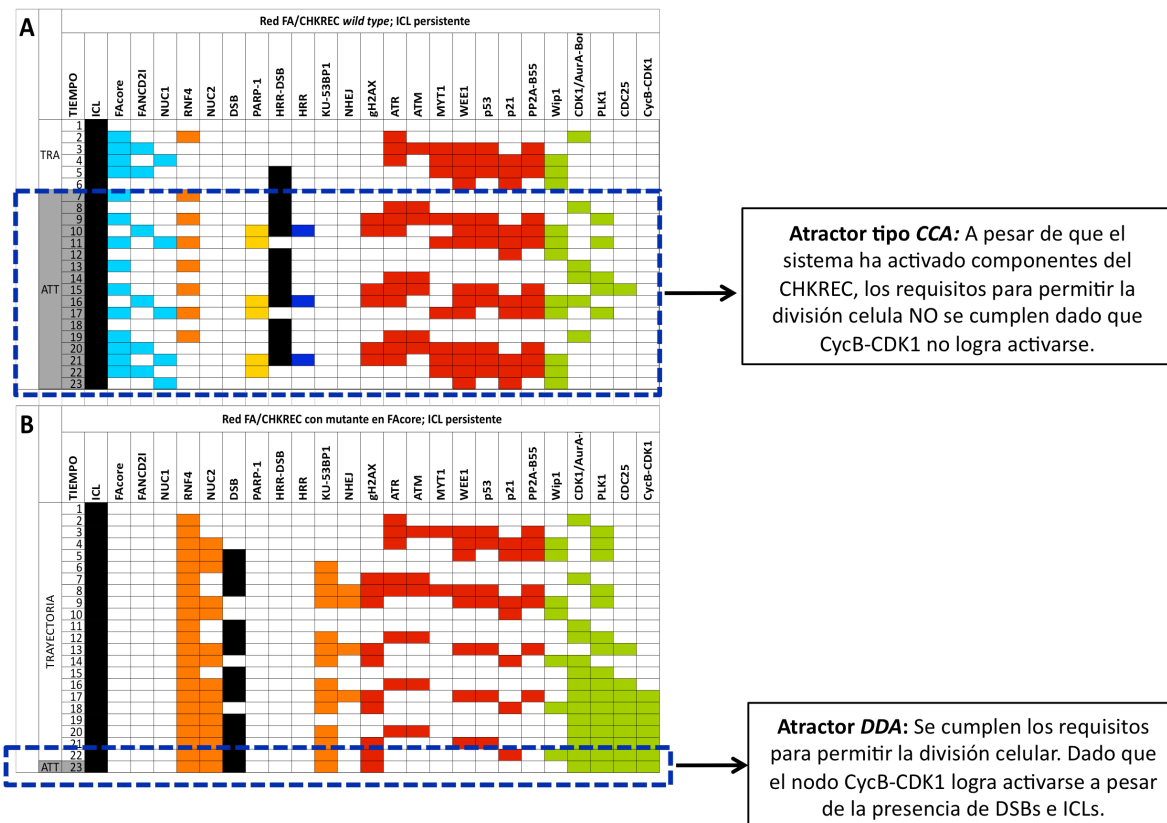
**Figura 10. La red de regulación del modelo FA-CHKREC (página anterior).** La red de regulación del modelo FA-CHKREC incluye tres nodos de daño en el DNA, los distintos nodos de reparación mediada por la vía FA/BRCA y un desglose de los principales componentes del *checkpoint* y del *CHKREC*.

### ***Dinámica del MB de la red FA-CHKREC wild type***

Los atractores obtenidos con el modelo FA/CHKREC en cada simulación de daño fueron considerados una decisión celular con respecto a la presencia de daño y fueron clasificados como: **1) *progresión normal del ciclo celular (NCCP***, por sus siglas en inglés); **2) *adaptación al daño en el DNA (DDA***, por sus siglas en inglés), y **3) el *atractor de arresto del ciclo celular (CCA***, por sus siglas en inglés). Nótese que el atractor CCP, de progresión del ciclo celular, del modelo *FA-BRCA simplificado* tiene dos versiones en el modelo FA-CHKREC, correspondientes a *NCCP* y *DDA*, pues dicha progresión puede ocurrir sin daño u ocurrir con daño, lo cual indica adaptación de la célula dañada.

El atractor *NCCP* se caracteriza por la activación de los promotores de la división celular (CDK1/Aurora A, PLK1, CDC25 y Cyclin B/CDK1) y por la ausencia de daño; el atractor *CCA* muestra activación de todos los bloqueadores de la división celular (ATM, ATR, p53, p21, WEE1, y MYT1) y presencia de daño; finalmente el atractor *DDA* muestra activación de los promotores de la división y de los nodos de DNA dañado. Debe notarse que un atractor *CCA* en este modelo puede considerarse como un estado transitorio hacia la apoptosis o la senescencia cuando el daño no ha sido reparado, sin embargo, el modelo no toma en cuenta esas salidas hasta este punto.

En nuestras simulaciones con la red *wild type* se observa claramente como un pulso de daño, ya sea DSB o ICL es reparado a través de la activación temporal de los componentes del DDR. Una vez que el daño ha sido reparado, el *CHKREC* inactiva al *checkpoint* y la célula procede a mitosis sin daño en el DNA, esto se considera un atractor NCCP. Sin embargo, la persistencia de daño conduce a un atractor CCA.



**Figura 11. Trayectorias y atractores obtenidos en la simulación del MB FA-CHKREC. (A)** Se observa que la red *wild type* en presencia de ICL persistente llega a un atractor CCA, en el cual las condiciones para dividirse no se cumplen mientras los nodos ICL y DSB estén encendidos. **(B)** En la red mutante de FAcore en presencia de ICL persistente se llega a un atractor de tipo DDA, en el cual reobserva que la célula ha activado al *CHKREC* a pesar de que los nodos ICL y DSB están encendidos, con esto se cumplen las condiciones para que la célula entre a división. **TRA:** Trayectoria

## ***Dinámica del MB FA-CHKREC con mutantes del checkpoint o del CHKREC***

Se verificó que nuestro modelo recapitulara el comportamiento conocido para los diferentes componentes del *checkpoint* y del *CHKREC* y de sus mutantes. Observamos que en presencia de daño persistente, los mutantes del *checkpoint* optan por llegar a un atractor de tipo DDA, mientras que los mutantes del *CHKREC* optan por llegar a un atractor de tipo CCA dado que la progresión en el ciclo celular está impedida.

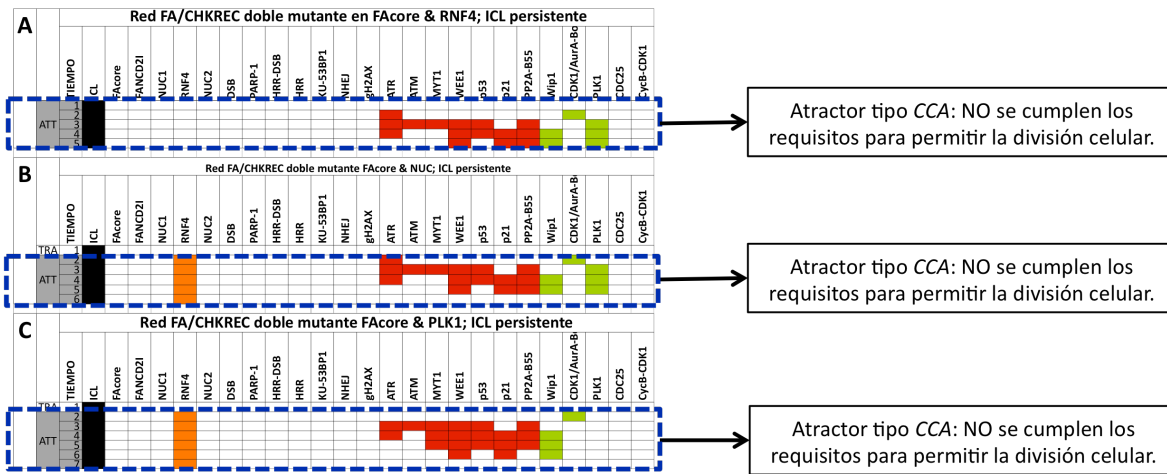
## ***Dinámica del MB FA-CHKREC en los mutantes de AF***

Es de gran relevancia el hecho de que, a pesar de tener un *checkpoint* de G2/M aparentemente normal, las células AF progresen en el ciclo celular con mayor cantidad de daño no reparado que las células normales. En las células AF dicho bloqueo en G2/M se ha atribuido a la hiper-activación del eje p53 y p21 (Ceccaldi, Parmar et al. 2012), pero nuestro grupo también observó recientemente que un programa desregulado de *CHKREC* con niveles bajos de MYT1 y de WEE1 y niveles elevados de PLK1 y de CDC25 podrían ser parcialmente responsables de la liberación de células con daño no reparado, a pesar del bloqueo de G2/M aparentemente normal (Rodríguez, Torres et al. 2015).

Para investigar el proceso responsable de la DDA en las células AF simulamos la dinámica de la mutante del nodo FAcCore. En estas simulaciones encontramos que nuestro modelo recapitula la respuesta de las células AF a los ICLs, incluyendo: la capacidad de convertir los ICLs en DSBs, la activación de la vía de NHEJ,

activación del *checkpoint* dependiente de p53 y p21 y nuestra propuesta reciente de sub-activación de las proteínas del *checkpoint* WEE1 y MYT1 (Figura 11B).

Para encontrar nodos relevantes para el DDA en la mutantes de FAcCore simulamos la mutante nula del FAcCore en combinación con todas posibles mutantes nulas del modelo. Encontramos que las dobles mutantes nulas del FAcCore y los nodos RNF4, NUC2 o PLK1 no llevan a cabo el desenganche inicial del ICL y no progresan en el ciclo celular, sino que se quedan arrestadas en un atractor de tipo CCA. Este comportamiento indica que los mecanismos de desenganche alternativo de ICLs en nuestro MB son críticos para la adaptación al daño en las células AF (Figura 12).



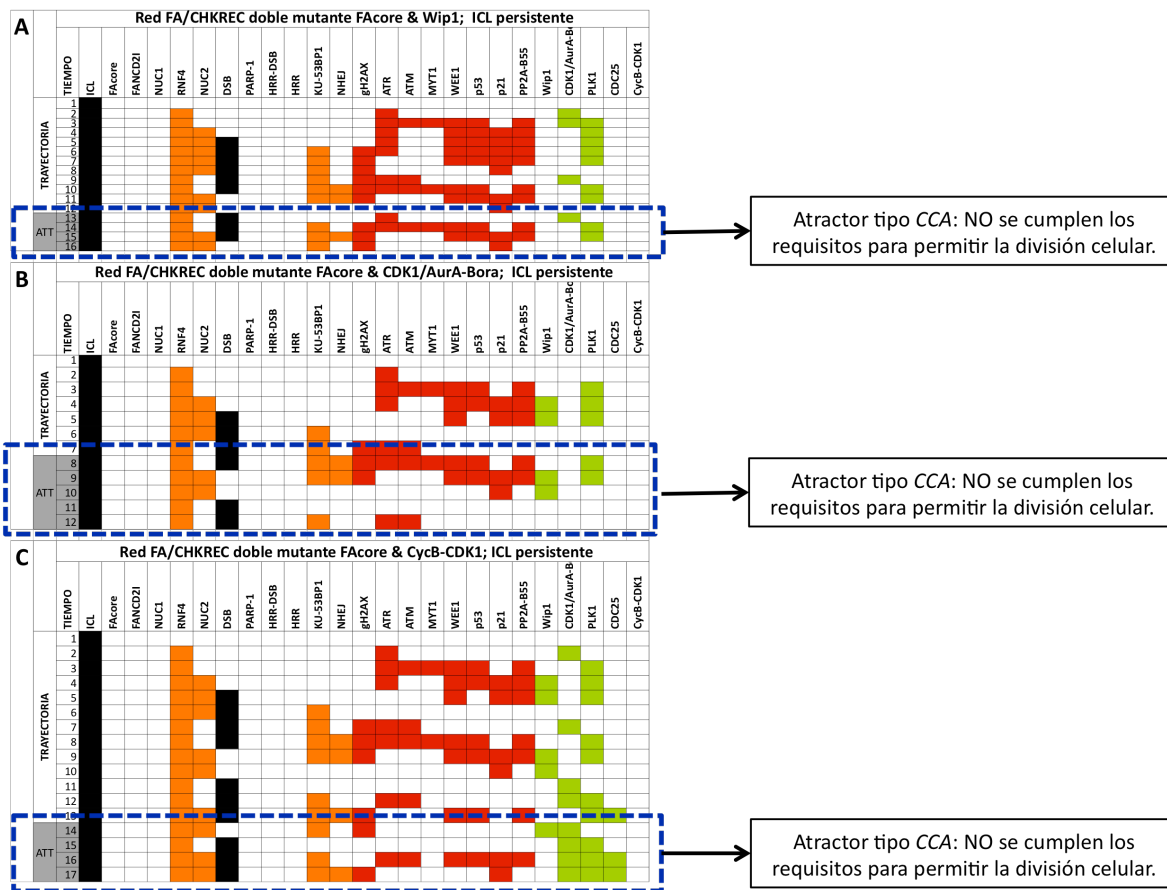
**Figura 12. Trayectorias y atractores obtenidos en la simulación del MB FA-CHKREC. (A)** Doble mutante en FAcCore y RNF4 en presencia de ICL persistente. **(B)** Doble mutante para FAcCore y NUC en presencia de ICL persistente. **(C)** Doble mutante para FAcCore y PLK1 en presencia de ICL persistente. Todos estas mutantes representan mecanismos alternativos de desenganche del ICL. En todos los casos se observa que la ausencia de estos nodos impide la división celular, por lo que el sistema llega a un atractor de tipo DDA. **TRA: Trayectoria.**

Por otro lado, las dobles mutantes que tienen pérdida de función de FAcCore y WIP1, CDK1/AurA-Bora, CDC25 o CycB-CDK1 son capaces de desenganchar el



ICL y generar rupturas de doble hebra, pero llegan a un atractor de tipo CCA, dada su incapacidad para inactivar a los componentes del *checkpoint*.

La fosfatasa WIP1 es particularmente relevante para la DDA ya que es capaz de inhibir tanto a los componentes del *checkpoint* de G2/M como a los componentes del DDR. Además la inhibición de WIP1 se ha asociado con reducción de la tumorigenesis e inducción de CCA en células cancerosas.



**Figura 13. Trayectorias y atractores obtenidos en la simulación del MB FA-CHKREC para las mutantes dobles de FAcore y del CHKREC. (A) Doble mutante FAcore y WIP1 en presencia de ICL persistente. (B) Doble mutante para FAcore y CDK1/AurA-Bora en presencia de ICL persistente. (C) Doble mutante para FAcore y CycB-CDK1 en presencia de ICL persistente. En todas las mutantes se observa que las células AF pierden la capacidad de activar la división celular, por lo que el sistema llega a un atractor de tipo DDA.**

## **APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MODELOS FA/BRCA SIMPLIFICADO Y FA-CHKREC**

Nuestra aproximación por medio del modelado para estudiar a la AF generó varias predicciones interesantes acerca del efecto que tienen las mutaciones AF en el proceso de reparación y tolerancia al daño en el DNA, dentro de estas hemos decidido enfocarnos en analizar experimentalmente una de ellas. Esta predicción indica que la inhibición que ejerce el *CHKREC* sobre los componentes del *checkpoint* es lo que permite la división de las células AF con gran cantidad de daño no reparado.

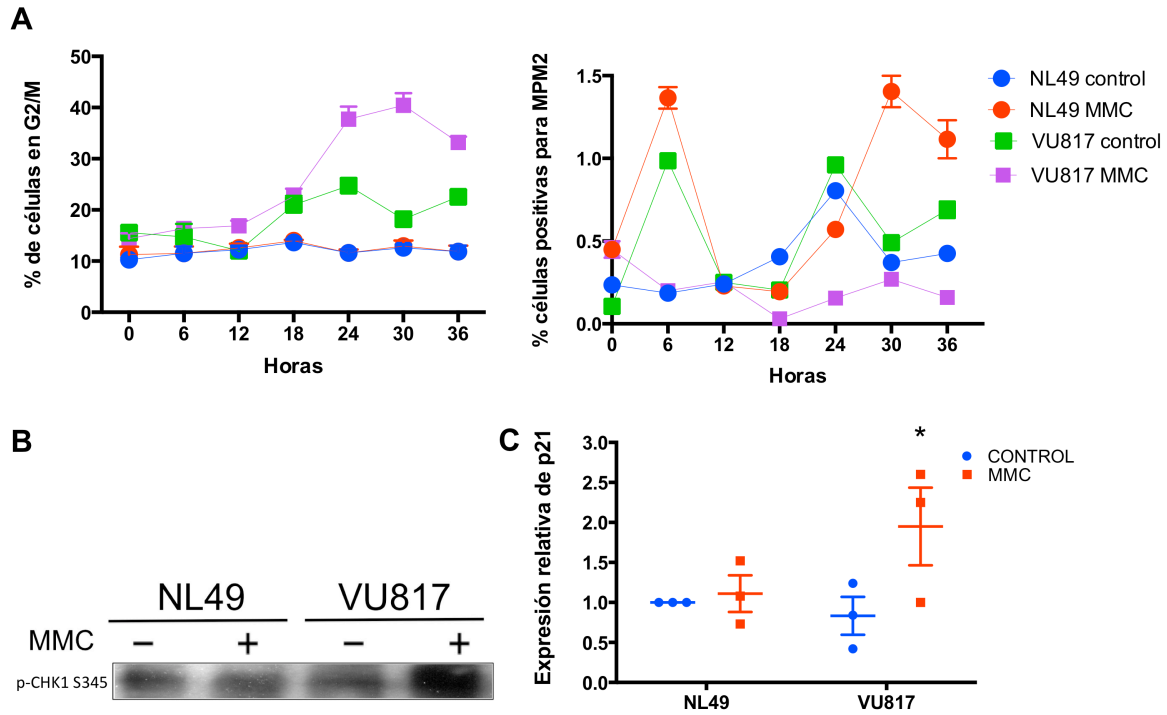
***HIPÓTESIS EXPERIMENTAL No. 1: Los componentes del CHKREC están activos en las células AF y generan un umbral de tolerancia que les permite dividirse con daño no reparado***

Las células deben dividirse únicamente después de que el daño en el DNA ha sido reparado (Zhou and Elledge 2000) (Khanna and Jackson 2001), lo cual se logra manteniendo sistemas eficientes de reparación y una activación apropiada del checkpoint de G2/M. Las mutantes del FAcore tienen defectos en la reparación del DNA pero poseen, en apariencia, una activación apropiada del checkpoint de G2/M. Nuestros modelos predicen que el apagado del *checkpoint* de G2/M en las células AF ocurriría a través de la activación del *CHKREC*, y esto permitiría la división de las células con DNA dañado. Primero verificamos esta predicciónn siguiendo el tránsito de las células a través de la fase G2 a M durante la

exposición a MMC. Evaluamos la activación del *checkpoint* mediante el uso de varios marcadores.

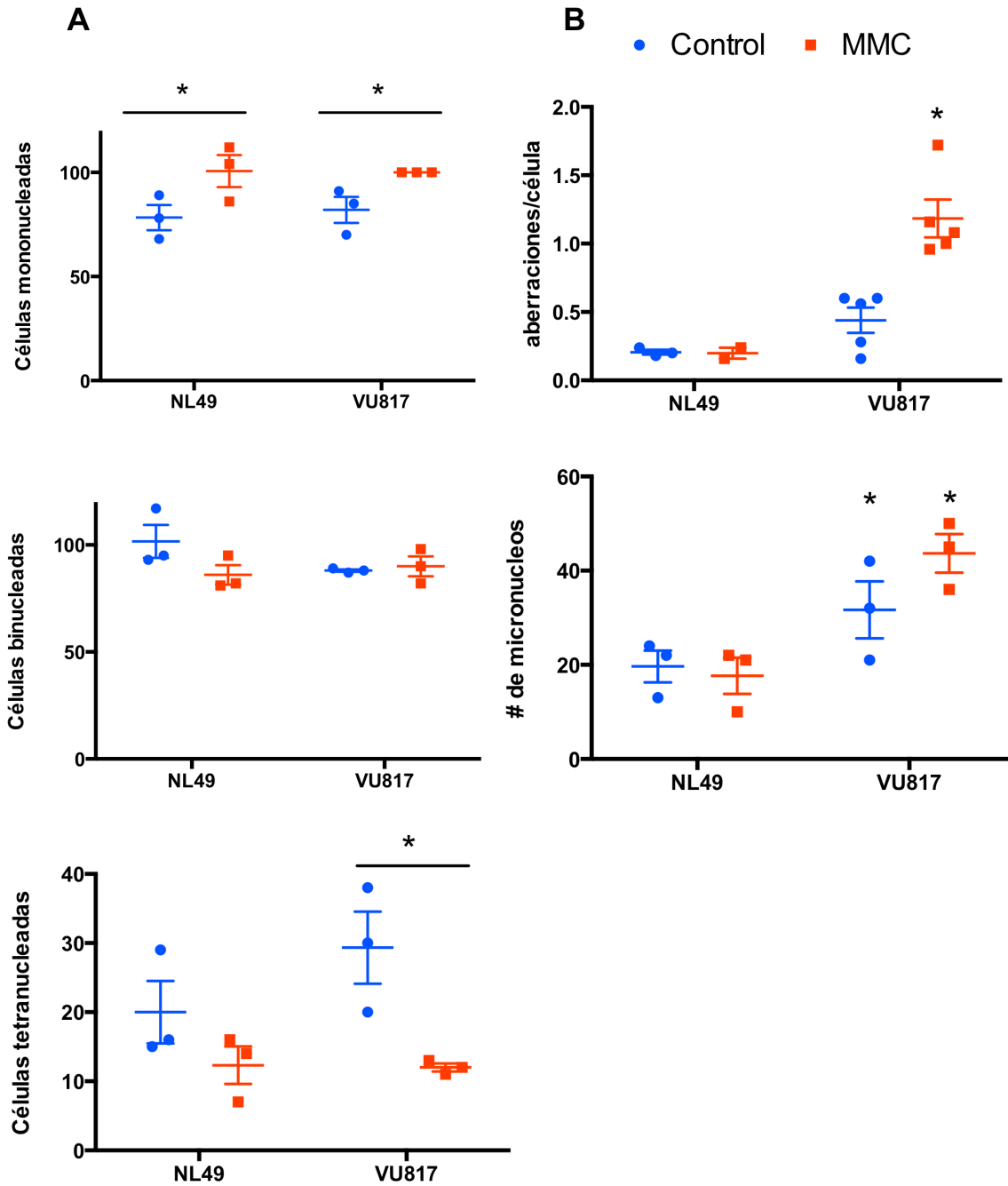
El análisis de distribución en el ciclo celular usando Yoduro de propidio mostró que la MMC induce un incremento en el número de células AF arrestadas en la fase G2 del ciclo celular y reduce el índice mitótico. También se observó que las células AF incrementan la cantidad de CHK1 fosforilado y aumentan la expresión del mensajero de p21, dos de los principales bloqueadores de la transición G2/M. Estos experimentos reiteran que las células AF son capaces de activar los mecanismos que arrestan la progresión del ciclo celular después de la inducción de daño en el DNA (Figura 14).

Se evaluó además la capacidad de división de las células a pesar del daño. Para tal efecto cuantificamos la frecuencia de AC en las células en metafase y la cantidad de daño heredándose en cada división en forma de micronúcleos en las células multinucleadas. En los experimentos con Citocalasina B encontramos que la MMC incrementa el número de células mononucleadas (células que no se han dividido debido al arresto en G2) y redujo el número de células tetranucleadas en AF, lo cual indica que están perdiendo la capacidad de división (Figura 15).



**Figura 14. Las células AF se arrestan en la fase G2 en respuesta a la MMC. (A)** Análisis por citometría de flujo que muestra la acumulación de las células en fase G2 en respuesta a la MMC (panel izquierdo) y número reducido de células AF en mitosis en comparación con las células normales (panel derecho). **(B)** Las células AF activan a la cinasa CHK1 en respuesta al tratamiento con MMC. **(C)** Las células AF incrementan la expresión del RNA mensajero de p21 ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ).

Por otro lado el análisis de las AC en metafase mostró que las células AF alcanzan la mitosis con un número significativamente elevado de AC en comparación a las células normales. Estos experimentos muestran que las células AF primero se arrestan en respuesta al daño y eventualmente son capaces de dividirse con daño no reparado (Figura 15).

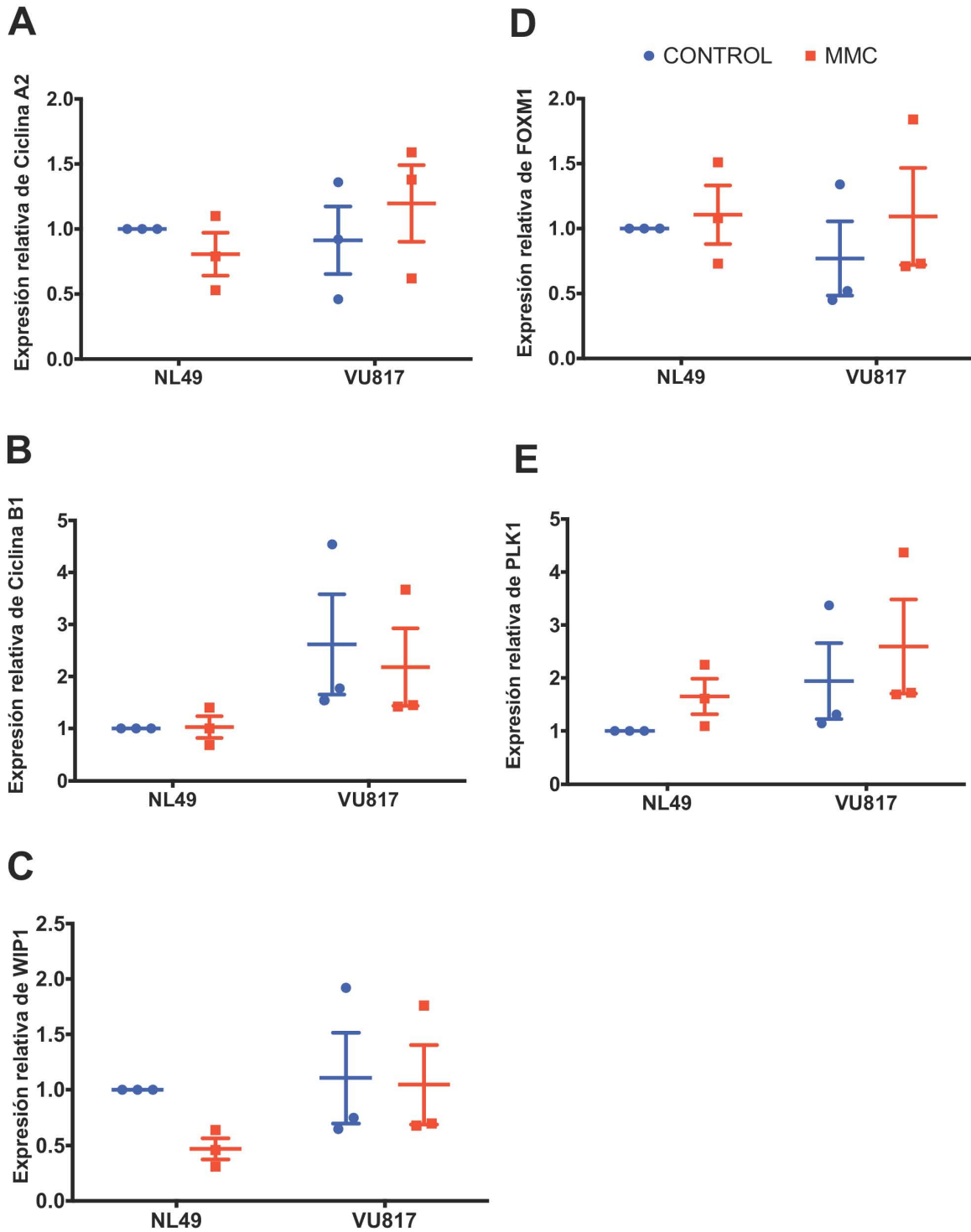


**Figura 15. Las células AF se dividen a pesar del tratamiento con MMC y son capaces de resolver el arresto del ciclo celular. (A)** El número de células mononucleadas (panel superior), células binucleadas (panel medio) y células tetranucleadas (panel inferior) se cuantificó después de 24 horas de exposición a MMC y citocalasina B (48 h). Se cuantificó el número basal de células binucleadas y tetranucleadas sin citocalasina B y se restó del número total. **(B)** A pesar del arresto en G2, las células AF llegan a mitosis con daño no reparado, esto fue demostrado mediante dos análisis independientes número incrementado de aberraciones cromosómicas (panel superior) y número incrementado de micronúcleos en células binucleadas (panel inferior) ( $n = 3, p < 0.05$ ).

Como se sugiere en nuestro modelo, la activación del *CHKREC* podría ser la responsable de mitigar el arresto del ciclo celular y permitir la división celular. Para determinarlo analizamos por qRT-PCR la expresión del programa transcripcional de G2, cuyos productos proteícos son necesarios para la transición G2/M, lo cual incluye a la Ciclina A2 (*CCNA2*), Ciclina B1 (*CCNB1*), WIP1 (*PPM1D*), *FOXM1* y *PLK1* (van Vugt and Yaffe 2010). En los resultados observamos que los niveles de expresión de estos genes no se afectan en las células AF y no se afectan por el tratamiento con MMC, lo cual sugiere que este programa permanece latente para la resolución del bloqueo de G2 en las células AF con DNA dañado (Figura 16).

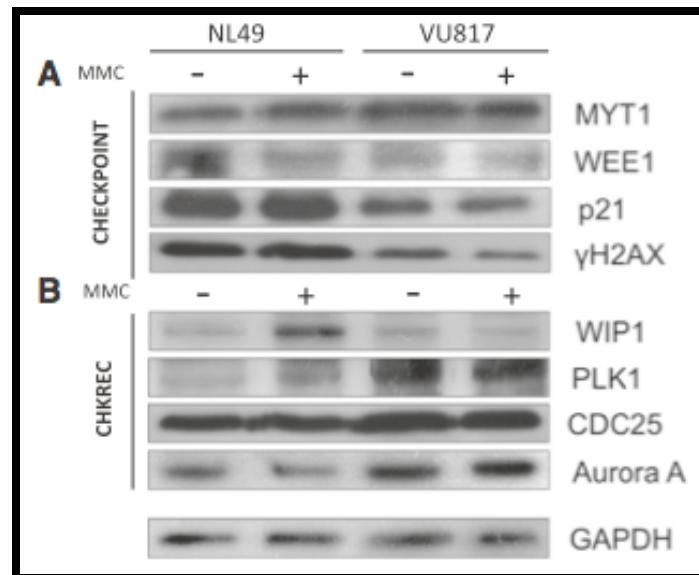
Además de CHK1 se evaluó por medio del Western Blot la activación de otras proteínas del *checkpoint*, lo cual incluyó a WEE1, MYT1, p21 y  $\gamma$ H2AX; y del *CHKREC*: WIP1, Aurora A, PLK1 y CDC25B. En este análisis encontramos que la actividad de CHK1 se incrementa después del tratamiento con MMC en las células AF, pero los otros componentes del *checkpoint* WEE1, p21 y  $\gamma$  H2AX, tienen niveles reducidos. También observamos activación concomitante de las proteínas del *CHKREC*: PLK1, CDC25B y Aurora A en las células AF con DNA dañado, lo cual indica que a pesar de tener una activación importante de CHK1, lo cual conduciría al arresto del ciclo celular, las células AF co-expresan a los componentes del *CHKREC* (Figura 17). En concordancia con esto, observamos que las células AF tienen niveles reducidos de la histona  $\gamma$ H2AX, un marcador clásico de rupturas de doble hebra y blanco de la fosfatasa WIP1. También

encontramos reducción en la señal de p21, lo cual ha sido relacionado con la activación del *CHKREC* (Amador, Ge et al. 2007).



**Figura 16. Las células AF tienen un patrón de expresión que es compatible con la resolución del checkpoint de G2/M.** La expresión de los genes del programa transcripcional de G2 no muestra diferencias a pesar del tratamiento con MMC. **(A)** Cyclin A2, **(B)** Cyclin B1, **(C)** WIP1, **(D)** FOXM1 y **(E)** PLK1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes entre los distintos grupos ( $n = 3$ ).

Estos experimentos muestran que el *CHKREC* se activa en las células AF con AC en un modo similar a como ocurre en las células normales no dañadas.



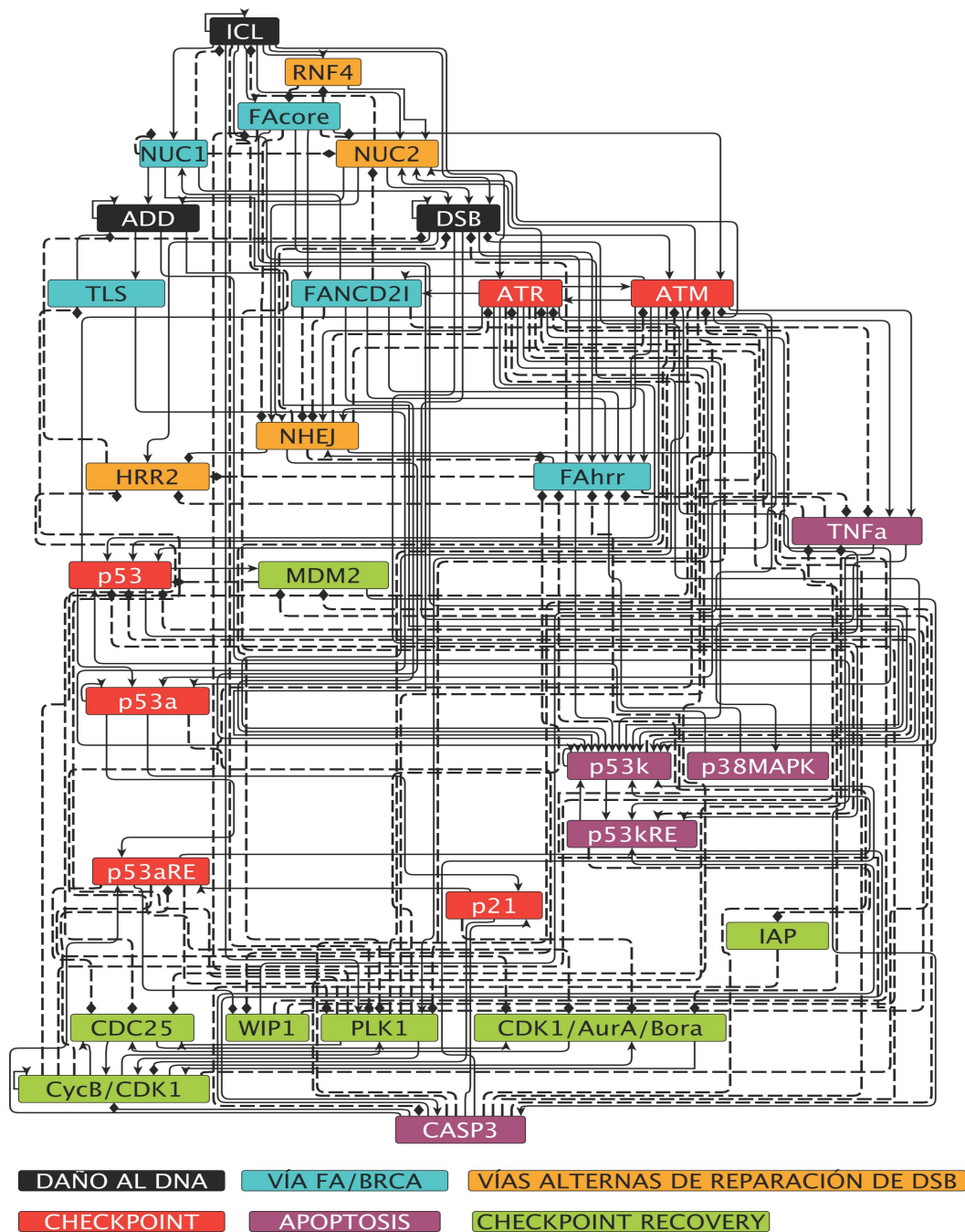
**Figura 17. Las células AF y normales co-expresan a las proteínas del checkpoint y del CHKREC.** **(A)** Western blot de las proteínas del *checkpoint* **(B)** Western blot de las proteínas del *CHKREC*. Las células AF incrementan la cantidad de algunas proteínas bloqueadoras de la fase G2, pero tienen reducción en otras. Aunque *CHK1* y *MYT1* muestran una señal incrementada *WEE1*,  $\gamma$ H2AX y *p21* se ven disminuidas en las células AF, esto debilita el bloqueo establecido por el *checkpoint*, el cual es eventualmente superado por la señalización del *CHKREC* ( $n = 3$ ).

## LA RED FA-APOPTOSIS

La red FA-APOPTOSIS está compuesta por 30 nodos y 185 interacciones regulatorias (117 positivas y 68 negativas). El modelo incluye 25 interacciones inferidas necesarias para recuperar el comportamiento del sistema que se observa



experimentalmente. Como ya se ha explicado antes, estas interacciones inferidas pueden considerarse predicciones del modelo. La red FA-APOPTOSIS puede verse en la Figura 18.



(Figura 18. Leyenda en la siguiente página)

**Figura 18. La red de regulación del modelo FA-APOPTOSIS (página anterior).** La red de regulación del modelo FA-APOPTOSIS incluye tres nodos de daño en el DNA, los distintos nodos de reparación mediada por la vía FA/BRCA, un desglose de los principales componentes del checkpoint y del *CHKREC*, y los componentes principales de la apoptosis inducida por daño en el DNA. La presencia de un ICL activa a los componentes de la vía FA/BRCA y a los componentes del checkpoint, entre ellos p53. Durante el arresto del ciclo celular p53a se activa y permite la reparación del daño en el DNA. Cuando el daño ha sido reparado se activa el *checkpoint recovery*. Cuando el daño no es reparable se activa p53k, el cual promueve la apoptosis. La activación inapropiada del *CHKREC* permitiría el escape de células con daño no reparado.

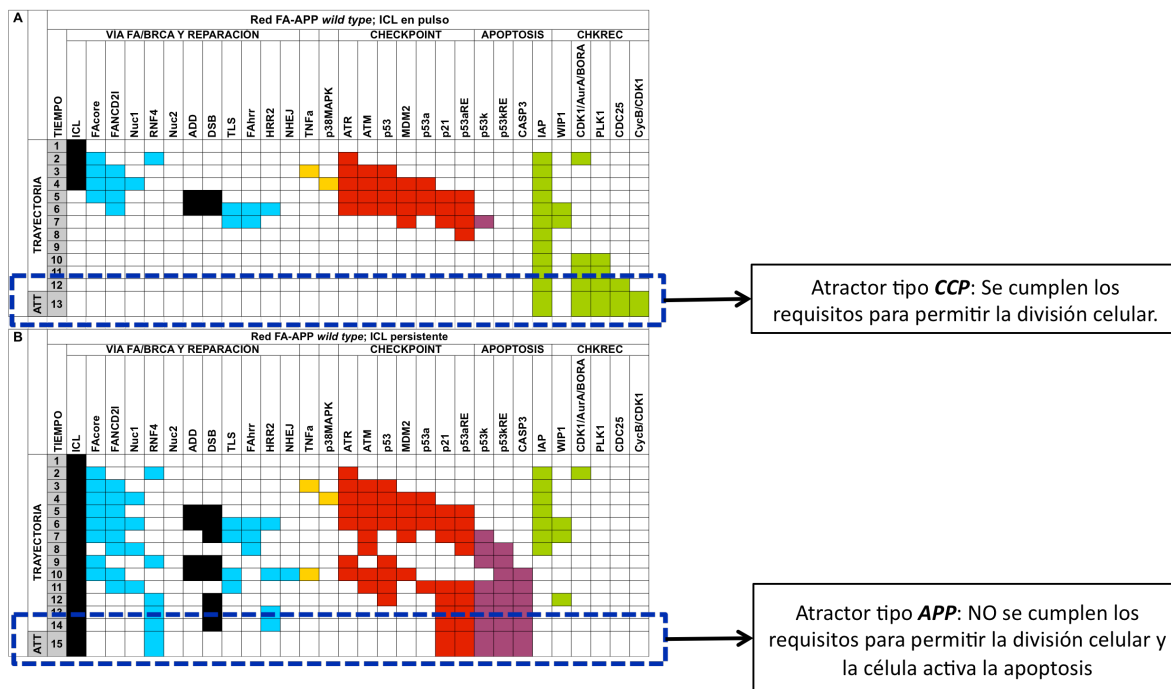
### ***Dinámica del MB de la red FA-APOPTOSIS wild type***

Los atractores obtenidos con el modelo en cada simulación de daño fueron considerados una decisión celular con respecto a la presencia de daño y fueron clasificados como: **1) atractor de progresión del ciclo celular (CCP**, por sus siglas en inglés); **2) atractor de arresto del ciclo celular (CCA**, por sus siglas en inglés) y **3) atractor de apoptosis (APP)**.

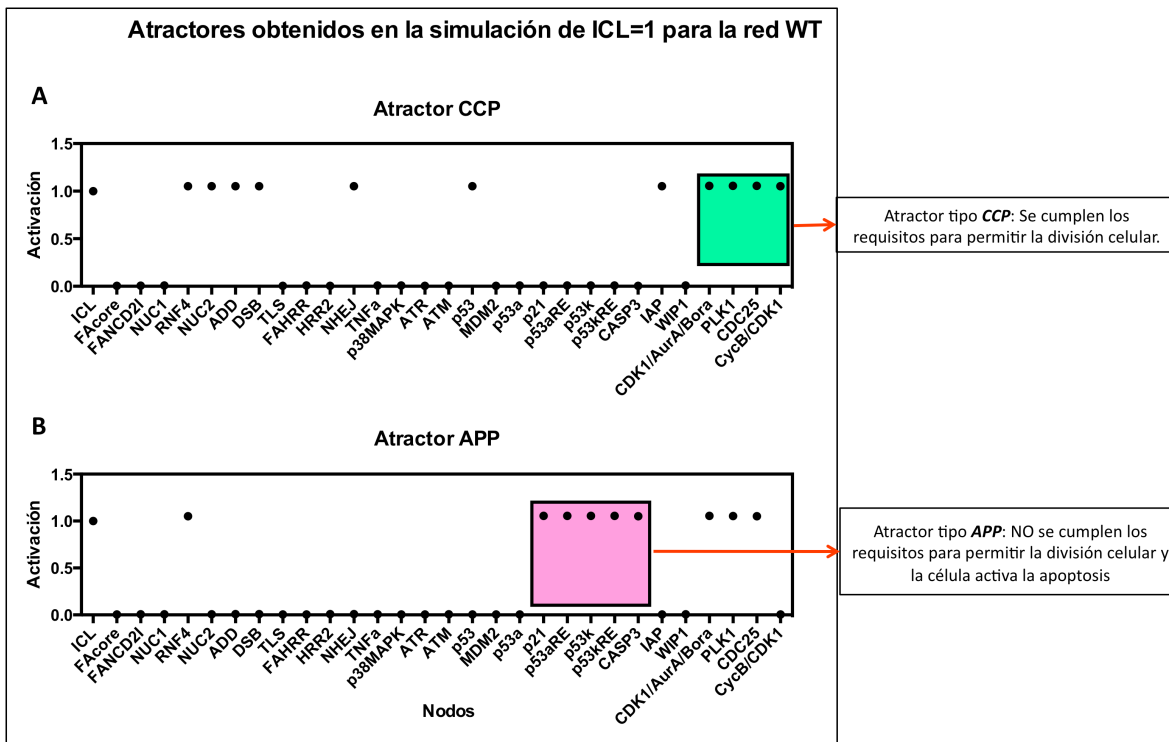
El atractor CCP se caracteriza por la activación de aquellas proteínas que promueven la división celular: WIP1, CDK1/Aurora-A/BORA, PLK1, CDC25 y Cyc B/CDK1; el atractor APP muestra activación de los bloqueadores de la progresión del ciclo celular: p21, p53aRE y de los promotores de la apoptosis: p53k, p53kRE y CASP3; finalmente el atractor CCA muestra activación de todos los bloqueadores de la división celular: ATM, ATR, p53, MDM2, p53a y p21.

En nuestras simulaciones con la red *wild type* se observa como un pulso de ICL activa al *checkpoint* mientras el DNA es reparado, posteriormente el *CHKREC* se activa apagando al *checkpoint* y permite que la célula proceda a mitosis sin daño en el DNA (Figura 19A), esto se considera un atractor CCP. Por el contrario, el daño persistente conduce a la célula al atractor APP (Figura 19B).

En la Figura 20 podemos observar las simulaciones de la versión continua del modelo en respuesta a ICLs persistentes. En este caso observamos que hay dos atractores, uno de tipo CCP y el otro de tipo APP. Es importante hacer notar que la versión discreta o Booleana del modelo FA-APOPTOSIS recupera unicamente al atractor APP en respuesta a ICL persistente, sin embargo al pasar a la versión continua del modelo aparece la posibilidad de dos atractores en respuesta al mismo estímulo, es decir la misma célula tiene ambas opciones



**Figura 19. Trayectorias y atractores obtenidos en la simulación del MB FA-APOPTOSIS para la red *wild type*.** (A) Simulación en respuesta a un pulso de ICL en la que se alcanza un atractor de tipo CCP debido a que el daño es reparado apropiadamente. (B) Simulación en respuesta a ICL persistente, se muestra que la división celular no se ha activado debido a que el daño se induce de manera permanente, por lo que el sistema llega a un atractor de tipo APP.



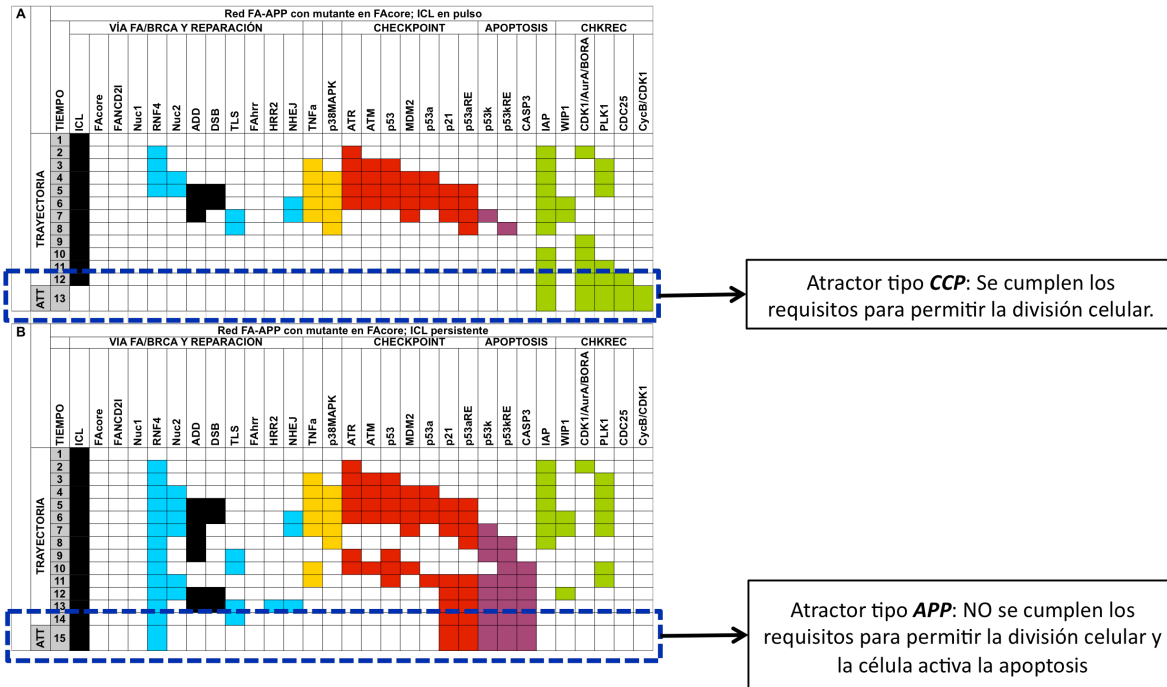
**Figura 20.** La versión continua del modelo permite obtener dos diferentes tipos de atractores en respuesta a ICL persistente en la red *wild type*. **(A)** Atractor de tipo CCP en el que a pesar de la presencia de ICL persistente se cumplen los requisitos para permitir la división celular. **(B)** Atractor de tipo APP en el que se muestra que el ICL persistente manda al sistema hacia la apoptosis. Esto muestra que la red *wild type* tiene múltiples salidas en respuesta a un ICL.

## ***Dinámica del MB de la red FA-APOPTOSIS en los mutantes de FAcore***

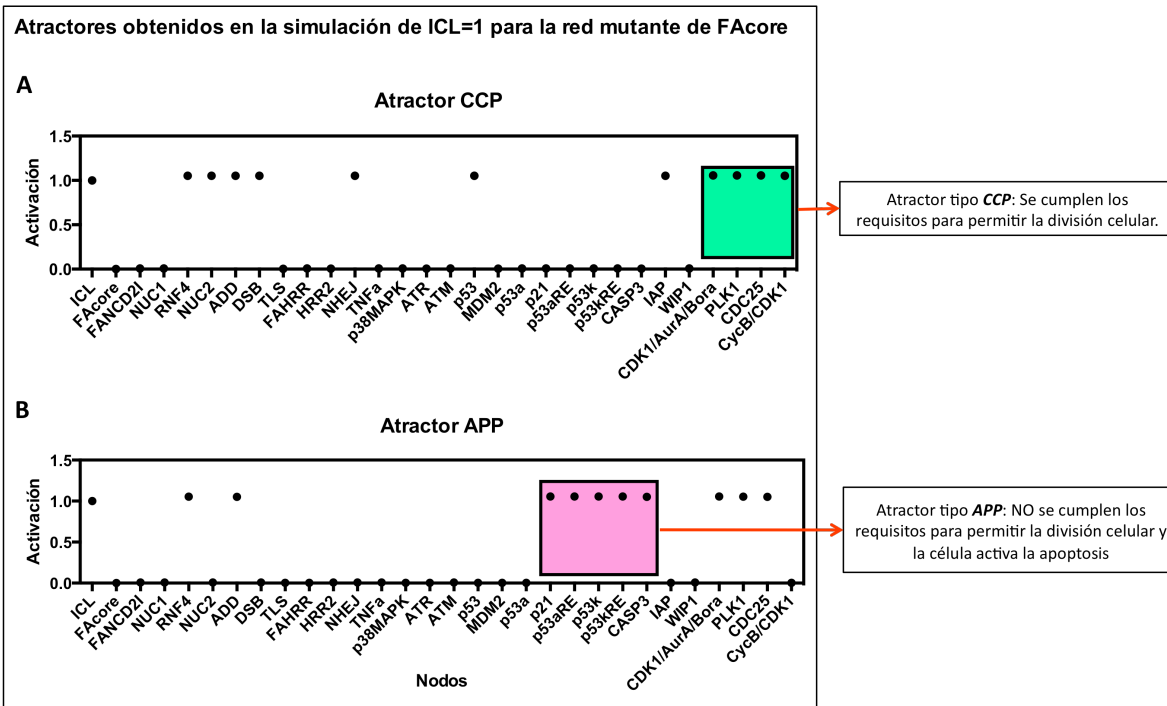
Después de llevar a cabo simulaciones con nuestro modelo en condiciones *wild-type*, simulamos la condición mutante en FAcore para un pulso de daño y para daño continuo. En el modelo discreto encontramos el atractor CCP cuando el estímulo del ICL es un pulso y encontramos al atractor APP cuando el estímulo del ICL es persistente (Figura 21); al evaluar las simulaciones en el modelo continuo encontramos para la simulación del ICL persistente que las células AF pueden alcanzar dos atractores, el atractor CCP y el atractor APP (Figura 22), lo cual

indica que nuestro modelo también es capaz de recapitular el comportamiento de las células AF con respecto al daño, es decir, las células AF pueden sobrevivir con daño no reparado o activar la apoptosis.

Aunque las células AF son más sensibles que las células normales al daño al DNA, debido a su incapacidad para repararlo apropiadamente, nuestro modelo no es capaz de recapitular esta mayor sensibilidad pues no utiliza probabilidades para llegar a un determinado atractor. Para poder obtener predicciones de ese tipo sería necesario generar un modelo probabilístico o un modelo de cultivo virtual en el que simulemos la probabilidad que tiene cada célula para alcanzar un determinado atractor. Por el momento, nuestro modelo es capaz de recapitular los atractores a los que puede llegar la célula y el camino hacia ése atractor, este último difiere entre la simulación *wild type* y la mutante de FAcCore (Figura 20 y Figura 21).

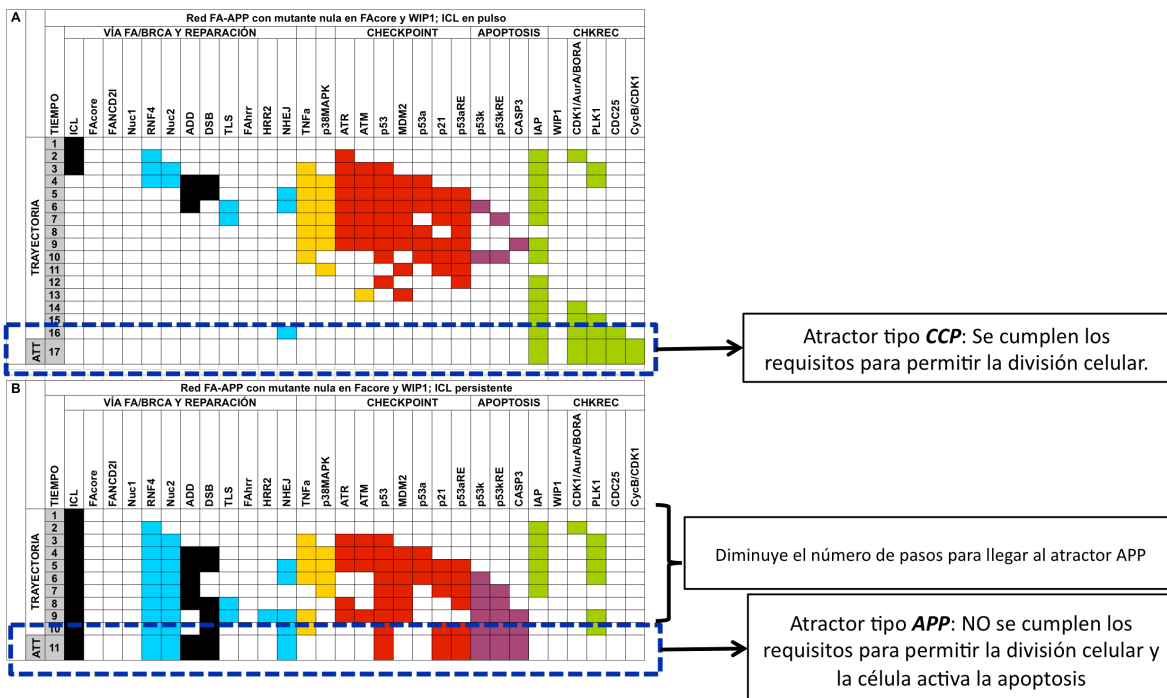


**Figura 21. Trayectorias y atractores obtenidos en la simulación del MB FA-APOPTOSIS para la mutante de FAcore.** (A) Simulación en respuesta a un pulso de ICL en la que se alcanza un atractor de tipo CCP debido a que la mutante de FAcore activa a la NHEJ para llevar a cabo la reparación del daño y a que se activan los mecanismos de tolerancia al daño. (B) Simulación en respuesta a ICL persistente, se muestra que la división celular no se ha activado debido a que el daño se induce de manera permanente, por lo que el sistema llega a un atractor de tipo APP.



**Figura 22. La versión continua del modelo permite obtener dos diferentes tipos de atractores en respuesta a ICL persistente en la red mutante para FAcCore. (A) Atractor de tipo CCP en el que a pesar de la presencia de ICL persistente se cumplen los requisitos para permitir la división celular. (B) Atractor de tipo APP en el que se muestra que el ICL persistente manda al sistema hacia la apoptosis. Esto muestra que la red mutante FAcCore tiene múltiples salidas en respuesta a un ICL.**

Como ya fue mencionado en las secciones anteriores la división con DNA dañado correría a cargo del *CHKREC*, así que en el modelo FA-APOPTOSIS simulamos qué pasaría si se inhibiera a dichos componentes. En este contexto encontramos que la inhibición de componentes críticos del *CHKREC*, tales como *WIP1* activaría en menos pasos a la apoptosis o mantendría a las células en un arresto permanente del ciclo celular. En la Figura 23 se pueden observar dichas simulaciones, la simulación ante un pulso de daño no muestra mayor diferencia (Figura 23A), sin embargo, en la simulación de daño persistente *p53* se estabiliza y envía en menos tiempo a la célula al atractor de apoptosis (Figura 23B), en comparación con el tiempo que tarda una célula AF sin inhibición de *WIP1* (comparar con Figura 20B).

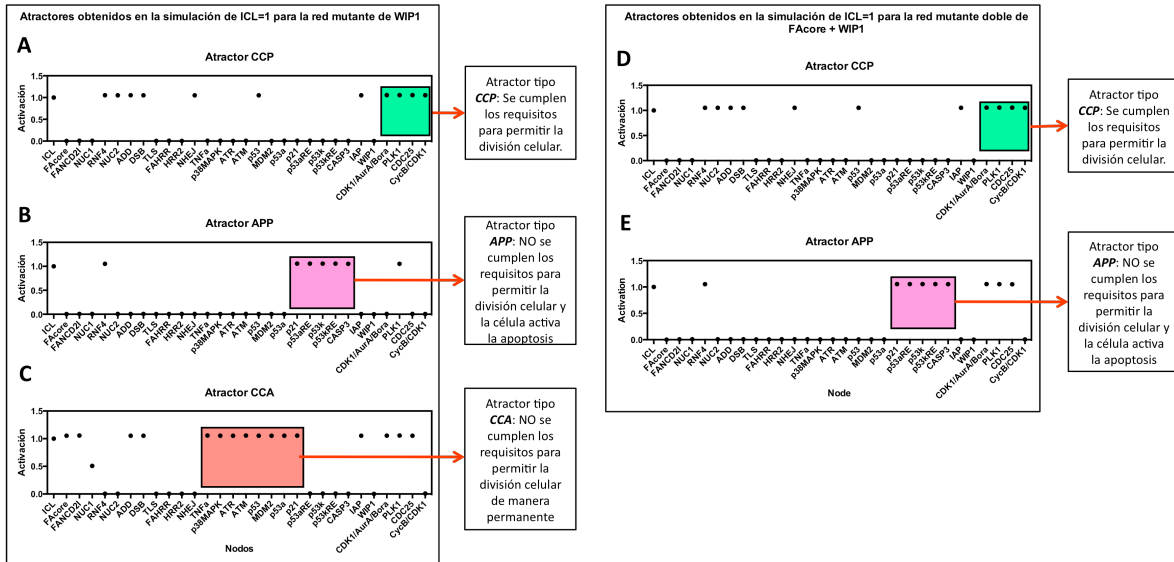


**Figura 23. Trayectorias y atractores obtenidos en la simulación del MB FA-APOPTOSIS para la mutante doble de FAcore y WIP1 en exposición a ICLs. (A)** Simulación en respuesta a un pulso de ICL en la que se alcanza un atractor de tipo CCP. Esta simulación nos muestra que con un pulso de daño la inhibición de *WIP1* no tendría un efecto muy grande en las células AF.



**(B)** Simulación en respuesta a ICL persistente en la que se muestra que en las mutantes de FAcCore, la inhibición adicional de WIP1 conduciría al atractor APP de manera más rápida, es decir en menos pasos (comparar con la figura 21B).

Nuevamente se realizaron las mismas simulaciones con la versión continua del modelo FA-APOPTOSIS y pudimos observar que además de los atractores CCP y APP, en respuesta a la doble inhibición aparece un nuevo atractor, el atractor CCA, el cual representa un arresto permanente de la célula y que está mediado por las cinasas ATM y ATR y por la activación permanente de p53 y de p21 (Figura 24).



**Figura 24.** La versión continua del modelo permite obtener varios tipos de atractores en respuesta a ICL persistente cuando se muta el nodo WIP1. **(A-C)** Se muestran los atractores obtenidos cuando se muta únicamente a WIP1 en presencia de ICL. Se observa que la mutación de WIP1 permite la aparición del atractor CCA, el cual indica un arresto del ciclo celular. **(D-E)** Se muestran los atractores obtenidos cuando se evalúa la mutante doble FAcCore +WIP1 en presencia de ICL. Aquí se puede observar que la doble inhibición genera la pérdida del atractor CCA y la célula únicamente tiene la opción de CCP o de APP.

## **APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACIÓN DEL MODELO FA-APOPTOSIS**

Hasta este momento sabemos que aunque las células AF son propensas a la apoptosis, a dosis sub-letales de daño son capaces de dividirse con una gran cantidad de AC. Este comportamiento permitiría el mantenimiento de los tejidos y la sobrevivencia de los pacientes con AF, sin embargo tiene la desventaja de permitir la eventual aparición de clonas pre-malignas.

Según las predicciones obtenidas en nuestro proceso de modelado, los componentes del *CHKREC* serían los responsables de permitir esta división celular en la que la célula AF ignora la presencia de daño no reparado, así que la inhibición del *CHKREC* induciría en la célula AF un arresto indefinido del ciclo celular o las dirigiría a la apoptosis con cantidades de daño que antes serían tolerables.

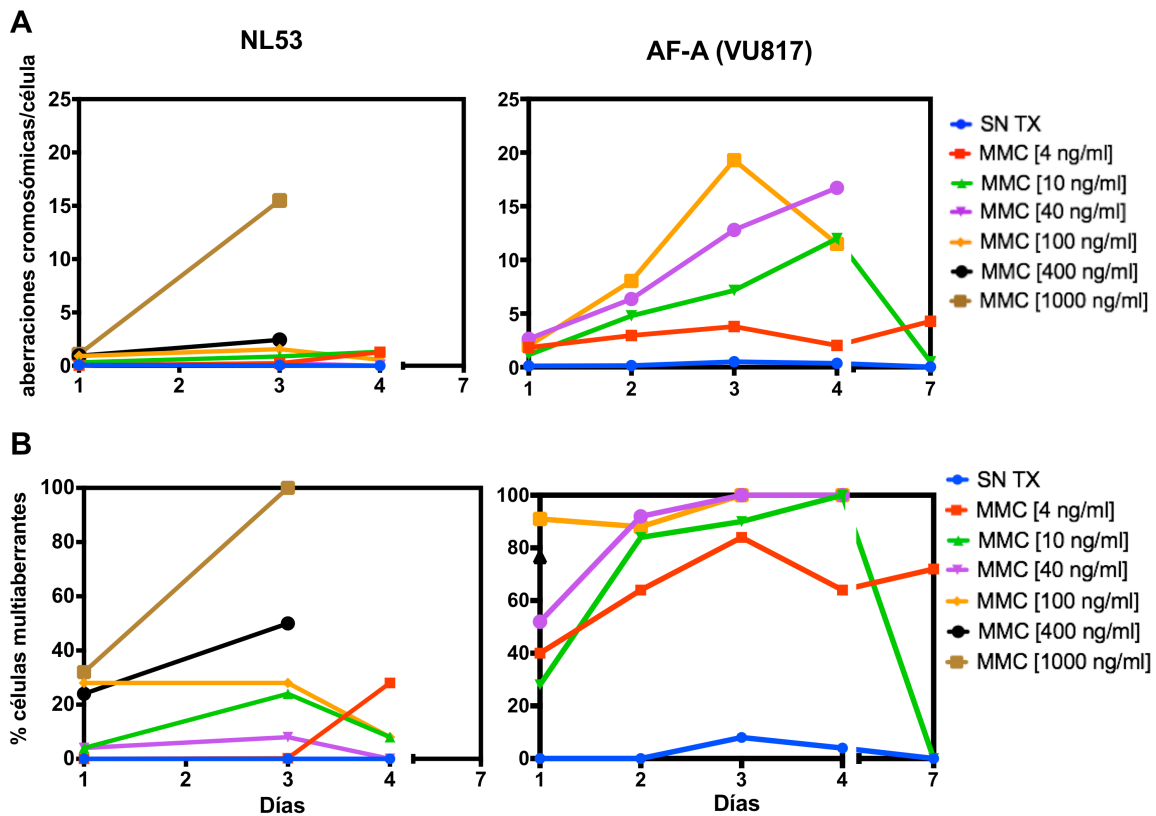
Para validar esta predicción buscamos una concentración de MMC que permitiera la sobrevivencia de las células AF por un periodo prolongado de tiempo y después inhibimos a la fosfatasa WIP1 en esta misma concentración de MMC, con el objetivo de verificar que efectivamente, la inhibición de los componentes del *CHKREC* aceleraría la muerte de las células AF en concentraciones de MMC que usualmente serían toleradas por la maquinaria que permite la división celular.

Para encontrar dicha concentración tolerable de daño expusimos a las células AF durante 7 días a 6 concentraciones distintas de MMC y evaluamos varios parámetros que nos indicarían el grado de tolerancia al daño que tienen las células AF. Esto a su vez nos ayudó a encontrar la mejor concentración para inhibir a WIP1.

Lo primero que hicimos fue cuantificar la cantidad de AC cada día, esto nos daría un indicio de la cantidad de daño no reparado que el *CHKREC* puede tolerar en cada concentración de MMC. Lo que observamos en estos experimentos fue que las concentraciones de 5 y 10 ng/ml de MMC son toleradas de manera continua hasta por 4 días y que en ellas se puede encontrar un promedio de 5-10 aberraciones/célula en hasta el 100% de células. En concentraciones más elevadas de MMC el número de AC aumentaba pero también disminuía dramáticamente la viabilidad celular (Figura 25).

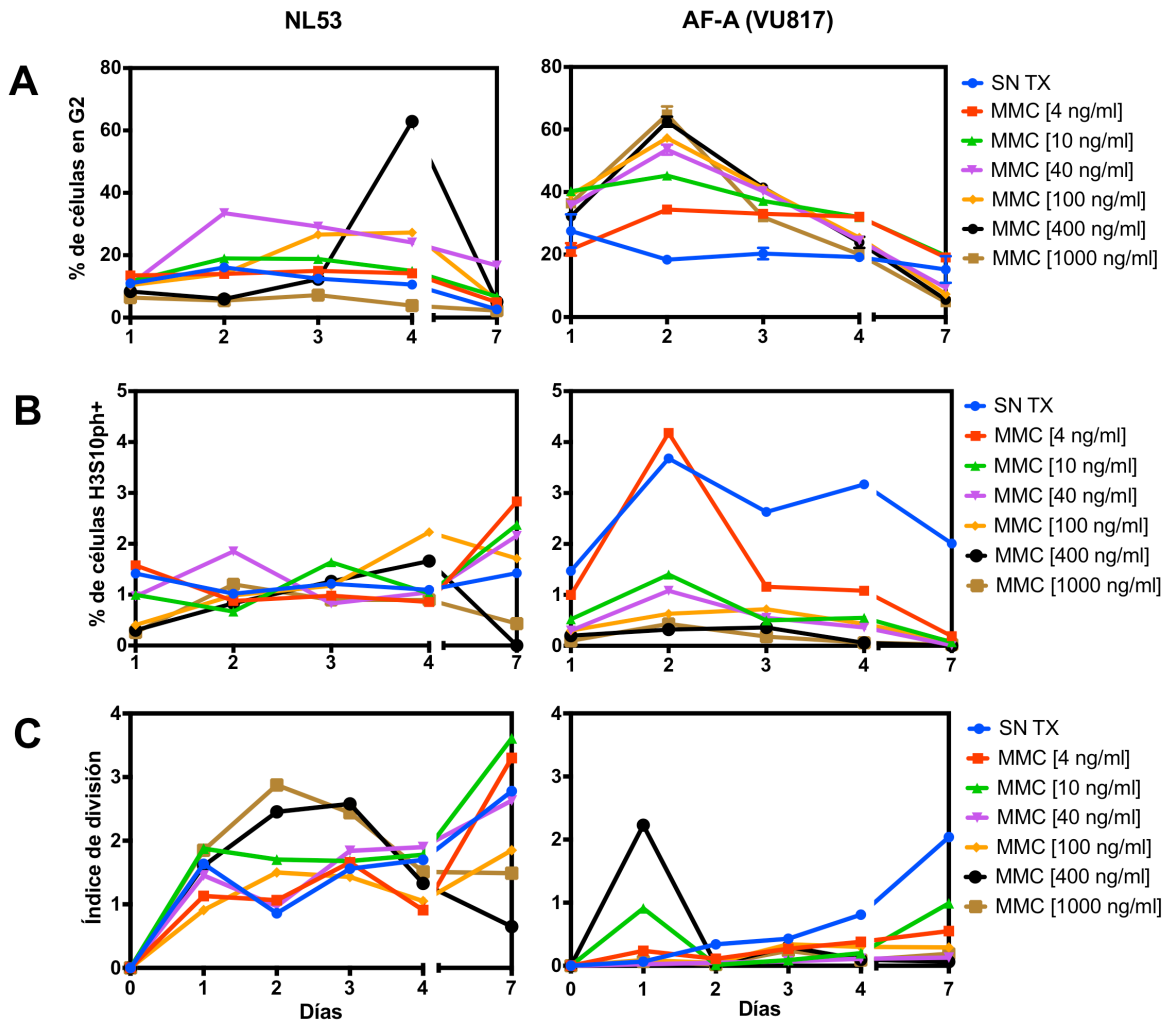
Por medio de citometría de flujo determinamos además la dinámica de tránsito de las células desde la fase G2 del ciclo celular, su paso por mitosis y su llegada a un nuevo ciclo celular (Figura 26). En todos los casos encontramos que las concentraciones muy elevadas de MMC aumentaban el número de células arrestadas en la fase G2 (determinado por la cuantificación del contenido de DNA teñido con yoduro de propidio), disminuían el índice mitótico (determinado con el número de células positivas a la marca epigenética H3S10ph) y disminuían la tasa de división (determinado por medio de la dilución del *cell tracker CFSE*) (Figura

26). Las concentraciones que menos afectaban estos parámetros fueron 5 y 10 ng/ml de MMC, es decir permiten la progresión celular pero con AC.



**Figura 25. Las células AF pueden ingresar a mitosis con una gran cantidad de aberraciones cromosómicas. (A)** Las células AF tienen un mayor número de aberraciones cromosómicas que las células normales. **(B)** Desde concentraciones bajas de MMC, una gran cantidad de células AF son multi-aberrantes, es decir que tienen dos o más aberraciones por célula.

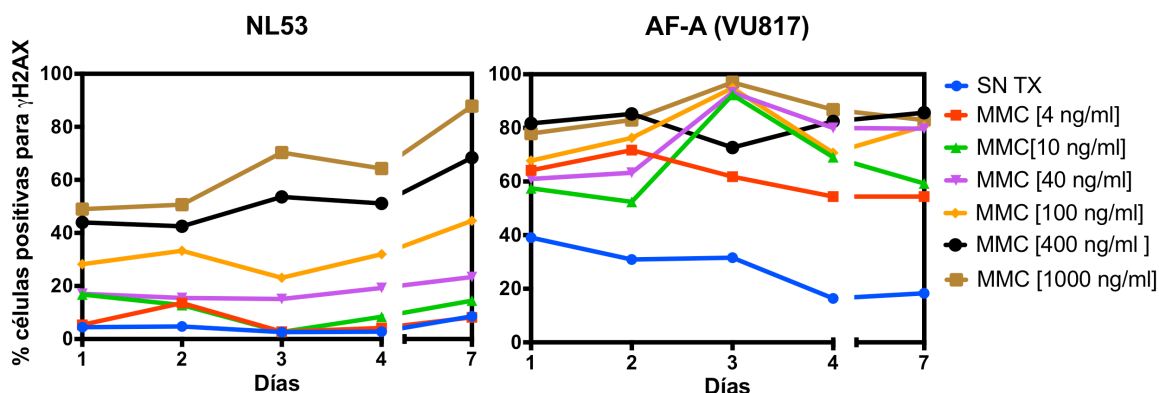
Utilizando citometría de flujo también se determinó el número de células con DSBs no reparados, es decir células positivas para la marca epigenética gH2AX, la cual señala las zonas en las que existen DSBs que no han sido reparados. En este caso observamos que en las concentraciones de 5 y 10 ng/ml de MMC hay una gran cantidad de células positivas para la gH2AX, las cuales llegarán a dividirse a pesar de la señalización activa de daño no reparado (Figura 27).



**Figura 26. Las células AF tienen una transición lenta a lo largo del ciclo celular. (A)** Las células normales comienzan a acumularse en fase G2 hasta que la concentración de MMC es muy elevada, mientras que las células AF se acumulan en la misma fase desde concentraciones bajas de MMC. **(B)** El índice mitótico de las células normales se mantiene estable en las diversas concentraciones de MMC, mientras que en las células AF las concentraciones bajas de MMC lo incrementan y las concentraciones altas de MMC lo abaten. **(C)** Las concentraciones altas de MMC reducen el índice de división de las células normales a lo largo del tiempo y en las células AF el índice de división se mantiene reducido pero constante.

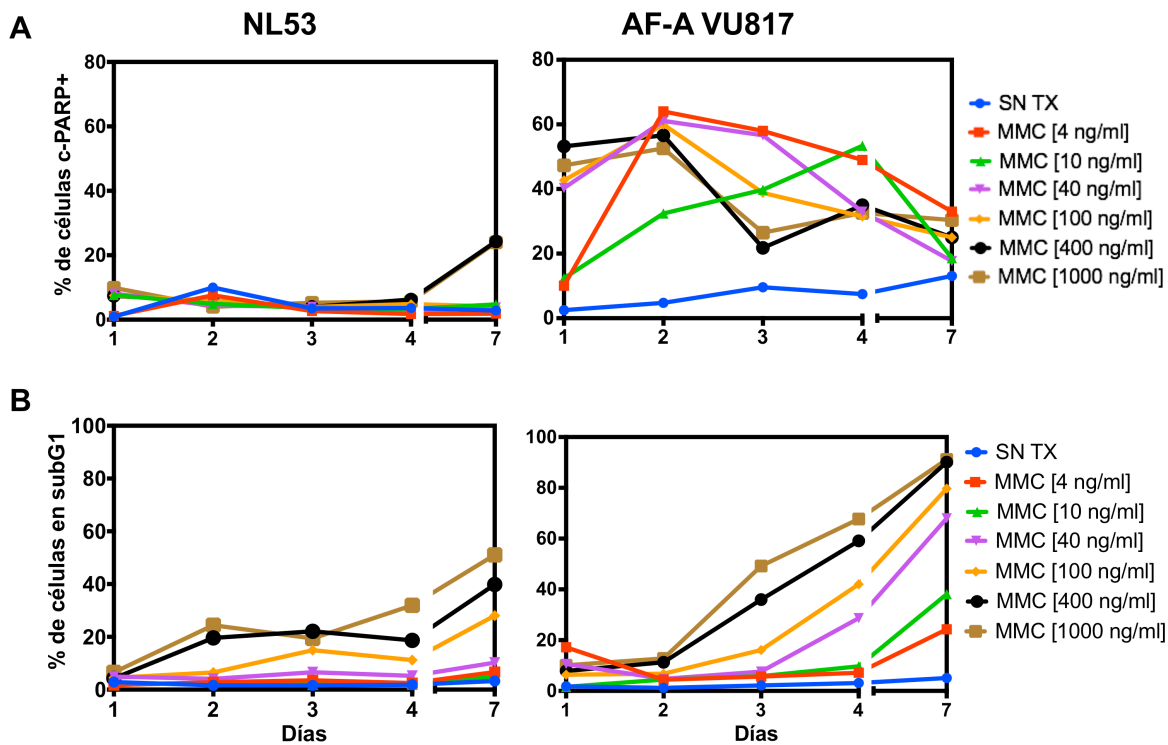
Finalmente evaluamos la activación de la apoptosis en las mismas condiciones mediante dos técnicas de citometría de flujo, la cuantificación de la fracción de subG1 en la tinción de yoduro de propidio y la cuantificación de las células positivas a c-PARP (un blanco de corte de la caspasa 3 activa). En estos análisis

observamos que la aparición de células con c-PARP antecede a la aparición de la fracción subG1, lo cual nos indica una apoptosis en marcha y una apoptosis tardía, respectivamente. En ambos casos, las concentraciones de 5 y 10 ng/ml de MMC permitían un tiempo más prolongado de supervivencia de las células AF, aunque con ciertos picos de elevación (Figura 28).



**Figura 27. Las células AF-A tienen una gran cantidad de DSBs en espera de ser reparadas.** Las células AF-A tienen de manera basal un mayor número de células positivas para la  $\gamma$ H2AX y esta cantidad se incrementa dramáticamente desde concentraciones bajas de MMC. Las células normales regulan mejor la cantidad de DSBs y acumulan daño no reparado en concentraciones muy elevadas de MMC.

Con estos ensayos exploratorios obtuvimos además una curva de tolerancia al daño en las células AF y pudimos concluir que las concentraciones de 5 y 10 ng/ml de MMC eran las mejores para estudiar la contribución del *CHKREC* para la supervivencia de las células AF, sin embargo seleccionamos sólo la concentración de 10  $\mu$ g/ml porque permite las transiciones a lo largo del ciclo celular con un mayor número de AC. El siguiente paso consistió en inhibir a la fosfatasa WIP1 a esta concentración de MMC y determinar como se afecta la tolerancia de las células AF al daño no reparado.



**Figura 28.** Las células AF activan la apoptosis en respuesta al daño de manera más temprana que las células normales. **(A)** El porcentaje de células positivas para c-PARP se incrementa muy rápido en las células AF desde concentraciones bajas de MMC en comparación con las células normales. **(B)** El porcentaje de células en subG1 aumenta gradualmente, tanto en las células normales como en las células AF.

**HIPÓTESIS EXPERIMENTAL No. 2:** las células AF requieren de *WIP1*, un componente central del *CHKREC*, para sobrevivir al daño no reparado.

Para estudiar el efecto de la inhibición de *WIP1* en las células AF se utilizó al inhibidor CCT007093 (SIGMA) en las células tratadas con 10 ng/ml de MMC y se evaluaron diversos parámetros de división celular y de activación de la apoptosis.

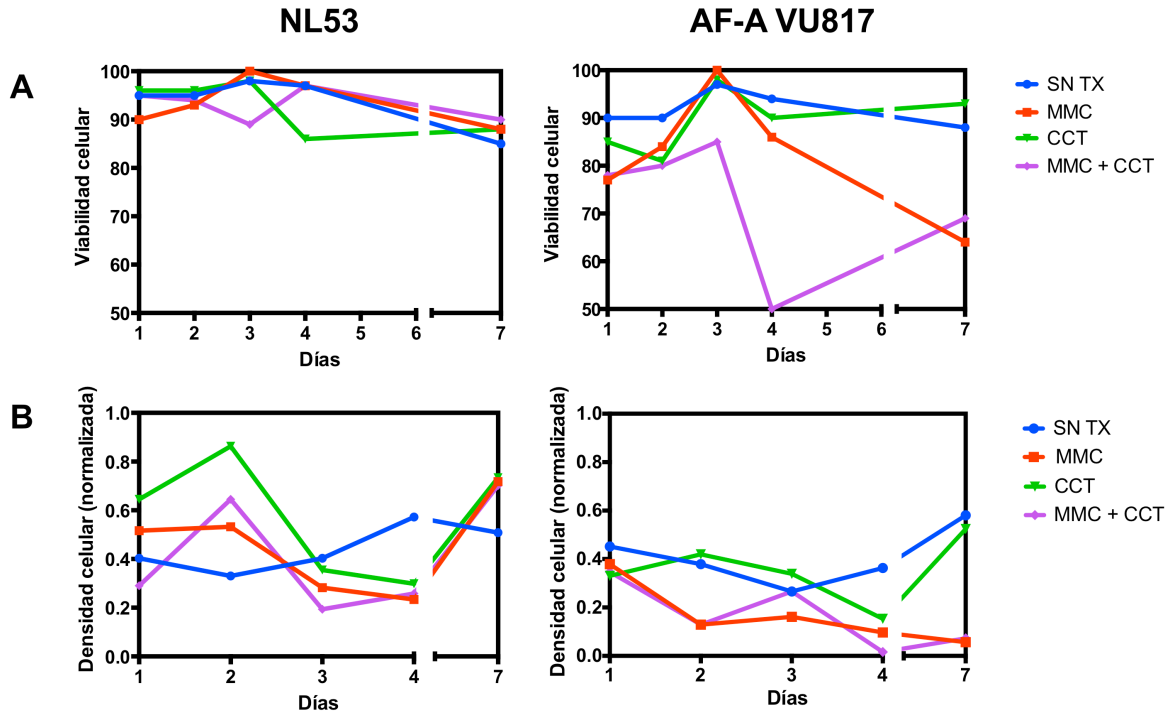


Figura 29. El uso combinado de MMC y del inhibidor de WIP1 reduce la viabilidad de las células AF (A) y disminuye la densidad celular (B).

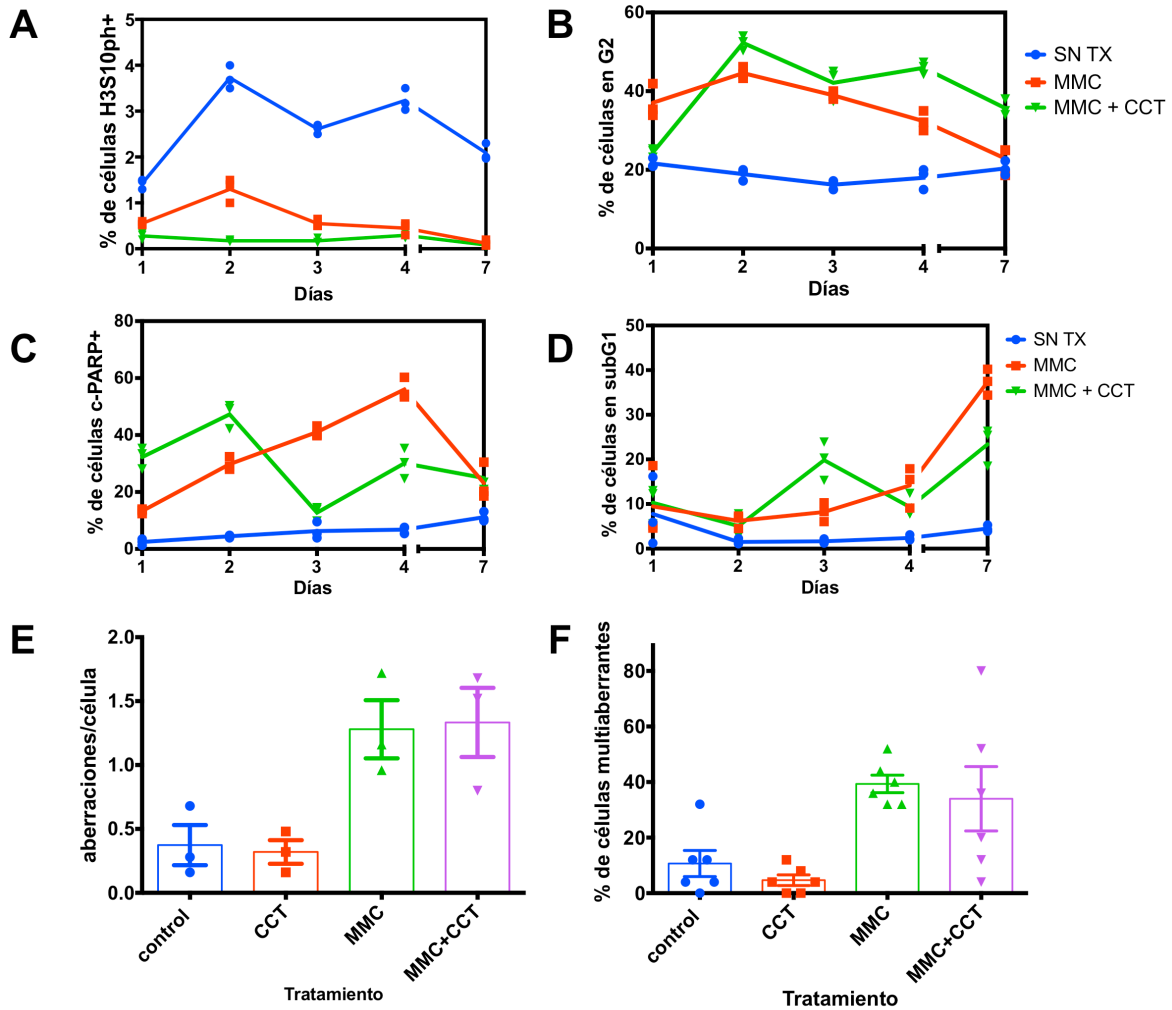
En la Figura 29 podemos observar que el uso combinado de la MMC y del inhibidor de WIP1 reduce la viabilidad celular y que además limita considerablemente la proliferación, disminuyendo así la densidad celular. En la Figura 30A podemos ver que el uso del inhibidor de WIP1 reduce dramáticamente el número de células AF-A en fase M. Esto podría deberse a un aumento en el número de células arrestadas en la fase G2 del ciclo celular o a un aumento en el número de células que están activando la apoptosis. Como se puede ver en las Figuras 30B-D ambas cosas suceden, hay un aumento en la fracción de células en G2 y una entrada prematura (durante las primeras 24 horas) a apoptosis después de la inhibición de WIP1.



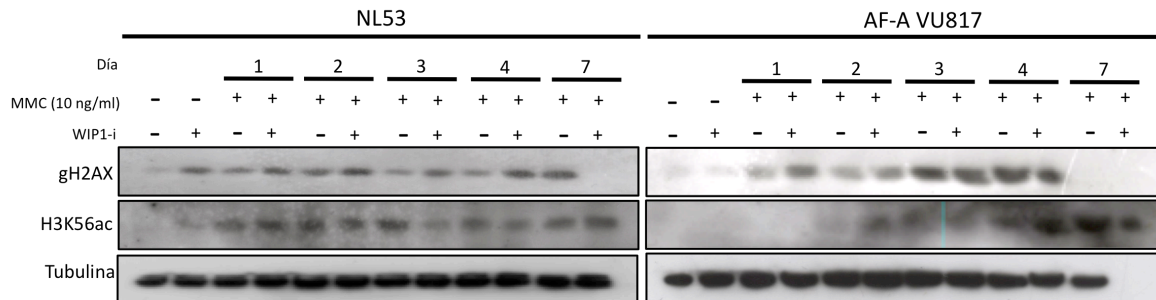
Debido a la reducción casi total del índice mitótico, sólo fue posible analizar la cantidad de AC en las primeras 24 h de tratamiento y no se observaron diferencias entre las células tratadas sólo con MMC y las células tratadas simultáneamente con MMC y con el inhibidor de WIP1, lo cual demostró que el inhibidor de WIP1 no induce daño adicional en las células AF (Figura 30E y 30F).

Para determinar los fenómenos moleculares que subyacen los cambios observados durante la inhibición de WIP1 evaluamos la cinética de señalización y de reparación del daño en las células normales y AF después de su exposición al inhibidor de WIP1.

Lo anterior se hizo evaluando simultáneamente por medio de Western blot a 1) la histona  $\gamma$ H2AX (daño no reparado), la cual además es un blanco de desfosforilación de WIP1, y la marca epigenética H3K56ac, la cual se considera una marca que se deposita en los sitios donde el daño ha sido reparado. En estos ensayos observamos que en las células normales hay un incremento ligero en la cantidad de  $\gamma$ H2AX cuando son expuestas al inhibidor de WIP1, y que la marca de daño reparado se va depositando a lo largo del tratamiento. En las células AF observamos una cantidad mayor de  $\gamma$ H2AX después de usar el inhibidor de WIP1, lo cual indica que su desfosforilación no se está llevando a cabo y observamos además que la marca de daño reparado no sigue un patrón específico, lo cual podría sugerir que hay una alteración en la señalización por esta marca epigenética (Figura 31).



**Figura 30. La inhibición de WIP1 en las células AF evita la división celular.** (A) Después de la exposición a MMC, aún existen células AF con capacidad de entrar a mitosis. sin embargo, la inhibición de WIP1 abate esta capacidad. (B) La inhibición de WIP1 aumenta el número de células en la fase G2. (C y D) La inhibición de WIP1 incrementa el número de células positivas para c-PARP en los dos primeros días de cultivo, por lo que podría estar acelerando la entrada a apoptosis. (E y F) El inhibidor de WIP1 (CCT) no incrementa el número de AC ni el número de células multiaberrantes.



**Figura 31. Señalización y dinámica de reparación del daño en el DNA (Imagen representativa de dos experimentos independientes).** Las células normales aumentan la fosforilación de la histona H2AX en respuesta a la MMC y mantienen constante la cantidad de H3K56ac. Las células AF tienen una mayor cantidad de histona H2AX fosforilada y un patrón alterado de H3K56ac.

Se sabe que las células AF sobre-activan a la proteína p53 y se considera que esta sobre-activación es la responsable de su apoptosis incrementada. p53 es un factor transcripcional que al ser fosforilado postraduccionalmente en sitios específicos puede activar la expresión de genes que medían el arresto del ciclo celular o la activación de la apoptosis, lo cual cambia su especificidad por ciertos genes blanco. La fosforilación de p53 en la Ser15 (p53S15) y en la Ser20 (p53S20) activa genes pro-arresto, mientras que la fosforilación en la Ser46 (p53S46) activa genes pro-apoptosis.

Nuestro proceso de modelado consideró esta versatilidad en la proteína p53 y la incluyó en tres nodos, el nodo p53, el nodo p53a (o p53 arrester) que se encarga de activar genes de arresto y finalmente el nodo p53k (o p53 killer) que se encarga de activar genes pro-apoptosis. En el modelo, p53a tiene bajo su control a los nodos p21 y p53aRE, este último representa a los elementos de respuesta a p53a, es decir todos los genes que están bajo el control transcripcional de p53a; por su

parte p53k tiene bajo su control a p53kRE, el cual representa a los elementos de respuesta a p53k, que son los genes bajo el control transcripcional de p53k.

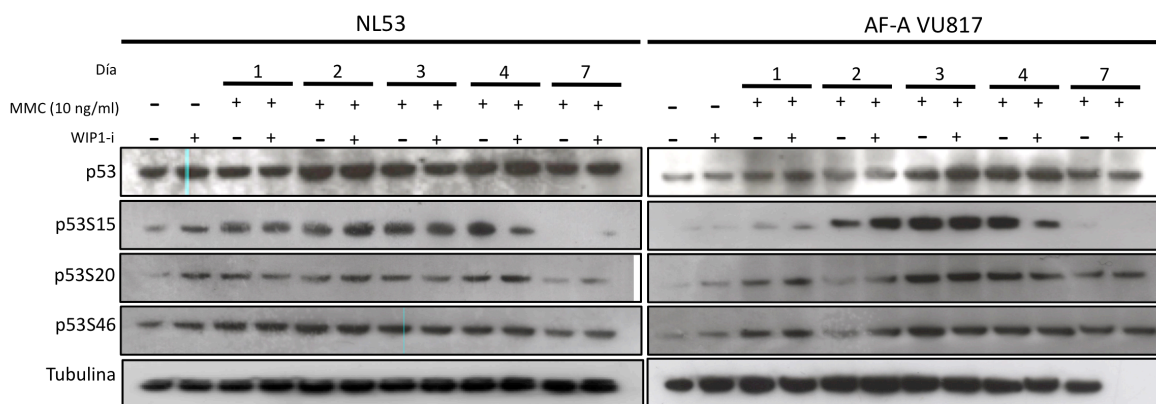
En las simulaciones discretas con el modelo FA-APOPTOSIS (Figura 23B) se observa que al inhibir a WIP1 en la mutante de FAcCore se llega a un atractor APP. En este atractor existe estabilización de p53, p21, p53aRE, p53k y los p53kRE. Las simulaciones con el modelo continuo (Figura 24) muestran un atractor APP con características similares a las del modelo continuo, pero muestran además un atractor de arresto CCA, en el cual también hay estabilización de p53 y de su principal blanco transcripcional p21.

Dados estos resultados teóricos, evaluamos experimentalmente la contribución de p53 en el proceso de arresto y apoptosis en las células AF después de la inhibición de WIP1. Primero examinamos las modificaciones postraduccionales de p53 que se han asociado de manera clásica con el arresto del ciclo celular (p53S15 y p53S20) y con la apoptosis en respuesta al daño (p53S46). La segunda aproximación consistió en evaluar los cambios en la expresión de los genes blanco de p53, estos genes incluyen blancos pro-arresto y blancos pro-apoptosis.

En la Figura 32 podemos observar el análisis por Western Blot que se hizo para determinar cambios postraduccionales en p53. Tanto en las células normales como en las AF hay un incremento gradual en la cantidad de p53 conforme avanzan los días en exposición continua a MMC. En las células AF el mayor aumento en la cantidad de p53 se observa en el tercer día de exposición a MMC y

se observa que la exposición al inhibidor de WIP1 aumenta la cantidad de p53 en los días 1, 3 y 4, debe considerarse además que en exposición a daño al DNA p53 tiene un comportamiento oscilatorio (Ciliberto, Novak et al. 2005, Batchelor, Mock et al. 2008, Zhang, Liu et al. 2009, Zhang, Liu et al. 2011) , por lo que nuestros datos están en concordancia con lo reportado.

Para la primera modificación postraducciona examinada p53S15, asociada a arresto, observamos cambios relevantes en las células AF a partir del día 2, en donde el inhibidor de WIP1 indujo aumento en su cantidad. Para la modificación p53S20, también asociada a arresto, encontramos cambios asociados al tratamiento con MMC, pero no observamos cambios relacionados con la inhibición de WIP1. Para la modificación p53S46, asociada a apoptosis, encontramos incremento y estabilización desde el primer día de tratamiento, pero sin cambios sustanciales cuando las células AF fueron expuestas al inhibidor de WIP1. Con esto podemos concluir que los principales cambios en respuesta a la inhibición de WIP1 recaen en aumentar la cantidad total de p53 y en aumentar la fosforilación de p53S15.



**Figura 32. Modificaciones postraduccionales de p53 asociadas a decisión supervivencia/apoptosis (Imagen representativa de dos experimentos independientes).** Las células normales y las AF aumentan gradualmente la cantidad de p53. El inhibidor de WIP1 indujo un aumento en la cantidad de p53S15 en las células AF a partir del día 2. Para p53S20, se observaron cambios asociados al tratamiento con MMC, pero no hay cambios relevantes cuando WIP1 es inhibido. La modificación p53S46 mostró incremento y estabilización desde el primer día de tratamiento y no cambió cuando las células AF cuando WIP1 fue inhibido.

Estos cambios en la cantidad de p53S15 dan soporte al arresto de las células AF después de ser expuestas a MMC y al inhibidor de WIP1 en conjunto, sin embargo no nos explican la entrada acelerada a apoptosis de varias células AF después de dicha exposición. Estos datos no excluyen la posibilidad de que otras modificaciones postraduccionales solas o en combinación con la p53S15 manden a la célula a apoptosis o que en nuestro modelo el nodo p53k no sea apropiado, sino que la identidad del nodo p53k podría ser más compleja de lo que originalmente se había pensado. Para discriminar esto se requiere más investigación.

Después de analizar los cambios postraduccionales de p53 analizamos los cambios en la expresión de sus blancos transcripcionales clásicos. Dado que tenemos aumento en la cantidad de p53S15 esperamos cambios en la expresión de genes de pro-arresto.

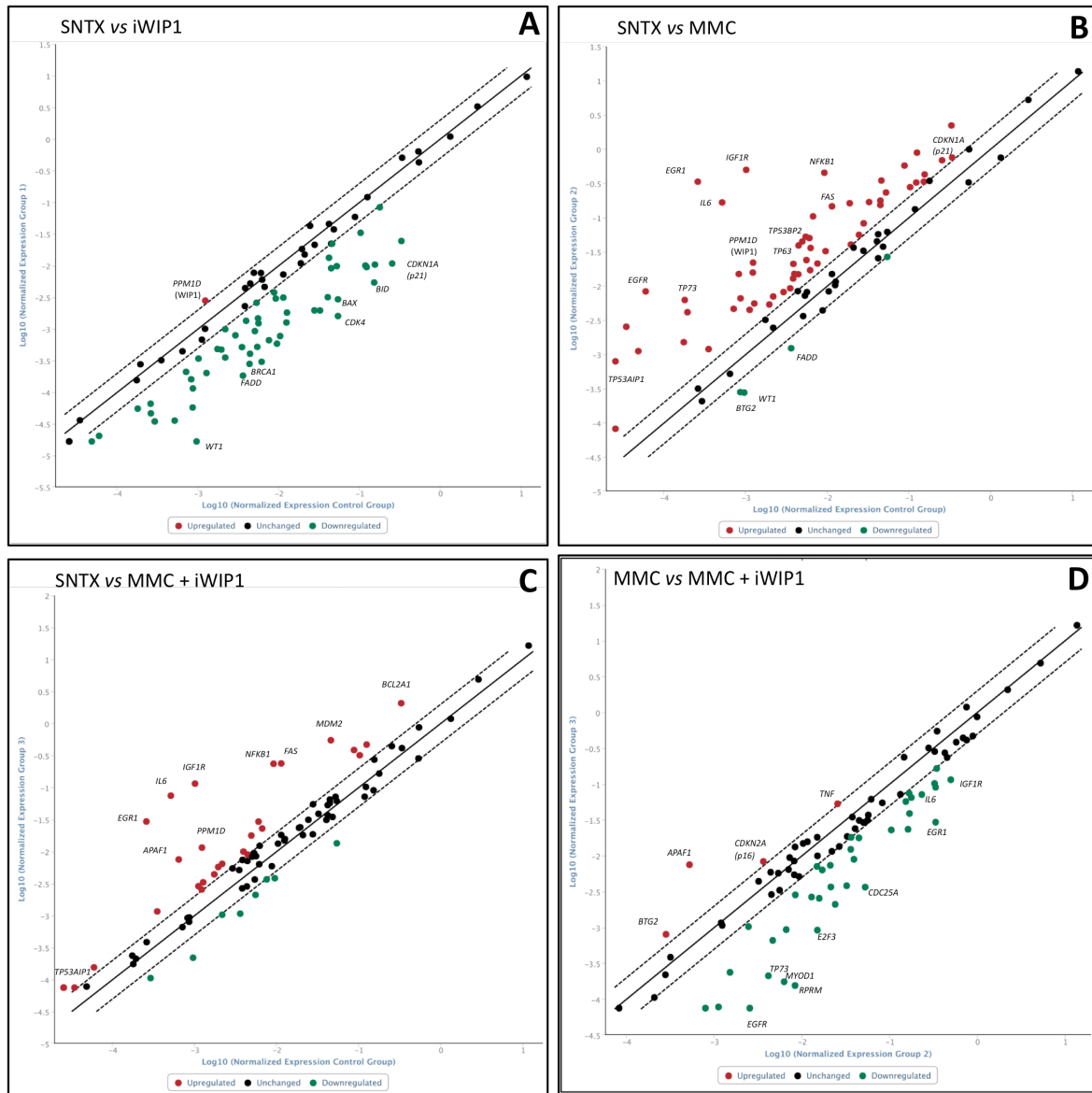
En la Figura 33 y en la Tabla 10 observamos el análisis de expresión de dichos genes para las células AF. En la Figura 33A se observa que el tratamiento con el inhibidor de WIP1 hace que la célula incremente la expresión del gen *PPM1D* como un mecanismo compensatorio ante el bloqueo de su proteína WIP1. En la Figura

33B se muestra la comparación entre las células sin tratamiento y las tratadas con MMC. En este caso hay incremento en la expresión de genes de reparación del daño al DNA y de genes pro-arresto y pro-apoptosis. Entre los genes de reparación hay cambios en la expresión de *BRCA2*, *MLH1* y de *XRCC5* (KU80), entre los genes pro-arresto tenemos aumento en la expresión de *ATR*, *RB1* y *TP63* y entre los genes pro-apoptosis tenemos aumento en la expresión de los genes *FAS*, *FASLG* y *TP53AIP1*. Además hay aumento en la expresión de genes con capacidades antiapoptóticas como *BCL2A1*, *IGFR1* *SESN2* y *TNFRSF10D*. Lo cual nos indica que hay células en apoptosis y células arrestadas que aún no han muerto.

Al momento de comparar a las células sin tratamiento con las células que recibieron el tratamiento doble de MMC + CCT (Figura 33C) se observa que se dejan de expresar los genes de reparación, disminuye la expresión de los genes asociados con el arresto celular y se añade la expresión del factor pro-apoptótico *BBC3* (PUMA).

Finalmente, al comparar los cambios en la expresión entre el tratamiento de sólo MMC contra MMC+CCT se observa que en el doble tratamiento hay aumento en la expresión del gen *CDKN2A* (p16), el cual está asociado al arresto permanente en el ciclo celular y a la senescencia celular, y el gen *APAF1* que modula la apoptosis (Figura 33D). En esta comparación se observa además, que se van a la baja prácticamente todos los genes que se sobre-expresaban al comparar las condiciones sin tratamiento con MMC. Así que, la adición de CCT al tratamiento

con MMC hace que la célula active la expresión de genes que median una salida irreversible del ciclo celular y también a la apoptosis, aunque cada célula podría afrontar el bloqueo de WIP1 con un destino celular distinto.



**Figura 33. Análisis de la expresión de genes asociados a la vía de p53 en respuesta a MMC y a la inhibición de WIP1.** Se muestra la comparación de la expresión de diversos genes en las células AF tratadas con MMC y con el inhibidor de WIP1.

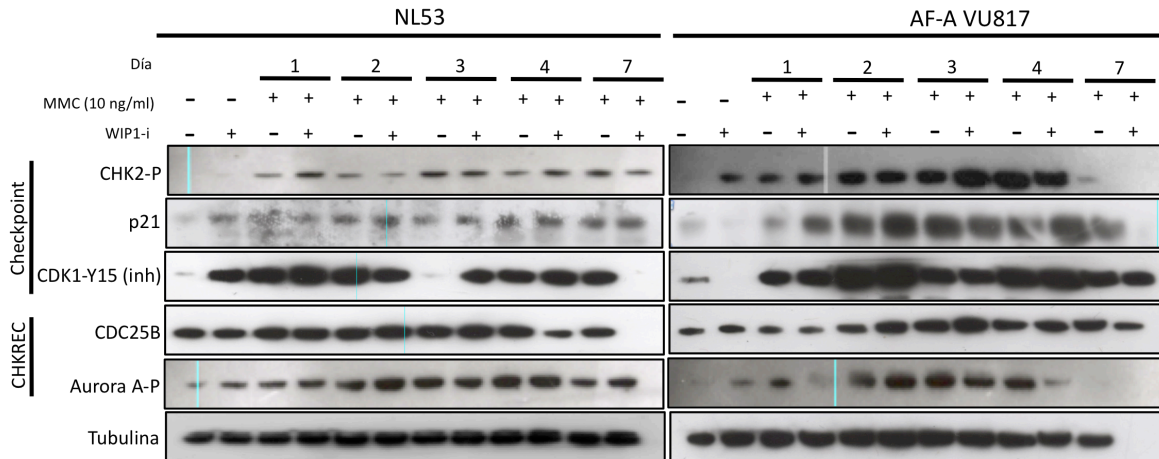


**Tabla 10. Genes de la vía de p53 con cambios en su expresión en respuesta a MMC y a la inhibición de WIP1**

SNTX vs MMC			SNTX vs MMC + CCT			MMC vs MMC + CCT						
GENES SOBRE-EXPRESADOS			GENES SUB-EXPRESADOS			GENES SOBRE-EXPRESADOS			GENES SUB-EXPRESADOS			
GEN	FOLD CHANGE	PROCESO	GEN	FOLD CHANGE	PROCESO	GEN	FOLD CHANGE	PROCESO	GEN	FOLD CHANGE	PROCESO	
BRCA2	2.7818	REPARACIÓN DEL DNA	Se dejan de expresar genes de reparación			E2F1	-2.0505	ARRESTO	CDKN2A (p16)	2.2942	SENESCENCIA /ARRESTO	
MLH1	2.0864		ARRESTO	BTG2	-3.0398	APOPTOSIS	CRADD	-2.1009	APOPTOSIS	APAF1	14.45	APOPTOSIS Y ANTIPROLIFERACIÓN
KRCC5 (KU80)	2.2439	FADD		-2.916		FADD	-3.3543		BTG2	2.854		
ATR*	2.7721			WT1	-3.4438	PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA	CDC25C	-2.4726	PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA	TNF	2.0893	
CCNG1	2.753			CDK4	-2.0265		ESR1	-2.7435	OTRAS FUNCIONES	Se dejan de expresar genes de reparación		
CDKN1A*	2.7151						WT1	-4.35		Se dejan de expresar genes de anti-apoptosis		
E2F1	2.8304						HK2	-2.6226		Se dejan de expresar genes de proliferación		
E2F3	18.2649											
GADD45A*	2.8206											
MYOD1	35.0417											
RB1	8.3745											
RPRM	74.0794											
TADA3	2.299											
TP63	8.852											
BBC3(PUMA)	4.3802											
BID	2.2053											
EI24	4.4568	APOPTOSIS										
FAS	12.5705											
FASLG	3.2513											
GML	8.6999											
MDM4	3.2513											
SIAH1	8.6698											
TP53AIP1	31.3632											
TP53BP2	5.506											
TP73	21.4961											
BCL2	3.3776											
BCL2A1	6.7318	ANTI-APOPTOSIS Y SOBREVIVENCIA										
BIRC5	6.5478											
IGF1R	493.1901											
MCL1	2.7057											
SESN2	12.9152											
TNFRSF10D	4.0306											
TRAF2	3.3893											
CDC25A*	9.7203											
CDC25C*	3.4129											
CDK1	2.6592		PROLIFERACIÓN Y MITOGÉNESIS									
EGFR	140.6533											
EGR1	1297.0335											
MDM2	7.6											
PPM1D*	17.889											
ADGRB1	23.1991	OTRAS FUNCIONES										
CCNH	5.209											
HDAC1	3.4366											
HK2	4.3349											
IL6	325.3841											
JUN	7.6794											
KAT5B	2.65											
KRAS	3.8264											
NF1	15.6816											
NFKB1	49.385											
PCNA	7.3157											
PRKCA	3.4248											
PTEN	2.9711											
SIRT1	9.1008											
STAT1	6.5478											
TSC1	5.7998											
BRCA1	-2.9424	REPARACIÓN DEL DNA										
BRCA2	-2.6796											
MSH2	-2.717											
RPRM	-33.8715											
E2F1	-5.8038	ARRESTO										
E2F3	-16.3023											
MYOD1	-35.6769											
TP63	-4.3681	APOPTOSIS										
BID	-3.6987											
CRADD	-2.3817											
EI24	-3.2423											
GML	-6.3731											
SIAH1	-6.9019											
TP53AIP1	-10.5707											
TP53BP2	-2.8521											
TP73	-19.5216											
BCL2	-2.0806		ANTI-APOPTOSIS Y SOBREVIVENCIA									
BIRC5	-7.0226											
IGF1R	-4.3229											
SESN2	-6.156											
TRAF2	-4.8299											
CDC25C	-8.4386											
CDK1	-3.1866	PROLIFERACIÓN Y MITOGÉNESIS										
EGFR	-53.7056											
EGR1	-11.3294											
MYC	-2.0806											
CCNH	-4.3229	OTRAS FUNCIONES										
HDAC1	-2.6703											
HK2	-11.3687											
IL6	-2.2299											
JUN	-7.0714											
NF1	-4.5336											
RELA	-2.0097											
SIRT1	-2.5088											
TSC1	-2.9221											

Finalmente evaluamos como responden los mediadores directos de la progresión G2/M ante el bloqueo de WIP1. En este caso esperamos cambios importantes debido a que la inhibición de WIP1 impidió la entrada de las células a la fase M del ciclo celular.

En la Figura 34 podemos observar que con el uso del inhibidor de WIP1 la cantidad de las proteínas mediadoras del arresto del ciclo celular CHK2 fosforilado y p21 se incrementa en las células AF. Del mismo modo, la cantidad de CDK1 fosforilado en la posición Y15 (CDK1-Y15) aumenta en estas células; esta fosforilación evita la activación del complejo promotor de la mitosis conformado por la Ciclina B y CDK1, por lo que cuando CDK1 está fosforilado en esta posición es incapaz de progresar a mitosis, lo que indica que el bloqueo en la progresión del ciclo celular se ha establecido. Por otro lado, aunque se observa una tendencia a aumentar a los mediadores de la transición G2/M: CDC25B y Aurora A, estos no son capaces de llevar a cabo sus actividades mientras que CDK1-Y15 no sea desfosforilado, es decir la actividad del *CHKREC* está incompleta sin WIP1 y las células AF pierden la capacidad de dividirse.



**Figura 34. Análisis de activación de las proteínas que median el arresto del ciclo celular y la división celular.** Se observa que hay un claro aumento en la cantidad de proteínas encargadas del checkpoint y este aumento es más evidente cuando WIP1 ha sido bloqueado. Las proteínas del CHKREC también muestran cambios en su activación, no tan evidentes como las del checkpoint, sin embargo la célula no es capaz de dividirse debido a que WIP1 no es funcional.

## CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CD34+ CIRCULANTES

La movilización a sangre periférica de células CD34+, inducida por citocinas como G-CSF, es una estrategia que ha sido implementada desde hace más de una década para obtener células troncales y progenitoras hematopoyéticas de pacientes con AF. Después de la movilización, se busca integrar el gen *FANC* mutado al genoma de las células CD34+ movilizadas y realizar con ellas un trasplante autólogo al paciente AF sin el potencial rechazo del injerto, lo cual puede ocurrir en un trasplante de células troncales a partir un donador histocompatible (Croop, Cooper et al. 2001).

En este estudio presentamos datos que muestran un incremento sustancial en el número de células CD34+ circulando en la sangre periférica de 18 niños con AF en comparación con un grupo control sano, las cuales sin embargo no se encuentran en circulación en respuesta a una movilización inducida, sino que se encuentran circulando en sangre periférica de manera espontánea. Este hallazgo podría representar una nueva característica de la AF.

Estas células fueron caracterizadas a nivel genotípico, funcional y molecular. La caracterización del fenotipo mostró que las células AF CD34+ circulantes son un grupo heterogéneo de progenitores hematopoyéticos tempranos y tardíos. Los ensayos funcionales *in vitro* mostraron que estas células tienen potencial múltiple de diferenciación, pero que tienen un potencial de proliferación limitado. La caracterización molecular de estas células nos permitió identificar que tienen una gran cantidad de daño en su DNA y que se encuentran en un estado pro-apoptótico.

Finalmente, estas células tienen un perfil de expresión de la vía de p53 con activación de genes de respuesta al daño como p21 y de expresión de genes asociados con SMD del subtipo RAEB2, sin embargo, ninguno de los pacientes AF evaluados presenta SMD reconocido clínicamente o patológicamente. Esto permite sugerir que las células CD34+ circulantes podrían ser usadas como marcadores tempranos de SMD en los pacientes con AF.

***Las células CD34+ circulantes de los pacientes AF tienen un fenotipo de célula troncal***

Dado el ambiente pro-inflamatorio de la médula ósea de los pacientes con AF y la acumulación de daño en el DNA hipotetizamos que, en comparación con sujetos sanos, encontraríamos un incremento en el número de células CD34+ en la sangre periférica de los pacientes con AF.

En efecto, encontramos un incremento extremadamente significativo en la cantidad de células CD34+ circulantes  $p < 0.0001$  en comparación con los sujetos sanos (rango de edad 2-13 años) (Figura 35A). Para discriminar si se trataba de progenitores comprometidos o células troncales primitivas, llevamos a cabo una caracterización inmunofenotípica adicional, lo cual incluyó una subdivisión de las células en CD34+Lin+ y células CD34+Lin-. En la fracción CD34+Lin+ identificamos progenitores linfoides tempranos (CD34+CD10+), células proB (CD34+CD10+CD19+) y progenitores mieloides (CD34+CD10-CD19-) (Figura 35B); mientras que en la fracción CD34+Lin- identificamos células troncales muy primitivas (CD34+Lin-CD38-CD45RA-) (Figura 36). De esta caracterización fenotípica podemos concluir que la fracción de células CD34+ circulantes en los pacientes con AF está compuesta por progenitores comprometidos y células troncales primitivas que aún no están comprometidas con algún linaje.

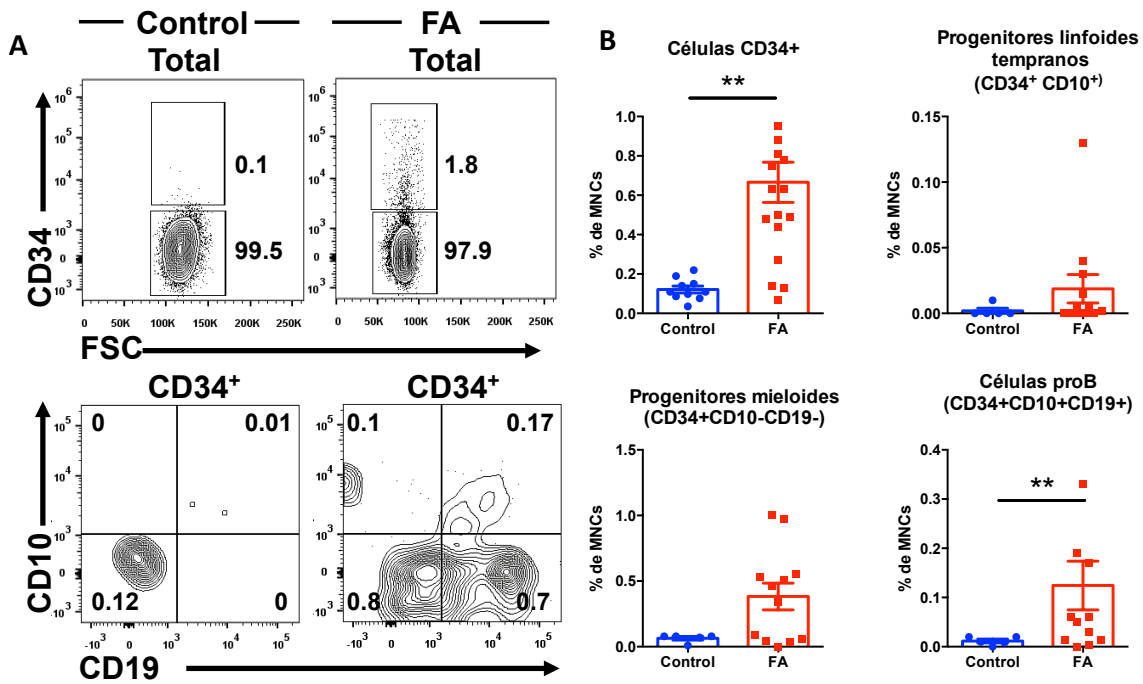
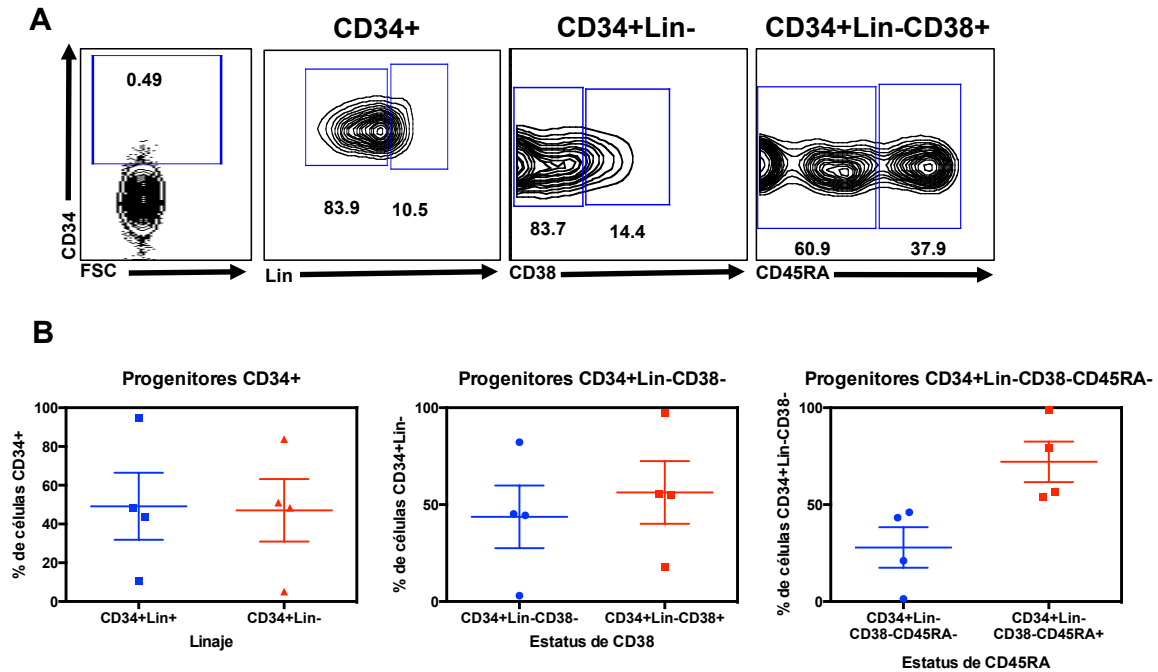


Figura 35. Las células CD34<sup>+</sup> derivadas de pacientes AF tienen un fenotipo de células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

**Las células CD34<sup>+</sup> circulantes derivadas de pacientes AF tienen propiedades de células troncales *in vitro***

Una evaluación adicional de las células CD34<sup>+</sup> circulantes se llevó a cabo para determinar si poseen propiedades de célula troncal *in vitro*, para hacerlo aislamos mediante perlas magnéticas a las células CD34<sup>+</sup> circulantes y llevamos a cabo ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés) en metilcelulosa y co-cultivos con estroma.



**Figura 36. La fracción de células CD34+ incluye células troncales con fenotipo primitivo.**

Los experimentos de CFU mostraron que las células CD34+ circulantes poseen potencial clonogénico para producir colonias mieloides y eritroides, sin embargo el potencial de estas células es dramáticamente menor cuando estas células fueron obtenidas de niños con falla medular (Figura 38A y 38B).

El número escaso de CFU en los cultivos de AF podría reflejar ya sea un contenido reducido de progenitores en la fracción total de células CD34+ circulantes o células menos competentes. Lo último parece razonable dado que el defecto en la reparación del DNA inherente a las células AF conduciría a la acumulación de daño no reparado y la muerte celular. Otra diferencia importante fue que el tamaño de las colonias en AF era menor que las observadas en los controles.

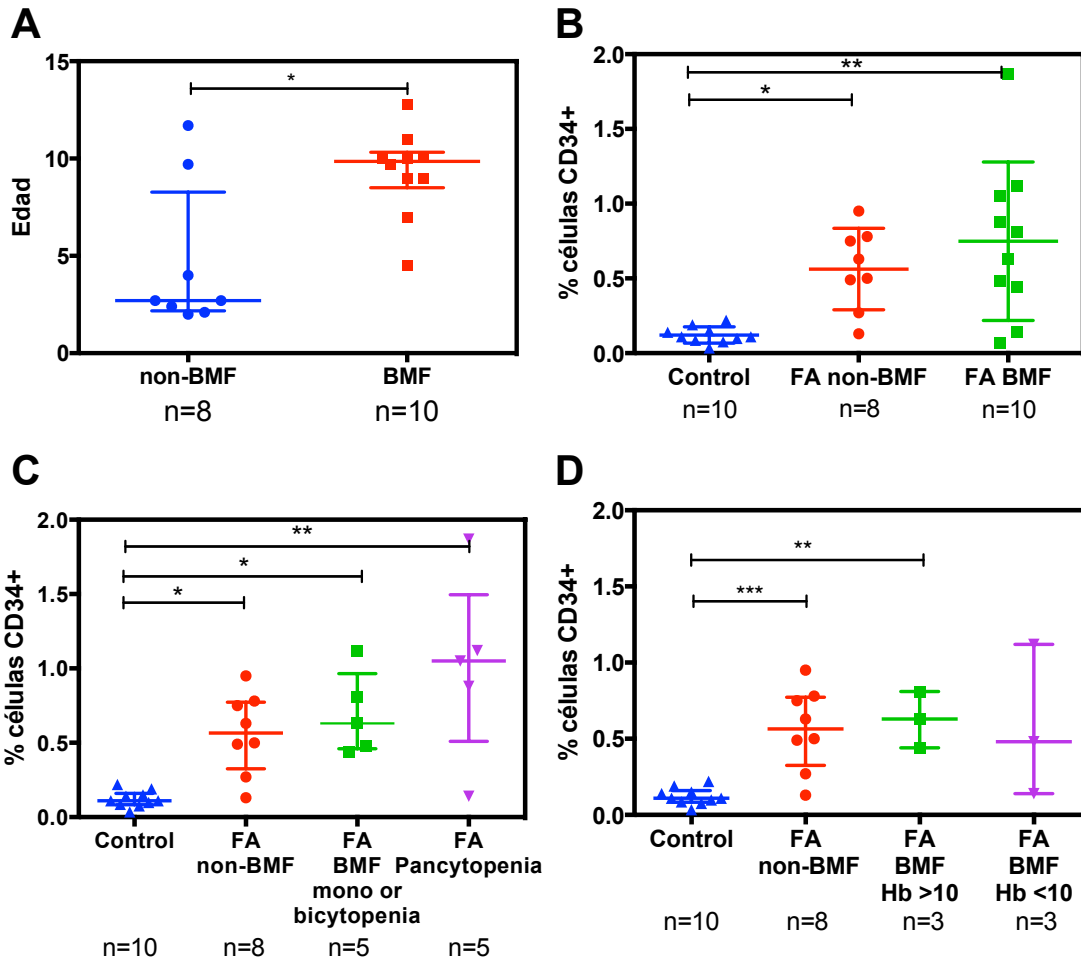


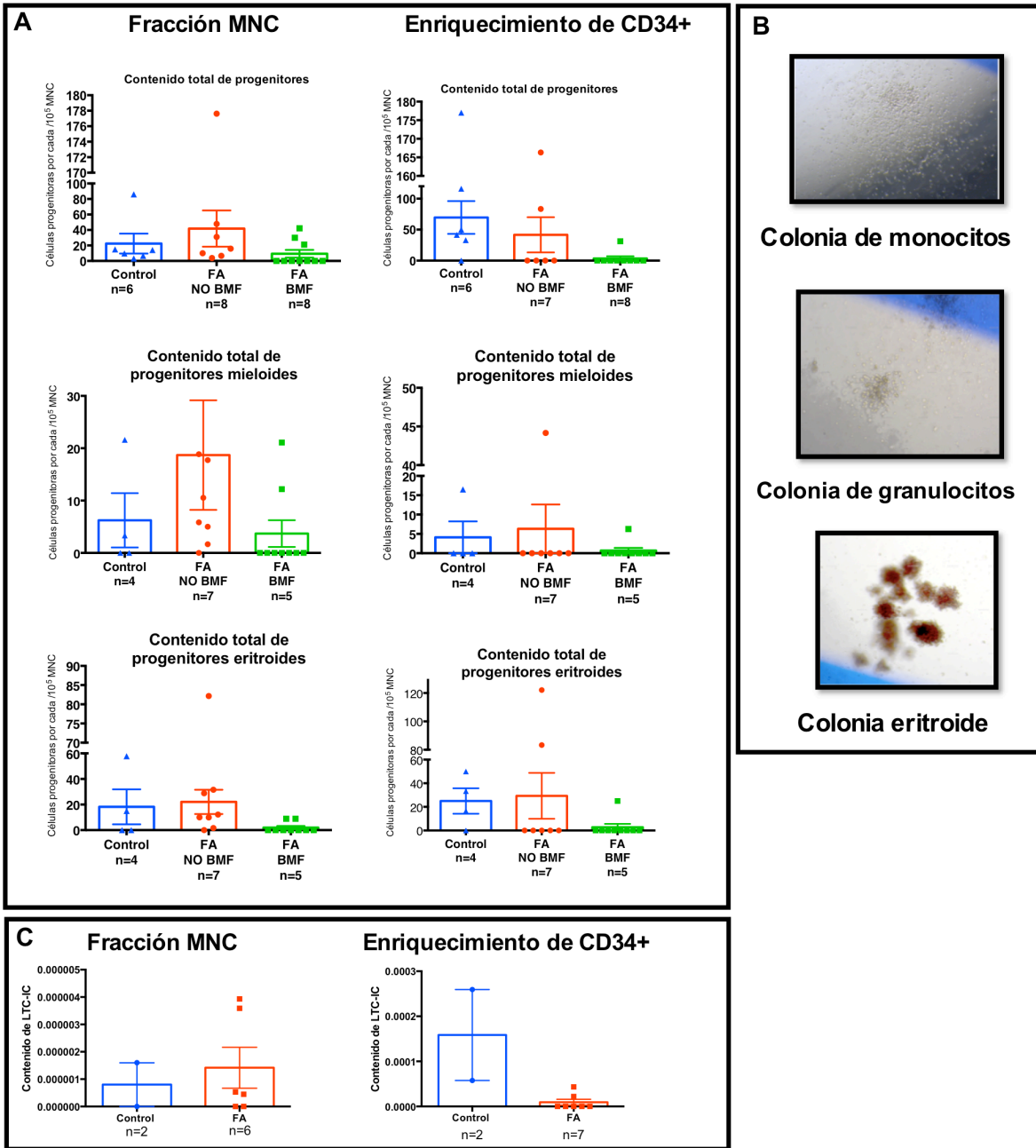
Figura 37. El número de células CD34+ en los pacientes con AF no se modifica por la presencia o severidad de la falla medular.

Para explorar las capacidades linfoides de diferenciación de estas células llevamos a cabo cultivos con soporte estromal con capacidad de promover la diferenciación linfóide (Figura 39). En estos cultivos analizamos el rendimiento y la capacidad de diferenciación 14 y 30 días después de iniciado el cultivo en condiciones de diferenciación linfóide B/NK y después de 30 días en condiciones de diferenciación linfóide T. Después de 14 días de cultivo se observó un poco de producción de células B, NK y linaje mielóide, mientras que a los 28 días de cultivo



la producción se incrementó notablemente. Una diferencia muy importante en estos experimentos entre los individuos AF y los individuos sanos fue que las células CD34+ derivadas de individuos AF fueron capaces de producir cualquier linaje, mientras que las derivadas de sujetos sanos producían principalmente células CD3+, lo cual indica que estaban fuertemente comprometidas con el linaje de células T; este sesgo hacia el linaje T podría reflejar el tráfico normal de progenitores de células T hacia el timo para completar su diferenciación. Por el contrario, la diversidad de linajes obtenidos de los pacientes AF sugiere que el desprendimiento de células CD34+ de la MO afecta a varios tipos de células progenitoras y a células primitivas.

La identificación de células con fenotipo CD34+Lin-CD38-CD45RA- sugiere la presencia de auténticas células troncales hematopoyéticas en la sangre periférica de los pacientes FA. Para explorar esta posibilidad se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de LTC-IC y observamos que tanto en los controles sanos como en las células AF existe potencial LTC-IC, el cual sin embargo está muy reducido cuando se le compara con células CD34+ de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica movilizada (Figura 38C).



**Figura 38.** Las células CD34+ derivadas de pacientes con AF poseen *in vitro* propiedades de células CD34+.

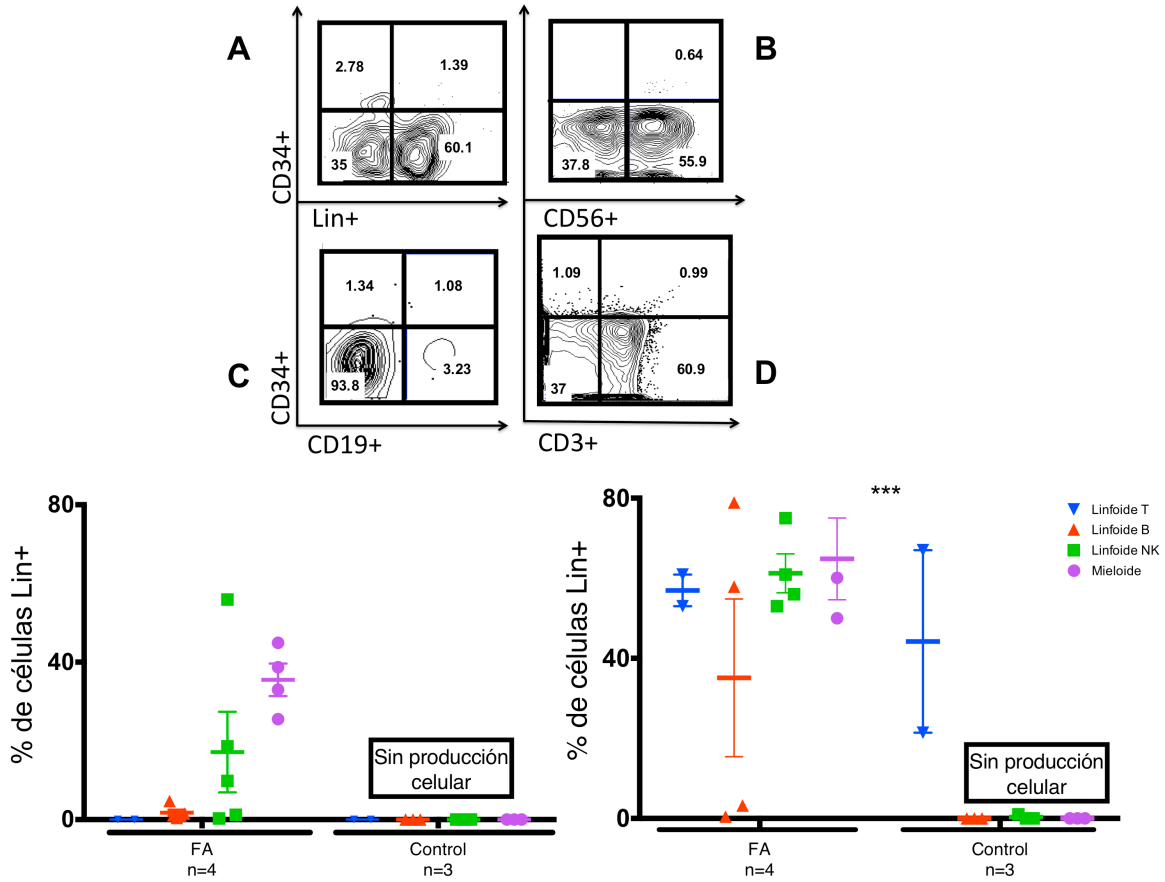


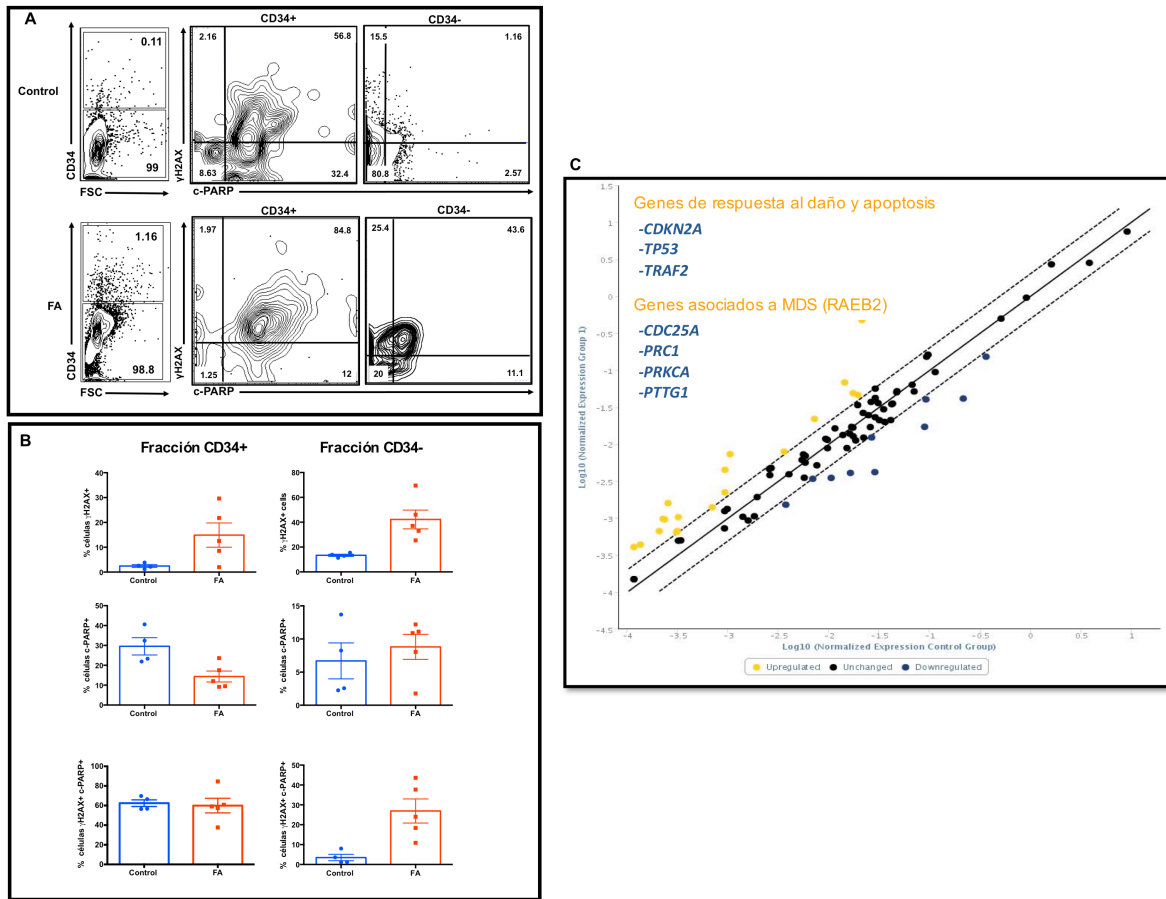
Figura 39. Las células CD34+ circulantes derivadas de pacientes AF tienen potencial de diferenciación linfoide B, NK y T.

***Las células CD34+ derivadas de pacientes AF tienen características pro-apoptóticas y tienen un patrón de expresión génica que combina genes pro-apoptóticos y genes del CHKREC***

Las capacidades de proliferación de las células CD34+ circulantes se encuentran bastante reducidas, lo cual podría deberse a un estado pro-apoptótico. Para averiguarlo evaluamos por citometría de flujo el número de células con rupturas no reparadas y su estado apoptótico, usando un anticuerpo anti- $\gamma$ H2AX y un anticuerpo anti-cleaved PARP (c-PARP), respectivamente. En estos experimentos

se subdividió a la población de CMN totales en las fracciones de células CD34+ y CD34- para determinar la cantidad de daño y de apoptosis en ambas y así poder compararlas.

Como se esperaba, las células AF tienen un número significativamente mayor de células con DNA dañado, independientemente de ser CD34+ o CD34- (Figura 40A y 40B). Para saber si la vía de p53 está implicada en la apoptosis de las células CD34+ circulantes de AF se extrajo el RNA de estas células y se realizó un arreglo de PCR de la vía de p53 para evaluar simultáneamente los cambios en la expresión de los genes de la vía de p53. En este experimentos observamos que las células CD34+ de AF activan la expresión de genes que han sido previamente ligados al estado pro-apoptótico en AF *CDKN2A (p21)*, *TP53* y *TRAF2* (Figura 40C), lo cual soporta nuestra hipótesis de que la proliferación reducida de las células CD34+ circulantes AF se debe a su estado pro-apoptótico, pero además sobre-expresan al gen *CDC25A* (Figura 40C), un gen central en el proceso de *CHKREC*, lo cual también indica que la capacidad de proliferación y de diferenciación que estas células aún mantienen, se deben a la actividad del *CHKREC*.



**Figura 40.** Las células CD34+ circulantes de pacientes AF tienen características proapoptóticas y expresan genes asociados a Síndrome mielodisplásico, los cuales sin embargo, no están asociados a cambios displásicos en la MO.

## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos desarrollado una aproximación por biología de sistemas para estudiar la conexión entre la vía FA/BRCA y los procesos de decisión celular entre supervivencia y muerte celular por apoptosis. El estudio de esta vía es relevante porque los genes que la componen se han encontrado mutados de manera hereditaria, produciendo AF o predisponiendo al síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario.

La biología de sistemas busca entender de manera global la complejidad de los sistemas biológicos a través de la integración de datos experimentales y de investigación computacional (Kitano 2002). Para tal efecto un sistema biológico puede estudiarse representándolo por medio de una red que muestre la conectividad entre sus componentes y/o generando un modelo matemático de dicha red, lo cual permite simular su comportamiento dinámico tanto en condiciones *wild type* o en condiciones de pérdida o ganancia de función de alguno de sus componentes.

El estudio de los sistemas biológicos de manera global se ha popularizado en los últimos años gracias a las tecnologías de generación masiva de datos que permiten estudiar simultáneamente ya sea el genoma, el proteoma, el transcriptoma e incluso el metaboloma de una célula. Desarrollar este tipo de estudios implica un gran costo en reactivos y equipo de laboratorio que pueden no

ser accesibles para cualquier grupo de trabajo. Sin embargo, la aproximación *bottom-up* de la biología de sistemas, la cual incorpora únicamente datos experimentales detallados con corroboración directa, permite estudiar a un sistema biológico integrando el conocimiento ya establecido, sin los elevados costos que implican las tecnologías de generación masiva de datos.

La exploración inicial de la vía FA/BRCA y sus conexiones mediante la aproximación *bottom-up*, mostró que esta vía forma parte de una compleja red de interacciones que puede ser estudiada de manera global, tal y como se hace en la biología de sistemas. Dicho análisis por biología de sistemas puede dividirse en dos, uno que implica analizar la topología o conectividad de la red, mientras que el otro implica estudiar su dinámica.

Para tal efecto, varios métodos computacionales y matemáticos han sido desarrollados. Si por ejemplo se quiere analizar la estructura de la red, se puede estudiar el grado de conectividad que tiene cada uno de los nodos dentro de ella, lo cual nos indicará si un determinado nodo interactúa con muchos nodos dentro de la red, por lo que se trata de un nodo *hub* o eje central de la red. También se puede averiguar si existe jerarquía dentro de los nodos que componen a la red, y detectar si existen módulos o motivos de nodos dentro de la red, los cuales se comportan como sub-redes altamente conectadas entre sí dentro de la red extensa que se está estudiando (Winterbach, Van Mieghem et al. 2013).

Por otro lado, el comportamiento dinámico de la red de interés puede reproducirse mediante modelos con dinámica discreta o con dinámica continua. Los modelos con dinámica discreta, como los MB, requieren únicamente de parámetros cualitativos para su generación y sirven para obtener una idea global del comportamiento dinámico de una red de regulación grande de la cual es difícil obtener información cinética detallada. Estos modelos recaen sobre todo en un comportamiento binario en el cual sus componentes pueden estar solamente en uno de dos estados posibles, es decir “encendidos” o “apagados”.

Esto último es relevante, dado que muchos sistemas biológicos muestran comportamientos binarios o actúan como *switches* con dos estados estables; así que la representación binaria o discreta de los procesos biológicos que se obtiene con un MB puede ser útil para modelar una gran cantidad de procesos biológicos y predecir la secuencia de patrones de activación de proteínas, activación de genes y para proponer interacciones desconocidas dentro de una red. Aunque los MB son multifacéticos y pueden aplicarse a una gran cantidad de sistemas biológicos, es importante considerar que para ser confiables requieren de una gran cantidad de información experimental y que pueden no ser apropiados para modelar un sistema que funcione con valores continuos de activación, de tal modo que un MB no será suficiente para obtener una representación fidedigna del sistema en estudio.

El comportamiento dinámico de las redes también puede estudiarse mediante un modelo dinámico continuo, el cual puede representar la dinámica bioquímica de



los procesos biológicos con un gran nivel de detalle, pero son altamente dependientes de conocer ciertos valores como la concentración de las proteínas de interés y de tener ciertos valores constantes. Este tipo de aproximaciones son útiles para modelar redes con muy pocos componentes ya que conocer la cinética bioquímica de cada uno de los componentes de una red de gran tamaño es muy costoso y requiere de mucho tiempo de laboratorio.

Debido a que la red FA/BRCA es muy compleja y también debido a que no existen datos cinéticos exhaustivos sobre la activación de cada uno de sus componentes, recurrimos a una aproximación discreta para su estudio y generamos tres MB que recapitulan de manera secuencial: 1) el funcionamiento de la vía FA/BRCA, 2) el proceso de adaptación al DNA dañado en células deficientes en la vía FA/BRCA y 3) el proceso de decisión que lleva a cabo una célula entre la supervivencia con daño no reparado o la activación de la apoptosis cuando la vía FA/BRCA no es funcional.

Nuestro proceso completo de modelado de la red FA/BRCA y su conexión con el control del ciclo celular y la apoptosis nos condujo a la observación de que el proceso conocido como *CHKREC* es una ruta bioquímica indispensable para mantener la estabilidad genómica y que su funcionamiento es crítico para permitir la supervivencia de las células.

La importancia del nodo *CHKREC* se hizo evidente al iniciar el proceso de modelado de la vía FA/BRCA, pues al incluir en el modelo únicamente el conocimiento experimental sobre el funcionamiento de la vía FA/BRCA y del

*checkpoint*, y llevar a cabo simulaciones, el sistema no era capaz de inactivar al *checkpoint* cuando el daño ya había sido reparado (Figura 9A) y en cambio llegaba a un atractor de arresto permanente del ciclo celular, aún en condiciones *wild type*.

Es por esto que al re-evaluar a los componentes de la red fue necesaria la adición de un nodo que fuese capaz de regular negativamente a los nodos del *checkpoint* y que permitiera llegar a un atractor que semejara un proceso de liberación del arresto una vez que el daño fuera reparado. El *CHKREC* está compuesto por fosfatasas que inactivan a las cinasas del *checkpoint* de G2 y por cinasas que liberan a la célula del arresto en el ciclo celular (Halim, Alvarez-Fernandez et al. 2013, Peng 2013), por lo que su adición al modelo resultó indispensable para recapitular de manera completa el comportamiento celular durante el proceso de reparación del DNA, sin contradecir el conocimiento experimental actual, y permitió además proponer al *CHKREC* como un regulador previamente no considerado en la red FA/BRCA (Figura 9B). De este modo, una cinética inexacta durante las primeras simulaciones evidenció la ausencia de un nodo relevante. Una vez que se incluyó al nodo *CHKREC* en el modelo y se llevaron a cabo simulaciones en las mutantes de AF, detectamos que su encendido inapropiado permitía la inactivación de los componentes del *checkpoint* a pesar de la presencia de daño no reparado (nodo DSB y nodo ICL).

Es importante recordar que la producción celular endógena de acetaldehído y de formaldehído, los cuales son capaces de formar ICLs en el DNA, es una fuente constante de daño en el DNA; es por ello que para lidiar con la producción constante de daño, la vía FA/BRCA es indispensable. Sin embargo, en las células AF, donde la capacidad de reparación es limitada, la sobrevivencia de los individuos con AF requiere de la sobre-activación de mecanismos que permitan la tolerancia al daño no reparado. Esto nos llevó a generar la **hipótesis experimental no. 1: Los componentes del CHKREC están activos en las células AF y generan un umbral de tolerancia que les permite dividirse con daño no reparado**

De acuerdo con esta hipótesis, observamos experimentalmente que a dosis sub-letales de MMC, las células AF son capaces de dividirse con daño no reparado, expresan a los genes del *CHKREC* de manera similar a las células normales y co-expresan a las proteínas del *checkpoint* y del *CHKREC*, sugiriendo que las células AF con daño sub-letal pueden eventualmente recuperarse del arresto en G2 y continuar ciclando. Esta capacidad de dividirse con dosis sub-letales de daño debida a la sobre-activación de los componentes del *CHKREC* probablemente es la que permite la sobrevivencia de los individuos con AF, sin embargo, es necesario analizar la expresión del *CHKREC* en cultivos primarios derivados de sujetos con AF y determinar si hay sobre-expresión de dichos componentes a dosis sub-letales de daño.

Se sabe además, que las rutas de reparación del DNA están conectadas con la apoptosis y que en las células AF la decisión entre sobrevivir o morir, en un contexto de daño genómico constante, se debe tomar ante cada intento de división celular; por lo que para estudiar dicha dicotomía, desarrollamos el modelo *FA-APOPTOSIS*, en el cual unimos en un modelo único a la vía FA/BRCA, el *checkpoint*, el *CHKREC* y la apoptosis.

En las simulaciones del modelo *FA-APOPTOSIS* el *CHKREC* emergió nuevamente como un proceso clave, no solo para la división de las células AF con daño, sino como un proceso que permite su sobrevivencia. En estas simulaciones observamos que las células AF llegaban al atractor de apoptosis (APP) en un menor tiempo de simulación (Figura 23B), por lo que generamos la **hipótesis experimental no. 2: las células AF requieren de *WIP1*, un componente central del *CHKREC*, para sobrevivir al daño no reparado.**

Al inhibir químicamente a la fosfatasa *WIP1* observamos que las células AF dejan de dividirse y activan la apoptosis de manera anticipada. Este efecto podría deberse a que la fosfatasa *WIP1* colabora en el apagado del *checkpoint* al desfosforilar a varios componentes, entre los que se incluye a ATM y a los blancos de fosforilación de esta cinasa como p53, CHK1, CHK2 y la  $\gamma$ H2AX. Además, *WIP1* puede desfosforilar al motivo proteico p(S/T)Q, el cual se modifica originalmente por las cinasas ATM y ATR (Lindqvist, de Bruijn et al. 2009, Shaltiel,

Aprelia et al. 2014), de tal modo que al dejar encendida a toda la maquinaria del *checkpoint* la señalización del daño sería constante y la célula no tendría más opción que morir. Otra alternativa interesante es la entrada en un arresto permanente del ciclo celular (senescencia inducida por daño), un fenómeno que ya ha sido previamente reportado en otros contextos de daño en el DNA (von Zglinicki, Saretzki et al. 2005, Marusyk, Wheeler et al. 2007, Kim, Kim et al. 2014).

Se sabe que las células AF sobre-expresan a p53 y que su apoptosis al parecer es dependiente de este factor transcripcional. Debido a ello, nuestro modelo incluyó a p53 y a sus modificaciones postraduccionales clásicas asociadas al bloqueo del ciclo celular y a la activación de la apoptosis. Encontramos, en concordancia con los datos de otros grupos, que en efecto p53, p53S15 y p21 se activan en presencia de daño en el DNA y que su estabilización se incrementa durante la inhibición de WIP1, esto sugiere que el bloqueo en el ciclo celular que observamos en las células AF se debe a la actividad de toda esta cascada de señalización. Sin embargo también observamos anticipación de la apoptosis y activación de genes pro-apoptóticos sin observar cambios sustanciales en la estabilización de p53S46, el cual se considera la modificación postraducciona clásica en p53 para activación de la apoptosis.

Lo último mencionado pareciera una contradicción, dado que estamos observando apoptosis y activación de genes pro-apoptóticos en ausencia del factor

transcripcional que en teoría se encarga de dicho proceso; sin embargo, la participación de p53S46 en el contexto de la apoptosis de las células AF no ha sido demostrada previamente. Esto hace pensar que la apoptosis de las células AF puede activarse en ausencia de esta modificación postraducciona, como ha sido demostrado para otros tipos de daño en otros contextos celulares (Thompson, Tovar et al. 2004), o a que la apoptosis puede ser el resultado de modificaciones postraduccionales en p53 no consideradas inicialmente en este estudio y que hasta la fecha permanecen poco estudiadas, tales como la acetilación de la lisina K120 (Marouco, Garabadgiu et al. 2013), la cual generaría p53K120ac. Esto demuestra que la complejidad de nuestro nodo *p53k*, el activador de los blancos transcripcionales de p53S46, es mayor de lo que originalmente pensábamos, pues ahora pasamos de pensar que se trata solamente de la fosforilación en la Ser46 a una combinación más complicada de modificaciones postraduccionales con capacidad de activar a los mismos blancos pro-apoptóticos que p53S46.

Otro escenario importante y que ya no pudo ser abordado experimentalmente en este estudio es la senescencia inducida por daño. La senescencia es un arresto irreversible en el crecimiento y en el ciclo celular que puede ser activada en respuesta a varios factores, entre los que se pueden incluir el envejecimiento, el daño en el DNA, la activación oncogénica y el estrés oxidativo (Rayess, Wang et al. 2012).

Aunque la senescencia inducida por daño es menos conocida que la apoptosis, varias situaciones y actores bioquímicos han comenzado a ser descubiertos como inductores de la senescencia o asociados a ella. Nuestros datos de expresión génica apoyan la posibilidad de que las células AF estén entrando en senescencia en respuesta al estrés generado por la MMC. Entre ellos podemos incluir la sobre-expresión del eje p53-p21, la sobre-expresión de la IL-6 y la sobre-expresión de uno de los marcadores por excelencia de la senescencia, p16. Además nuestras simulaciones computacionales muestran al atractor CCA como uno de los destinos celulares en presencia de daño no reparado y las célula AF disminuyen claramente su capacidad de dividirse cuando WIP1 es inhibido.

Con respecto al eje p53-p21, se ha reportado que la exposición crónica a concentraciones bajas de agentes inductores de estrés replicativo como etopósido, hidroxurea y afidicolina, sustancias a las que las células AF son hipersensibles, inducen un arresto irreversible en el ciclo celular. De manera importante, la inhibición de p53 es capaz de antagonizar dicho efecto incrementando la capacidad proliferativa de las células; p21 por su parte, es capaz de inducir senescencia durante la exposición crónica a dosis bajas de hidroxurea y afidicolina (Marusyk, Wheeler et al. 2007). También se ha demostrado en otros estudios que la sobre-expresión de p21 acelera la entrada a senescencia en respuesta a DNA dañado o ante la activación del oncogen RAS, sin necesidad de

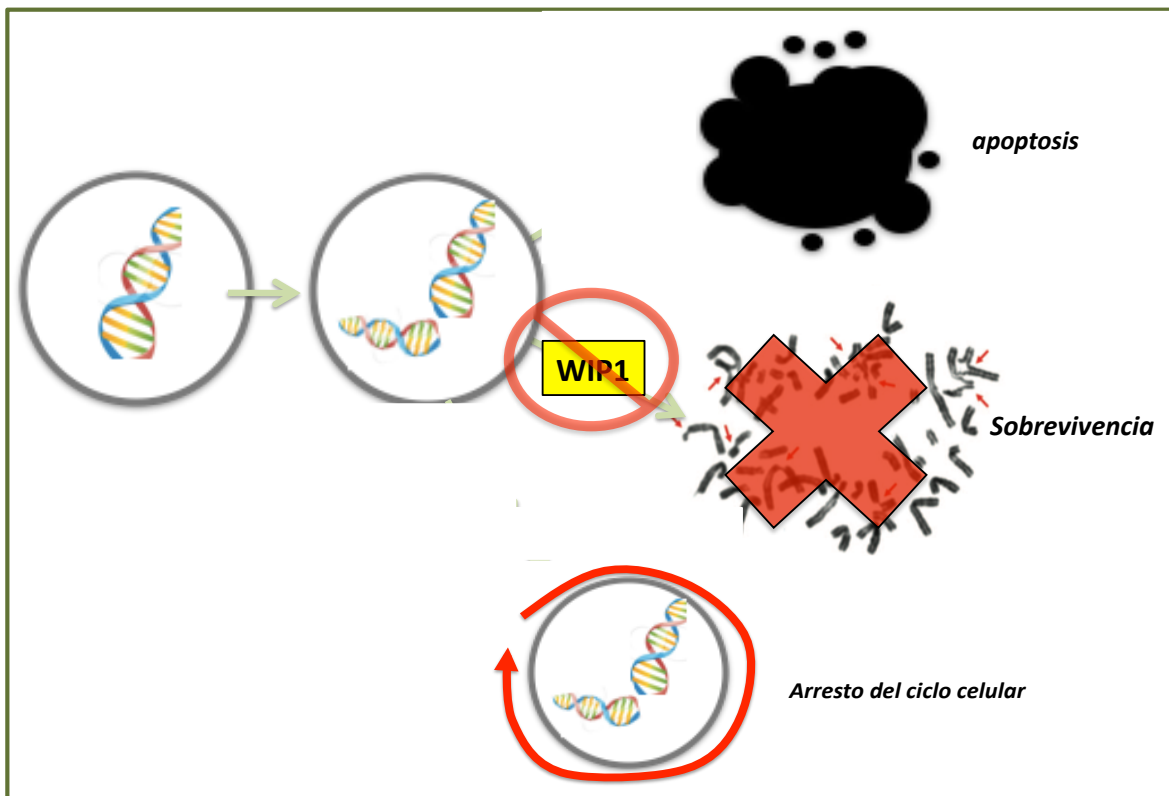
acortamiento telomérico, uno de los marcadores clásicos de entrada a senescencia debido a la pérdida de capacidad replicativa (Roninson 2002).

Por su parte, p16 el mediador clásico de la senescencia actúa a través de la vía de Rb inhibiendo la acción de las CDKs que permiten la transición G1/S. En este estado Rb se mantiene hiperfosforilado y se bloquea la expresión del factor transcripcional E2F1, el cual activa la expresión de los genes que dirigen la entrada a ciclo celular. De manera importante, en nuestros datos de expresión génica vemos que la expresión de *E2F1* se va a la baja durante la inhibición de WIP1 en presencia de MMC en las células AF.

El último dato en nuestro estudio que apoya la presencia de células en senescencia es la sobre-expresión de la IL-6 durante la exposición a MMC y durante la exposición a MMC acompañada por el inhibidor de WIP1. Esta citocina forma parte del denominado *fenotipo secretorio asociado a senescencia* (SASP, *por sus siglas en ingles*). El SASP está conformado por una serie de factores solubles secretados por las células en senescencia que permiten establecer comunicación entre las células senescentes y las células circundantes. Para el caso de la IL-6 en específico, se ha demostrado que las células con DNA dañado desarrollan lesiones persistentes que señalizan para la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Aunque el papel exacto de dicha secreción aún no ha sido establecido con certeza, se sabe que estas citocinas sólo se secretan en



presencia de daño persistente y no cuando el daño fue transitorio. El inicio y mantenimiento en la secreción de estas citocinas requiere del establecimiento de la cascada de señalización en respuesta al daño al DNA liderada por la cinasa ATM y requiere también de sus blancos de fosforilación NBS1 y CHK2, aunque podría no depender de p53 y de Rb (Rodier, Coppe et al. 2009).



**Figura 41.** Una célula con capacidades limitadas en la reparación del DNA, como una célula AF, es capaz de tolerar la presencia de daño gracias a las fosfatasa del *CHKREC* como WIP1 y de este modo retrasar la activación de la apoptosis cuando el daño genómico es sub-letal. Si dicha fosfatasa es inhibida la célula puede entrar en apoptosis o en senescencia, sin embargo, el punto de decisión entre ambos destinos celulares permanece desconocido.

Tomando en cuenta toda la información presentada y las simulaciones de nuestro modelo, podemos sugerir que nos estamos enfrentando a un escenario con

múltiples salidas. Cuando una célula AF tiene daño sub-letal en el DNA y cuenta con la expresión de WIP1 es capaz de seguir dividiéndose, sin embargo cuando hay DNA dañado y WIP1 es inhibido, una porción de las células activa la apoptosis mientras que en otra proporción se podría estar activando la senescencia. Por eso tenemos muchas células negativas a los marcadores de apoptosis y que sobreviven pero sin seguir dividiéndose (Figura 41). El *sorting* de ambos tipos celulares, basándose en la expresión de Anexina V en superficie (exclusivo de células apoptóticas) y el análisis de expresión de  $\beta$ -galactosidasa (exclusivo de células en senescencia) puede ser de gran utilidad para discriminar entre ambos destinos celulares.

Nuestros resultados muestran que las células AF con una gran cantidad de daño en el DNA conservan la capacidad de dividirse después de un arresto en la fase G2 del ciclo celular inducida por daño en el DNA, un resultado que es consistente con las simulaciones de nuestros modelos. Además, la predicción que indicaba que la inhibición de los componentes del CHKREC activaría la muerte de las células AF o induciría un arresto indefinido en la progresión del ciclo celular resultó muy relevante a partir de nuestro proceso de modelado de la red de regulación de la vía FA-APOPTOSIS. Esto podría tener un impacto importante en la biología de la AF, dado que la promoción del *CHKREC* permitiría la sobrevivencia celular del compartimiento hematopoyético y mejoras en las cuentas celulares de los pacientes AF, sin embargo, la sobre-expresión de los componentes del *CHKREC*

podría conducir también al agotamiento del *pool* de células troncales hematopoyéticas y a la selección de clonas malignas. Debido a esto, el estudio profundo de este proceso es relevante para entender el balance entre la hematopoyesis normal y una hematopoyesis maligna.

***Las características de las células CD34+ circulantes las convierten en un sistema in vitro con potencial de ser utilizado para estudiar las hipótesis generadas con nuestros modelos computacionales.***

Las células troncales hematopoyéticas residen en la médula ósea en asociación con las células estromales que forman su nicho, y pueden egresar de la ella en condiciones normales a una tasa muy baja (Wright, Wagers et al. 2001, Katayama, Battista et al. 2006, Massberg, Schaerli et al. 2007). Este egreso fisiológico ha sido demostrado en experimentos de ratones conectados de manera parabiótica en donde las células troncales pueden movilizarse de la médula hacia la circulación y establecerse nuevamente en la médula ósea, pero en un nicho distinto, que incluso puede ser de un ratón distinto al ratón de origen (Abkowitz, Robinson et al. 2003). La movilización de las células troncales puede intensificarse por la administración de citocinas como G-CSF (Bendall and Bradstock 2014) y también en condiciones de estrés, como en un evento de pérdida de sangre, presencia de una herida o lesión, durante procesos inflamatorios y cuando se detecta daño en el DNA, lo cual promueve su desprendimiento del nicho hematopoyético (Lapidot and Kollet 2010). Este desprendimiento se acompaña de la entrada a ciclo celular, proliferación y diferenciación de la célula troncal desprendida (Papayannopoulou

and Scadden 2008). En la AF se combinan dos factores que pueden contribuir a la movilización de las células troncales: la acumulación de daño en el DNA y un ambiente pro-inflamatorio en la MO (Kaschutnig, Bogeska et al. 2015).

En este trabajo detectamos un incremento en el número de células CD34+ circulando en sangre periférica (sin administración de ninguna citocina movilizadora), hasta diez veces mayor que el observado en los individuos sanos. Esta población está compuesta por diversas células hematopoyéticas maduras y células troncales con características primitivas que incluye a progenitores mieloides, progenitores linfoides y progenitores hematopoyéticos muy primitivos (Wisniewski, Affer et al. 2011), sugiriendo que las células troncales egresan de la médula ósea de los pacientes AF desde etapas muy tempranas en su diferenciación. El incremento detectado representa la entrada a circulación de células CD34+ no transformadas, a diferencia de otras condiciones malignas como la leucemia o enfermedades premalignas, como el síndrome mielodisplásico (Fuchigami, Mori et al. 2000, Barosi, Viarengo et al. 2001, Timeus, Crescenzo et al. 2005).

Las células detectadas tienen potencial clonogénico y fueron capaces de generar células del linaje eritroide, mieloide, linfocito B, linfocito NK y linfocito T, demostrando que tienen capacidad de diferenciación multi-linaje. La demostración óptima de que estas células efectivamente son troncales incluiría estudios de xenotransplante en un modelo de ratón humanizado inmunosuprimido, como los ratones NGS (Goyama, Wunderlich et al. 2015), en el cual se esperaría que las

células CD34+ circulantes formen un injerto y re-establezcan la hematopoyesis, sin embargo el éxito de dichos experimentos no parece plausible dadas las deficiencias en reparación del DNA inherentes a las células AF y a su estado pro-apoptótico. Nuestros estudios *in vitro* dan soporte a esta idea dado que la capacidad proliferativa de las células CD34+ circulantes de los pacientes AF está severamente comprometida, tal y como se esperaría de células primarias AF.

El potencial proliferativo de las células CD34+ está severamente comprometido debido a la presencia de daño excesivo en su DNA y a que muchas de ellas se encuentran en un estado pro-apoptótico caracterizado por la sobre-expresión de genes que ya han asociados con la apoptosis de las células AF: *CDKN2A*, *TP53* (Ceccaldi, Parmar et al. 2012) y *TRAF2*, un miembro de la familia de receptores de TNF $\alpha$ , el cual también se sobre-expresa en las células con AF (Du, Erden et al. 2014). Interesantemente, las células CD34+ circulantes de AF sobre-expresan a genes asociados con el *CHKREC*, como *CDC25C*, lo cual podría ayudarlas a mantener su capacidad de entrar a ciclo celular mientras se encuentran en circulación.

En este estudio caracterizamos las propiedades de las células CD34+ circulantes derivadas de pacientes con AF, sin embargo no identificamos los mecanismos que subyacen su desprendimiento del nicho hematopoyético en la MO. Para tal efecto, sería necesario determinar si las células CD34+ son capaces de establecer interacciones moleculares apropiadas con su estroma y como es que la acumulación de daño y la producción de citocinas pro-inflamatorias afectan dicha

interacción. Dado que la inflamación también está asociada con una producción elevada de G-CSF como un desencadenante de la movilización, sería importante evaluar si la modulación de la inflamación tiene algún efecto en la movilización de las células troncales de su nicho hematopoyético.

Finalmente, el estudio de las células CD34+ circulantes nos abre la posibilidad de utilizarlas como un modelo para estudiar el funcionamiento del *CHKREC* en ellas. Estas células cumplen con requisitos indispensables para tal efecto, entre los que podemos mencionar que emergen de la médula ósea con capacidad de dividirse y generar diferentes tipos de progenie a pesar de tener una gran cantidad de daño no reparado y que además sobre-expresan a genes del *CHKREC* como *CDC25C*, el cual forma parte del proceso de activación de la CDK1, la cual una vez en complejo con la Ciclina B formará al factor promotor de la división celular.

## CONCLUSIONES

El estudio de la toma de decisión celular entre activación de la apoptosis y la supervivencia es un proceso crítico en el mantenimiento celular y tisular. En los síndromes de inestabilidad cromosómica, como la AF, dicho proceso de decisión es aún más crítico porque la apoptosis masiva de las células puede conducir al agotamiento de las reservas celulares tanto troncales como diferenciadas, mientras que la supervivencia con daño genómico sub-letal permitiría la aparición de clonas malignas y cáncer.

Actualmente se considera que la falla medular en los pacientes con AF se debe a la apoptosis de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas, lo cual conduce a un número muy reducido de células en la médula ósea. Dicha escasez implica barreras éticas y experimentales que limitan el estudio en cultivos primarios de los pacientes AF para estudiar en ellas los procesos de decisión celular cuando la reparación del DNA no funciona apropiadamente. En este trabajo hemos sorteado dicha dificultad a través del modelado de redes de regulación y mediante la búsqueda de fuentes alternativas y menos invasivas de células troncales y progenitoras hematopoyéticas AF.

En la primera etapa de este trabajo recurrimos a la biología de sistemas para estudiar *in silico* el destino de las células AF cuando existe daño en su DNA. Con esta aproximación propusimos que el proceso conocido como *CHKREC* es indispensable para que las células AF se adapten al daño no reparado en su DNA y propusimos también que la inhibición de alguno de sus componentes, como *WIP1*, activaría ya sea el proceso apoptótico o el arresto permanente del ciclo celular.

En la segunda etapa demostramos experimentalmente que las células AF tienen actividad basal de los componentes del *CHKREC*, lo cual permite ignorar la presencia de cromosomas rotos y promueve la sobrevivencia de estas células con daño sub-letal no reparado. Mediante el uso de un inhibidor químico bloqueamos a la fosfatasa *WIP1*, un componente crítico del *CHKREC*, y observamos que efectivamente la tasa de división y la entrada a mitosis disminuían, mientras que la apoptosis se incrementaba, lo cual comprobó nuestra predicción.

En la tercera etapa de este proyecto detectamos que en la sangre periférica de los pacientes con AF se encuentran circulando células *CD34+*, en números significativamente más elevados que en los individuos sanos; estas células son células troncales y progenitoras hematopoyéticas que han dejado de residir en su nicho natural: la médula ósea. Dichas células presentan niveles altos de daño al DNA pero no han perdido su capacidad de diferenciación multi-linaje ni de



formación de colonias hematopoyéticas *in vitro*; la preservación de estas capacidades podría deberse a que expresan ciertos componentes del *CHKREC*, como *CDC25*, el cual es un promotor de la división celular. Este hallazgo es relevante en el campo de la AF porque la presencia de células CD34+ circulantes, sin estimulación por G-CSF, no ha sido previamente descrita en la AF y porque tener células troncales hematopoyéticas más accesibles facilitaría a todos los investigadores que trabajan en el campo de la AF, llevar a cabo estudios experimentales en ellas que permitan entender el proceso de toma de decisión entre la supervivencia y la apoptosis en las células troncales y la falla medular en la AF.

Finalmente, podemos decir que la identificación de los mecanismos que permiten la sobrevivencia de las células AF a pesar del daño en el DNA, tiene implicaciones potenciales en el desarrollo de terapias enfocadas en promover la hematopoyesis y su entendimiento puede permitir además el desarrollo de medicamentos que eviten la aparición de clonas malignas en el contexto de inestabilidad genómica propio de la AF.

## REFERENCIAS

- Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, S. Kale, M. W. Long and J. Chen (2003). "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure." Blood **102**(4): 1249-1253.
- Adamo, A., S. J. Collis, C. A. Adelman, N. Silva, Z. Horejsi, J. D. Ward, E. Martinez-Perez, S. J. Boulton and A. La Volpe (2010). "Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia." Molecular Cell **39**(1): 25-35.
- Aitken, A. (2006). "14-3-3 proteins: A historic overview." Seminars in Cancer Biology **16**(3): 162-172.
- Albert, R. (2007). "Network inference, analysis, and modeling in systems biology." Plant Cell **19**(11): 3327-3338.
- Alter, B. P. (2003). "Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001." Cancer **97**(2): 425-440.
- Alter, B. P., M. H. Greene, I. Velazquez and P. S. Rosenberg (2003). "Cancer in Fanconi anemia." Blood **101**(5): 2072-2073.
- Amador, V., S. Ge, P. G. Santamaria, D. Guardavaccaro and M. Pagano (2007). "APC/C-Cdc20 controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase." Molecular Cell **27**(3): 462-473.
- Ameziane, N., A. Errami, F. Leveille, C. Fontaine, Y. de Vries, R. M. L. van Spaendonk, J. R. de Winter, G. Pals and H. Joenje (2008). "Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening." Human Mutation **29**(1): 159-166.
- Andreassen, P. R., A. D. D'Andrea and T. Taniguchi (2004). "ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response." Genes & Development **18**(16): 1958-1963.
- Assmann, S. M. and R. Albert (2009). "Discrete Dynamic Modeling with Asynchronous Update, or How to Model Complex Systems in the Absence of Quantitative Information." Plant Systems Biology **553**: 207-225.
- Auerbach, A. D. (2009). "Fanconi anemia and its diagnosis." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **668**(1-2): 4-10.
- Barosi, G., G. Viarengo, A. Pecci, V. Rosti, G. Piaggio, M. Marchetti, F. Frassoni and M. Investigators Italian Registry (2001). "Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia." Blood **98**(12): 3249-3255.
- Batchelor, E., C. S. Mock, I. Bhan, A. Loewer and G. Lahav (2008). "Recurrent initiation: A mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage." Molecular Cell **30**(3): 277-289.
- Beerman, I., J. Seita, M. A. Inlay, I. L. Weissman and D. J. Rossi (2014). "Quiescent Hematopoietic Stem Cells Accumulate DNA Damage during Aging that Is Repaired upon Entry into Cell Cycle." Cell Stem Cell **15**(1): 37-50.
- Bendall, L. J. and K. F. Bradstock (2014). "G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent." Cytokine & Growth Factor Reviews **25**(4): 355-367.
- Bunting, S. F., E. Callen, M. L. Kozak, J. M. Kim, N. Wong, A. J. Lopez-Contreras, T. Ludwig, R. Baer, R. B. Faryabi, A. Malhowski, H.-T. Chen, O. Fernandez-Capetillo, A. D'Andrea and A. Nussenzweig (2012). "BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair." Molecular Cell **46**(2): 125-135.
- Bunting, S. F., E. Callen, N. Wong, H.-T. Chen, F. Polato, A. Gunn, A. Bothmer, N. Feldhahn, O. Fernandez-Capetillo, L. Cao, X. Xu, C.-X. Deng, T. Finkel, M. Nussenzweig,

J. M. Stark and A. Nussenzweig (2010). "53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks." *Cell* **141**(2): 243-254.

Ceccaldi, R., K. Parmar, E. Mouly, M. Delord, J. M. Kim, M. Regairaz, M. Pla, N. Vasquez, Q.-S. Zhang, C. Pondarre, R. P. de Latour, E. Gluckman, M. Cavazzana-Calvo, T. Leblanc, J. Larghero, M. Grompe, G. Socie, A. D. D'Andrea and J. Soulier (2012). "Bone Marrow Failure in Fanconi Anemia Is Triggered by an Exacerbated p53/p21 DNA Damage Response that Impairs Hematopoietic Stem and Progenitor Cells." *Cell Stem Cell* **11**(1): 36-49.

Ceccaldi, R., P. Sarangi and A. D. D'Andrea (2016). "The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**(6): 337-349.

Cesana, C., C. Klersy, B. Brando, A. Nosari, B. Scarpati, L. Scampini, A. Molteni, G. Nador, L. Santoleri, M. Formenti, M. Valentini, A. Mazzone, E. Morra and R. Cairoli (2008). "Prognostic value of circulating CD34(+) cells in myelodysplastic syndromes." *Leukemia Research* **32**(11): 1715-1723.

Cha, H., J. M. Lowe, H. Li, J.-S. Lee, G. I. Belova, D. V. Bulavin and A. J. Fornace, Jr. (2010). "Wip1 Directly Dephosphorylates (Y)-H2AX and Attenuates the DNA Damage Response." *Cancer Research* **70**(10): 4112-4122.

Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. Newmeyer, M. Schuler and D. R. Green (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." *Science* **303**(5660): 1010-1014.

Ciliberto, A., B. Novak and J. J. Tyson (2005). "Steady states and oscillations in the p53/Mdm2 network." *Cell Cycle* **4**(3): 488-493.

Cohen, K. S., S. Cheng, M. G. Larson, L. A. Cupples, E. L. McCabe, Y. A. Wang, J. S. Ngwa, R. P. Martin, R. J. Klein, B. Hashmi, Y. Ge, C. J. O'Donnell, R. S. Vasani, S. Y. Shaw and T. J. Wang (2013). "Circulating CD34(+) progenitor cell frequency is associated with clinical and genetic factors." *Blood* **121**(8): E50-E56.

Croop, J. M., R. Cooper, C. Fernandez, V. Graves, S. Kreissman, H. Hanenberg, F. O. Smith and D. A. Williams (2001). "Mobilization and collection of peripheral blood CD34(+) cells from patients with Fanconi anemia." *Blood* **98**(10): 2917-2921.

David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu (2007). "Base-excision repair of oxidative DNA damage." *Nature* **447**(7147): 941-950.

Davidich, M. I. and S. Bornholdt (2013). "Boolean Network Model Predicts Knockout Mutant Phenotypes of Fission Yeast." *Plos One* **8**(9).

De Jong, H. (2002). "Modeling and simulation of genetic regulatory systems: A literature review." *Journal of Computational Biology* **9**(1): 67-103.

Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." *Embo Journal* **17**(8): 2215-2223.

Deveraux, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." *Nature* **388**(6639): 300-304.

Douwel, D. K., R. A. C. M. Boonen, D. T. Long, A. A. Szypowska, M. Raschle, J. C. Walter and P. Knipscheer (2014). "XPF-ERCC1 Acts in Unhooking DNA Interstrand Crosslinks in Cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4." *Molecular Cell* **54**(3): 460-471.

Du, W., O. Erden and Q. S. Pang (2014). "TNF-alpha signaling in Fanconi anemia." *Blood Cells Molecules and Diseases* **52**(1): 2-11.

Dutrillaux, B., A. Aurias, A. M. Dutrillaux, D. Buriot and M. Prieur (1982). "THE CELL-CYCLE OF LYMPHOCYTES IN FANCONI ANEMIA." *Human Genetics* **62**(4): 327-332.

Faure, A., A. Naldi, C. Chaouiya and D. Thieffry (2006). "Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle." Bioinformatics **22**(14): E124-E131.

Filippo, J. S., P. Sung and H. Klein (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annual Review of Biochemistry **77**: 229-257.

Frias, S., L. Gomez, B. Molina, E. Rojas, P. OstroskyWegman and A. Carnevale (1996). "Effect of hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **357**(1-2): 115-121.

Fuchigami, K., H. Mori, T. Matsuo, M. Iwanaga, K. Nagai, K. Kuriyama and M. Tomonaga (2000). "Absolute number of circulating CD34(+) cells is abnormally low in refractory anemias and extremely high in RAEB and RAEB-t; novel pathologic features of myelodysplastic syndromes identified by highly sensitive flow cytometry." Leukemia Research **24**(2): 163-174.

Gan, G. N., J. P. Wittschieben, B. O. Wittschieben and R. D. Wood (2008). "DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes." Cell Research **18**(1): 174-183.

Garaycochea, J. I., G. P. Crossan, F. Langevin, M. Daly, M. J. Arends and K. J. Patel (2012). "Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function." Nature **489**(7417): 571-+.

Garaycochea, J. I. and K. J. Patel (2014). "Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia?" Blood **123**(1): 26-34.

Garcia de Teresa, B., A. Rodriguez and S. Frias (2016). "Multidisciplinary approach of the Fanconi anemia patient." Acta Pediatrica De Mexico **37**(1): 54-59.

Gari, K., C. Decaillet, M. Delannoy, L. Wu and A. Constantinou (2008). "Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(42): 16107-16112.

Geiger, H., G. de Haan and M. C. Florian (2013). "The ageing haematopoietic stem cell compartment." Nature Reviews Immunology **13**(5): 376-389.

Geiger, H., A. Koehler and M. Gunzer (2007). "Stem cells, aging, niche, adhesion and Cdc42 - A model for changes in cell-cell interactions and hematopoietic stem cell aging." Cell Cycle **6**(8): 884-887.

Goldstone, S., S. Pavey, A. Forrest, J. Sinnamon and B. Gabrielli (2001). "Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR." Oncogene **20**(8): 921-932.

Goyama, S., M. Wunderlich and J. C. Mulloy (2015). "Xenograft models for normal and malignant stem cells." Blood **125**(17): 2630-2640.

Halim, V. A., M. Alvarez-Fernandez, Y. J. Xu, M. Aprelia, H. W. P. van den Toorn, A. J. R. Heck, S. Mohammed and R. H. Medema (2013). "Comparative Phosphoproteomic Analysis of Checkpoint Recovery Identifies New Regulators of the DNA Damage Response." Science Signaling **6**(272).

Heidt, T., H. B. Sager, G. Courties, P. Dutta, Y. Iwamoto, A. Zaltsman, C. von zur Muhlen, C. Bode, G. L. Fricchione, J. Denninger, C. P. Lin, C. Vinegoni, P. Libby, F. K. Swirski, R. Weissleder and M. Nahrendorf (2014). "Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells." Nature Medicine **20**(7): 754-758.

Heinrich, M. C., M. E. Hoatlin, A. J. Zigler, K. V. Silvey, A. C. Bakke, W. W. Keeble, Y. Zhi, C. A. Reifsteck, M. Grompe, M. G. Brown, R. E. Magenis, S. B. Olson and G. C. Bagby (1998). "DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function." Blood **91**(1): 275-287.

Higgs, M. R., J. J. Reynolds, A. Winczura, A. N. Blackford, V. Borel, E. S. Miller, A. Zlatanou, J. Nieminuszczy, E. L. Ryan, N. J. Davies, T. Stankovic, S. J. Boulton, W. Niedzwiedz and G. S. Stewart (2015). "BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks." Molecular Cell **59**(3): 462-477.

Hira, A., H. Yabe, K. Yoshida, Y. Okuno, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, J. Nakamura, S. Kojima, S. Ogawa, K. Matsuo, M. Takata and M. Yabe (2013). "Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients." Blood **122**(18): 3206-3209.

Hira, A., K. Yoshida, K. Sato, Y. Okuno, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, A. Shimamoto, H. Tahara, E. Ito, S. Kojima, H. Kurumizaka, S. Ogawa, M. Takata, H. Yabe and M. Yabe (2015). "Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia." American Journal of Human Genetics **96**(6): 1001-1007.

Hoeijmakers, J. H. J. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.

Howard, S. M., D. A. Yanez and J. M. Stark (2015). "DNA Damage Response Factors from Diverse Pathways, Including DNA Crosslink Repair, Mediate Alternative End Joining." Plos Genetics **11**(1).

Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks." Journal of Cell Science **116**(8): 1397-1408.

Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.

Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**(5): 335-346.

Joenje, H. and A. B. Oostra (1983). "EFFECT OF OXYGEN-TENSION ON CHROMOSOMAL-ABERRATIONS IN FANCONI ANEMIA." Human Genetics **65**(2): 99-101.

Jovanovic, S. and S. Rotter (2016). "Interplay between Graph Topology and Correlations of Third Order in Spiking Neuronal Networks." Plos Computational Biology **12**(6).

Kaschutnig, P., R. Bogeska, D. Walter, A. Lier, S. Huntscha and M. D. Milsom (2015). "The Fanconi anemia pathway is required for efficient repair of stress-induced DNA damage in haematopoietic stem cells." Cell Cycle **14**(17): 2734-2742.

Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas and P. S. Frenette (2006). "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow." Cell **124**(2): 407-421.

Kawanishi, S., Y. Hiraku, S. Pinlaor and N. Ma (2006). "Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis." Biological Chemistry **387**(4): 365-372.

Kennedy, R. D. and A. D. D'Andrea (2005). "The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd." Genes & Development **19**(24): 2925-2940.

Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." Nature Genetics **27**(3): 247-254.

Kim, J. M., Y. Kee, A. Gurtan and A. D. D'Andrea (2008). "Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24." Blood **111**(10): 5215-5222.

Kim, K. S., J. E. Kim, K. J. Choi, S. Bae and D. H. Kim (2014). "Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells." International Journal of Radiation Biology **90**(1): 71-80.

Kitano, H. (2002). "Computational systems biology." Nature **420**(6912): 206-210.

Knipscheer, P., M. Raeschle, A. Smogorzewska, M. Enoiu, T. V. Ho, O. D. Schaerer, S. J. Elledge and J. C. Walter (2009). "The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair." Science **326**(5960): 1698-1701.

Kottemann, M. C. and A. Smogorzewska (2013). "Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks." Nature **493**(7432): 356-363.

Langevin, F., G. P. Crossan, I. V. Rosado, M. J. Arends and K. J. Patel (2011). "Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice." Nature **475**(7354): 53-U67.

Lapidot, T. and O. Kollet (2010). "The Brain-Bone-Blood Triad: Traffic Lights for Stem-Cell Homing and Mobilization." Hematology-American Society Hematology Education Program: 1-6.

Leteurtre, F., X. Li, P. Guardiola, G. Le Roux, J. C. Sergere, P. Richard, E. D. Carosella and E. Gluckman (1999). "Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia." British Journal of Haematology **105**(4): 883-893.

Lieber, M. R. (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." Journal of Biological Chemistry **283**(1): 1-5.

Lieber, M. R. (2010). "The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway." Annual Review of Biochemistry, Vol 79 **79**: 181-211.

Lindahl, T. and D. E. Barnes (2000). "Repair of endogenous DNA damage." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **65**: 127-133.

Lindqvist, A., M. de Bruijn, L. Macurek, A. Bras, A. Mensinga, W. Bruinsma, O. Voets, O. Kranenburg and R. H. Medema (2009). "Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression." Embo Journal **28**(20): 3196-3206.

Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo and R. H. Medema (2009). "The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network." Journal of Cell Biology **185**(2): 193-202.

Loeb, L. A. and R. J. Monnat, Jr. (2008). "DNA polymerases and human disease." Nature Reviews Genetics **9**(8): 594-604.

Lu, X., O. Ma, T.-A. Nguyen, S. N. Jones, M. Oren and L. A. Donehower (2007). "The Wip1 phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop." Cancer Cell **12**(4): 342-354.

Lu, X., T.-A. Nguyen, S.-H. Moon, Y. Darlington, M. Sommer and L. A. Donehower (2008). "The type 2C phosphatase Wip1: An oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways." Cancer and Metastasis Reviews **27**(2): 123-135.

Lu, X. B., T. A. Nguyen and L. A. Donehower (2005). "Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D." Cell Cycle **4**(8): 1060-1064.

Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein and T. Jacks (1995). "P53-DEPENDENT AND INDEPENDENT EXPRESSION OF P21 DURING CELL-GROWTH, DIFFERENTIATION, AND DNA-DAMAGE." Genes & Development **9**(8): 935-944.

Mailand, N., S. Bekker-Jensen, J. Bartek and J. Lukas (2006). "Destruction of claspin by SCF beta TrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress." Molecular Cell **23**(3): 307-318.

Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek and J. Lukas (2002). "Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability." Embo Journal **21**(21): 5911-5920.

Mamely, I., M. A. T. M. van Vugt, V. A. J. Smits, J. I. Semple, B. Lemmens, A. Perrakis, R. H. Medema and R. Freire (2006). "Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of claspin during checkpoint recovery." *Current Biology* **16**(19): 1950-1955.

Marouco, D., A. V. Garabadgiu, G. Melino and N. A. Barlev (2013). "Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death?" *Oncotarget* **4**(10): 1556-1571.

Marusyk, A., L. J. Wheeler, C. K. Mathews and J. DeGregori (2007). "p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress." *Molecular and Cellular Biology* **27**(15): 5336-5351.

Massberg, S., P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica, M. Kollnberger, N. Tubo, E. A. Moseman, I. V. Huff, T. Junt, A. J. Wagers, I. B. Mazo and U. H. von Andrian (2007). "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues." *Cell* **131**(5): 994-1008.

Mayo, L. D., Y. R. Seo, M. W. Jackson, M. L. Smith, J. R. Guzman, C. K. Korgaonkar and D. B. Donner (2005). "Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified." *Journal of Biological Chemistry* **280**(28): 25953-25959.

McHugh, P. J., W. R. Sones and J. A. Hartley (2000). "Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* **20**(10): 3425-3433.

McVey, M. and S. E. Lee (2008). "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings." *Trends in Genetics* **24**(11): 529-538.

Mehta, P. A., R. E. Harris, S. M. Davies, M.-O. Kim, R. Mueller, B. Lampkin, J. Mo, K. Myers and T. A. Smolarek (2010). "Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome-acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia." *Cancer Genetics and Cytogenetics* **203**(2): 180-186.

Mendoza, L. (2006). "A network model for the control of the differentiation process in Th cells." *Biosystems* **84**(2): 101-114.

Mendoza, L., D. Thieffry and E. R. Alvarez-Buylla (1999). "Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis." *Bioinformatics* **15**(7-8): 593-606.

Mochida, S., S. Ikeo, J. Gannon and T. Hunt (2009). "Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts." *Embo Journal* **28**(18): 2777-2785.

Moroni, M. C., E. S. Hickman, E. L. Denchi, G. Caprara, E. Colli, F. Cecconi, H. Muller and K. Helin (2001). "Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53." *Nature Cell Biology* **3**(6): 552-558.

Muessel, C., M. Hopfensitz and H. A. Kestler (2010). "BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks." *Bioinformatics* **26**(10): 1378-1380.

Murina, O., C. von Aesch, U. Karakus, L. P. Ferretti, H. A. Bolck, K. Haenggi and A. A. Sartori (2014). "FANCD2 and CtIP Cooperate to Repair DNA Interstrand Crosslinks." *Cell Reports* **7**(4): 1030-1038.

Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Molecular Cell* **7**(3): 683-694.

Nijman, S. M. B., T. T. Huang, A. M. G. Dirac, T. R. Brummelkamp, R. M. Kerkhoven, A. D. D'Andrea and R. Bernards (2005). "The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway." *Molecular Cell* **17**(3): 331-339.

Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura and Y. Taya (2000). "p53AIP1, a potential mediator of p53-

dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53." *Cell* **102**(6): 849-862.

Oliva-Trastoy, M., V. Berthonaud, A. Chevalier, C. Ducrot, M. C. Marsolier-Kergoat, C. Mann and F. Leteurtre (2007). "The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase." *Oncogene* **26**(10): 1449-1458.

Owenschaub, L. B., W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, E. Kruzel and R. Radinsky (1995). "WILD-TYPE HUMAN P53 AND A TEMPERATURE-SENSITIVE MUTANT INDUCE FAS/APO-1 EXPRESSION." *Molecular and Cellular Biology* **15**(6): 3032-3040.

Pace, P., G. Mosedale, M. R. Hodkinson, I. V. Rosado, M. Sivasubramaniam and K. J. Patel (2010). "Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway." *Science* **329**(5988): 219-223.

Papayanopoulou, T. and D. T. Scadden (2008). "Stem-cell ecology and stem cells in motion." *Blood* **111**(8): 3923-3930.

Peng, A. (2013). "Working hard for recovery: mitotic kinases in the DNA damage checkpoint." *Cell and Bioscience* **3**.

Peng, M., R. Litman, J. Xie, S. Sharma, R. M. Brosh, Jr. and S. B. Cantor (2007). "The FANCI/MutL alpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells." *Embo Journal* **26**(13): 3238-3249.

Peschiaroli, A., N. V. Dorrello, D. Guardavaccaro, M. Venere, T. Halazonetis, N. E. Sherman and M. Pagano (2006). "SCF beta TrCP-mediated degradation of claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response." *Molecular Cell* **23**(3): 319-329.

Pichierri, P. and F. Rosselli (2004). "The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHEK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways." *Embo Journal* **23**(5): 1178-1187.

Prakash, R., Y. Zhang, W. Feng and M. Jasin (2015). "Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**(4).

Rayess, H., M. B. Wang and E. S. Srivatsan (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." *International Journal of Cancer* **130**(8): 1715-1725.

Rios, O., S. Frias, A. Rodriguez, S. Kofman, H. Merchant, L. Torres and L. Mendoza (2015). "A Boolean network model of human gonadal sex determination." *Theoretical Biology and Medical Modelling* **12**.

Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. M. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos and J. Campisi (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." *Nature Cell Biology* **11**(8): 973-U142.

Rodriguez, A., D. Sosa, L. Torres, B. Molina, S. Frias and L. Mendoza (2012). "A Boolean network model of the FA/BRCA pathway." *Bioinformatics* **28**(6): 858-866.

Rodriguez, A., L. Torres, U. Juarez, D. Sosa, E. Azpeitia, B. Garcia-de Teresa, E. Cortes, R. Ortiz, A. M. Salazar, P. Ostrosky-Wegman, L. Mendoza and S. Frias (2015). "Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process." *Theoretical Biology and Medical Modelling* **12**.

Roninson, I. B. (2002). "Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts." *Cancer Letters* **179**(1): 1-14.

Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." *Trends in Molecular Medicine* **12**(9): 440-450.



Roques, C., Y. Coulombe, M. Delannoy, J. Vignard, S. Grossi, I. Brodeur, A. Rodrigue, J. Gautier, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, A. Constantinou and J.-Y. Masson (2009). "MRE11-RAD50-NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair." *Embo Journal* **28**(16): 2400-2413.

Rosado, I. V., F. Langevin, G. P. Crossan, M. Takata and K. J. Patel (2011). "Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway." *Nature Structural & Molecular Biology* **18**(12): 1432-1434.

Rosenberg (2003). "Cancer incidence in persons with Fanconi anemia (vol 101, pg 822, 2003)." *Blood* **101**(6): 2136-2136.

Rosenberg, P. S., M. H. Greene and B. P. Alter (2003). "Cancer incidence in persons with Fanconi anemia." *Blood* **101**(3): 822-826.

Rosselli, F., J. Sanceau, E. Gluckman, J. Wietzerbin and E. Moustacchi (1994). "ABNORMAL LYMPHOKINE PRODUCTION - A NOVEL FEATURE OF THE GENETIC-DISEASE FANCONI-ANEMIA .2. IN-VITRO AND IN-VIVO SPONTANEOUS OVERPRODUCTION OF TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA." *Blood* **83**(5): 1216-1225.

Rosselli, F., J. Sanceau, J. Wietzerbin and E. Moustacchi (1992). "ABNORMAL LYMPHOKINE PRODUCTION - A NOVEL FEATURE OF THE GENETIC-DISEASE FANCONI ANEMIA .1. INVOLVEMENT OF INTERLEUKIN-6." *Human Genetics* **89**(1): 42-48.

Sanchez, Y., C. Wong, R. S. Thoma, R. Richman, R. Q. Wu, H. Piwnica-Worms and S. J. Elledge (1997). "Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25." *Science* **277**(5331): 1497-1501.

Schuettelz, L. G. and D. C. Link (2013). "Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation." *Frontiers in Immunology* **4**.

Seki, A., J. A. Coppinger, C.-Y. Jang, J. R. Yates, III and G. Fang (2008). "Bora and the kinase Aurora A cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry." *Science* **320**(5883): 1655-1658.

Sengupta, S. and C. C. Harris (2005). "p53: Traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**(1): 44-55.

Shaltiel, I. A., M. Aprelia, A. T. Saurin, D. Chowdhury, G. J. P. L. Kops, E. E. Voest and R. H. Medema (2014). "Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(20): 7313-7318.

Smits, V. A. J., R. Klompaker, L. Arnaud, G. Rijksen, E. A. Nigg and R. H. Medema (2000). "Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint." *Nature Cell Biology* **2**(9): 672-676.

Somyajit, K., S. Subramanya and G. Nagaraju (2012). "Distinct Roles of FANCO/RAD51C Protein in DNA Damage Signaling and Repair IMPLICATIONS FOR FANCONI ANEMIA AND BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY." *Journal of Biological Chemistry* **287**(5): 3366-3380.

Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, P. R. Andreassen, R. C. Gregory, M. Grompe and A. D. D'Andrea (2002). "S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51." *Blood* **100**(7): 2414-2420.

Terui, T., K. Murakami, R. Takimoto, M. Takahashi, K. Takada, T. Murakami, S. Minami, T. Matsunaga, T. Takayama, J. Kato and Y. Niitsu (2003). "Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors." *Cancer Research* **63**(24): 8948-8954.

Thompson, T., C. Tovar, H. Yang, D. Carvajal, B. T. Vu, Q. L. Xu, G. M. Wahl, D. C. Heimbrook and L. T. Vassilev (2004). "Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis." Journal of Biological Chemistry **279**(51): 53015-53022.

Timeus, F., N. Crescenzo, A. Doria, L. Foglia, A. Linari, M. Giaccone, G. Pastore, L. C. di Montezemolo, U. Ramenghi and P. Saracco (2005). "Flow cytometric evaluation of circulating CD34(+) cell counts and apoptotic rate in children with acquired aplastic anemia and myelodysplasia." Experimental Hematology **33**(5): 597-604.

Toczyski, D. P., D. J. Galgoczy and L. H. Hartwell (1997). "CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint." Cell **90**(6): 1097-1106.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi and E. Nishida (2002). "Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase." Embo Reports **3**(4): 341-348.

Tulpule, A., M. W. Lensch, J. D. Miller, K. Austin, A. D'Andrea, T. M. Schlaeger, A. Shimamura and G. Q. Daley (2010). "Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage." Blood **115**(17): 3453-3462.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chemico-Biological Interactions **160**(1): 1-40.

van Vugt, M. and R. H. Medema (2004). "Checkpoint adaptation and recovery - Back with polo after the break." Cell Cycle **3**(11): 1383-1386.

van Vugt, M. A. T. M., A. K. Gardino, R. Linding, G. J. Ostheimer, H. C. Reinhardt, S.-E. Ong, C. S. Tan, H. Miao, S. M. Keezer, J. Li, T. Pawson, T. A. Lewis, S. A. Carr, S. J. Smerdon, T. R. Brummelkamp and M. B. Yaffe (2010). "A Mitotic Phosphorylation Feedback Network Connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to Inactivate the G2/M DNA Damage Checkpoint." Plos Biology **8**(1).

van Vugt, M. A. T. M. and M. B. Yaffe (2010). "Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints Giving it some gas to shut off the breaks!" Cell Cycle **9**(11): 2097-2101.

Vidanes, G. M., F. D. Sweeney, S. Galicia, S. Cheung, J. P. Doyle, D. Durocher and D. P. Toczyski (2010). "CDC5 Inhibits the Hyperphosphorylation of the Checkpoint Kinase Rad53, Leading to Checkpoint Adaptation." Plos Biology **8**(1).

von Zglinicki, T., G. Saretzki, J. Ladhoff, F. D. di Fagagna and S. P. Jackson (2005). "Human cell senescence as a DNA damage response." Mechanisms of Ageing and Development **126**(1): 111-117.

Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8**(4): 275-283.

Walter, D., A. Lier, A. Geiselhart, F. B. Thalheimer, S. Huntscha, M. C. Sobotta, B. Moehrle, D. Brocks, I. Bayindir, P. Kaschutnig, K. Muedder, C. Klein, A. Jauch, T. Schroeder, H. Geiger, T. P. Dick, T. Holland-Letz, P. Schmezer, S. W. Lane, M. A. Rieger, M. A. G. Essers, D. A. Williams, A. Trumpp and M. D. Milsom (2015). "Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells." Nature **520**(7548): 549-+.

Wang, J. W., Q. Sun, Y. Morita, H. Jiang, A. Gross, A. Lechel, K. Hildner, L. M. Guachalla, A. Gompf, D. Hartmann, A. Schambach, T. Wustefeld, D. Dauch, H. Schrezenmeier, W. K. Hofmann, H. Nakauchi, Z. Y. Ju, H. A. Kestler, L. Zender and K. L. Rudolph (2014). "A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage (vol 148, pg 1001, 2012)." Cell **158**(6): 1444-1444.

Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, T. Hunter and H. Osada (2004). "M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF beta-TrCP." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(13): 4419-4424.

Winterbach, W., P. Van Mieghem, M. Reinders, H. J. Wang and D. de Ridder (2013). "Topology of molecular interaction networks." Bmc Systems Biology **7**.

Wisniewski, D., M. Affer, J. Willshire and B. Clarkson (2011). "Further phenotypic characterization of the primitive lineage-CD34+CD38-CD90+CD45RA-hematopoietic stem cell/progenitor cell sub-population isolated from cord blood, mobilized peripheral blood and patients with chronic myelogenous leukemia." Blood Cancer Journal **1**.

Wright, D. E., A. J. Wagers, A. P. Gulati, F. L. Johnson and I. L. Weissman (2001). "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor Celts." Science **294**(5548): 1933-1936.

Xiao, Y. (2009). "A Tutorial on Analysis and Simulation of Boolean Gene Regulatory Network Models." Current Genomics **10**(7): 511-525.

Yamamoto, K. N., S. Kobayashi, M. Tsuda, H. Kurumizaka, M. Takata, K. Kono, J. Jiricny, S. Takeda and K. Hirota (2011). "Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(16): 6492-6496.

Zhan, Q. M. (2005). "Gadd45a, a p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **569**(1-2): 133-143.

Zhang, R., T. P. Loughran, Jr. and R. Albert (2010). "Network Model of Survival Signaling in T-Cell Large Granular Lymphocyte Leukemia." Cancer Systems Biology: 125-141.

Zhang, R., M. V. Shah, J. Yang, S. B. Nyland, X. Liu, J. K. Yun, R. Albert and T. P. Loughran, Jr. (2008). "Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(42): 16308-16313.

Zhang, X. P., F. Liu, Z. Cheng and W. Wang (2009). "Cell fate decision mediated by p53 pulses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(30): 12245-12250.

Zhang, X. P., F. Liu and W. Wang (2011). "Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(22): 8990-8995.

Zhou, B. B. S. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.

# ANEXOS




RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process

Alfredo Rodríguez<sup>1,2</sup>, Leda Torres<sup>1</sup>, Ulises Juárez<sup>1</sup>, David Sosa<sup>1</sup>, Eugenio Azpeitia<sup>3,4,5</sup>, Benilde García-de Teresa<sup>1</sup>, Edith Cortés<sup>6</sup>, Rocío Ortíz<sup>6</sup>, Ana M. Salazar<sup>7</sup>, Patricia Ostrosky-Wegman<sup>7</sup>, Luis Mendoza<sup>4,7</sup> <sup>†</sup> and Sara Frías<sup>1,7\*†</sup>

\*Correspondence:

sarafrias@biomedicas.unam.mx

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>1</sup>Laboratorio de Citogenética,  
Departamento de Investigación en  
Genética Humana, Instituto  
Nacional de Pediatría, D.F., México  
<sup>7</sup>Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México, D.F., México  
Full list of author information is  
available at the end of the article

## Abstract

**Background:** The FA/BRCA pathway repairs DNA interstrand crosslinks. Mutations in this pathway cause Fanconi anemia (FA), a chromosome instability syndrome with bone marrow failure and cancer predisposition. Upon DNA damage, normal and FA cells inhibit the cell cycle progression, until the G2/M checkpoint is turned off by the checkpoint recovery, which becomes activated when the DNA damage has been repaired. Interestingly, highly damaged FA cells seem to override the G2/M checkpoint. In this study we explored with a Boolean network model and key experiments whether checkpoint recovery activation occurs in FA cells with extensive unrepaired DNA damage.

**Methods:** We performed synchronous/asynchronous simulations of the FA/BRCA pathway Boolean network model. FA-A and normal lymphoblastoid cell lines were used to study checkpoint and checkpoint recovery activation after DNA damage induction. The experimental approach included flow cytometry cell cycle analysis, cell division tracking, chromosome aberration analysis and gene expression analysis through qRT-PCR and western blot.

**Results:** Computational simulations suggested that in FA mutants checkpoint recovery activity inhibits the checkpoint components despite unrepaired DNA damage, a behavior that we did not observe in *wild-type* simulations. This result implies that FA cells would eventually reenter the cell cycle after a DNA damage induced G2/M checkpoint arrest, but before the damage has been fixed. We observed that FA-A cells activate the G2/M checkpoint and arrest in G2 phase, but eventually reach mitosis and divide with unrepaired DNA damage, thus resolving the initial checkpoint arrest. Based on our model result we look for ectopic activity of checkpoint recovery components. We found that checkpoint recovery components, such as PLK1, are expressed to a similar extent as normal undamaged cells do, even though FA-A cells harbor highly damaged DNA.

**Conclusions:** Our results show that FA cells, despite extensive DNA damage, do not lose the capacity to express the transcriptional and protein components of checkpoint recovery that might eventually allow their division with unrepaired DNA damage. This might allow cell survival but increases the genomic instability inherent to FA individuals and promotes cancer.

**Keywords:** DNA damage, Checkpoint recovery, Boolean network model

## Introduction

The molecular basis of the DNA damage response (DDR) has been largely elucidated through the study of the rare chromosome instability syndromes (CIS) [1] which are cytogenetically characterized by the spontaneous appearance of chromosome aberrations (CA) as well as hypersensitivity to specific DNA damaging agents [2–4]. The best-known CIS include Bloom syndrome (BS) which appears due to mutations in BLM helicase [5, 6] and results in increased sister chromatid exchanges [7], Ataxia Telangiectasia (AT) that shows particular clonal chromosome rearrangements as a consequence of mutations in the checkpoint kinase ATM gene [8–11], and Fanconi anemia (FA) [12] whose phenotype results from mutations in any of the genes that conform the FA/BRCA pathway [13–19] and consists of chromatidic breaks, iso-chromatidic breaks and radial exchange figures among chromosomes. Even if these breaks and radials are predominantly seen in FA, they can also be observed in BS and AT [4, 20]. Although patients affected by CIS display phenotypic similarities, such as growth defects, compromised immunological system and an increased risk to develop cancer [1, 20], each syndrome presents particular phenotypes and pivotal data. Namely, BS shows sun sensitivity [5], AT presents progressive cerebellar ataxia and oculo-cutaneous telangiectases [8], while FA is characterized by congenital malformations and progressive bone marrow failure [21]. The products of these genes interact in the cell's DNA damage response [1], and thus the deficiency of any of these proteins diminishes the efficiency of a cell to cope with DNA damage, leading to their accumulation.

Given the critical role that these proteins have in the protection of the human genome, certain authors have speculated that survival of CIS patients is an oddity and that cells escaping apoptotic death do so by constitutively inducing alternative replication or DNA damage tolerance pathways, which might contribute to the characteristic mutator phenotypes observed in the CIS [22].

In the particular case of FA, cells are hypersensitive to agents that create DNA inter-strand crosslinks (ICL), such as mitomycin C (MMC) or diepoxybutane (DEB) [21]. The treatment of FA cells with MMC or DEB induces a blockage during the G2 phase of the cell cycle and exacerbates the frequency of CAs, including double strand breaks (DSBs) and radial exchange figures [23]. Biallelic mutations in at least one of 18 distinct *FANC* genes can generate FA. The products of these genes interact in the so-called Fanconi Anemia/Breast Cancer (FA/BRCA) pathway [13–18], involved in the repair of the DNA damage generated by intrinsic acetaldehydes and extrinsic ICL inducing agents. Therefore, a deficiency in this pathway results in DNA damage accumulation that might originate congenital malformations, uncontrolled hematopoietic cell death and cancer in FA patients [24–27].

Over the years, the FA diagnosis assays and experimental approaches have shown that a great proportion of FA cells succumb to DNA damage due to their inherent repair deficiencies. However, some cells are able to tolerate high levels of DNA damage and progress into mitosis despite a great amount of CAs. The mechanisms that allow the cells with CAs to omit the DNA damage integrity checkpoints remain uncertain because the more obvious candidate, the G2/M checkpoint, is considered to be properly activated in FA cells [28–30]. Thus, the idea of a malfunctioning checkpoint in FA cells has been ruled out and it is presumed that some other mechanisms are responsible for the checkpoint override in FA cells with unrepaired DSBs.

In recent times, an attenuated G2 checkpoint phenotype, characterized by low levels of CHK1 (NP\_001107594.1) and p53 (NP\_000537.3), absence of the G2 phase arrest, and arrival to metaphase with a large number of MMC-induced CAs has been described in cells from adult FA individuals [31]. It has been suggested that the G2 checkpoint attenuation could be an important contributor for the increased life expectancy of these FA patients, and that the release of cells with unrepaired DSBs could promote neoplastic transformation [31]. Nevertheless, since non-attenuated FA cells carrying unrepaired DNA damage achieve a correct G2/M checkpoint activation [28–30], the aforementioned mechanism seems to be a particular scenario rather than a general mechanism to enable the resolution of the G2 checkpoint blockage.

Network modeling has been previously used with success to study the dynamics of biological systems [32–37]. Particularly, we developed a Boolean network model (BNM) for the FA/BRCA pathway [38], in which we observed that the inclusion of the checkpoint recovery (CHKREC) node is crucial for the network correct function. In our model, the CHKREC node represents the process that relieves the inhibition of the checkpoint machinery over the mitosis-promoting factor (Cyclin B/CDK1) after a complete DNA damage repair to allow further cell division [39–42]. This node comprises the G2 transcriptional program that activates the expression of genes driving the G2/M transition and the protein program that inactivates the  $\gamma$ H2AX histone (NP\_002096.1) and checkpoint kinases [43]. We presumed that CHKREC activation might be releasing cells with unrepaired DNA damage in FA mutants. To test this possibility, as well as to validate the inclusion of the node itself in the FA/BRCA network, we used a simplified version of our previously published FA/BRCA pathway BNM and experimentally determined if CHKREC components become activated in FA cells during G2/M during MMC-induced arrest.

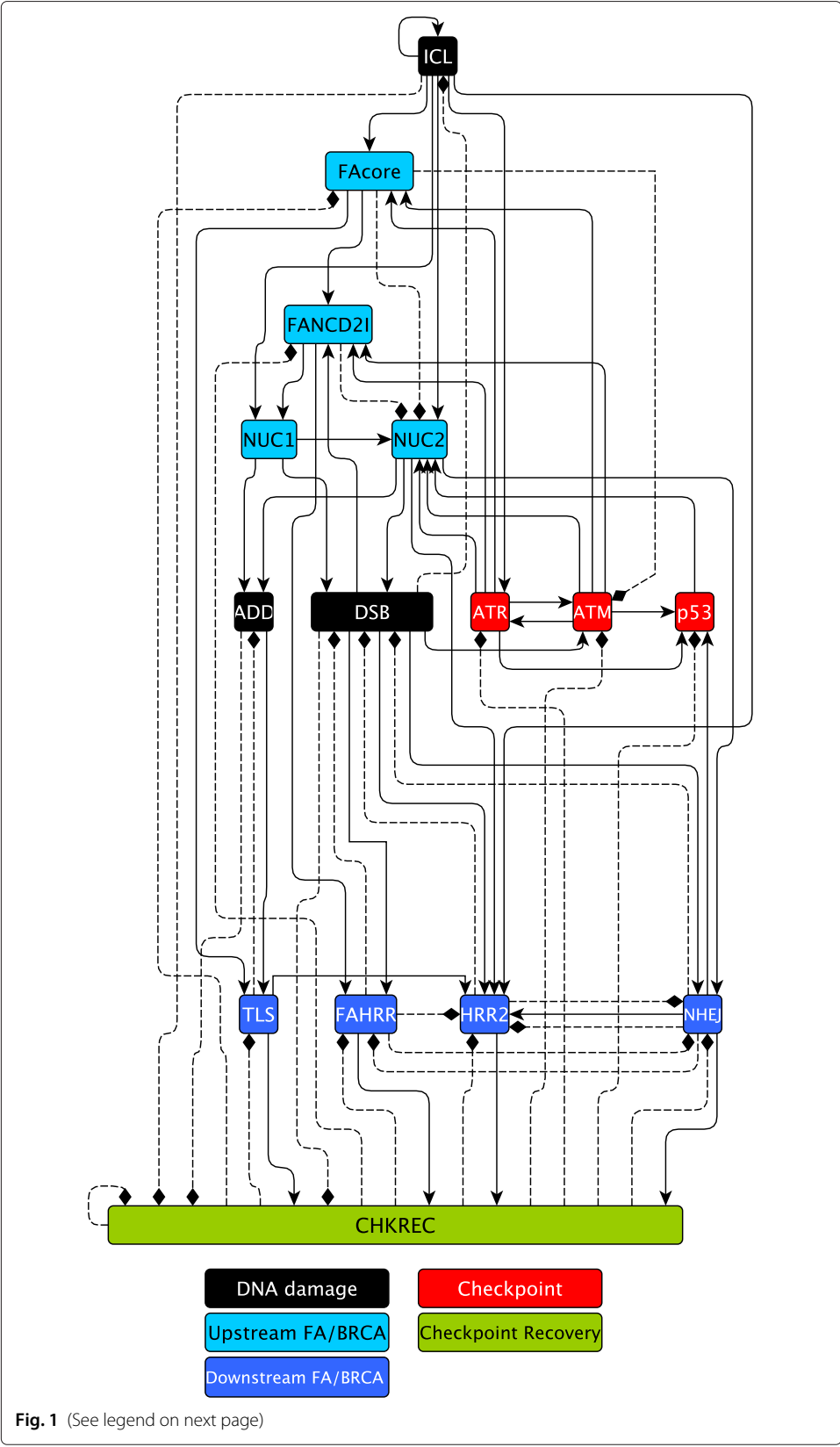
## Materials and methods

### Model and simulations

The simplification of the FA/BRCA network was done by reorganizing the existing 28 nodes and 122 interactions [38], resulting in a deterministic BNM with 15 nodes and 66 interactions (Fig. 1 and Table 1) that vastly simplifies the computational analysis while maintaining the qualitative dynamical behavior of the original FA/BRCA network. The simplification was made by collapsing the network components that share functions or belong to a single pathway into one single node. We were careful to preserve all the important functional categories of the network and made sure to recover the behavior of the *wild type* and mutant networks. The modifications and simplification criteria are listed in Table 2.

Simulations were performed for the *wild type* and all possible gain of function or null mutants of the model with synchronous and asynchronous update regimes. Here we report the simulations exploring checkpoint and CHKREC function in *wild type* and FA core mutants. These null mutants were simulated fixing to zero the node of interest.

In these mutants we simulated the response to ICLs, whose presence is dependent on the time that the system requires to turn it off. With our model we simulated two biologically relevant conditions, a short exposure to ICLs, which is supposed to be repaired fast and efficiently by the FA/BRCA pathway (Fig. 2b) and a persistent exposure to damaging agents, which is more difficult to face given the accumulation of damage and saturation





(See figure on previous page)

The latest FA/BRCA network. In response to an ICL, the FA/BRCA network responds by blocking the cell cycle through the ATR and ATM checkpoint kinases and their downstream target p53. Similarly, the FA core complex (FAcore) becomes activated and ubiquitinates FANCD2I complex, which in turn recruits DNA endonucleases (NUC1 and NUC2). These endonucleases unhook the ICL generating a DNA adduct (ADD) and a double strand break (DSB). Translesion synthesis (TLS) takes over the ADD while the DSB can be rejoined either by FA/BRCA-dependent Homologous Recombination (FAHRR), FA/BRCA-independent Homologous Recombination (HRR2), or by the error prone Non-Homologous End-Joining (NHEJ) pathways. Finally, we predict that the CHKREC node, composed by the G2/M transcriptional program and checkpoint recovery proteins, turns off the checkpoint and DNA repair proteins. Rectangles represent proteins or protein complexes, pointed arrows are positive regulatory interactions, and dashed lines with blunt arrows are negative regulatory interactions. Readers may refer to [38] for a more detailed description of the FA/BRCA pathway

of the DNA repair pathway (Fig. 2c). The response to short ICL exposure was simulated in both the *wild type* (Fig. 2b) and FAcore mutant (Fig. 2d) with the ICL value ON only at the starting time step; whereas a continuous exposure to DNA damage was simulated fixing the ICL value to 1 during the entire simulation. We performed exhaustive searches of all possible trajectories and attractors in the system.

### Implementation

The current FA/BRCA network is available through the supplementary file *FAnetwork.r* this file has been tested using R (v3.1.1) package BoolNet (v1.63) [66]. Additionally, the SBML-qual implementation of the model obtained by using the **toSBML()** function of BoolNet is provided as the supplementary file *FAnetwork.sbml*. The generated file was validated using the online service at <http://sbml.org/Facilities/Validator/>.

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

RULES	REFERENCES
$ICL \leftarrow ICL \wedge \neg DSB$	[38]
$FAcore \leftarrow ICL \wedge (ATR \vee ATM) \wedge \neg CHKREC$	[14, 16, 44–46]
$FANCD2I \leftarrow FAcore \wedge ((ATR \vee ATM) \vee ((ATR \vee ATM) \wedge DSB)) \wedge \neg (CHKREC)$	[47–49]
$NUC1 \leftarrow ICL \wedge FANCD2I$	[50]; [38]
$NUC2 \leftarrow (ICL \wedge (ATR \vee ATM) \wedge \neg (FAcore \wedge FANCD2I)) \vee (ICL \wedge NUC1 \wedge p53 \wedge \neg (FAcore \wedge FANCD2I))$	[51]; [38]
$ADD \leftarrow (NUC1 \vee NUC2 \vee (NUC1 \wedge NUC2)) \wedge \neg (TLS)$	[47, 50, 51]
$DSB \leftarrow (NUC1 \vee NUC2) \wedge \neg (NHEJ \vee FAHRR \vee HRR2)$	[50, 52]
$TLS \leftarrow (ADD \vee (ADD \wedge FAcore)) \wedge \neg (CHKREC)$	[53, 54]
$FAHRR \leftarrow DSB \wedge FANCD2I \wedge \neg (NHEJ \wedge CHKREC)$	[53, 54]
$HRR2 \leftarrow (DSB \wedge NUC2 \wedge NHEJ \wedge ICL \wedge \neg (FAHRR \vee CHKREC)) \vee (DSB \wedge NUC2 \wedge TLS \wedge \neg (NHEJ \vee FAHRR \vee CHKREC))$	[38]
$NHEJ \leftarrow (DSB \wedge NUC2 \wedge \neg (FAHRR \vee HRR2 \vee CHKREC))$	[49, 52, 55–57]
$ATR \leftarrow (ICL \vee ATM) \wedge \neg CHKREC$	[58–60]
$ATM \leftarrow (ATR \vee DSB) \wedge \neg CHKREC \vee FAcore$	[61, 62]
$P53 \leftarrow ((ATR \vee ATM) \vee NHEJ) \wedge \neg CHKREC$	[58, 63, 64]
$CHKREC \leftarrow ((TLS \vee NHEJ \vee FAHRR \vee HRR2) \wedge \neg DSB) \vee ((\neg ADD) \wedge (\neg ICL) \wedge (\neg DSB) \wedge \neg (CHKREC))$	[52, 53]; [38, 65]

Key references are included. Full discussion of interactions can be found in [38]

**Table 2** Network model simplification criteria

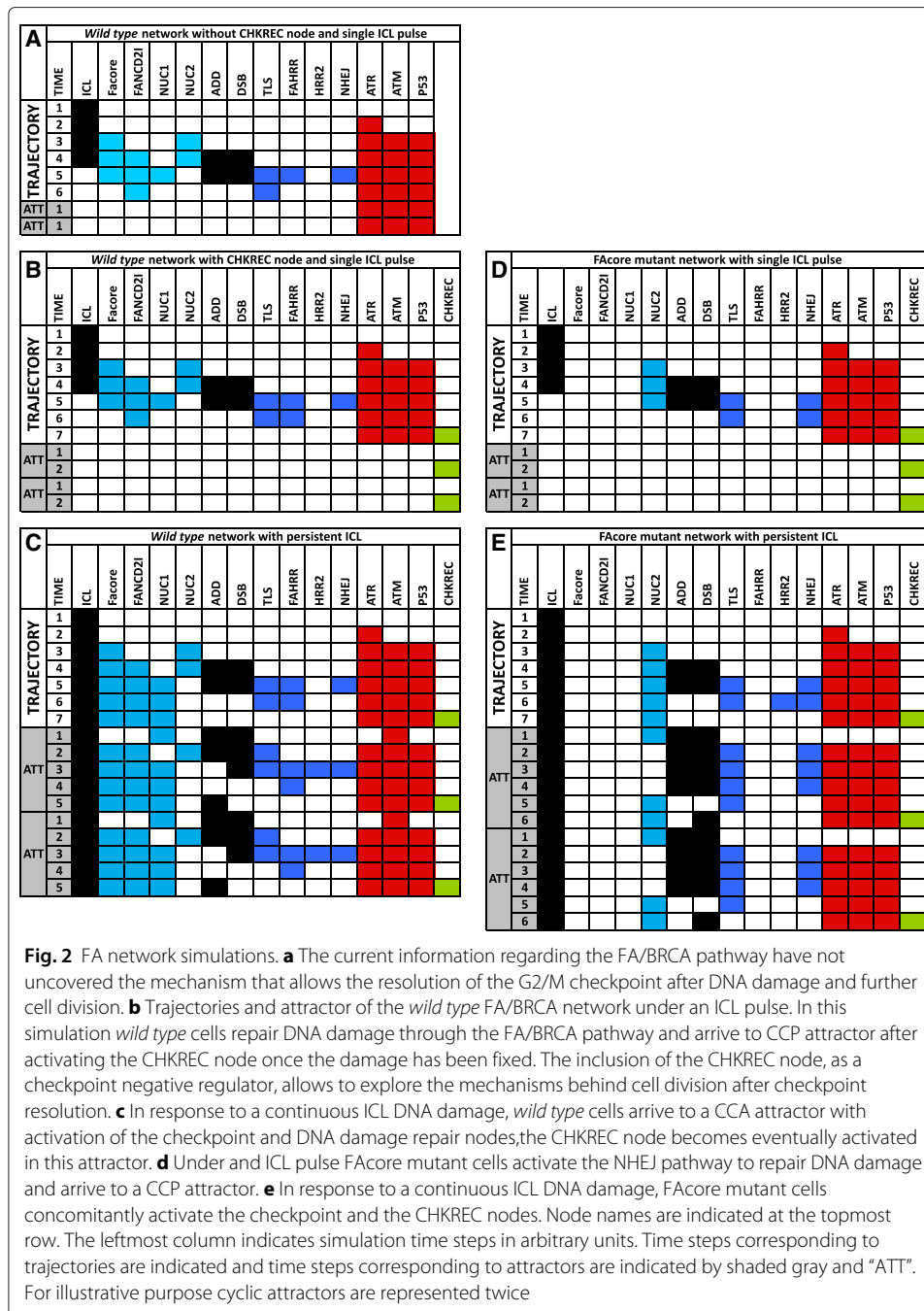
Node in the original BNM	Nodes in the simplified BNM	Simplification criteria
ICL	ICL	Unchanged node
FANCM, FAcORE	FAcore	ICL recognition proteins working together in the upstream FA/BRCA pathway
FANCD2I	FANCD2I	Unchanged node
MUS81	NUC1	Nuclease mediated ICL incision
XPF, FAN1	NUC2	Nuclease mediated ICL incision
ADD	ADD	Unchanged node
DSB	DSB	Unchanged node
ATR, CHK1, H2AX	ATR	These proteins act in the Checkpoint pathway
ATM, CHK2, H2AX	ATM	These proteins act in the Checkpoint pathway
p53	p53	Unchanged node
PCNATLS	TLS	This is only a change in name
FANCD1N, MRN, BRCA1, FANCD1N, RAD51, HRR, ssDNARPA	FAHRR	These proteins act in the Homologous Recombination Repair pathway
—	HRR2	New node representing the alternative Homologous Recombination Repair Pathway
KU, DNAPK, NHEJ	NHEJ	These proteins act in the Non-Homologous End-Joining DNA repair pathway
USP1, CHKREC	CHKREC	Global negative regulators of the FA/BRCA pathway

### Cell culture and treatments

Lymphoblastoid cell lines from FA-A VU817 (kindly donated by Dr. Hans Joenje, VU University Medical Center) and normal NL-49 (generated in our institution under written informed consent) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal calf serum, 1 % non-essential aminoacids and 1 % sodium pyruvate (all from GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA). During experiments 300,000 cell/ml were exposed to 10 ng/ml of MMC (Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA) for 24 h and harvested to evaluate different markers. All the experiments were run by triplicate.

### Chromosome aberration and nuclear division index analysis

For chromosome aberration analysis, colchicine (Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA) (final concentration of 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to cell cultures one hour before harvesting with the conventional method. Twenty five metaphases per experimental condition were scored by recording the number of chromatid breaks, chromosome breaks and radial figures. A cytokinesis block assay, using 3  $\mu\text{g/ml}$  of cytochalasin B (Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA), was implemented to obtain binucleated and tetranucleated cells: after exposing the cells to MMC for 24 h, they were washed, reincubated with fresh



cytochalasin B for another 24 h and harvested using a 7:1 methanol:acetic acid fixative. Five hundred cells were scored to quantify the number of micronuclei, mononucleated, binucleated and tetranucleated cells in every experimental condition [67].

### Flow cytometry analysis

To determine cell cycle distribution and mitotic index the cells were fixed with 70 % ice-cold ethanol, washed twice with PBS (GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA) and permeabilized with 0.1 % PBS 1X + Triton X100. The MPM2 antibody (CellSignaling,

Boston MA, USA) was used to determine the number of cells in M phase. The antibody was marked with the labeling anti-mouse Alexa-Fluor 488 fluorophore from the Zenon Tricolor Mouse IgG Labeling Kit # 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer instructions. The cells were incubated during 1 h with the antibody, washed with PBS/NGS 10 % and counterstained with propidium iodide (Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, USA). A total of 20,000 events were scored in a FACScan (Beckton Dickinson, Ontario, CA) cytometer and the analysis was performed using the CellQuest program version 3.2.1.

#### **RNA extraction and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

Total RNA was obtained employing the combined method of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by RNeasy mini procedure (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to manufacturer instructions. Before retro-transcription, 1  $\mu$ g of total RNA was treated with 0.1 U RNase-free DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, and 1 mM MgCl<sub>2</sub> for 15 min at room temperature. The enzyme was inactivated by adding EDTA to a final concentration of 1 mM followed by incubation at 65°C/10 min. Total RNA was retro-transcribed into cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) using anchored-oligo (dT) 18 primer (50-pmol/ $\mu$ L) and Random hexamer primer (600 pmol/ $\mu$ L), protector RNase Inhibitor (20 U), and Transcriptor Reverse Transcriptase (10 U). Total RNA and cDNA were quantified using a Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Real-time quantitative-PCR (qRT-PCR) was performed by duplicate for each cell line, treatment and biological repeat using 2  $\mu$ g of cDNA per reaction with the Universal Probes system (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) and the Light Cycler Taq Man Master kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). 7SL (NR\_002715.1),  $\beta$ 2 microglobulin (NM\_004048.2) and  $\beta$ -actin (NM\_001017992.3) gene expression were used as reference. Primers for each gene were designed on-line with the ProbeFinder Software (<http://www.universalprobelibrary.com>) and manufactured by the Sequencing and Synthesis Unit (IBT, UNAM). The qRT -PCR was carried out in a Light Cycler 2.0 Carousel Roche equipment.

#### **Protein extraction and immunoblot**

Cells were harvested in TLB lysis buffer supplemented with the Complete C protease and phosphatase inhibitors mix (Roche, Mannheim, Germany). Quantification was made with Bradford ready to use reagent (Biorad, Hercules, CA). Total cell protein (10 $\mu$ g) was separated by 12 % SDS- PAGE, transferred to nitrocellulose membrane (Biorad, Hercules, CA) and incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation with goat-anti-mouse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or goat-anti-rabbit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) HRP tagged secondary antibodies. Bands were visualized with Lumigen on Amersham Hyperfilm (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA). Primary antibodies used are listed below: anti-WEE1 (NP\_001137448.1) (Abcam, Cambridge, UK), anti-WIP1 (NP\_003611.1) (Abcam, Cambridge, UK), anti-pCHK1 Ser345 (Cell Signaling, Boston MA, USA), anti- $\gamma$ H2AX (Genetex, Irvine, CA), anti-p21 (NP\_000380.1) (Genetex, Irvine, CA), anti-MYT1 (NP\_004526.1) (Genetex, Irvine, CA), anti-Aurora A (NP\_003591.2) (Abcam, Cambridge, UK), anti-CDC25B (NP\_001274445.1) (Genetex, Irvine, CA) and

anti-PLK1 (NP\_005021.2) (Abcam, Cambridge, UK); anti-GAPDH (NP\_001243728.1) was used as loading control (Genetex, Irvine, CA).

### Statistical analysis

Experimental groups were compared using two way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. A difference was considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### FA/BRCA network analyses show that CHKREC promotes cell division in FA mutants with DNA damage

Appropriate function of the FA/BRCA pathway guarantees the complete repair of ICLs and correct checkpoint activation impedes cell division upon DNA damage detection [68]. Therefore an accurate model of the FA/BRCA pathway should show cell division after complete DNA damage repair in *wild-type* cells. In our previous work [38], we demonstrated that the inclusion of the CHKREC node is crucial to reproduce correctly the DNA repair behavior. Without CHKREC, as a negative regulator of the checkpoint nodes, the network remains in a permanent arrest after DNA repair (Fig. 2a). Hence, CHKREC provides a mechanism that allows the cell to resolve the checkpoint (Fig. 2b).

We performed synchronous and asynchronous simulations with the updated and simplified version of the FA/BRCA network and observed that the simplified model is able to reproduce all the previously reported results (Fig. 2b and data not shown). Only synchronous simulations are shown given that asynchronous update results in complex trajectories, while preserving the attractors of the original model [38]. Hence, we decided to use our new version of the network model to deeply study the role of CHKREC in the abnormal behavior of FA cells.

Ninety percent of FA patients carry mutations in one of the components of the FA core complex, including FANCA (NP\_000126.2), FANCB (NP\_001018123.1), FANCC (NP\_000127.2), FANCE (NP\_068741.1), FANCF (NP\_073562.1), FANCG (NP\_004620.1), FANCL (NP\_001108108.1) and FANCM (NP\_001295063.1) [21]. Hence, to study the role of CHKREC in FA cells, we simulated the FA core complex mutant, represented in our model by the FA core node, and compared its dynamic behavior to a *wild type* network.

Our simulations recapitulate two cellular behaviors relevant to DNA damage that are represented by two specific attractors. We denominated them as the cell cycle progression attractor (CCP), and the cell cycle arrest attractor (CCA). The CCP attractor is characterized by the CHKREC-mediated inactivation of every checkpoint node, namely ATM, ATR and p53, followed by CHKREC oscillations. It has been experimentally proven that CHKREC is required for the activation of the genes and proteins that release the G2/M checkpoint to allow cell cycle progression [39, 41–43]. Hence, the cyclic behavior of the CHKREC node in the CCP attractor represents the periodical transition into the cell cycle, and should ideally be reached when DNA damage has been repaired. In our simulations both *wild type* and FA core mutant reach the CCP attractor after an ICL pulse of damage (Fig. 2b,d).

On the other hand, CCA is a cyclic attractor that represents a checkpoint mediated cell cycle arrest that is reached when DNA damage persists and the cell is engaged in a DNA repair process. Once the system has reached CCA there is recurrent activation of the DNA damage repair and the checkpoint nodes, accompanied by CHKREC node

activation, thus CHKREC activation might occur during an ongoing CCA but the cell would not divide unless the checkpoint nodes are turned off, which in turn would not occur until the DNA damage has been completely removed. Although more than one combination of node activation patterns can be interpreted as a CCA attractor, all such patterns share the activation of the DNA damage and the checkpoint nodes followed by activation of CHKREC.

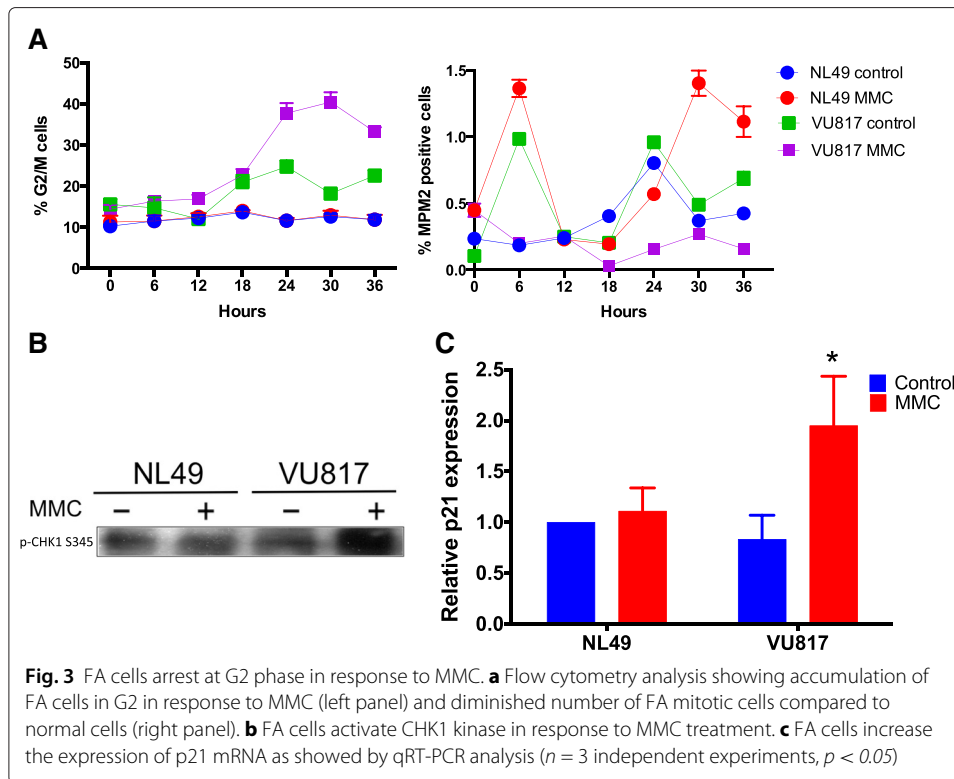
In our simulations with a constant ICL damage the *wild type* (Fig. 2c) and FA core mutant (Fig. 2e) networks reach a CCA attractor with checkpoint and CHKREC activation. In the *wild-type* simulation we observe that the checkpoint components are never completely down-regulated in presence of DSBs or during the ICL stimulus, however the FA core mutants have a transient state in which DSBs are activated and the checkpoint components are inactivated, as a response to CHKREC activation in the previous step. This result suggests that FA cells might overcome, through CHKREC activation, the cell cycle arrest despite unrepaired DNA damage.

Our modeling approach has advanced many interesting predictions about the effect of FA mutations during the DNA repair process. In the next section we focused on the one that we considered more general and important. Namely, that CHKREC inhibition over the checkpoint components might allow the division of FA cells even if DNA has not been completely repaired. Hence, we verified if CHKREC activation might occur in FA cells after DNA damage induction allowing their eventual cell division, even in the presence of unrepaired DNA damage.

#### **CHKREC components are activated in FA cells with unrepaired DNA damage**

Cells should divide only after successful and thorough DNA repair [68, 69], which is achieved through efficient DNA repair and accurate G2/M checkpoint activation. FA core mutants are DNA repair deficient but G2/M checkpoint proficient, therefore the fact that they are able to divide despite a strong G2/M checkpoint activation and carrying unrepaired DNA damage is remarkable. Our BNM anticipates that turning off a DNA damage-induced G2/M checkpoint might occur through CHKREC activation, thus allowing cell division. We verified this prediction by following the transit through G2 and M phases in the presence of DNA damage in *wild type* (NL49) and FA-A (VU817) cell lines exposed to MMC.

First, we evaluated checkpoint activation using several markers. Using PI cell cycle flow cytometry analysis we observed that treatment with MMC induces an over time increase in the number of FA-A cells arrested in G2 when compared to normal cells (Fig. 3a, left panel), as well as a reduction in the number of mitotic cells (MPM2+ cells in Fig. 3a, right panel), accompanied by a lag of approximately 6–12 hours in the peak of MPM2+ cells in both MMC-treated FA and normal cells, compared to their respective untreated controls (see 24 and 30 hrs of MMC treatment). However normal MMC treated cells have the highest peak as they deliver a bigger number of cells into M phase. This lag might indicate that, while repairing the MMC-induced DNA damage, the cells postpone the resolution of the G2 checkpoint. This arrest is shorter in normal cells given that they repair in a more efficient way thus having a more prominent contribution to the mitotic index when compared to FA cells. The highest percentage of MPM2+ cells of MMC treated normal cells might indicate a sharp delivery of previously G2 arrested cells, contrary to a smooth delivery of untreated normal cells.



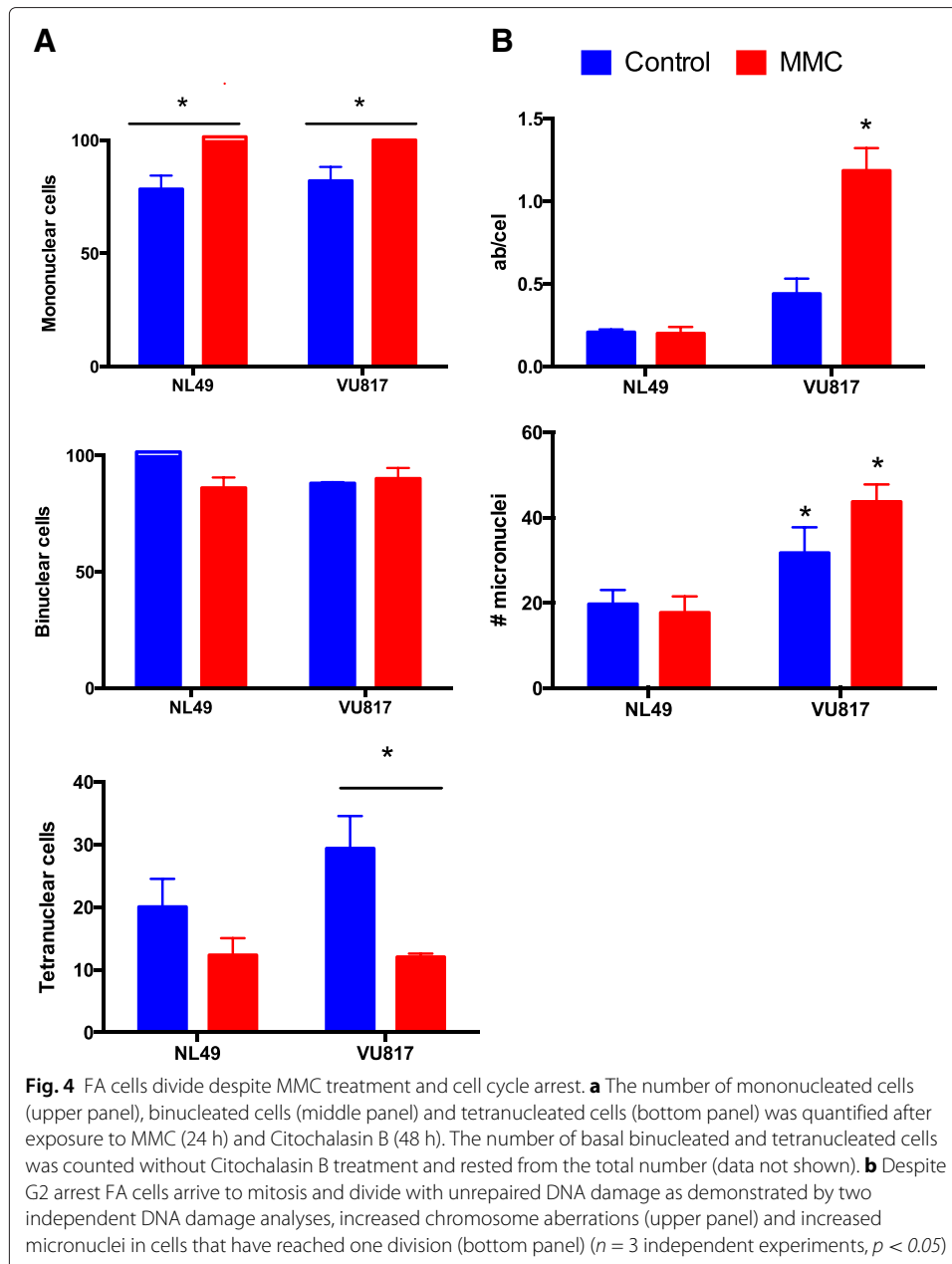
**Fig. 3** FA cells arrest at G2 phase in response to MMC. **a** Flow cytometry analysis showing accumulation of FA cells in G2 in response to MMC (left panel) and diminished number of FA mitotic cells compared to normal cells (right panel). **b** FA cells activate CHK1 kinase in response to MMC treatment. **c** FA cells increase the expression of p21 mRNA as showed by qRT-PCR analysis ( $n = 3$  independent experiments,  $p < 0.05$ )

In FA-A cells treated with MMC we also observed increased CHK1 phosphorylation (Fig. 3b), a classical checkpoint activation marker, along with increased p21 mRNA expression (Fig. 3c). p21 is the main p53 target and is an important player for cell cycle arrest. The expression of this gene shows that the cell is committed to cell cycle arrest and its continuous expression is necessary to prevent cell division in cells that carry unrepaired chromosomes [68, 69]. These experiments show that FA-A cells are able to activate mechanisms that halt cell cycle progression at the G2 phase upon DNA damage induction.

We then evaluated if FA-A and normal cells were able to divide despite unrepaired DNA damage. We quantified the cell division capacity after MMC treatment by performing a cytokinesis block assay with cytochalasin B (CB). Meanwhile, the DNA damage was evaluated by recording the frequency of micronuclei in multinucleated cells and the frequency of CAs in metaphase spreads.

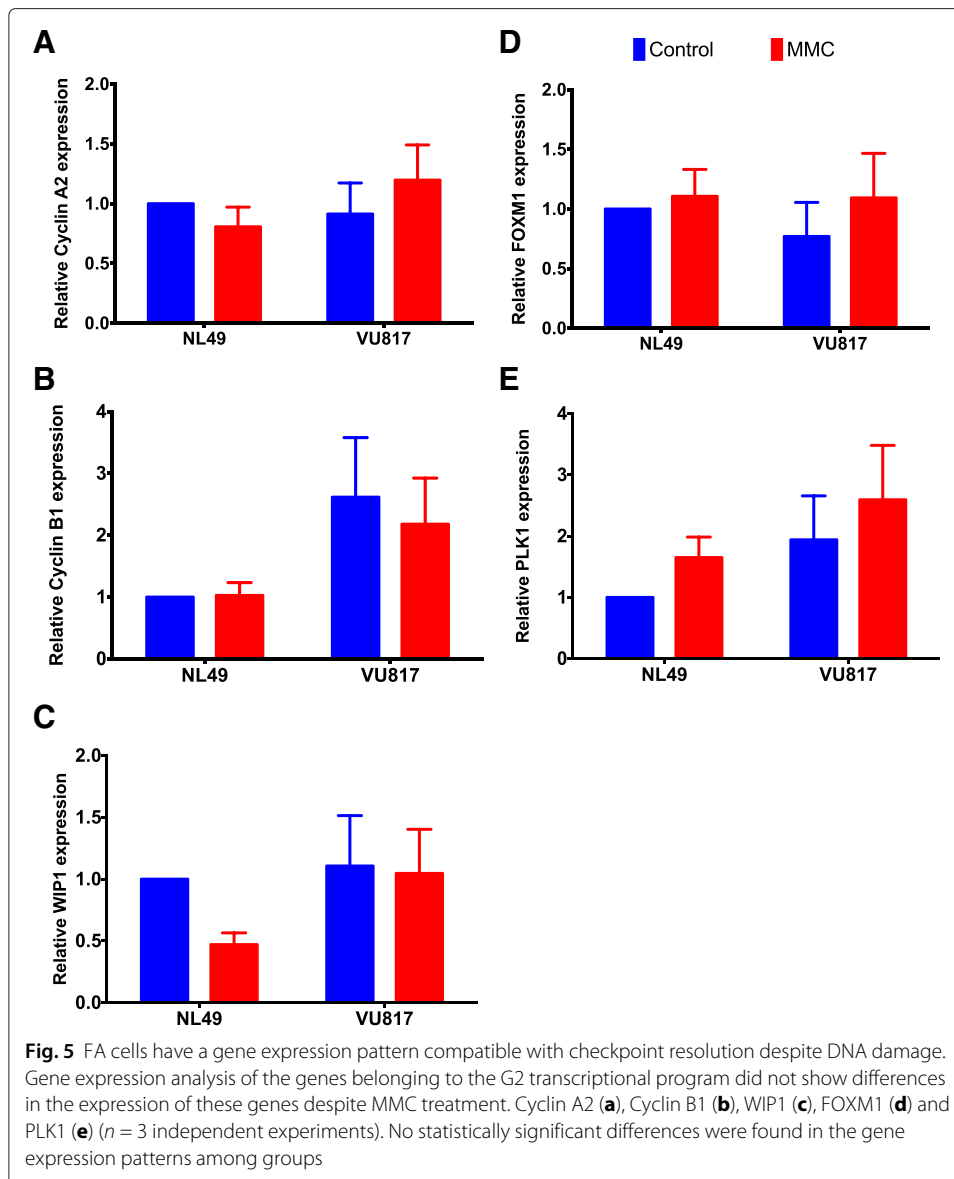
CB experiments showed that treatment with MMC increased the proportion of mononucleated cells (cells that still do not divide due to G2 halt) (Fig. 4a upper panel), while the number of binucleated cells irrespective of the cell type (NL49 or VU817) or the addition or not of MMC remained the same (Fig. 4a middle panel). Remarkably, MMC treatment reduced significantly the number of tetranucleated FA cells (Fig. 4a bottom panel). On the other hand, the analysis of metaphase spreads showed that FA-A cells reached mitosis with a significantly higher frequency of CAs (Fig. 4b upper panel) than normal cells, and were able to divide despite unrepaired DNA damage, i.e. micronuclei (Fig. 4b bottom panel). These experiments show that FA-A cells first arrest in response to DNA damage but eventually reach cell division regardless of CA.

As suggested by our model, CHKREC activation could be relieving cell cycle arrest mediators, leading the cell to divide. To determine if the CHKREC components became



active in MMC treated FA cells, thus allowing their eventual division, we evaluated some molecular markers relevant for CHKREC and cell division. We analyzed by qRT-PCR the expression of the G2 transcriptional program, whose protein products are necessary for the G2/M transition; namely, Cyclin A2 (*CCNA2*, NM\_001237.3), Cyclin B1 (*CCNB1*, NM\_031966.3), WIP1 (*PPM1D*, NM\_003620.3), *FOXM1* (NM\_001243088.1) and *PLK1* (NM\_005030.4) [16, 27, 70]. Our results show that the expression levels of these genes remain unaffected in FA-A cells, compared to wild type cells (Fig. 5a–e). Importantly, these genes are expressed in a cell cycle-dependent manner and are necessary for G2 phase completion [43], thus if they remain unchanged after MMC treatment, suggests

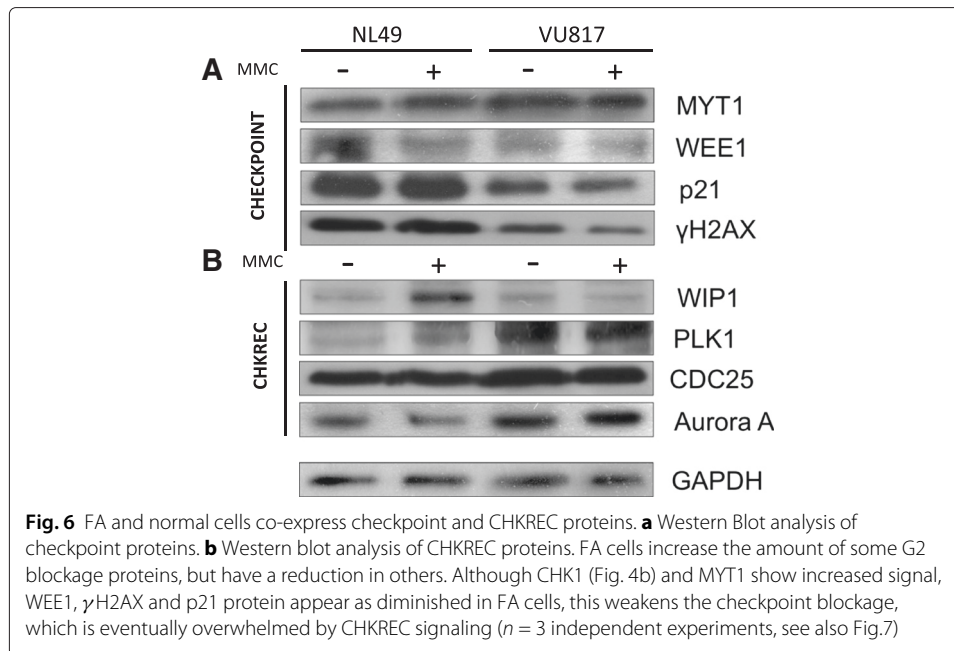




that this program remains poised for resolution of the G2 cell cycle blockage in FA cells, even with incomplete DNA repair.

Our BNM and these experimental results indicate that FA-A cells are able to block the cell cycle progression in G2 but eventually recover. Simulations with the BNM showed also that co-activation of G2 checkpoint and CHKREC components might occur in arrested FA cells, therefore, additional to CHK1, we evaluated other protein markers to assess key G2 checkpoint and CHKREC activation 24 h after MMC treatment. The G2 checkpoint markers included: WEE1, MYT1, p21 and  $\gamma$ H2AX; while CHKREC activation markers consisted of: WIP1, Aurora A, PLK1 and CDC25B.

We observed that CHK1 activity is increased after MMC treatment in FA-A cells (See Fig. 3b), but other checkpoint components, namely WEE1, p21 and  $\gamma$ H2AX (Fig. 6a), have reduced levels. Remarkably, we also observed concomitant activation of CHKREC proteins PLK1, CDC25B and Aurora A (Fig. 6b) in damaged FA cells. Thus indicating



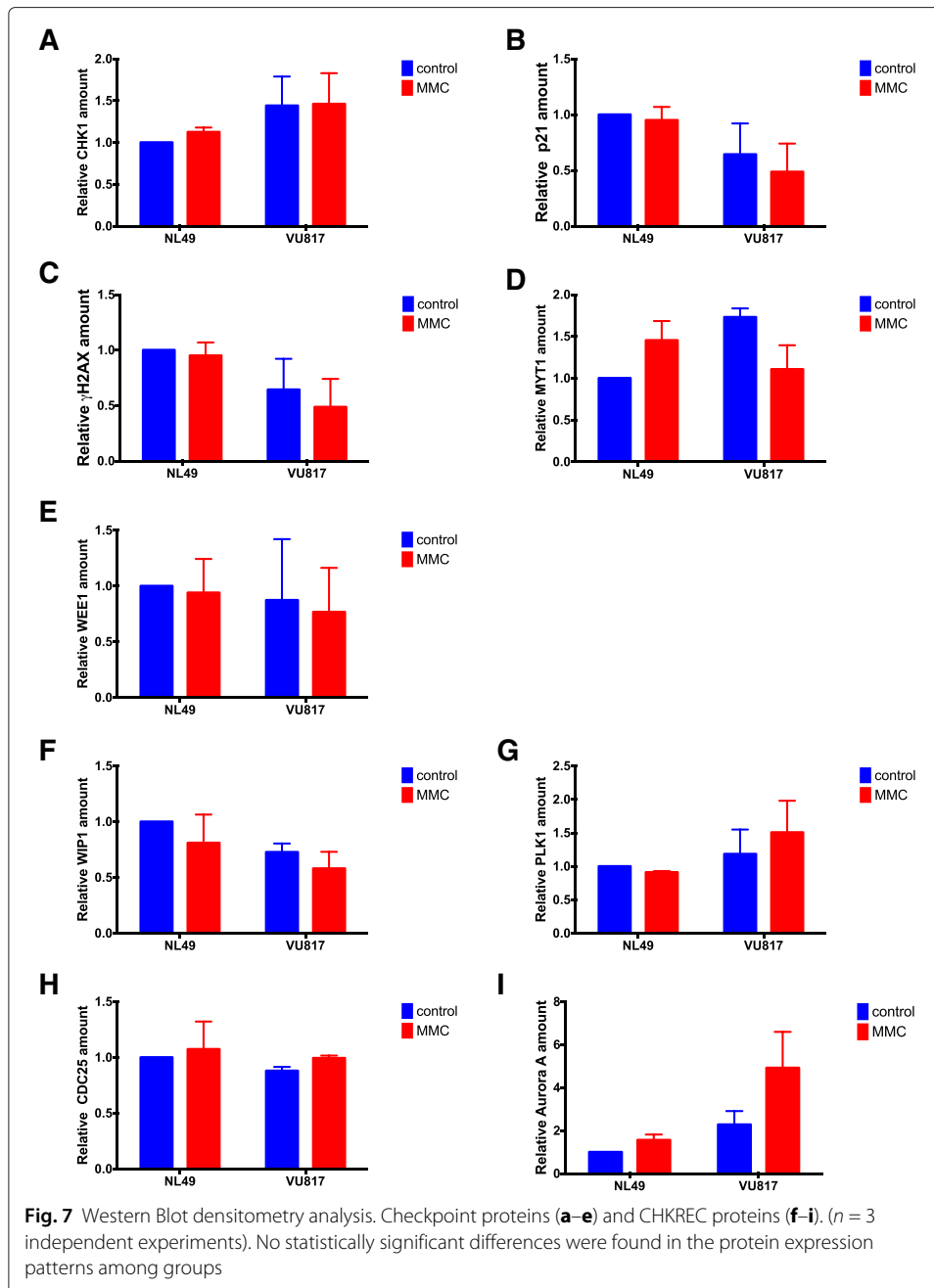
that despite a strong CHK1 signal that leads to cell cycle progression blockage, FA-A cells co-express the components that might dampen the DNA damage signaling and allow an eventual CHKREC despite an elevated amount of CA. In agreement, we observed in FA-A cells reduced levels of the histone  $\gamma$ H2AX, a DNA damage signaler and WIP1 phosphatase target. Notably, we also observed weakening of p21 protein signaling, which has also been correlated with CHKREC activation [71]. These results suggest that signaling of DSBs might be weakened at this time-point, triggering full CHKREC activation and cell division despite a strong CHK1 signaling and high levels of CAs (relative protein amount for all the markers can be seen in Fig. 7).

These experimental results show that the CHKREC is being activated in FA cells carrying CA to a similar extent as normal undamaged cells, this CHKREC induction might allow the escape of G2 with unrepaired DNA damage and cell division. The correlation between the nodes of the network and the experiments performed can be seen in Table 3.

## Discussion

Several methods are used to model and analyze biological systems [72–74]. These methods analyze the topology of the network or the kinetics of the system specifying the flux of information through a continuous model or a logical model [74].

Continuous models represent the temporal dynamics of biochemical processes with considerable detail, but are highly dependent on the values of free parameters (initial protein concentrations and rate constants), whose estimation might be challenging as networks get larger [73, 75]. Logical models rely on qualitative knowledge [72]. Logical BNM are the minimal computational model necessary to obtain a meaningful idea about the dynamics of a regulatory network and are useful when detailed enzymatic information is missing [75, 76]. Many molecular regulatory systems show binary behaviors or act like bistable switches [77], thus the binary or discrete representation of BNM can adjust to them and predict sequence patterns of proteins and gene activities with less



parameters than a continuous model. Although BNM have been used for modeling several systems [32–37], they might not be appropriate if the system has continuous values or if knowledge on the network architecture is lacking [75].

We have developed a binary BNM that recapitulates in a simple manner the response to ICLs mediated by the FA/BRCA pathway [78]. Given that the different components of the network might remain unchanged, up-regulated or down-regulated instead of binary, an additional representation of the FA/BRCA network as a discrete ternary logical network might be also feasible [79], however a binary BNM resulted optimal given that our system presents gene expression showing a pattern of binary states (over-expressed,

**Table 3** Correlation between experimental validations and nodes in the FA/BRCA BNM

Process	Nodes in the FA/BRCA BNM	Experimental markers used in this study	Validated role in the BNM	References
DNA damage induction	ICL	MMC	FA cells are hypersensitive to ICL inducing agents	[21, 25, 26]
Upstream FA/BRCA pathway	FAcore FANCD21 NUC1 NUC2	Non-evaluated	ICL recognition proteins	[14, 16, 17]
DNA repair intermediaries	ADD DSB	$\gamma$ H2AX, CA in metaphase spreads	ICLs are unhooked by FA core-recruited DNA-endonucleases that generate a DSB and an ADD	[13, 21]
Downstream FA/BRCA pathway	TLS FAHRR	Non-evaluated	The ADD and DSB are repaired by TLS and FA-dependent downstream homologous recombination repair, respectively. FA cells accumulate DSBs	[14, 15, 18, 54]
Alternative DNA repair pathways	HRR2 NHEJ	Non-evaluated	FA cells use alternative DNA repair pathways, mainly NHEJ HRR2 is a criptic repair choice	[49, 56]
Checkpoint	ATR ATM p53	Cell cycle arrest in G2, pCHK1-S341, p21 gene expression, MYT1, WEE1, p21 proteins	Upon DNA damage normal and FA cells activate the G2/M checkpoint	[27, 28, 31]
Checkpoint recovery	CHKREC	MPM2 mitotic index, cytokinesis block assay, G2/M transcriptional program, WIP1, PLK1, CDC25, Aurora A proteins	The checkpoint is inactivated by CHKREC after DNA repair FA cells seem to have a lower threshold for CHKREC activation compared to normal cells	[83, 84] and this work

under-expressed) or protein concentrations that can reach a saturation regime (full activation) or remain in small concentrations (inactive). In addition the change to a ternary system would increase the possible states of the system from 32,768 to 14,348,907 states, thus augmenting the computational work.

Our modeling of the FA/BRCA regulatory network has led to the observation that CHKREC is a mechanism conferring stability to this system in *wild type* and FA cells ([38] and this work). CHKREC is fully activated once the G2/M checkpoint has been satisfied

leading to the division of the cell [42]. CHKREC is mainly composed of phosphatases, such as WIP1, that inactivate the G2 checkpoint and protein-kinases that release the cell cycle blockage, such as Aurora A and PLK1 [41, 80]. Notably, the negative circuits mediated by CHKREC seem to be a central part of the control system of the FA/BRCA network: they are activated when the system induces the expression of its own inhibitors, and are necessary to attenuate the stimulatory signals arising from DNA damage (Fig. 1 and Fig. 2).

When simulating mutants, we noticed that CHKREC function inactivates the checkpoint in FA core mutants despite unrepaired DNA damage, thus resolving the G2/M checkpoint arrest and allowing cell division. Therefore we should notice elevated/unchanged levels in the expression, quantity or activity of CHKREC components in FA cells with damaged DNA compared to undamaged normal cells, indicating that FA cells conserve checkpoint resolution capacity and are poised for cell division when the DNA damage checkpoint response ceases. To test the function of the CHKREC node, we experimentally evaluated the cell division capacity as well as checkpoint/CHKREC activation in FA-A lymphoblasts after induction of DNA damage with MMC.

We evaluated the G2 blockage and found accumulation of FA-A cells into the G2 phase compartment after induction of DNA damage (Fig. 3a left panel) and a reduced number of FA-A mitotic cells in comparison to normal cells after MMC exposition (Fig. 3a right panel). We also detected high CHK1 phosphorylation levels (Fig. 3b) as well as high p21 gene expression (Fig. 3c) in FA-A cells. CHK1 is a key protein kinase that transduces the DNA damage signaling, and p21 is a direct p53 transcription target, therefore an increase in p21 activation is the result of p53-increased activity, thus demonstrating that FA cells achieve a correct activation of the checkpoint that blocks the G2/M transition [27, 28]. p21 is a negative regulator of Cyclin B/CDK1 complex and is necessary to avoid the G2/M transition in presence of DNA damage [81]. Thus, CHK1 phosphorylation and p21 expression augment when a cell is exposed to DNA damaging agents and would be expected to drop-off once a cell has repaired the DNA damage [82].

When we evaluated the cell division capacity in a CB block assay, we did not observe differences in the frequency of binucleated cells between normal and FA-A cells (Fig. 4 middle panel), although MMC limited tetranucleated cells production in both cell types (Fig. 4c bottom panel). These results show that, under these experimental conditions, both FA-A and normal cells divide to a similar extent after induction of DNA damage by MMC.

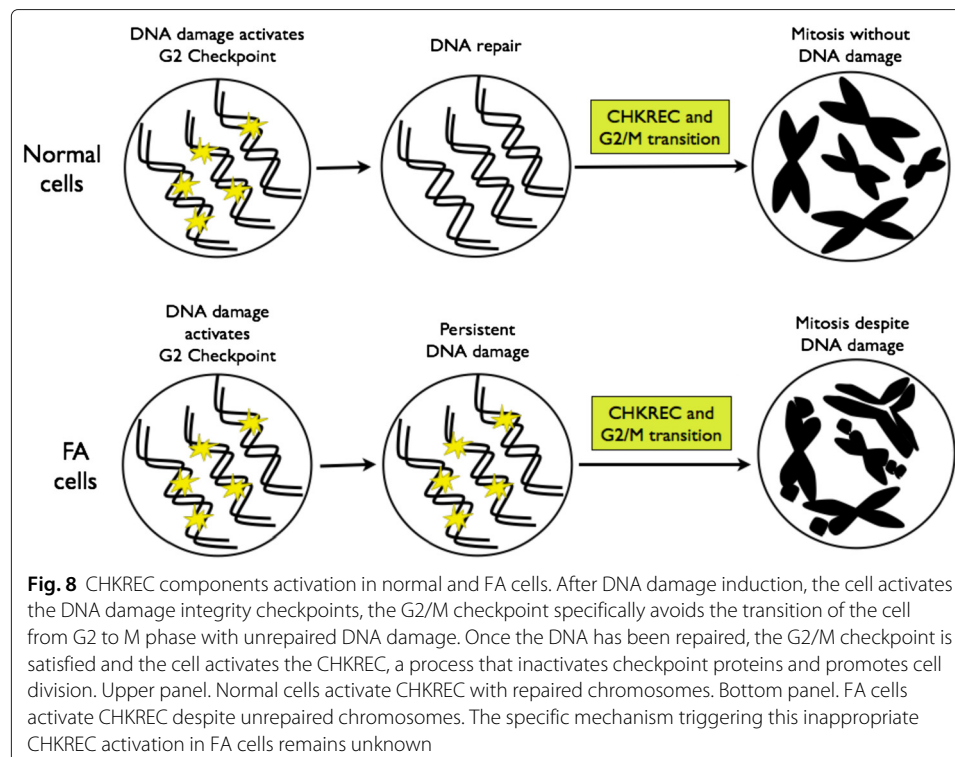
The capability of FA cells to divide with unrepaired DNA damage was evaluated by quantifying the frequency of DNA damage induced by MMC in cells committed to divide by scoring CAs in metaphase spreads, as well as in cells that have already performed cell division by quantifying the micronuclei observed in binucleated and tetranucleated cells. Our results showed, in both assays, that FA-A cells exposed to MMC carry significant DNA damage during mitosis and, nonetheless divide (Fig. 4b).

Our BNM allowed us to propose that CHKREC function in FA cells might ignore in a certain level the presence of unrepaired DNA damage and could be responsible for their division, therefore we expected that normal and FA-A cells would have similar activation levels of the CHKREC components. To test this possibility, we measured the expression of the G2 transcriptional program genes that promote CDK activity and

progression into mitosis, namely *WIP1*, *Cyclin A2*, *Cyclin B1*, *PLK1*, *CDC25* and *FOXM1* [43] (Fig. 5a–e) and evaluated the activation of some of the proteins involved in checkpoint and CHKREC (Fig. 6). In the first assay we observed that the expression of the genes that enable CHKREC and cell division are similar in normal/undamaged cells and damaged FA cells, even when FA cells carry a higher number of CAs. In addition, we observed co-expression of checkpoint and CHKREC proteins in FA cells treated with MMC (Fig. 6 and 7), indicating that damaged FA cells are poised for an eventual cell division despite DNA damage (Fig. 8).

Checkpoint activation, cell cycle arrest and DNA repair require a great number of protein posttranslational modifications for their establishment. Dedicated enzymes that remove these modifications or degrade modified proteins allow checkpoint silencing and recovery [84]. WIP1 phosphatase and PLK1 kinase emerge as the coordinators of checkpoint silencing and recovery, respectively, however if there exist a certain order in their activation remains elusive. In general terms for cell division, Cyclin B levels must gradually increase, while CDC25 phosphatase should remove any inhibitory phosphorylation of CDK1, thus promoting Cyclin B/CDK1 complex formation and mitotic entry. However, after induction of DNA damage, the G2 checkpoint inhibits CDK1 activity through p21, whilst WEE1 and MYT1 kinases degrade CDC25, avoiding mitotic entry [42, 70, 80].

WIP1 phosphatase dephosphorylates ATM, p53, CHK1, CHK2,  $\gamma$ H2AX and the p(S/T)Q motif originally modified by ATM and ATR [85, 86]. During CHKREC, Aurora-A kinase activates PLK1, which in turn targets WEE1 for proteasomal degradation and releases CDK1 from blockage [42, 87–89], in addition PLK1 interferes with CHK1, CHK2 and p53 stability, thus it also has an active role turning-off the DNA damage checkpoint [40].



In Fig. 6b we observe that the concentration of WIP1 is increased in normal cells and reduced in FA cells; on the contrary PLK1 is reduced in normal cell and increased in FA cells. Interestingly, PLK1 activity is redundant in unperturbed mitotic entry whereas it becomes essential in CHKREC after DNA damage [88, 89], consistently it is activated in our experiments in damaged FA-A cells. As FA cells carry spontaneous unrepaired DNA damage, this implies that their transition through G2 is always perturbed to a certain extent, thus PLK1 should become essential for FA cells survival. Given this, PLK1 over-activation must be involved in the adaptation of FA cells to DNA damage. Recent evidence shows that PLK1 activity is gradually increased during an ongoing DNA damage-induced cell cycle arrest and if the activity of the kinase exceeds beyond a certain level, the cell progresses to mitosis despite DNA damage persistence [83]. G2 checkpoint recovery might thus represent a checkpoint adaptation, where DNA damage triggers an arrest whose duration is not necessarily conditioned by DNA repair [84]. Regarding this, PLK1 might have a more critical role than WIP1 in the delivery of FA cells with unrepaired DNA damage from the G2 arrest, or WIP1 is acting before than the time-point that we are evaluating in this assays, hence we are not able to detect WIP1 protein (Fig. 6b). The distinction between both possible scenarios deserves further research.

A final aspect to be considered are the findings of Ceccaldi and coworkers [31], who described an attenuated G2/M checkpoint activity in adult FA individuals that, concomitantly to low CHK1 and p53 protein levels, allowed the escape of unrepaired DNA damage. Although they demonstrate that downregulation of the ATR-CHK1 axis is responsible for this phenotype, it remains elusive if this reduced checkpoint activity might be due to CHKREC over-activation or ectopic activity. In this study we set the basis to explore this possibility in FA individuals with an attenuated G2/M checkpoint and the general mechanism allowing G2/M resolution in non-attenuated FA individuals. Further, modeling the full interaction between the G2/M checkpoint and CHKREC, as well as a systematic inhibition of CHKREC components in FA cells, will shed light into the intricate interactions between these two processes.

Our results show that highly damaged FA-A cells preserve the capacity to divide after a cell cycle arrest induced by DNA damage, a result that is consistent with our BNM FA core null mutant simulations. Nonetheless, the definition of the specific trigger for cell division remains unknown. To our judgment, the CHKREC hypothesis became the most relevant hypothesis emerging from our BNM given that CHKREC promotion might enable cell survival and amelioration of blood cell counts in pancytopenic FA patients, however CHKREC overexpression might also lead to exhaustion of the hematopoietic stem cell compartment as well as selection of malignant clones. Therefore, the thorough study of this process becomes relevant for the understanding of hematopoiesis and carcinogenesis in a FA background.

## Conclusion

In this study we propose through network modeling that CHKREC, a program necessary for cell division after DNA damage, becomes activated in FA core mutant cells with unrepaired DNA damage. We experimentally show that highly damaged FA-A cells have CHKREC expression levels similar to those observed in normal undamaged cells, thus FA-A cells might ignore the presence of broken chromosomes through this process. We

observed that despite a prominent G2 arrest after MMC exposure, FA cells were able to activate the mechanisms that allow cell division (Fig. 8).

FA cells are prone to apoptosis due to their DNA repair defects, however a great quantity of them divide in spite of unrepaired DNA damage, thus allowing the survival of FA individuals. The study of the mechanisms that allow FA cells to survive may help to develop novel therapies designed to promote hematopoiesis, as well as to avoid the division of malignant clones in FA patients.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

AR, LM and SF conceived the project; AR, DS and EA developed the BNM; AR, LT, UJ, DS, BGT, EC and AMS performed experiments; RO and POW provided essential reagents; LM coordinated computational work; SF coordinated laboratory work. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

Authors thank our colleagues at Dr. Frías' laboratory for insightful discussions and Anet Rivera Osorio for invaluable assistance with experiments. This work was supported in part by grants from Universidad Nacional Autónoma de México PAPIIT IN200514 and IA201713, and Instituto Nacional de Pediatría-SSA, Fondos Federales 043-12. AR received the 346717 scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). We thank S Becerra and J Yañez from IBT UNAM for primer synthesis.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratorio de Citogenética, Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, D.F., México. <sup>2</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México. <sup>3</sup>Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México. <sup>4</sup>CC3, Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México. <sup>5</sup>Current address: INRIA, Virtual Plants Project Team, UMR AGAP, Montpellier, France. <sup>6</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, D.F., México. <sup>7</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.

Received: 26 May 2015 Accepted: 12 August 2015

Published online: 18 September 2015

#### References

- Surrallés J, Jackson SP, Jasin M, Kastan MB, West SC, Joenje H. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev.* 2004;18(12):1359–70.
- Aurias A, Antoine JL, Assathiany R, Odievre M, Dutrillaux B. Radiation sensitivity of bloom's syndrome lymphocytes during S and G 2 phases. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985;16(2):131–6.
- Krepinsky AB, Heddle JA, German J. Sensitivity of Bloom's syndrome lymphocytes to ethyl methanesulfonate. *Hum Genet.* 1979;50(2):151–6.
- Taylor AMR. Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 1978;50(3):407–18.
- German J, Reginald A, David B. Chromosomal breakage in a rare and probably genetically determined syndrome of man. *Science.* 1965;148.3669:506–7.
- German J, Sanz MM, Ciocci S, Ye TZ, Ellis NA. Syndrome causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. *Hum Mutat.* 2007;28(8):743–53.
- Chaganti RSK, Schonberg S, German J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1974;71(11):4508–12.
- Tadjoedin MK, Fraser FC. Heredity of ataxia-telangiectasia (Louis-Bar syndrome). *Am J Dis Child.* 1965;110(1):64–8.
- Concannon P, Gatti RA. Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* 1997;10(2):100.
- Kojis TL, Gatti RA, Sparkes, RS. The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1991;56(2):143–156.
- Oxford JM, Harnden DG, Parrington JM, Delhanty JD. Specific chromosome aberrations in ataxia telangiectasia. *J Med Genet.* 1975;12(3):251–62.
- Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892–1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):893–8.
- de Winter J, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res.* 2009;668:11–9.
- Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* 2010;24:1680–94.
- Vaz F, Hanenberg H, Schuster B. Mutation of the RAD51C gene in a fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet.* 2010;42:406–9.
- Kim Y, Lach F, Desetty R, et al. Mutations of the SLX4 gene in fanconi anemia. *Nat Genet.* 2011;43:142–6.
- Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 2013;92:800–6.



18. Greenberg RA, Sawyer SL, Tian L, et al. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer discov.* 2014;CD-14.
19. Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraiishi Y, Chiba K, et al. Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia. *Am J Hum Genet.* 2015;96(6):1001–7.
20. Schroeder TM, German J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns of chromosome disruption and rearrangement. *Humangenetik.* 1974;25(4):299–306.
21. Auerbach A. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009;668:4–10.
22. Amor-Guérét M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett.* 2006;236(1): 1–12.
23. Soulier J. Fanconi anemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Prog.* 2011;1492–7.
24. Tulpule A, Lensch MW, Miller J, et al. Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood.* 2011;115(17):3453–62.
25. Langevin F, Crossan GP, Rosado IV, et al. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature.* 2011;475:53–8.
26. Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, et al. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18:1432–4.
27. Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell.* 2012;11:36–49.
28. Heinrich M, Hoatlin ME, Zigler AJ, et al. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood.* 1998;91:275–87.
29. Freie B, Ciccone S, Li X, et al. A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. *J Biol Chem.* 2004;279:50986–93.
30. Neveling K, Endt D, Hoehn H, et al. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat Res.* 2009;668:73–91.
31. Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, et al. Spontaneous abrogation of the G2 DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *J Clin Invest.* 2011;121:184–94.
32. Faure A, Naldi A, Chaouiya C, et al. Dynamical analysis of a generic boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics.* 2006;22:e124–131.
33. Mendoza L. A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Biosystems.* 2006;84:101–14.
34. Zhang R, Shah MV, Yang J, et al. Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;105:16308–13.
35. Chaves M, Albert R, Sontag E. Robustness and fragility of Boolean models for genetic regulatory networks. *J Theor Biol.* 2005;235:431–49.
36. Christensen C, Thakar J, Albert R. Systems-level insights into cellular regulation: inferring, analyzing, and modelling intracellular networks. *LET Syst Biol.* 2007;1:61–77.
37. Wu M, Yang X, Chan C. A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: a discrete modeling approach. *PLoS One.* 2009;4(12):e8040.
38. Rodríguez A, Sosa D, Torres L, et al. A Boolean network model of the FA/BRCA pathway. *Bioinformatics.* 2012;28: 858–66.
39. van Vugt M, Yaffe M, et al. Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: Giving it some gas to shut off the breaks. *Cell Cycle.* 2010;11:2097–101.
40. van Vugt MA, Gardino AK, Linding R, et al. A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1 and Chk2 to inactivate the G2/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000287.
41. Halim V, Alvarez-Fernandez M, Xu YJ, et al. Comparative phosphoproteomic analysis of checkpoint recovery identifies new regulators of the DNA damage response. *Sci Signal.* 2013;6:rs9.
42. Medema RH, Macurek L. Checkpoint recovery in cells: how a molecular understanding can help in the fight against cancer. *F1000 Biol Rep.* 2011;3.
43. Álvarez-Fernández M, Medema RH, Lindqvist A. Transcriptional regulation underlying recovery from a DNA damage-induced arrest. *Transcription.* 2010;1:32–5.
44. Meetei AR, et al. A Human Orthologue of Archaeal DNA Repair Protein Hef is Defective in Fanconi Anemia Complementation Group. *M Nat Genet.* 2005;37:958–63.
45. Kee Y, et al. Regulated degradation of FANCM in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes Dev.* 2009;23: 555–60.
46. Wang XZ, et al. Chk1-Mediated Phosphorylation of FANCE Is Required for the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Mol Cell Biol.* 2007;27:3098–108.
47. Smogorzewska A, et al. Identification of the Fanconi anemia (FANCI) protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for crosslink repair. *Cell.* 2007;129:289–301.
48. Bogliolo M, et al. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J.* 2007;26:1340–51.
49. Pace P, et al. Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science.* 2010;329:219–23.
50. Bhagwat N, et al. XPF-ERCC1 Participates in the Fanconi Anemia Pathway of Cross-Link Repair. *Mol Cell Biol.* 2009;29: 6427–37.
51. Hanada K, et al. The structure-specific endonuclease Mus81/Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *EMBO J.* 2006;25:492125–4932.
52. Lieber MR. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181–211.
53. Chang DJ, Cimprich KA. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nature Chem Biol.* 2009;5:82–90.
54. Mirchandani KD, et al. The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair.* 2008;7:902–11.
55. Kass EM, Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters.* 2010;584:3703–8.

56. Adamo A, et al. Preventing Non-homologous End-Joining suppresses DNA repair defects of Fanconi Anemia. *Mol Cell*. 2010;39:25–35.
57. Yaneva M, et al. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with KU: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J*. 1997;16:5098–112.
58. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:616–127.
59. Collis SJ, et al. FANCM and FAAP24 function in ATR-Mediated Checkpoint Signaling Independently of the Fanconi Anemia Core Complex. *Mol Cell*. 2008;32:313–24.
60. Jazayeri A, et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biol*. 2006;8:37–45.
61. Stiff T, et al. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J*. 2006;25:5775–82.
62. Lavin MF. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene*. 2008;26:7749–58.
63. Lee J, et al. The Rad9-Hus1-Rad1 Checkpoint Clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem*. 2007;282:28036–44.
64. Shieh S, et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*. 2000;14:289–300.
65. Bassermann F, Pagano M. Dissecting the role of ubiquitylation in the DNA damage response checkpoint in G2. *Cell Death Differ*. 2010;17:78–85.
66. Mussel C, Hopfensitz M, Kestler HA. BoolNet—an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*. 2010;26:1378–80.
67. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 1985;147:29–36.
68. Zhou B, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408:433–9.
69. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27:247–54.
70. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:149–60.
71. Krenning L, Feringa FM, Shaltiel IA, et al. Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Molecular Cell*. 2014;55:59–72.
72. Karlebach G, Shamir R. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(10):770–80.
73. Morris MK, Saez-Rodriguez J, Sorger PK, Lauffenburger DA. Logic-based models for the analysis of cell signaling networks. *Biochemistry*. 2010;49(15):3216–24.
74. Tenazinha N, Vinga S. A survey on methods for modeling and analyzing integrated biological networks. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinforma (TCBB)*. 2011;8(4):943–58.
75. Bornholdt S. Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *J R Soc Interface* 5. 2008;1: S85–S94.
76. Lazebnik Y. Can a biologist fix a radio?—or, what I learned while studying apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*. 2004;69(12):1403–6.
77. Tyson JJ, Chen KC, Novak B. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(2):221–31.
78. Wang AT, Smogorzewska A. SnapShot: Fanconi anemia and associated proteins. *Cell*. 2015;160(1):354.
79. Fritsch P, Craddock TJA, del Rosario RM, Rice MA, Smylie A, Folcik VA, et al. Succumbing to the laws of attraction: Exploring the sometimes pathogenic versatility of discrete immune logic. *Syst Biomed*. 2013;1(3):179–94.
80. Peng A. Working hard for recovery: mitotic kinases in the DNA damage checkpoint. *Cell Biosci*. 2013;3:20.
81. Amador V, Ge S, Santamaría PG, et al. APC<sup>CDC20</sup> controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell*. 2007;3:462–73.
82. Mailand N, Bekker-Jensen S, Bartek J, et al. Destruction of Claspin by SCF<sup>btTrCP</sup> restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell*. 2006;23:307–18.
83. Liang H, Esposito A, De S, Ber S, Collin P, Surana U, et al. Homeostatic control of polo-like kinase-1 engenders non-genetic heterogeneity in G2 checkpoint fidelity and timing. *Nat Commun*. 2014;5.
84. Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, Medema RH. The same, only different—DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci*. 2015;128:607–20.
85. Lindqvist A, de Bruijn M, Macurek L, et al. Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53 dependent transcriptional repression. *EMBO J*. 2009;20:3196–206.
86. Shaltiel IA, Aprelia M, Saurin AT, et al. Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;20:7313–8.
87. Seki A, Coppinger J, Jang C, et al. Bora and the kinase Aurora A cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. 2008;320:1655–8.
88. Macurek L, Lindqvist A, Lim D, et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. 2008;455:119–23.
89. van Vugt MA, Brás A, Medema RH. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell*. 2004;15(5):799–811.