



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

CONTRIBUCIÓN EPIGENÉTICA EN LA DECISIÓN DE REPARACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS

DEFICIENTES EN LA VÍA FA/BRCA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CECILIA AYALA ZAMBRANO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MAYRA FURLÁN MAGARIL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX., enero 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

CONTRIBUCIÓN EPIGENÉTICA EN LA DECISIÓN DE REPARACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS

DEFICIENTES EN LA VÍA FA/BRCA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CECILIA AYALA ZAMBRANO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Leda Carolina Torres Maldonado
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MAYRA FURLÁN MAGARIL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX., enero 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0900/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de octubre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **AYALA ZAMBRANO CECILIA** con número de cuenta **409061877** con la tesis titulada **“CONTRIBUCIÓN EPIGENÉTICA EN LA DECISIÓN DE REPARACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DEFICIENTES EN LA VÍA FA/BRCA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Vocal: DR. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA
Vocal: DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO
Vocal: DR. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ
Secretario: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de noviembre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Gracias al Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Apoyo financiero de parte de Recursos Fiscales INP 2020/**012** y 2023/**03**, CONAHCyT **319344**, CONAHCyT **194183**, DGAPA-PAPIIT/UNAM **IA205022**

Beca CONAHCyT con número de registro **747486** para Cecilia Ayala Zambrano.

Gracias a la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado, la Dra. Mayra Furlán Magaril, la Dra. Rosana Pelayo Camacho y al Dr. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez por su participación en el comité tutorial.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, CP 04530, Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Realizar y sobrevivir al doctorado requiere de la conjunción de buena fortuna y privilegio. Requiere de esfuerzos colectivos que permitan encontrar los límites sin perder la cordura. Requiere de espacios donde la camaradería te ofrezca manos para colaborar, cabeza para intercambiar ideas, hombros para llorar y carcajadas para compartir. Requiere de un hogar que tolere los tiempos del laboratorio, te abraze en los peores momentos y celebre los mejores, aun cuando no entiendan está sucediendo. Requiere de toda una aldea con pilares para sostenerte en cada ocasión que sientes que la caída es inminente. Requiere de mentores que te reten, te empujen y al mismo tiempo te sostengan. Requiere de figuras que te inspiren a querer ser mejor y a no rendirte. Requiere de un cuerpo que te contenga, sostenga y albergue. Requiere de mucho amor y paciencia.

No puedo más que agradecer a cada una de las personas que conformó esa aldea que me acompañó durante el tránsito por el doctorado, que me inspiró a seguir adelante. A los miembros del jurado que me leyeron y fueron clave para mejorar el producto final aquí expuesto y a todos los individuos de la comunidad Fanconi, por ser inspiración y propósito de este trabajo. A todos ustedes, gracias, este doctorado también es de ustedes.

A los valientes que se animen a leerme y a los que no, también

ÍNDICE

.....	1
.....	Error! Bookmark not defined.
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
La vía de reparación de DNA FA/BRCA	5
<i>Generación de la DSB</i>	7
<i>Reparación de la DSB</i>	10
<i>Deficiencias en la reparación de ICL</i>	11
Participación de la cromatina en la reparación del DNA	12
<i>La cromatina señala las DSB</i>	13
<i>Marcas en la cromatina que facilitan la reparación por c-NHEJ</i>	14
<i>NuA4, el complejo acetiltransferasa que favorece la HR durante la reparación</i>	15
Los modelos Booleanos como herramienta para estudiar redes biológicas complejas	17
ANTECEDENTES DIRECTOS	20
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL:	21
OBJETIVOS PARTICULARES:	21
METODOLOGÍA	22
APROXIMACIÓN BIOLÓGICA COMPUTACIONAL	22
Revisión bibliográfica y reconstrucción de la red de decisión de la vía de reparación de DSB	22
<i>Señalización de la DSB</i>	23
<i>Resección de rango corto de los extremos de la DSB</i>	23
<i>Extensión de la resección</i>	25
<i>Invasión de la cromátida hermana</i>	26
Modelación matemática de la red de reparación de la DSB	28
APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	28
Modelo celular e inducción de daño al DNA	28

Transfección de RNA interferente pequeño (siRNA) y RNAguía (sgRNA, CRISPR/Cas).....	29
Extracción de proteína total y cromatina	29
Western Blot	30
Inmunofluorescencia.....	30
Ensayo de ligación por proximidad	31
Ensayo de aberraciones cromosómicas	31
Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS	32
APROXIMACIÓN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL	32
Reconstrucción de la red de reparación de DSB	32
En el modelo que generamos la vía de reparación que se activa durante la reparación de las DSB es la HR	41
El contexto genético de las células altera la selección de la vía de reparación de DSB.....	43
Alteraciones en el contexto genético de las mutantes nulas <i>BRCA1/FANCS</i> modifican la selección de vías de reparación	48
La selección de la vía de reparación de DSB es modificada en ausencia del complejo acetil transferasa NuA4	51
APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	55
La formación del complejo NuA4 aumenta en presencia de ICL en el DNA	55
El proceso de reparación de ICL se ve afectado ante la ausencia de EPC1.....	56
La ausencia de EPC1 favorece a la SSA durante la reparación de ICL.....	60
La ausencia de EPC1 en células FA aumentan la inestabilidad cromosómica pero no favorece el reclutamiento de RAD52.....	63
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I. Reactivos utilizados	
ANEXO II. Simulaciones de todas las mutantes con un pulso de daño o daño continuo	
ANEXO III. Densitometrías Western Blot	
ANEXO IV. Artículo requisito	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía FA/BRCA.	9
Figura 2. Modificaciones de histonas que favorecen la reparación por c-NHEJ	15
Figura 3. NuA4 inhibe a 53BP1 y favorece la reparación fidedigna	17
Figura 4. Modelo Booleano de redes	18
Figura 5. Resumen gráfico de la red de reparación de las DSB.....	22
Figura 6. Vías de reparación de las DSB.....	27
Figura 7. Red de regulación de la reparación de las DSB.....	34
Figura 8. El modelo reproduce la trayectoria de la reparación de DSB por HR.	42
Figura 9. El daño continuo favorece la reparación por HR.	44
Figura 10. Mutaciones nulas en <i>ATM</i> o <i>BRCA1/FANCS</i> favorecen la reparación por c-NHEJ.....	46
Figura 11. Mutaciones nulas en <i>EXO1</i> o <i>RAD51</i> favorecen la reparación por MMEJ o SSA, respectivamente.	47
Figura 12. Mutaciones secundarias a <i>BRCA1/FANCS</i> pueden restaurar la HR como vía preferencial en la reparación de DSB.	50
Figura 13. La sobreexpresión de POLQ en las mutantes nulas de <i>BRCA1/FANCS</i> promueve a la MMEJ como la vía preferente de reparación de DSB.	51
Figura 14. La alteración en el equilibrio epigenético modifica la trayectoria y vía de reparación de DSB.....	52
Figura 15. La deficiencia de NuA4 se favorece el establecimiento de RAD52, y en consecuencia se favorece la reparación por SSA.	54
Figura 16. La presencia de ICL induce el ensamblaje de NuA4	56
Figura 17. La presencia de EPC1 es necesaria para la apropiada reparación de ICL.	58
Figura 18. La ausencia de EPC1 interfiere con ensamblaje del complejo y acetilación de histonas en zona de daño	60
Figura 19. La ausencia de EPC1 la reparación de ICL por SSA.	62
Figura 20. La ausencia de EPC1 en células deficientes de la vía FA/BRCA amplifica la inestabilidad cromosómica sin favorecer la reparación por la vía SSA	64

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BNM: modelos Booleano de redes	MMEJ: Unión de extremos mediado por microhomología
c-NHEJ: Unión de extremos no homólogo canónica	NER: Reparación por escisión de nucleótidos
DDR: Respuesta a DNA dañado	pb: pares de bases
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PLA: Ensayo de ligación por proximidad
DSB: Ruptura de doble hebra	PTM: Modificaciones postraduccionales
FA: Anemia de Fanconi	RNA: Ácido ribonucleico
HAT: Histona acetiltransferasa	sc-RNAseq: Secuenciación de RNA a nivel de célula única
HDAC: Histona desacetilasa	siRNA: RNA pequeño de interferencia
HSPC: Células troncales y progenitoras hematopoyéticas	SSA: Alineación de hebra sencilla
HR: Recombinación homóloga	ssDNA: DNA monocatenario
ICL: Enlace covalente cruzado	TLS: Síntesis translesión
Mb: Mega base	WB: Western blot
MMC: Mitomicina C	WT: silvestre

RESUMEN

La interacción cotidiana del DNA con factores físicos, químicos y biológicos (presentes en el ambiente) puede alterar la composición y/o estructura de la molécula, comprometiendo la funcionalidad y supervivencia de la célula, y su descendencia. La generación constante del daño en el DNA presupondría la inestabilidad cromosómica inherente a la existencia de la célula, sin embargo, existen vías de reparación que restauran la estructura del DNA procurando la estabilidad genómica. Las posibles alteraciones al DNA son múltiples, por lo que la reparación de todas requiere de la existencia de vías de reparación especializadas para cada tipo de lesión. Los enlaces covalentes cruzados (ICL por sus siglas en inglés), por ejemplo, son un tipo de daño en el que se impide la separación de la doble hélice del DNA durante la replicación debido a la unión covalente entre las dos hebras del DNA.

Los ICL se detectan y se reparan por la vía FA/BRCA, la cual genera, como intermediario de la reparación, una ruptura de doble hebra (DSB por sus siglas en inglés) que implica la pérdida de la continuidad del DNA. Estas DSB intermediarias se reparan por la acción de proteínas de recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) que actúan río abajo en la vía FA/BRCA, para garantizar la reparación fidedigna de la ruptura. Variantes patogénicas bialélicas en alguno de los genes *FANC* (que codifican proteínas que participan en la vía FA/BRCA) conducen a un síndrome de inestabilidad cromosómica conocido como anemia de Fanconi (FA por sus siglas en inglés). En este síndrome, la reparación de la DSB intermediaria es ineficiente y se queda sin reparar o bien se repara empleando alguna de las vías no fidedignas como: la unión de extremos no homólogos canónica, unión de extremos mediada por microhomología y la alineación de hebra sencilla (c-NHEJ, MMEJ, SSA, por sus siglas en inglés, respectivamente).

La restauración apropiada del DNA después del daño por DSB requiere que las distintas vías de reparación disponibles se regulen para garantizar la reparación. Esto incluye, además de las proteínas efectoras, a las modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) de histonas que rodean a la DSB, y que participan activamente en el reclutamiento de proteínas a la zona de daño al permitir o inhibir su anclaje a cromatina. Tal es el ejemplo del complejo acetil transferasa NuA4, cuyo reclutamiento a la DSB inhibe la participación de vías propensas a error, favoreciendo la reparación por HR. En conjunto, todos los elementos

de las vías de reparación interactúan formando redes complejas que coordinan y regulan la restauración del DNA. En vista de lo complejo de estos procesos, en este trabajo empleamos aproximaciones complementarias, que incluyeron una estrategia matemática y otra experimental con el fin de entender mejor la reparación de los ICL y las DSB.

En la aproximación matemática, reconstruimos la red de regulación de la reparación de la DSB y desarrollamos un modelo Booleano (BNM por sus siglas en inglés) asociado a ella. En esta aproximación incorporamos el conocimiento documentado sobre la regulación de la reparación de la DSB en un sistema dinámico, permitiéndonos generar predicciones sobre aspectos asociados a la reparación de la DSB y no caracterizados previamente. El modelo contempla la reparación durante las fases S y G2 del ciclo celular, y recapitula la actividad de HR reportada en condiciones silvestres bajo este escenario. Aunado a esto, reconstruye comportamientos de mutantes como *BRCA1/FANCS*^{-/-}, así como de los mecanismos de resistencia atribuidos a ganancia de función de variantes patogénicas de relevancia clínica. Por otro lado, incluimos factores epigenéticos en el modelo, como la participación del complejo acetiltransferasa NuA4. De acuerdo con el modelo, la pérdida del complejo favorece a la reparación de las DSB por la vía propensa a error SSA. Esta predicción fue corroborada experimentalmente.

Por otro lado, estudiamos la participación del complejo NuA4 en la reparación de ICL, siendo que las características del modelo sitúan el contexto ambiental en el que la reparación del ICL sucede, hipotetizamos que la acetiltransferasa tendría una participación relevante en la vía FA/BRCA. Encontramos que la transcripción de *EPC1*, elemento clave para la actividad acetiltransferasa de NuA4, se encuentra regulado a la baja en células troncales hematopoyéticas de pacientes FA, y que la inducción de ICL promueve el ensamblaje del complejo NuA4 y la acetilación de histonas alrededor de la DSB. Sumado a esto, el *knock-out* de *EPC1* derivó en el aumento en el reclutamiento de RAD52 (factor clave en la vía SSA) tras la inducción de ICL. Corroborando la hipótesis generada por el modelo de que NuA4 es un complejo que inhibe la vía SSA. Por otro lado, la ausencia de *EPC1* en contexto deficiente de la vía FA/BRCA resultó en la exacerbación de la inestabilidad cromosómica, sin embargo, el reclutamiento de RAD52 a cromatina tras la inducción de ICL no sucede, sugiriendo la participación de MMEJ o c-NHEJ en la reparación de estas células.

ABSTRACT

The daily interaction of DNA with physical, chemical, and biological factors (present in the environment) can alter the molecule composition and/or structure, jeopardizing the functionality and survival of the cell and its progeny. The continuous generation of DNA damage presupposes the chromosomal instability inherent in the existence of the cell; however, the structure can be restored through the existence of DNA repair pathways, ensuring genomic stability. The diversity in the DNA possible alterations characteristics requires the existence of repair pathways specialized in each type of damage. Interstrand DNA crosslinks (ICL), for example, are a type of damage in which DNA replication is blocked due to the covalent bond between the strands.

During the replication, ICLs are detected and repaired by the FA/BRCA pathway. The repair process includes the generation of another type of damage as an intermediary: a double-strand break (DSB). DSBs are very dangerous lesions where the DNA molecule continuity is lost. However, the FA/BRCA pathway includes the homologous recombination (HR) pathway, ensuring the faithful repair of the break. Biallelic pathogenic variants in any of the *FANC* genes (which encode the FA/BRCA pathway proteins) lead to a chromosomal instability syndrome known as Fanconi anemia (FA). In this syndrome, there is a shift the intermediary DSB repair pathway selection, where, instead of using HR, an error-prone pathway, such as the canonical non-homologous end joining, microhomology-mediated end joining, or single-strand annealing (c-NHEJ, MMEJ, SSA, respectively), is chosen.

The regulation of DSB repair pathways activity, regardless of the damage origin, requires the repair elements to coordinate actions to guarantee the proper restoration of the DNA molecule continuity. Which, in addition to the effector proteins, include the histone post-translational modifications (PTMs) surrounding the DSB.

The regulation of DSB repair pathways activity, regardless of the damage origin, requires the coordinated actions of the repair elements (including not only effector proteins but also chromatin) to guarantee the proper restoration of the DNA molecule continuity. The presence of histone post-translational modifications (PTMs) surrounding the DSB, for example, actively participates in the repair process by enabling or inhibiting the chromatin recruitment of effector proteins as shown in the histone acetylation through NuA4 complex during the DSB repair

process, where the recruitment of error-prone pathway elements is blocked, promoting the repair through the HR pathway. However, chromatin participation is not limited to NuA4 activity and, together with the effector proteins, creates a complex network that coordinates and regulates the DNA restoration. For this reason, the DSB repair understanding requires a combination of different approaches that can provide a comprehensive and global perspective. In this work, we used mathematical and experimental approximations to extend the ICL and DSB repair process knowledge.

In the mathematical approach, we constructed a Boolean network model (BNM) of the DSB repair pathway selection, where we incorporated the documented knowledge about the DSB repair regulation into a dynamic system, allowing us to generate predictions about uncharacterized aspects. The model encompasses the DSB repair during the S and G2 cell cycle phases and recapitulates HR as the preferred pathway under wild-type conditions. In addition, the model reproduces mutant behavior such as *BRCA1/FANCS*^{-/-}, as well as resistance mechanisms attributed to the gain of function of clinically relevant pathogenic variants. Moreover, we included epigenetic factors in the model, such as the involvement of the NuA4 acetyltransferase complex. The model predicted that the NuA4 loss favors the DSB repair through the error prone SSA pathway activity, which was experimentally validated.

Furthermore, we studied the involvement of the NuA4 complex in the repair of ICLs. Given that the model establishes the environmental context in which the ICL repair occurs, we hypothesized that NuA4 would play a significant role in the FA/BRCA pathway. We identified that the transcription of *EPC1*, a key member for the acetyltransferase activity of NuA4, is downregulated in hematopoietic stem cells from FA patients. Furthermore, we found that the induction of ICL promotes the assembly of the NuA4 complex and histone acetylation around the DSB. In addition, the knockout of *EPC1* favored the recruitment of RAD52 (a key factor in the SSA pathway) after ICL induction, corroborating that NuA4 is an anti-SSA pathway complex, as predicted by the BNM. On the other hand, the absence of *EPC1* in the FA/BRCA pathway deficient context led to chromosomal instability exacerbation. However, the recruitment of RAD52 to chromatin after ICL induction did not occur, suggesting the involvement of MMEJ or c-NHEJ in the repair of these cells.

INTRODUCCIÓN

La vía de reparación de DNA FA/BRCA

El DNA es una molécula química que, al interactuar con su entorno, puede ser modificada por factores químicos, físicos y biológicos. Las modificaciones en el DNA pueden comprometer la información genética contenida en la molécula y, para reducir sus consecuencias, existen diferentes vías de reparación del DNA. De entre el universo de compuestos genotóxicos, existen los agentes alquilantes bifuncionales, como el cisplatino, los psoralenos (origen exógeno) y los aldehídos (producto del metabolismo celular del acetaldehído), que son compuestos químicos que unen covalentemente las dos hebras del DNA^{1,2}. A esta unión inter-hebra se le denomina enlace covalente cruzado (ICL por sus siglas en inglés) y representa un obstáculo físico para la apertura de la molécula en procesos celulares como la replicación. El impedimento en la progresión de la maquinaria de replicación, consecuencia de la presencia del ICL, activa a la principal vía de reparación encargada de reparar ICL: la vía FA/BRCA^{3,4}.

La vía FA/BRCA incluye la participación de las 22 proteínas codificadas por los genes *FANC* (Tabla 1) y las proteínas accesorias a la vía (FAAP10/MHF2, FAAP16/MHF1, FAAP20, FAAP24 y FAAP100), las cuales interactúan formando una red de regulación que coordina la activación de la vía, la inducción de una ruptura de doble hebra (DSB por sus siglas en inglés) y la reparación de la misma⁴⁻⁶.

TABLA 1. GENES *FANC*. LA LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES FUE OBTENIDA DEL OMIM.

Gen <i>FANC</i>	locus	Función en la reparación de ICL	Referencia
<i>FANCA</i>	16q24.3	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi Subcomplejo con <i>FANCG</i> y <i>FAAP20</i>	7
<i>FANCB</i>	Xp22.31	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi Subcomplejo con <i>FAAP100</i> y <i>FANCL</i>	8
<i>FANCC</i>	9q22.3	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi Complejo ternario con <i>FANCE</i> , <i>FANCF</i> y <i>FANCD2</i>	9
<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.13	Facilita la carga de <i>RAD51</i> durante la recombinación homóloga	10
<i>FANCD2</i>	3p25.3	Unión a <i>FANCI</i> , río arriba es clave para la escisión del ICL, también tiene actividad río abajo	11
<i>FANCE</i>	6p21.22	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	12
<i>FANCF</i>	11p15	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi Requerido para las interacciones entre <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> y <i>FANCE</i>	12
<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi Subcomplejo con <i>FANCA</i> y <i>FAAP20</i>	12
<i>FANCI</i>	15q25.16	Se une a <i>FANCD2</i> ; es clave para la escisión del ICL	13
<i>FANCJ/BRIP1</i>	17q22-q24	Interactúa con <i>FANCS/BRCA1</i> promoviendo la HR e inhibe la síntesis traslesión	14
<i>FANCL</i>	2p16.1	Ubiquitin ligasa E3 del complejo <i>core</i> anemia de Fanconi	15
<i>FANCM</i>	14q21.3	Complejo <i>core</i> anemia de Fanconi, reconocimiento de la lesión	16
<i>FANCN/PALB2</i>	16p12.1	Facilita la carga de <i>RAD51</i> durante la recombinación homóloga	17
<i>FANCO/RAD51C</i>	17q25.1	Recombinación Homóloga	18
<i>FANCP/SLX4</i>	16p13.3	Andamiaje de nucleasas <i>ERCC1-XPF</i> , <i>MUS81-EME1/2</i> y <i>SLX1</i>	19
<i>FANCQ/XPF o ERCC4</i>	16p13.12	Endonucleasa	20
<i>FANCR/RAD51</i>	15q15.1	Recombinación Homóloga	21
<i>FANCS/BRCA1</i>	17q21.31	Facilita la carga de <i>RAD51</i> durante la recombinación homóloga	22
<i>FANCT/UBE2T</i>	1q32.1	E2 se conjuga con E3 y cataliza la ubiquitinación de proteínas	23
<i>FANCU/XRCC2</i>	7q36.1	Recombinación homóloga	24
<i>FANCV/REV7 o MAD2L2</i>	1p36	Síntesis traslesión (TLS)	25
<i>FANCW/RFWD3</i>	16q23.1	Ubiquitin E3 ligasa que regula el intercambio de pRPA y <i>RAD51</i> durante la HR	6

Generación de la DSB

Los ICL son detectados principalmente durante la fase S del ciclo celular, cuando la progresión de dos horquillas de replicación convergen en el ICL y, en consecuencia, se arrestan²⁶. El proceso genera una estructura ramificada (en forma de X) que es detectada por FANCM (en asociación con FAAP24, FAAP16/MHF1 y FAAP10/MHF2) lo que induce el agrupamiento y reclutamiento del resto del complejo multiprotéico conocido como complejo *core* (Figura 1A)^{4,27}.

El complejo *core* forma una unidad funcional con actividad E3 ubiquitin-ligasa cuyo blanco es el heterodímero FANCD2-FANCI (FANCD2-I). 16 proteínas agrupadas en 5 subcomplejos conforman del complejo *core*^{4,27}:

- Subcomplejo de anclaje. Está compuesto por FANCM, FAAP16/MHF1, FAAP10/MHF2 y FAAP24.: tras la identificación de ICL, son el sitio de andamiaje para el complejo *core*.
- Subcomplejo AG20 Está compuesto por FANCA, FANCG y FAAP20.: se une al subcomplejo ternario CEF, al subcomplejo BL100 y es el puente entre el complejo *core* y el subcomplejo TLS.
- Subcomplejo TLS. Compuesto por REV1, FANCV/REV7 y REV3. Se une directamente a FAAP20 y participa en la TLS.
- Subcomplejo ternario CEF: compuesto por FANCC, FANCE y FANCF. Se une al complejo de anclaje y sirve de puente entre el complejo *core* y el blanco enzimático FANCD2-I.
- Subcomplejo BL100: Se une a los subcomplejos AG20 y CEF, y contiene a la subunidad con actividad E2 ubiquitin ligasa (FANCT). Está compuesto por FANCB, FANCL (E3, Ubiquitin ligasa) y FAAP100.

El ensamblaje correcto de los cinco subcomplejos es necesario para que, en acción conjunta con FANCL, se monoubiquitine a FANCD2 y FANCI (FANCD2-I-Ub) (Figura 1B). La monoubiquitinación del heterodímero permite su anclaje a la zona de daño y posibilita la incorporación de FANCP/SLX4 a la cromatina. FANCP/SLX4 es el sitio de andamiaje que coordina la actividad de las

endonucleasas específicas de estructura FANCG/XPF/ ERCC4-ERCC1, MUS81-EME1 y SLX1 ²⁸.

Las endonucleasas liberan el ICL al hacer dos incisiones nucleolíticas sobre la misma hebra del DNA, una en cada lado del ICL (Figura 1C). Como resultado se separan las dos hebras de DNA, y, como consecuencia del desenganche del ICL, las hebras parentales guarecen lesiones intermediarias de la reparación. Por un lado, en la hebra que no fue afectada por la acción nucleasa prevalece un aducto (el fragmento de DNA de la hebra complementaria unido por el ICL) y una ruptura de hebra sencilla, activando la reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés) y la síntesis translesión (TLS por sus siglas en inglés), respectivamente (Figura 1D). En contraste, en la hebra en la que se hizo la incisión, la continuidad de la molécula del DNA se pierde, generándose una DSB activando la reparación por HR (Figuras 1E-F) ^{4,27}.

La replicación de la hebra complementaria al aducto requiere de la coordinación de una polimerasa de TLS, como REV1, y una de alta fidelidad, como Polζ (compuesta por FANCV/REV7, REV3 y una polimerasa de alta fidelidad como POLD2 o POLD3). Esta cooperación permite, por un lado, acomodar el aducto y agregar los desoxicitidin mono fosfatos (dCMPs) complementarios a las bases dañadas, y, por otro, extender la replicación hasta restaurar la doble hebra de DNA ^{25,29}. Existen otras polimerasas TLS en mamíferos ((POL κ, POL η, POL ι), sin embargo, la actividad de la dupla REV1-POL ζ es la de mayor relevancia durante la reparación de ICL ^{29,30}. Esto se debe, en parte, a que se REV1 interactúa directamente con el complejo *core*, FAAP20, además que, la ausencia de FANCV/REV7 incrementa la sensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales ^{25,27,30}.

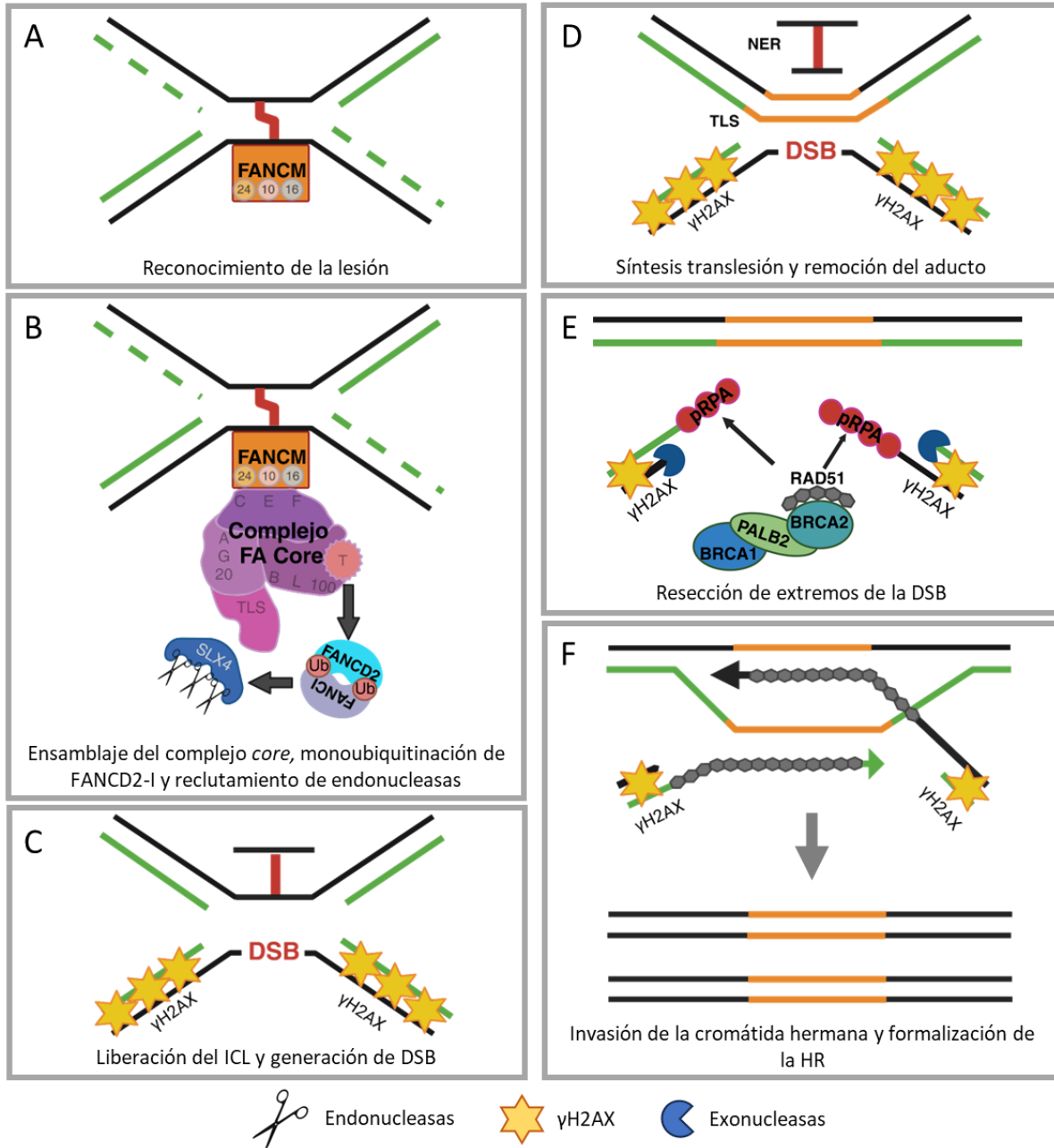


FIGURA 1. Vía FA/BRCA.

A) La presencia de ICL es detectada durante la replicación, cuando la doble hélice no puede ser separada. FANCM reconoce la lesión.

B) El reclutamiento y ensamblaje del complejo FA Core promueve la monoubiquitinación de FANCD2 y FANCI, facilitando el reclutamiento de SLX4 y en consecuencia las endonucleasas que cortan alrededor del ICL.

C) La liberación del ICL genera, en consecuencia, tres diferentes lesiones: un aducto, la exposición de DNA de cadena sencilla y una ruptura de doble hebra, el daño es señalado con la fosforilación de la variante de histona H2A.X (conocida como γ H2AX).

D) La exposición de DNA de hebra sencilla y el aducto son resuelto a través de TLS y NER (respectivamente).

E) Las exonucleasas procesan los extremos de la DSB, generando extremos cohesivos de DNA de cadena de hebra sencilla. La hebra sencilla es protegida por pRPA que, más tarde, es intercambiada por RAD51 a través de la acción de BRCA1/FANCS, PALB2/FANCN y BRCA2/FANCD1.

F) RAD51 media la búsqueda de homología en la cromátida hermana y se concreta la HR.

Creado con BioRender.com.

Reparación de la DSB

Durante la fase S del ciclo celular, fase en la que sucede la reparación de los ICL, la disponibilidad de la cromátida hermana y la presencia y activación de proteínas de recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés), favorecen la reparación de la DSB intermediaria por la vía HR (Figuras 1E-F) ^{31,32}.

La HR depende en gran parte de la participación de proteínas FANC (Tabla 1) y, durante la reparación de los ICL, pertenece a la vía FA/BRCA. Es una vía de reparación fidedigna, ya que utiliza como molde a la cromátida hermana y requiere de varios pasos intermedios para lograr la reparación. Estos pasos incluyen:

1. La generación de extremos 3' libres de ssDNA: a través de la acción consecutiva de las nucleasas MRN-CtIP y EXO1 se genera extremos cohesivos de DNA monocatenario, los cuales son protegidos por la presencia de pRPA. La actividad nucleasa de MRN-CtIP, es favorecida por la presencia de la proteína FANCS/BRCA1 ³³⁻³⁷.
2. La invasión de la cromátida hermana: FANCR/RAD51 es la recombinasa que cataliza la búsqueda de homología en la cromátida hermana. Su carga en el DNA monocatenario depende FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2 y FANCS/BRCA1, quienes promueven el intercambio de pRPA por FANCR/RAD51³⁸.
3. Síntesis de DNA: cuando el nucleofilamento conformado por el DNA monocatenario y FANCR/RAD51 encuentra la secuencia homóloga en la cromátida hermana, se forma una estructura conocida como bucle D (compuesta por el DNA invasor y el DNA recombinante) que permite la síntesis del DNA. Esta síntesis se extiende a lo largo de la hebra invasora

hasta capturar el segundo extremo de la ruptura, formando una estructura con dos intermediarios de Holliday ^{32,38}.

4. Resolución de los intermediarios de Holliday: resolvasas como GEN1, FANCP/SLX4-MUS81-EME1 y SLX1 realizan incisiones sobre las intersecciones de Holliday, separando a las cromátidas³⁹.

Fallas en la vía FA/BRCA comprometen la reparación apropiada de las DSB y en consecuencia incrementa la inestabilidad cromosómica ⁴.

Deficiencias en la reparación de ICL

La herencia de variantes patogénicas bialélicas en alguno de los genes *FANC* (con excepción de *FANCB* y *FANCR/RAD51* que tiene patrones de herencia ligada al X y autosómica dominante, respectivamente; (Tabla 1) producen un síndrome hereditario de inestabilidad cromosómica llamado anemia de Fanconi (FA por sus siglas en inglés), en el cual la reparación de los ICL por la vía FA/BRCA no es adecuada ⁴. Como consecuencia, la reparación de la DSB intermediara se ve afectada, y las rupturas pueden quedarse sin reparar o hacer uso de alguna de las vías de reparación no fidedignas o propensas a error, como la unión de extremos no homólogos canónica o la unión de extremos mediado por microhomología (c-NHEJ y MMEJ, respectivamente) ^{40,41}. En consecuencia, estas células presentan arresto en fase G2 del ciclo celular, incremento en la fragilidad cromosómica espontánea e inducida por agentes alquilantes (como la mitomicina C, el diepoxibutano y los aldehídos) y un estado celular proapoptótico. Las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC, por sus siglas en inglés), son particularmente sensibles y se encuentra frecuentemente afectadas en los pacientes con FA, donde la acumulación del daño y activación de apoptosis se asocia con el desarrollo de falla medular y neoplasias hematopoyéticas como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda ⁴.

Ante la deficiencia de la vía FA/BRCA, la célula FA activa vías de reparación propensas a error como la c-NHEJ, la MMEJ y la alineación de hebra sencilla (SSA, por sus siglas en inglés). Estas vías se encuentran interconectadas y son capaces de regularse unas a otras ⁴².

La c-NHEJ es la vía más directa, de reparación rápida y más frecuentemente usada, ya que es la única que no requiere la presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y puede unir los extremos romos de manera directa. Sin embargo, al unir los extremos romos, sin tomar en cuenta la homología entre los extremos religados, no asegura que la secuencia original del DNA será restaurada. La c-NHEJ se encuentra activa durante todas las fases del ciclo celular y se encarga de reparar la mayoría de las DSB. Aunque la c-NHEJ es una vía propensa a cometer errores, en muy pocas ocasiones se equivoca ^{42,43}. Por otro lado, también se ha reportado la participación de proteínas de la vía MMEJ en la reparación de ICL en las células FA, donde se le ha asociado con la formación de figuras radiales. Esto confirma la participación de vías alternas durante la reparación de ICL ante la ausencia de la vía FA/BRCA ⁴¹, sin embargo, se desconocen todos los mecanismos de regulación que rigen la selección de una vía de reparación sobre la otra.

Participación de la cromatina en la reparación del DNA

En las células eucariontes, la molécula de DNA se localiza en el núcleo, donde se asocia con proteínas para formar una estructura núcleo-proteica conocida como cromatina. La cromatina organiza y protege al genoma a través de su unidad funcional: el nucleosoma. El nucleosoma consiste en dos tetrámeros de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) rodeados por 146 pb de DNA, la interacción entre las histonas y el DNA es producto de la afinidad entre el carácter básico de las histonas y el ácido del DNA ⁴⁴. Los extremos amino y carboxilo, conocidos como colas de histonas, sobresalen a la estructura dejando disponibles aminoácidos que pueden ser modificados bioquímicamente (acetilación, metilación, fosforilación, etc.) para señalar y ser sitio de anclaje para factores modificadores de la cromatina. Estas modificaciones son conocidas como modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés) y han sido ampliamente estudiadas por el impacto que tienen en la regulación de la compactación de la cromatina, la transcripción y la reparación ⁴⁵.

La participación de la cromatina durante la reparación de DSB ha sido de gran interés, ya que el ambiente cromatínico determina la accesibilidad de los

factores de reparación al sitio de daño, así como el entorno donde se lleva a cabo la reparación, facilitando e inhibiendo el reclutamiento de las proteínas específicas de respuesta a daño. De esta manera, el estatus de la cromatina establece el espacio propicio para que se lleve a cabo la reparación, e influye en la vía de reparación que resolverá la DSB. El ambiente cromatínico se establece por el grado de condensación de la cromatina, las PTM de las colas de las histonas y remodeladores de la cromatina, todos estos factores pueden ya encontrarse en la zona de daño previo a que éste suceda o puede ser modificados durante el proceso de reparación ⁴⁶.

La cromatina señala las DSB

Tras la aparición de las DSB, las cinasas ATR, DNA-PKc y especialmente ATM, desencadenan una cascada de fosforilaciones que señalizan el daño y activan factores de reparación ⁴⁷. La fosforilación de la serina 139 de la variante de histona H2A.X (referida como γ H2AX una vez fosforilada) ha sido descrita como una marca clave para la regulación de la respuesta al daño y que sirve como plataforma para acumular y retener a las proteínas de reparación, como MRN y 53BP1 ^{48,49}. La H2AX se encuentra entre el 10-25% de lo nucleosomas, y su asociación se fortalece y estimula en presencia de las DSB, propagándose y amplificando la señal de daño a lo largo de 1-2Mb alrededor de cada DSB ^{50,51}.

La propagación de la γ H2AX hacia la cromatina flanqueante a la ruptura no es un evento lineal a lo largo del cromosoma, sino que está determinada por contactos físicos, por lo que la distribución de la marca no siempre es simétrica, es decir, no necesariamente tiene la misma extensión hacia ambos lados de los extremos rotos ⁵². La distribución del genoma dentro del núcleo no es aleatoria y está compartimentado en regiones de secuencias de DNA que se localizan e interactúan frecuentemente y se encuentran delimitadas por lindes definidos genéticamente, conocidos como dominio de asociación topológica (TAD, por sus siglas en inglés) ⁵³. La localización de la DSB dentro del TAD, es en buena parte responsable de la simetría de la expansión de la γ H2AX, pues las fronteras de los TAD funcionan como barreras para la propagación de la marca. Cuando la DSB

sucede cerca de la frontera de un TAD, se produce una fosforilación asimétrica con γ H2AX delimitada por el linde del TAD, mientras que, si la perturbación sucede en la región central del TAD, la propagación probablemente será simétrica. En los casos en los que la DSB irrumpe el borde topológico, la barrera entre los TAD se elimina y la propagación de la marca se extiende a ambos TAD⁵².

La γ H2AX es una marca en la cromatina indispensable en la respuesta al daño, que se encuentra altamente conservada evolutivamente y forma parte de una cascada de señalización que moviliza y concentra a los factores de reparación en la zona de daño⁴⁸⁻⁵⁰. Asimismo, su rápida aparición tras la generación de la DSB, así como su propagación y distribución y permanencia en la zona de daño, le hacen un marcador de daño al DNA por excelencia.

Marcas en la cromatina que facilitan la reparación por c-NHEJ

Una de las características que distingue a la c-NHEJ de las otras vías de reparación de DSB, es que es la única que no requiere extremos 3' de ssDNA y, a través de 53BP1, inhibe la resección de los extremos de la ruptura. El reclutamiento de 53BP1 a la cromatina requiere de haber sido fosforilado por ATM y la presencia de dos PTM a las que se une en la cromatina: H4K20me2 y H2AK15ub (Figura 2). La H4K20me2, no es una marca inducida por la DSB, sino que la establecen las metil-transferasas SETD8 y SUV4-20H1/2 durante la fase tardía de G2 en las histonas recién sintetizadas e incorporadas en la cromatina. SETD8 cataliza la mono metilación y es degradada antes de entrar a fase S, restringiendo el reclutamiento de 53BP1 a cromatina pre-replicativa⁵⁴. 53BP1 no es la única proteína lectora de la H4K20me2; JMJD2A y L3MBTL1 también se unen a esta marca y su degradación es mediada por las ubiquitin-ligasas RNF8 y RNF168 como respuesta a daño, liberando el sitio para que 53BP1 pueda unirse^{55,56}.

Contrario a la H4K20me2, la H2AK15ub sí es producto de una cascada de ubiquitinaciones en respuesta al daño. La γ H2AX funciona como plataforma de reclutamiento de MDC1, quien interactúa con RNF8 estimulando la poliubiquitinación de la histona H1, que a su vez induce la mono ubiquitinación de la histona H2A en las lisinas 13 y 15 a través de RNF168 (Figura 2)⁵⁷. La

acumulación de 53BP1 en la cromatina es dependiente de que las PTM adecuadas se encuentren en la DSB, oponiéndose a la resección de los extremos de la ruptura y en consecuencia de la reparación de la DSB por cualquier vía de reparación diferente a la c-NHEJ. En consecuencia, la interferencia con la H2AK15ub y la H4K20me2 favorece la actividad de las vías pro resección como la HR ⁵⁸.

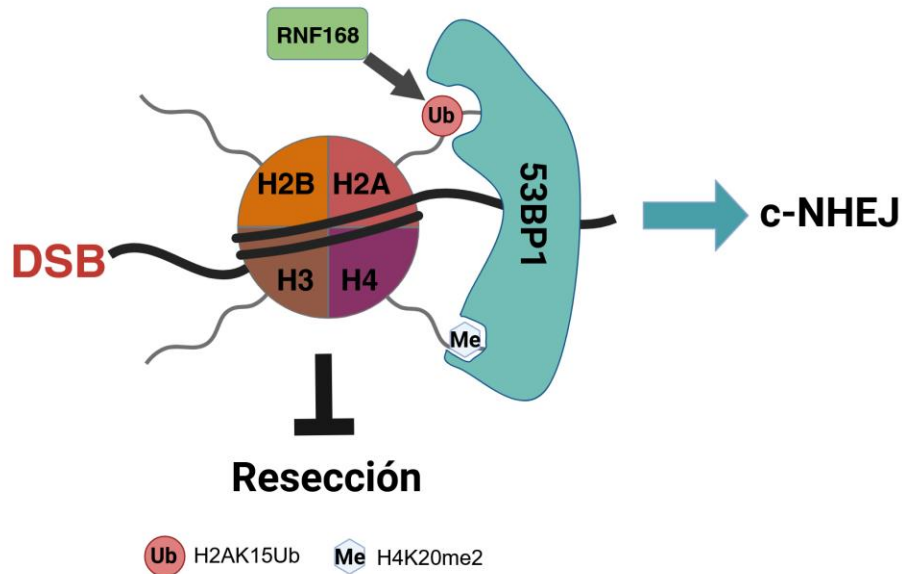


FIGURA 2. MODIFICACIONES DE HISTONAS QUE FAVORECEN LA REPARACIÓN POR c-NHEJ

Como parte de la respuesta a la presencia de DSB, RNF168 ubiquitina a la lisina 15 de la histona H2A (generando la H2AK15ub), en conjunto con la H4K20me2, estas dos PTM facilitan la unión de 53BP1 a la cromatina donde se encuentra la DSB promueven la reparación por c-NHEJ e inhiben a las otras vías de reparación al suprimir la resección de los extremos. Creado con BioRender.com.

NuA4, el complejo acetiltransferasa que favorece la HR durante la reparación

NuA4 es un complejo multiprotéico con actividad acetiltransferasa que interfiere con la asociación de 53BP1 a la cromatina. NuA4 es se encuentra evolutivamente conservado desde levadura hasta humano, cuya actividad se ha asociado con la regulación de procesos vitales cómo la transcripción y reparación de DSB a través de la acetilación de la histona H4, aunque también acetila algunas lisinas de la histona H2A ⁵⁹.

En humano, el complejo NuA4 está compuesto por al menos 17 proteínas organizadas en dos módulos que se unen a través de la proteína EPC1: el módulo de reclutamiento a cromatina y el módulo con actividad acetil transferasa de nucleosomas (también llamado Piccolo-NuA4) ^{59,60}. Durante las fases S y G2 del ciclo celular, la formación de la DSB promueve la asociación de NuA4 a la cromatina en la zona de daño, en levadura este evento es mediado por MRX (homólogo del complejo MRN humano), e interfiere con ambas marcas de reclutamiento de 53BP1 a través de dos integrantes del módulo acetil transferasa: Tip60/KAT5 y MBTD1. Tip60/KAT5 acetila a la H2AK15, lo que imposibilita que sea ubiquitinado y por ende leído por 53BP1; Tip60/KAT5 también acetila a la H4K16, que debido a la carga del grupo acetilo y su cercanía física con la H4K20 desestabiliza la interacción entre la H4K20me2 y 53BP1, acción que se ve reforzada por la unión de MBTD1 a H4K20me2, bloqueando así a 53BP1 por todos los flancos (Figura 3) ^{60,61}.

La H4K20me2 es una marca abundante en la cromatina durante todas las fases del ciclo celular, excepto durante la fase S, cuando se diluye debido a integración de histonas recién sintetizadas y que carecen de esta PTM (H4K20me0). La H4K20me0 no sólo elimina un sitio de unión de 53BP1, sino que además es sitio de unión de la competencia: BRCA1. Se ha descrito que en células en las que se inhibe la metilación de la H4K20 la actividad de la c-NHEJ disminuye, mientras que la de la HR y SSA incrementan ⁶².

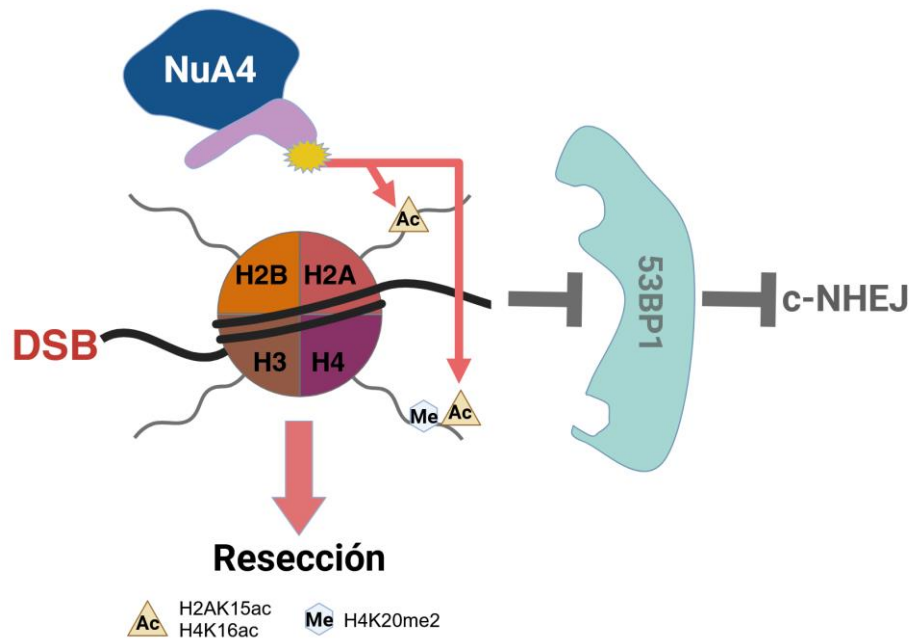


FIGURA 3. NUA4 INHIBE A 53BP1 Y FAVORECE LA REPARACIÓN FIDELIGNA

Como Respuesta a la presencia de DSB, NuA4 acetila residuos de lisinas de las histonas H4 y H2A, en las que la H4K16 y H2AK15ac inhiben la unión de 53BP1 a la cromatina donde se encuentra la DSB facilitando la resección de los extremos de la ruptura y en consecuencia la reparación por la HR, SSA o MMEJ. Creado con BioRender.com.

Los modelos Booleanos como herramienta para estudiar redes biológicas complejas

Los modelos Booleanos de redes (BNM) de regulación son aproximaciones matemáticas de baja complejidad útiles para entender los mecanismos que regulan las propiedades de sistemas biológicos dinámicos.

Los BNM están constituidos por variables y funciones Booleanas, las cuales se establecen tras una extensa investigación bibliográfica. Las variables, también conocidas como nodos, representan los componentes biológicos del sistema de interés, cómo genes o proteínas, y durante las simulaciones pueden presentar únicamente un estado durante cada transición: prendido o apagado (representado por 1 o 0, respectivamente) (Figura 4A). El estado del nodo está determinado por las funciones Booleanas, que son las representaciones matemáticas de las

interacciones entre las variables del BNM que se rigen por tres diferentes operadores: “AND”, “OR” y “NOT” (representados por los símbolos &, | y !, respectivamente) (Figura 4B). El estado de los nodos se actualiza en cada transición con base en las funciones Booleanas hasta llegar a un estado estacionario llamado atractor (Figura 4C) ⁶³.

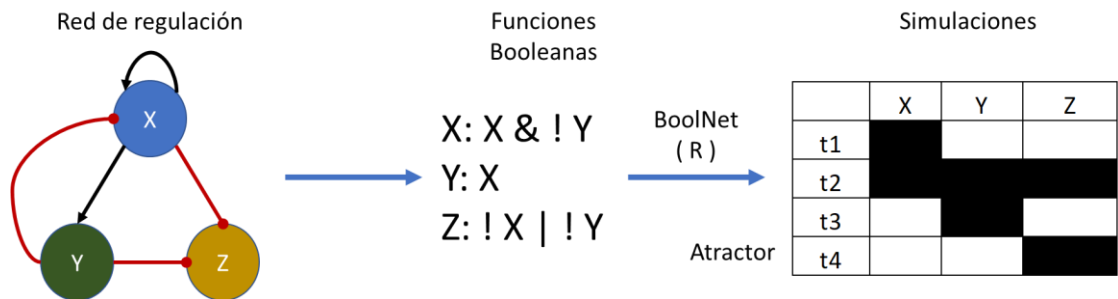


FIGURA 4. MODELO BOOLEANO DE REDES

A) Las redes de regulación son representaciones gráficas de las relaciones presentes en la red, están compuestas por los nodos, que simbolizan las entidades biológicas como genes, proteínas, intermediarios, etc. y las interacciones entre estas (positivas si favorecen la activación del nodo o negativas si la inhiben).

B) El dinamismo de la red de regulación está dado por las funciones Booleanas. A cada nodo le pertenece una función lógica, la cual establece que componentes de la red deben estar prendidos y/o apagados para que el nodo en cuestión se active. Las funciones Booleanas se rigen por los operadores “AND”, “OR” y “NOT” (representados por los símbolos &, | y !, respectivamente).

C) Las simulaciones de la red se realizan usando el paquete BoolNet (albergado en R) Boolnet ⁶⁴ en el entorno R studio [®]. En un modelo de actualización sincrónica el estado de todos los nodos se actualiza en cada transición a partir de las funciones lógicas (ejemplificadas como t1, t2, t3 y t4) hasta llegar a un estado estacionario llamado atractor.

Durante las simulaciones, la actualización de los estados de los nodos puede llevarse a cabo bajo esquemas sincrónicos o asincrónicos. En la actualización sincrónica cada función Booleana se aplica para establecer el estado de la siguiente transición (t+1, Figura 4C), permitiendo trazar la trayectoria de la simulación del inicio hasta llegar al atractor. Además, permite hacer análisis de cuencas de atractores, donde se obtienen todos los atractores obtenidos a partir todos los estados iniciales posibles (2^n , siendo n el número de nodos en la red) y sus proporciones. Los tamaños de las cuencas de atracción se asocian por la

probabilidad de tener relevancia biológica, permitiendo generar hipótesis sobre el proceso de decisión del sistema modelado⁶³. Algunas limitantes de este tipo de actualización son que presupone que todos los componentes del sistema se encuentran en concentraciones equivalentes, disponibles y que las reacciones que llevan a la activación de cada nodo se llevan a cabo a la misma velocidad, además de que en ocasiones se obtiene atractores cíclicos (repeticiones periódicas de dos o más transiciones) los cuales se consideran artefactos. A pesar de estas limitantes, se ha reportado que es un modelo útil, eficiente y confiable para analizar redes grandes en donde los atractores son fijos (compuestos por un solo estado) ⁶³⁻⁶⁶. Una variación de los modelos Booleanos con actualización sincrónica son los modelos probabilísticos, en estos, las variables tienen funciones alternativas, es decir, cada nodo tiene más de una función a la cual se le establece la probabilidad de suceder en cada estado de transición. Si bien, estas características incrementan el realismo biológico, el desarrollo de los modelos queda limitado a la existencia o generación de la información probabilística ⁶³.

En contraste con la actualización sincrónica, en la asincrónica, la actualización de los estados de los nodos no sucede simultáneamente en todas las transiciones, sino que, aleatoriamente sólo una función y su variable correspondiente se actualiza en cada punto de tiempo. Esta actualización estocástica se considera más representativa para los sistemas biológicos, sin embargo, debido a que sólo se obtiene una actualización por transición, no es eficiente para analizar redes grandes y los tiempos que llevan las simulaciones no son equiparables con la cinética biológica ⁶³.

Los BNM son herramientas útiles para estudiar redes biológicas grandes de alta complejidad, que permiten generar hipótesis (que pueden ser corroborados experimentalmente) sobre los procesos de decisión y trayectorias seguidas en diferentes escenarios genéticos y epigenéticos. Esta cualidad ha sido aprovechada para estudiar las dinámicas de supervivencia en contexto FA, donde a partir de modelos Booleanos se han explorado los mecanismos de regulación de las

proteínas del *check point* del ciclo celular, mejorando el entendimiento de los procesos de reparación del DNA ^{65,66}.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Recientemente, nuestro grupo secuenció el RNA mensajero de HSPC de 7 pacientes con FA y 5 individuos sanos con resolución unicelular (scRNA-seq, por sus siglas en inglés), donde se encontró que el gen *EPC1* está regulado a la baja en FA ⁶⁷. Este gen codifica para la proteína EPC1, la cual es parte del complejo acetil transferasa de nucleosoma H4 (NuA4) ^{59,68}. NuA4 es un complejo multimérico conformado por un módulo de reclutamiento a cromatina y un módulo con actividad acetil transferasa (también conocido como *piccolo* NuA4) unidos a través de EPC1 ^{59,68}. Durante la reparación de una DSB, NuA4, mediado por EPC1, acetila las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histona H4 y la lisina 15 de la histona H2A ^{69,70}. La acetilación de estas lisinas, especialmente la H4K16 y la H2AK15, más la unión al nucleosoma de MBTD1 (presente en *piccolo* NuA4) bloquean la unión de 53BP1 (proteína clave en la reparación por c-NHEJ) a la zona de daño y promueven la reparación por HR ^{59,60}.

Las células FA se caracterizan por sobre utilizar a la c-NHEJ para la reparación del daño, la cual es propensa a error, lo cual va acompañado por un incremento en el número de foci de 53BP1 en la cromatina con DNA dañado. Todo lo anterior sugiere que el reclutamiento asiduo de 53BP1 a la cromatina de las células FA podría deberse a la disminución transcripcional y consecuente ausencia de EPC1, con lo cual se promovería la reparación ineficiente de los ICL utilizando c-NHEJ.

JUSTIFICACIÓN

La inestabilidad cromosómica de las células deficientes en la vía FA/BRCA es producto del uso de vías de reparación de DSB propensas a error durante la reparación de ICL. Comprender la influencia de factores epigenéticos, como el complejo NuA4, en la selección de la vía de reparación de DSB, en contextos con una vía FA/BRCA funcional y en una vía FA/BRCA deficiente, permitirá entender

mejor las consecuencias celulares que tiene la regulación a la baja del complejo NuA4, y sus posibles implicaciones en el seguimiento clínico de los pacientes y/o propuestas de nuevos blancos terapéuticos.

HIPÓTESIS

La acetilación de histonas ejecutada por el complejo NuA4 favorece la reparación de enlaces covalentes cruzados (ICL) por la vía de recombinación homóloga (HR), fallas en la actividad acetiltransferasa de NuA4 promueve la utilización de vías de reparación alternas no fidedignas

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Describir la participación del complejo NuA4 durante la reparación de enlaces covalentes cruzados y rupturas de doble hebra en células deficientes en la vía FA/BRCA.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Aproximación biología computacional

1. Generar un modelo predictivo computacional de tipo Booleano para estudiar el papel del complejo NuA4 en la reparación de rupturas de doble hebra.

Aproximación experimental

1. Identificar la inducción del ensamblaje del complejo NuA4 durante la reparación de enlaces covalentes cruzados (ICL).
2. Describir cómo la interferencia en el ensamblaje del complejo NuA4 afecta a la reparación de ICL.
3. Determinar la vía de reparación favorecida durante la reparación de ICL en ausencia de NuA4.

4. Describir cómo afecta a la reparación de los ICL la deficiencia concomitante de la vía FA/BRCA y el complejo NuA4.

METODOLOGÍA

APROXIMACIÓN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

Revisión bibliográfica y reconstrucción de la red de decisión de la vía de reparación de DSB

Las DSB se puede reparar por al menos cuatro vías diferentes: la c-NHEJ, la HR, la MMEJ y la SSA. Estas vías tienen elementos que interactúan para promover o inhibir tres puntos de decisión que preparan al DNA para restablecer la continuidad de la molécula: I) resección corta de los extremos de la DSB, II) extensión de la resección de los extremos, III) invasión de la cromátida hermana (Figura 5).

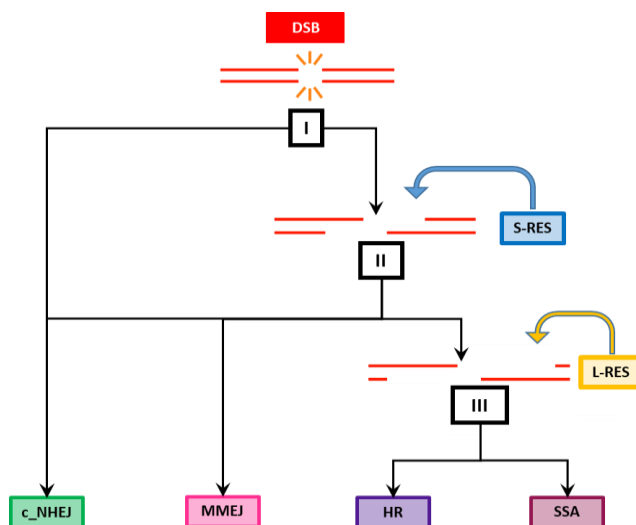


FIGURA 5. RESUMEN GRÁFICO DE LA RED DE REPARACIÓN DE LAS DSB

Descripción general de la red de reparación de DSB. La reparación de las DSB se puede llevar a cabo por al menos cuatro diferentes vías de reparación: c-NHEJ, MMEJ, HR o SSA. Aun cuando los resultados de las cuatro vías de reparación son muy diferentes, todas tienen el objetivo de restaurar la continuidad de la molécula del DNA. Los elementos de las cuatro vías de reparación interactúan generando una red parecida a un árbol de decisiones en el que se favorece o se inhibe:

- I. La unión directa de los extremos romos (que dirigiría la reparación hacia la c-NHEJ) o la resección corta del DNA que genera extremos cohesivos (S-RES).
- II. Restauración de los extremos romos de la DSB (dirige la reparación hacia c-NHEJ), alineación de micro homólogas (dirige a MMEJ) o extensión de la resección aumentando la longitud del DNA monocatenario (L-RES).

III. La invasión a la cromátida hermana (dirige a HR) o la alineación de las dos hebras que conduce a SSA.

c-NHEJ: Unión de extremos no homólogos canónico; MMEJ: unión de extremos por micro homología; HR: Recombinación homóloga; SSA: alineación de hebra sencilla.

Señalización de la DSB

La reparación del DNA inicia hasta que se da la alerta de que está dañado. Durante la reparación de las DSB hay dos eventos claves en la señalización del daño: 1) las cinasas ATM y DNA-PKc detectan el daño e inician una cascada de fosforilación, y 2) el heterodímero KU70/80 se une a los extremos de la ruptura para proteger el DNA ^{71,72} (Figura 6A).

La activación de ATM lleva a la fosforilación de proteínas de la DDR como CtIP, MRE11, EXO1 y BRCA1/FANCS ⁷¹. Además, la detección de la DSB induce la fosforilación de la serina 139 de la variante de histona H2AX en la ruptura ⁷³, misma que es propaga en la cromatina que rodea a la DSB (se estima que entre 1 y 2 Mb) ^{52,74}. A esta PTM se le conoce como γ H2AX, y su presencia se considera evidencia clara de la existencia de DSB. La γ H2AX funciona como sitio de anclaje para MDC1 (mediador de la DDR) ⁷⁵ que a su vez puede reclutar tanto a MRN (trímero compuesto por MRE11, RAD51 y NBS1), como a RNF8. Esta dualidad inicia la competencia por el procesamiento de los extremos de la DSB, ya que el reclutamiento del trímero MRN propicia la resección de los extremos de la DSB (generando extremos pegajosos), mientras que el establecimiento de RNF8 inicia la cascada de ubiquitinación en cromatina que promueve la llegada de proteínas asociadas a la c-NHEJ ^{74,75}(Figura 6B).

Resección de rango corto de los extremos de la DSB

La competencia por el procesamiento de los extremos de la DSB es un evento clave durante la DDR. KU70-80 protege los extremos, por lo que la activación de proteínas anti-resección favorecen su permanencia, mientras que el dímero es desalojado como consecuencia del procesamiento de los extremos. En este punto, los dos competidores más conocidos son 53BP1 y BRCA1/FANCS (Figura 6B).

El reclutamiento a cromatina de 53BP1 depende, inicialmente, de la presencia de dos histonas con PTM específicas a las que se puede anclar: la H4K20me2 y la H2AK15ub⁷⁶⁻⁷⁸. La primera, H4K20me2, se encuentra ampliamente distribuida en la cromatina, la cual queda expuesta y disponible para el reclutamiento de 53BP1 durante la DDR^{55,56}. Aunque no se considera una marca específica de daño, existen reportes que documentan un incremento en la actividad de SET8 y SUV4.10H1/2 (metiltransferasas de H4K20) durante el proceso de reparación del DNA^{76,79}. En contraste, la H2AK15ub es producto de una cascada de ubiquitinación consecuencia de la respuesta a la DSB. La cascada inicia con el reclutamiento de MDC1 a la cromatina (yH2AX), promoviendo la actividad ubiquitin-ligasa consecutiva de RNF8 y RNF168 que finaliza con la monoubiquitinación de la lisina 15 de la histona H2A^{78,80} (Figura 6B).

El establecimiento de 53BP1 en la cromatina aledaña a la DSB favorece la permanencia de KU70-80, facilitando la actividad de la DNA-PKc, Artemisa, XRCC4 y Ligasa 4, y, en consecuencia, la reparación por c-NHEJ (Figura 6B)^{81,82}. Sin embargo, el reclutamiento de 53BP1 puede ser entorpecido por la actividad de BRCA1/FANCS y NuA4, la cual está acotada a las fases S y G2 del ciclo celular. Por un lado, BRCA1/FANCS obstaculiza a 53BP1 a través de dos frentes: 1) facilita su desfosforilación, modificación necesaria para su permanencia en cromatina, y 2) permite el reclutamiento del remodelador de la cromatina SMARCD1, quien desplaza a 53BP1^{83,84}. A su vez, NuA4 acetila a los residuos H2AK15 y H4K16, bloqueando los sitios a los que 53BP1 se une^{60,61}.

BRCA1/FANCS, además, facilita la actividad enzimática del complejo compuesto por la asociación de MRN y CtIP (MRN-CtIP), quienes son responsables de iniciar la resección de los extremos de la DSB. MRN-CtIP tiene la característica de actuar como endo y exonucleasa y participa de dos maneras en el procesamiento de los extremos del DNA: 1) hace un corte sobre la hebra 5' del DNA cerca de la DSB, y 2) aprovecha ese corte como sitio de entrada para iniciar la resección del DNA (exonucleasa), con la característica de ir en dirección 3'→5' (es decir de río arriba de la DSB hacia el extremo roto). Esta acción resulta en la formación del

extremo cohesivo (S-RES) y, en consecuencia, la expulsión del extremo de KU70-80 (Figura 6C) ³³⁻³⁶. Además de ser el ejecutor del procesamiento de los extremos de la DSB, la activación de MRX (homólogo de MRN en levadura) provoca el reclutamiento del complejo NuA4, promoviendo la acetilación de histonas y el bloqueo de 53BP1 ^{60,61}.

Extensión de la resección

El segundo punto de decisión, durante la reparación de la DSB, aparece con la generación de la S-RES. En este momento el extremo 3' de DNA monocatenario puede ser blanco del complejo Shieldin (SHLD), PARP1-POLQ o de las nucleasas EXO1/BLM-DNA2, promoviendo la reparación por c-NHEJ, MMEJ o la extensión de la resección del DNA (L-RES), respectivamente (Figura 6C).

Hasta antes del descubrimiento del complejo multiprotéico SHLD, el establecimiento de la S-RES se consideraba un punto de no retorno en el que la posibilidad de reparación a través de la c-NHEJ quedaba impedida. Sin embargo, el paradigma se rompió cuando se describió que SHLD se puede unir a 53BP1 y, a través del complejo CST-Pol α , polimerizar la hebra complementaria del S-RES, reestableciendo los extremos romos de la ruptura. La restitución del DNA de doble cadena, así como el establecimiento de 53BP1, favorecen la participación de las proteínas asociadas a la c-NHEJ, las cuales unen los extremos romos, restituyendo la continuidad de la molécula del DNA ^{85,86} (Figura 6C). Sin embargo, la actividad de SHLD está limitada por la ATPasa TRIP13, que, durante la fases S/G2 del ciclo celular inhibe la formación del complejo, restringiendo la actividad de c-NHEJ ⁸⁷. En consecuencia, las exonucleasas de largo rango, como EXO1, reconocen el DNA monocatenario sobresaliente y, degradando en esta ocasión el DNA en dirección 5'→3', extienden la longitud del DNA monocatenario ³⁷ (Figura 6C).

En contextos con deficiencia en alguna de las dos principales vías de reparación (HR y c-NHEJ), PARP1 y POLQ reconocen y actúan sobre la S-RES, promoviendo la MMEJ ⁸⁸⁻⁹⁰. En la región dañada, PARP1 induce el reclutamiento de POLQ, quien, alinea las dos hebras de DNA monocatenario con base en la

complementariedad de entre 2 y 5 nucleótidos. Esto restaura la continuidad de la molécula, sin embargo, se produce el desplazamiento de la hebra donde, además, las regiones de DNA monocatenario no complementarias son removidas, generando deleciones, translocaciones cromosómicas e inserciones en el templado (Figura 6C) ^{42,91,92}.

Invasión de la cromátida hermana

En el curso hacia la reparación de la DSB por HR, el último punto de decisión está dado por la competencia por la L-RES. El DNA monocatenario en ese momento se encuentra recubierto y protegido de la degradación por el complejo proteico RPA, y puede ser blanco de RAD51 o RAD52, promoviendo la HR o SSA, respectivamente. Se espera, que en condiciones no alteradas se forme el complejo BRCA1/FANCS-PALB2/FANCN-BRCA2/FANCD1 y dirija el intercambio de RPA por la recombinasa RAD51. RAD51 guía la invasión y la búsqueda de homología en la cromátida hermana, conduciendo a la reparación por HR (Figura 6D) ^{93,94}.

Alternativamente, la ausencia de RAD51 permite que RAD52 actúe sobre la L-RES. De manera similar a lo ejecutado por POLQ, RAD52 conduce el alineamiento de las dos hebras de DNA monocatenario, sin embargo, en esta ocasión, la homología entre las hebras es de más de 30 pares de base restaurando la continuidad de la molécula. Durante la última etapa de la reparación por SSA, los extremos sobresalientes de las hebras que no fueron apareadas son escindidos por ERCC1-ERCC4, provocando deleciones en la secuencia del DNA (Figura 6D) ^{42,95}.

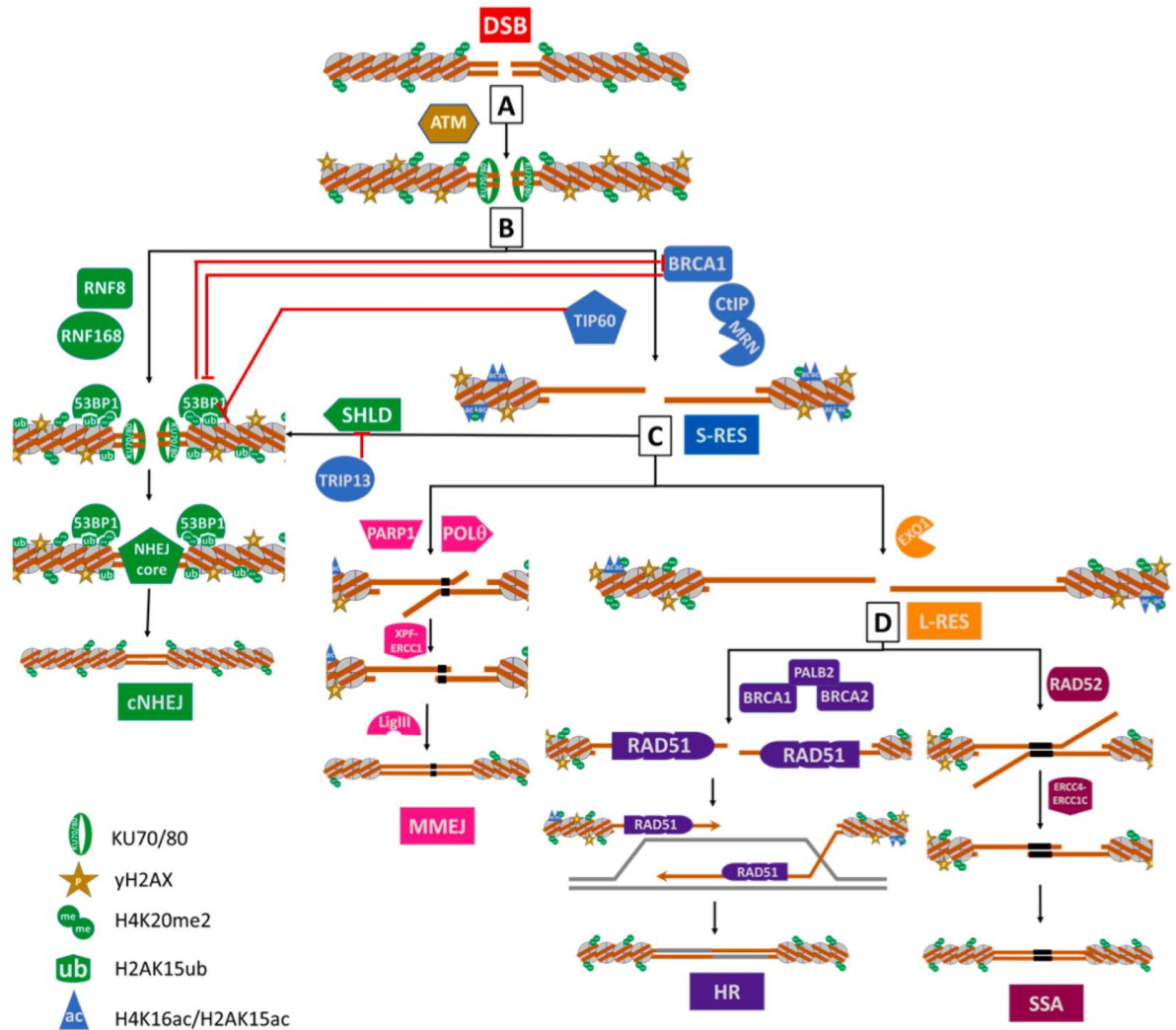


FIGURA 6. VÍAS DE REPARACIÓN DE LAS DSB.

A) La presencia de las DSB desencadena una reacción en cadena que protege la integridad del DNA y restaura la continuidad de la molécula. Tras la generación del daño, la activación de ATM inicia la señalización del daño y el reclutamiento a los extremos de la ruptura de KU70/KU80 protege de la degradación a la molécula. **B)** ATM fosforila a la variante de histona H2AX en la serina 139, marca conocida como γ H2AX, y propaga la señal, promoviendo el reclutamiento de proteínas de reparación. En este punto la ruptura puede tomar dos caminos: (*verde*) ser blanco de las proteínas asociadas a la c-NHEJ y reunir los extremos romos, o (*azul*) ser blanco de las nucleasas que generan una región corta de DNA monocatenario (S-RES). **C)** La generación de la S-RES es el segundo punto de decisión. (*Verde*) Si es blanco del complejo SHLD, se restauran los extremos romos y se favorece la c-NHEJ, mientras que (*rosa*) el reclutamiento de PARP1-POLQ guía la reparación a MMEJ y (*amarillo*) la activación de EXO1 extiende la resección del DNA (L-RES). **D)** Por último, el destino de la L-RES puede (*morado*) ser blanco de las proteínas que dirigen la reparación por HR o, en casos en que la HR no es funcional, (*guinda*) de RAD52, favoreciendo la reparación por SSA.

c-NHEJ: Unión de extremos no homólogos canónico; MMEJ: unión de extremos por micro homología; HR: Recombinación homóloga; SSA: alineación de hebra sencilla.

Modelación matemática de la red de reparación de la DSB

Con base en la literatura se seleccionaron los elementos relevantes para el desarrollo de las cuatro vías de reparación (HR, c-NHEJ, MMEJ y SSA) y se integraron en nodos. Los nodos son las variables que representan los componentes biológicos del sistema y están compuestos por una o más proteínas, elementos intermediarios de la reparación y las vías de reparación. A cada nodo se le asignó una función Booleana, la cual, establece los escenarios en los que el nodo puede activarse. Las reglas lógicas son representaciones matemáticas de las interacciones que se rigen por los operadores “AND”, “OR” y “NOT” (representados por los símbolos &, | y !, respectivamente), y establecen que nodos deben estar activos y/o inactivos para que el nodo en cuestión se active.

Las reglas lógicas se cargaron en el programa Boolnet ⁶⁴ en el entorno *R studio*, donde se realizaron las simulaciones del modelo en condiciones silvestres y mutantes. De cada simulación se obtuvieron trayectorias de reparación y cuencas de atracción ⁶³. A partir de estos resultados se retroalimentaron las reglas lógicas, ciclo que se repitió hasta obtener una red cuyas simulaciones recapitularan lo reportado previamente en la literatura. Durante el ciclo de retroalimentación se infirieron interacciones entre nodos las cuales no han sido reportadas previamente, estas inferencias son consideradas predicciones del modelo, las cuales pueden ser validadas experimentalmente.

APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

Los números de catálogos y casas comerciales de reactivos utilizados se encuentran detallados en el anexo 1.

Modelo celular e inducción de daño al DNA

Se emplearon tres líneas celulares durante la aproximación experimental de este trabajo: RPE (células epiteliales pigmentarias de la retina), GM6914+EV (referidas en el texto como FA-A, son fibroblastos derivados de pacientes con variantes patogénicas en *FANCA* ⁹⁶) y GM6914+A (referidas en el texto como WT,

son células isogénicas derivadas de los fibroblastos FA-A y que fueron corregidas mediante la incorporación de un plásmido que expresa el gen *FANCA*⁹⁷). Las tres líneas celulares se crecieron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (v/v), en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ a una temperatura de 37°C.

El daño al DNA se indujo empleando dos aproximaciones. La primera aproximación consistió en retar durante 10h las células con bleomicina (1µg/ml). La bleomicina, es un fármaco radio mimético que genera DSB, este tratamiento se utilizó para validar la predicción del modelo booleano. Por otro lado, los ICL fueron generados retando las células a tratamientos de 24h con el agente alquilante bifuncional MMC (20 o 10ng/ml, según se especifique en el experimento), permitiéndonos evaluar la relevancia de EPC1 durante la reparación de ICL.

Transfección de RNA interferente pequeño (siRNA) y RNAguía (sgRNA, CRISPR/Cas)

Las células se sembraron en cajas de 6 pozos, y al día siguiente se transfectaron con siRNA o sgRNA (números de catálogo en anexo 1). La interferencia del RNA de *TIP60/KAT5* consistió en lipofectar, 48 horas previo al reto con bleomicina, 25pmol de siRNA control (sin blanco en la célula, referido en el texto como scr) o contra el mRNA de *TIP60/KAT5*. Por otro lado, el *knock-out* de *EPC1* se logró lipofectando las células con el sgRNA contra el gen de *EPC1*. La selección de clonas se inició 48h posterior a la transfección en cajas de 96 pozos (se hizo el cálculo para que hubiera 0.6 células por pozo). Las clonas se expandieron y congelaron hasta seleccionar alguna en la que la presencia de EPC1 no fuera detectable a nivel de proteína (western blot).

Extracción de proteína total y cromatina

La extracción de proteína total se realizó incubando los botones de las células en buffer RIPA 1X durante 15min en hielo. Transcurrida el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad en frío (4°C) durante 15min. Los sobrenadantes se trasladaron a tubos nuevos y se almacenaron a -70°C hasta el momento de uso. La extracción de cromatina se realizó siguiendo las indicaciones

establecidas por el inserto del kit “Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells”. Al igual que con los extractos de proteína total, las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de uso.

Western Blot

Para la electroforesis se usaron geles de gradiente pre hechos (4-12%). Se cargaron 30ug de proteína total o 12ug de cromatina por pozo y se corrieron durante 2-2.5h a 120V. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 2h a 90V.

Las membranas se bloquearon durante 1h en leche al 5% (w/v) e incubaron durante la noche con el anticuerpo deseado a 4°C. Al día siguiente, se lavaron por 10 minutos con TBST 1X (3 veces), incubaron con el respectivo anticuerpo secundario (acoplado a HRP) durante 1h, se repitió el lavado y se revelaron con ECL y se capturaron en el fotodocumentador. El análisis densitométrico de las imágenes fue realizado a través del software ImageJ

Tras obtener las imágenes, las membranas se incubaron en stripping buffer para iniciar un nuevo ciclo de bloqueo, cada membrana se usó hasta 4 veces. El ensayo se hizo tres veces.

Inmunofluorescencia

Para las inmunofluorescencias, las células se sembraron directamente en cubreobjetos previo a ser tratadas con siRNAs y bleomicina, o MMC. Posterior a los respectivos tratamientos, las células fueron fijadas durante 10 minutos con formaldehído (2% v/v), permeabilizadas durante 10 minutos con tritón (10% v/v), bloqueadas durante 1h con suero normal de cabra (5% v/v) e incubadas con sus respectivos anticuerpos toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cubreobjetos fueron lavados durante 10min con PBS 1X (3 veces) e incubados durante 1h a 37°C con sus respectivos anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromo. Previo a montar en portaobjetos con VectaShield® y DAPI, los cubreobjetos fueron lavados durante 10min con PBS 1X (3 veces).

Se adquirieron imágenes de más de 100 células (distribuidas entre 10 y 20 distintos campos de cada cubreobjeto) usando el microscopio Zeiss Z1 ubicado en el laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría (INP). El análisis de intensidad de fluorescencia por núcleo se realizó utilizando el software ImageJ.

Ensayo de ligación por proximidad

Para las inmunofluorescencias, las células se sembraron directamente en cubreobjetos previo a ser tratadas MMC. Posterior a los respectivos tratamientos, las células fueron fijadas durante 10 minutos con formaldehído (2% v/v), permeabilizadas durante 10 minutos con tritón (10% v/v), bloqueadas durante 1h con suero normal de cabra (5% v/v) e incubadas con sus respectivos anticuerpos toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizó el PLA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente se montaron en portaobjetos con VectaShield® y DAPI.

Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio Zeiss Z1 ubicado en el laboratorio de citogenética del INP. El análisis de intensidad de fluorescencia por núcleo se realizó utilizando el software ImageJ.

Ensayo de aberraciones cromosómicas

Las células se sembraron y trataron con MMC (10ng/ml) durante 24h. A las 23h de tratamiento se adicionó al medio de cultivo Colcemid™ (concentración final 0.1ug/ml) durante 1h. concluido el tiempo de tratamiento, las células se levantaron, trataron durante 30min/37°C con solución hipotónica y fijaron con solución de Carnoy (metanol:ácido acético 3:1). Las laminillas se prepararon y tiñeron para posteriormente ser analizadas (cuantificación de rupturas cromosómicas y figuras radiales) en al menos 20 metafases.

Análisis estadístico

El análisis de la tendencia normal de los datos fue evaluada a través de la prueba D' Agostino-Pearson. Debido a que la tendencia de los datos obtenidos no siguió tendencia normal, los datos se compararon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis en el programa GraphPad Prism 7.

RESULTADOS

APROXIMACIÓN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

Reconstrucción de la red de reparación de DSB

Con base en la revisión bibliográfica, seleccionamos los elementos que participan en los puntos estratégicos de la decisión en la reparación de las DSB (resección corta de los extremos de la DSB, extensión de la resección de los extremos e invasión de la cromátida hermana, (Figura 4) y los agrupamos en 22 diferentes nodos. Cabe señalar que el modelo está diseñado para simular la reparación de las DSB durante las fases del ciclo celular S y G2, por lo que las PTM de proteínas (específicas de estas fases del ciclo celular) están consideradas (Tabla 2).

Las interacciones y las reglas lógicas para cada nodo se establecieron con base en la evidencia científica reportada en la literatura. Como resultado se generó una red de regulación con 142 interacciones (Figura 7, Tabla 3), de las cuales 17 no habían sido reportado previamente y son resultado de inferencias durante la construcción de la red, por lo que se consideran predicciones del modelo (líneas punteadas en Figura 7, fuente azul en la tabla 3).

TABLA 2. ELEMENTOS INCLUIDOS EN LOS 22 NODOS DE LA RED

	Nodo	Elementos incluidos en el nodo	Actividad
DSB	DSB	DSB	Ruptura de doble hebra
DDR	ATM	ATM	Fosforila efectores de la DSB
	γ H2AX	γ H2AX, MDC1	Amplifica la señal de la DSB
C-NHEJ	NHEJCore	KU70-KU80, DNA PKc, Artemis, LIGIV	Protección los extremos de la DSB Efectores de la c-NHEJ
	H2AK15_H4K20	RNF8, H1-Ub, RNF168, H2AK15Ub SET8, SUV4-20H1/2, accessible H2AK20me2	Sitio de anclaje en cromatina de 53BP1
	53BP1	53BP1-Ph, RIF1	Protección de los extremos de la DSB
	SHLD	REV7, SHLD1, SHLD2, SHLD3, CST complex, DNA POL α	Restaura extremos romos
	c-NHEJ		Reparación por c-NHEJ
S-RES	TRIP13	TRIP13	Inhibidor de SHLD
	BRCA1/FANCS	BRCA1/FANCS-BARD1, SMARCAD1	Facilita la S-RES e inhibe la actividad de 53BP1
	MRN-CtIP	MRN: MRE11-Ph, RAD50, NBS1-Ub CtIP: CtIP-Ph	Genera extremos 3' de DNA monocatenario (S-RES)
	NuA4	H4K16ac, H2AK15ac Complejo NuA4: Módulo de reclutamiento: TRRAP, P400, BRD8, YL1, RUBVL1/2, MRG15, MRGBP, hEaf6, DAMP, BAF53a, ACTIN, GAS41 Módulo HAT: EPC1, TIP60/KAT5, ING3, MBTD1	Obstaculiza reclutamiento de 53BP1 Facilita el intercambio de pRPA por RAD51 al L-RES
	sRES	<300 nt 3' DNA monocatenario, pRPA	Sustrato de SHLD, EXO1, y PARP1-POLQ
L-RES	EXO1	EXO1-Ph, BLM-DNA2	Aumenta la extensión de DNA monocatenario (L-RES)
	L-RES	>300 nt of 3' DNA monocatenario, pRPA	Sustrato de RAD51 y RAD52
HR	RAD51	BRCA2/FANCD1, PALB2/FANCN, BRCA1/FANCS, RAD51	Carga de RAD51 a DNA monocatenario y efectores de la HR.
	HR	Reparación precisa de la DSB, puede generar pérdida de heterocigocidad (LOH)	Reparación por HR
MMEJ	PARP1	PARP1	Facilita la reparación por MMEJ
	POLQ	POL θ , DNA LIGIII	Detecta micro homología (2 – 20 nt) en los DNA monocatenarios (S-RES)
	MMEJ	Re arreglos mutagénicos (inserciones/deleciones)	Reparación por MMEJ
SSA	RAD52	RAD52, ERCC4-ERCC1C	Alinea los extremos sobresalientes del DNA monocatenario (30 pb longitud aprox) y corta el DNA no apareado
	SSA	Deleciones largas	Reparación por SSA

Ph: Fosforilado me: Metilado
 Ub: Ubiquitinado ac: Acetilado

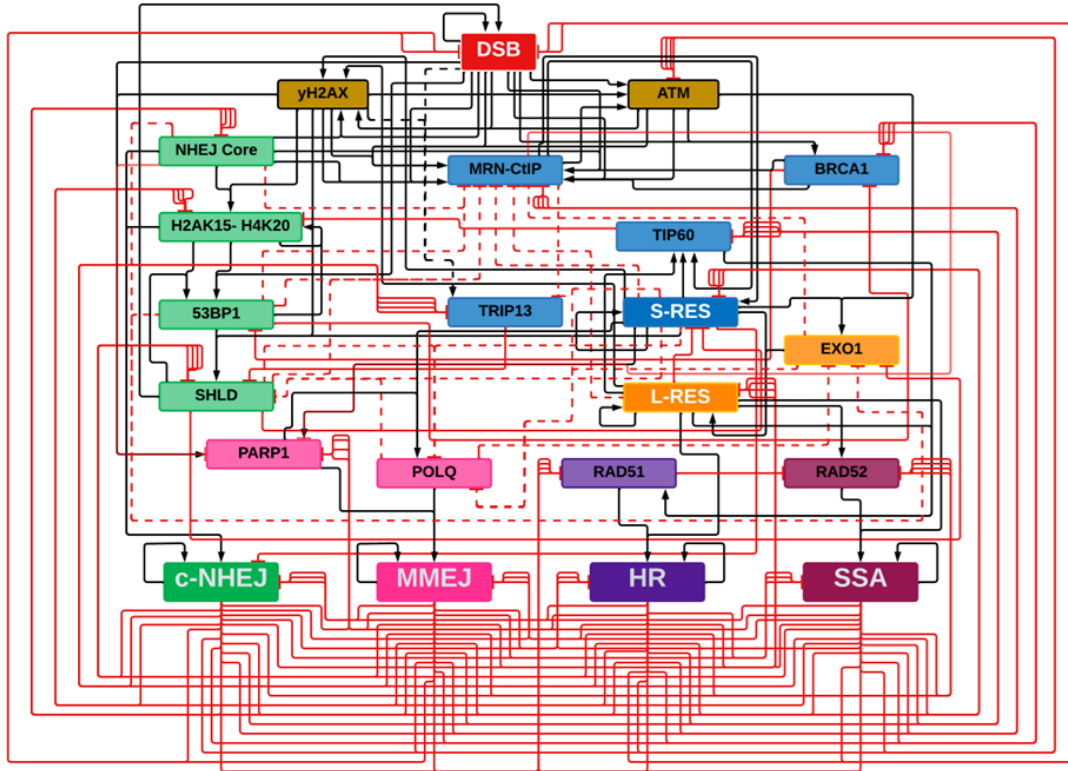


FIGURA 7. RED DE REGULACIÓN DE LA REPARACIÓN DE LAS DSB.

Reconstrucción de la red de reparación de las DSB. La red está compuesta por 22 nodos y 159 interacciones, cada nodo representa proteínas, complejos de proteínas o elementos de reparación esenciales para el funcionamiento de las vías de reparación c-NHEJ, MMEJ, HR y SSA. Los colores de los nodos indican los elementos asociados al daño en el DNA (rojo); la señalización del daño (café); a la S-RES (azul); a la L-RES (amarillo); c-NHEJ (verde); MMEJ (rosa), HR (morado) y SSA (guinda). Las interacciones positivas están indicadas con flechas negras, mientras que las negativas están representadas en rojo. Las líneas punteadas señalan las interacciones inferidas.

c-NHEJ: unión de extremos no homólogos canónica; MMEJ: unión de extremos mediado por microhomología; HR: Recombinación homóloga; SSA: Alineación de hebra sencilla. Creado en Lucidchart®

TABLA 3. REGLAS LÓGICAS Y BASE TEÓRICA QUE LAS SUSTENTA.

Al inicio de cada cuadro se encuentran las reglas lógicas de cada nodo, seguido de la descripción (y respectiva referencia) de la base teórica que llevó a la construcción de la regla. Las inferencias se encuentran identificadas con azul.

DSB: (DSB | SHLD) &! (sRES | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
DSB	Positivo		
	DSB	El DSB se mantiene activo hasta que la actividad endonucleasa procesa los extremos, generando extremos adhesivos de DNA monocatenario, y/o cuando se reparó el daño.	
	SHLD	El complejo SHLD sintetiza el DNA complementario y revierte la S-RES, llevando a la estructura inicial de la DSB (extremos romos).	85,86
	Negativo		
	sRES	La acción exonucleasa sobre los extremos del DNA cambia la estructura inicial de la DSB (de extremos romos a extremos adhesivos), la cual es renombrada como sRES	
	c_NHEJ, HR, MMEJ, SSA	La DSB no puede existir si ya fue reparada.	

ATM: (DSB | MRN_CtIP | γH2AX) &! (c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
ATM	Positivo		
	DSB	La presencia de ATM activa a ATM.	71,98
	MRN-CtIP	El complejo MRN recluta a ATM cuando hay rupturas en el DNA.	99,100
	γH2AX	Durante la reparación de las DSB existe un ciclo de retroalimentación entre la γH2AX y ATM. ATM fosforila a la H2AX y la presencia de γH2AX activa a ATM.	101
	Negativo		
	c_NHEJ, HR, MMEJ, SSA	La activación de alguna de las vías de reparación indica la reparación daño.	

γH2AX: ((DSB & (ATM | NHEJCore)) | (sRES | IRES))

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
γH2AX	Positivo		
	DSB & ATM	En presencia de la DSB, la H2AX puede ser fosforilada tanto por ATM como por DNA-PKc (ésta última es parte del nodo NHEJ Core).	73
	DSB & NHEJ Core		73,102
	sRES, IRES	La γH2AX se propaga y se mantiene alrededor de la zona de daño hasta que el DNA es reparado. De hecho, colocaliza con DNA monocatenario y proteínas de reparación a lo largo del proceso de reparación.	103-105

NHEJ Core: (DSB | SHLD) &! (sRES | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
NHEJ Core	Positivo		
	DSB	Las proteínas del NHEJ Core protege los extremos romos de la DSB e inicia la señalización de la DDR.	106,107

	SHLD	La actividad de SHLD recupera los extremos romos de la ruptura, lo que favorece la activación y reclutamiento del NHEJ Core.	85,86
	Negativo		
	sRES	La resección del DNA, producto de la actividad endonucleasa, expulsa de la ruptura a las proteínas agrupadas en el nodo del NHEJ Core.	108,109
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

H2AK15_H4K20: (((gH2AX & NHEJCore) & !(NuA4)) | (H2AK15_H4K20 & DYNLL1_53BP1)) & !(c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
H2AK15 H4K20	Positivo		
	yH2AX & NHEJ Core & ! NuA4	Las proteínas del NHEJ Core se unen a la yH2AX y promueven el establecimiento de las PTM H2AK20me2 Y H2AK15Ub. El proceso es obstruido por la actividad acetiltransferasa de NuA4.	56,60,79,110
	H2AK15_H4K20 & 53BP1	La unión a 53BP1 protege el mantenimiento de las PTM en cuestión.	76
	Negativo		
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

53BP1: (DSB | SHLD) & H2AK15_H4K20) & ! (BRCA1/FANCS)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
53BP1	Positivo		
	DSB & H2AK15_H4K20	La presencia de DSB induce el reclutamiento de 53BP1, quién se ancla a cromatina a través de las PTM H2AK15Ub y H4K20me2.	56,76,78,79
	SHLD & H2AK15_H4K20	La recuperación de los extremos romos, consecuencia de SHLD, restablece el sitio de anclaje de 53BP1 a través de H2AK15Ub y H4K20me2.	85
	Negativo		
	BRCA1/FANCS	53BP1 recruitment and activity is inhibited by BRCA1/FANCS.	83,84

SHLD: (53BP1 & yH2AX & sRES) & !(TRIP13 | (sRES & POLQ) | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
SHLD	Positivo		
	53BP1 & yH2AX & sRES	En la zona de la ruptura (señalizada por la yH2AX), SHLD se une a 53BP1, donde revierte la S-RES	85,86
	Negativo		
	TRIP13	TRIP13 inactiva a SHLD.	87
	sRES & POLQ	La S-RES no puede ser blanco simultaneo de POLQ y SHLD.	
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

cNHEJ: ((NHEJCore & 53BP1) | c_NHEJ) & ! (sRES | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
c-NHEJ	Positivo		

	NHEJCore & 53BP1	La reparación por c-NHEJ se concreta cuando los extremos de la DSB se encuentran protegidos y las proteínas asociadas a la c-NHEJ conducen a la ligación de los extremos romo. Eso requiere de la activación concomitante de las proteínas del NHEJ Core y 53BP1.	81,82,111
	c_NHEJ	Cuando el daño fue reparado por una de las vías, ésta no puede ser cambiada.	
	Negativo		
	sRES	La c-NHEJ requiere de extremos romo, por lo tanto, el procesamiento de los extremos (S-RES) es un antagonista de la c-NHEJ.	85,86
	HR MMEJ SSA	Si el daño ya fue reparado por alguna otra vía de reparación, la c-NHEJ no puede ser activada.	

TRIP13: (yH2AX & DSB) & !(MRN_CtIP |c_NHEJ | HR |MMEJ |SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
TRIP13	Positivo		
	yH2AX &DSB	Aun no hay mucha información sobre lo que induce el reclutamiento y permanencia de TRIP13, sin embargo, se ha detectado la presencia de TRIP13 tras la inducción a daño. Por lo que se sugiere que su reclutamiento podría ser inducido (directa o indirectamente) por la presencia de la DSB y la yH2AX.	112
	Negativo		
	MRN_CtIP	En etapas tempranas de la señalización del daño, TRIP13 interactúa con MRE11 (miembro del trímero MRN). Sin embargo, no se ha reportado si esta interacción puede interferir con la interacción de TRIP13 con SHLD.	112
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

BRCA1/FANCS: (DSB & ATM) & !(53BP1 | c_NHEJ | HR |MMEJ |SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
BRCA1/ FANCS	Positivo		
	DSB & ATM	ATM phosphorylates BRCA1/FANCS in reaction to DSB presence.	113
	Negativo		
	53BP1	53BP1 is an antagonist of BRCA1/FANCS.	114
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

MRN-CtIP: (DSB & ATM & (BRCA1/FANCS | yH2AX)) &!(sRES |IRES | (53BP1 & (SHLD |NHEJCore) |EXO1 | c_NHEJ | HR |MMEJ |SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
MRN CtIP	Positivo		
	DSB & ATM & BRCA1/FANCS	La presencia de la DSB activa la DDR y, en consecuencia, ATM fosforila a los miembros del complejo MRN-CtIP. Esto, junto con la presencia de BRCA1/FANCS, activan al complejo MRN-CtIP.	33,34,115-118

	DSB & ATM & γH2AX	La fosforilación de la γH2AX y CtIP mediada por ATM, tras la inducción de DSB, favorecen el reclutamiento de MRN.	114,119
	Negativo		
	sRES IRES	La sobre resección del DNA se evita descargando a MRN-CtIP de la cromatina (tras generación de extremos cohesivos de DNA).	118
	53BP1 & SHLD	La reconstitución de los extremos romos en la DSB, consecuencia de la presencia de 53BP1 y SHLD, interfiere con MRN-CtIP.	
	53BP1 & NHEJCore	MRN-CtIP is blocked when 53BP1 together with NHEJCore safeguard the DSB blunt ends.	
	EXO1	La acción exonucleasa de EXO1 sucede al de MRN-CtIP, amplificando la longitud de la resección. Por lo que, la presencia de EXO1 bloquea a MRN-CtIP.	
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

NuA4: (MRN_CtIP | sRES | IRES) & ! (c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
	Positivo		
NuA4	MRN_CtIP	Durante el proceso de reparación de DSB, el complejo NuA4 interactúa y es reclutado por MRN.	61
	sRES IRES	El complejo NuA4 permanece en la zona de daño y colocaliza con la γH2AX hasta que RAD51 es cargado.	61
	Negativo		
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

RES: (MRN_CtIP | sRES) & ! (IRES | SHLD | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
	Positivo		
sRES	MRN_CtIP	Los extremos de la DSB son procesados por la acción exonucleasa de MRN-CtIP, lo que genera un fragmento de DNA monocatenario (sRES).	33,115
	sRES	La sRES se mantiene como sRES hasta que alguna enzima actúe le modifique.	
	Negativo		
	IRES	La longitud de DNA monocatenario se incrementa tras la acción de exonucleasas de extensión (EXO1), transformando la sRES en IRES.	37,109
	SHLD	La acción de SHLD sobre el DNA monocatenario transforma los extremos cohesivo (sRES) en extremos romos (DSB).	85,86
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

EXO1: (ATM & sRES) & ! (53BP1 & NHEJCore) | SHLD | POLQ

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
EXO1	Positivo		

	ATM & sRES	La fosforilación de EXO1 es mediada por ATM. Al ser activada, EXO1 reconoce el extremo cohesivo 3' de DNA monocatenario (sRES).	37,109
	Negativo		
	53BP1 & NHEJCore	53BP1 y el NHEJ Core protege al DNA de la actividad de exonucleasas.	120
	SHLD	La actividad y presencia de SHLD sobre el DNA monocatenario (sRES) bloquea el reclutamiento de EXO1.	120
	POLQ	POLQ y EXO1 compiten por el mismo sustrato (sRES).	

IRES: ((sRES & EXO1) | IRES) & ! (HR | SSA | c_NHEJ | MMEJ)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
IRES	Positivo		
	sRES & EXO1	EXO1 reconoce el extremo cohesivo 3' de DNA monocatenario (sRES) y extiende la resección (IRES).	37,109
	IRES	La IRES se mantiene como IRES hasta que alguna enzima actúe le modifique.	
	Negativo		
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

RAD51, (IRES & TIP60) & !((RAD52 | SHLD | POLQ | HR)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
RAD51	Positivo		
	IRES & NuA4	En coordinación con el complejo NuA4, RAD51 es cargado al DNA monocatenario (IRES).	61,94
	Negativo		
	RAD52	RAD52 compite con RAD51 por la IRES durante la DDR.	121
	SHLD	SHLD es un antagonista de RAD51.	
	POLQ	La actividad de POLQ interfiere con la activación de RAD51.	90
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

HR: ((RAD51&IRES) | HR) & ! (c_NHEJ | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
HR	Positivo		
	RAD51&IRES	La IRES recubierta por RAD51 busca la región homóloga en la cromátida hermana, conduciendo al final de la reparación por HR.	94,122
	HR	Cuando el daño fue reparado por una de las vías, ésta no puede ser cambiada.	
	Negativo		
	c-NHEJ MMEJ SSA	Si el daño ya fue reparado por alguna otra vía de reparación, la HR no puede ser activada.	

PARP1: (((DSB & gH2AX) & ! NHEJCore) | (sRES & !(MRN_CtIP | SHLD))) & ! (c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
------	-------------	--------------	-------------

PARP1	Positivo		
	(DSB & γH2AX) &! NHEJCore	El reclutamiento de PARP1 al sitio de daño sucede rápido (marcado con la γH2AX), sin embargo, la presencia del NHEJ Core lo inhibe	89,123 124
	sRES &! MRN_CtIP	Se ha reportado que la sensibilidad a inhibidores de PARP incrementa en ausencia de CtIP, por lo que se sugiere que CtIP es un regulador negativo de PARP1.	125
	sRES &! SHLD	PARP1 y SHLD compiten por el mismo sustrato, por lo tanto, la presencia de SHLD evita la activación de PARP1.	
	Negativo		
	c-NHEJ MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

POLQ: (PARP1 & sRES) &! ((sRES & SHLD) |(EXO1 & sRES) | MMEJ)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
POLQ	Positivo		
	(PARP1 & sRES)	POLQ y PARP1 coordinan la alineación de los extremos cohesivos y conducen a la reparación por MMEJ.	90,126
	Negativo		
	sRES & SHLD	POLQ y SHLD comparten sustrato, por lo que, en la presencia de SHLD en la sRES bloquea la activación de POLQ.	
	EXO1 & sRES	POLQ y EXO1 comparten sustrato, por lo que, en la presencia de SHLD en la sRES bloquea la activación de POLQ.	
	MMEJ	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

MMEJ: ((PARP1 & POLQ) | MMEJ) &! (c_NHEJ | HR | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
MMEJ	Positivo		
	PARP1 & POLQ	POLQ y PARP1 coordinan la alineación de los extremos cohesivos y conducen a la reparación por MMEJ.	89,90
	MMEJ	Cuando el daño fue reparado por una de las vías, ésta no puede ser cambiada.	
	Negativo		
	c-NHEJ HR SSA	Si el daño ya fue reparado por alguna otra vía de reparación, la MMEJ no puede ser activada.	

RAD52: IRES &! (RAD51 | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
RAD52	Positivo		
	IREs	RAD52 se une a IRES.	95
	Negativo		
	RAD51	RAD51 es un antagonista de la activación de RAD52.	127
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	La respuesta al daño debe apagarse cuando se concretó la reparación.	

SSA: ((IRES & RAD52) | SSA) & !(RAD51 | c_NHEJ | HR | MMEJ)

Nodo	Reguladores	Base teórica	Referencias
SSA	Positivo		
	IRES & RAD52	La acción de RAD52 sobre la IRES conduce a la reparación por SSA.	95
	SSA	Cuando el daño fue reparado por una de las vías, ésta no puede ser cambiada.	
	Negativo		
	RAD51	RAD51 es un antagonista de la SSA.	127
	c_NHEJ HR MMEJ	Si el daño ya fue reparado por alguna otra vía de reparación, la SSA no puede ser activada.	

En el modelo que generamos la vía de reparación que se activa durante la reparación de las DSB es la HR

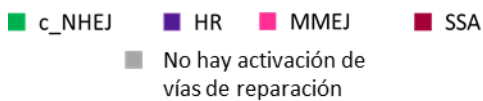
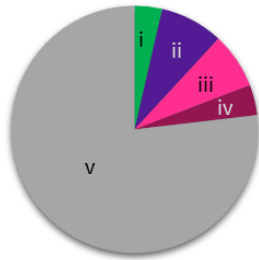
La validez del modelo depende, en parte de su capacidad de reproducir resultados biológicos previamente reportados, en este caso, la selección de la HR como vía de reparación preferencial durante la reparación de DSB.

A partir de las reglas lógicas establecidas en la Tabla 3 se simularon todos los estados iniciales posibles de la red (2^{22}) y se obtuvieron 5 cuencas de atracción (Figura 8A). El 23.1% de las simulaciones pertenece a cuatro de las cuencas obtenidas, las cuales están compuestas por todos los nodos apagados excepto alguna de las cuatro vías de reparación (Figura 8B, i-iv). El 76.9% restante, pertenece al atractor en el que todos los nodos se encuentran apagados (Figura 8B, v). Si bien, no se puede identificar los estados iniciales y trayectorias que conducen a éste atractor, se sugiere provienen de los estados iniciales en los que el nodo de la DSB no se encontró activo (en consecuencia no había nada que reparar) o de las simulaciones en las que dos vías de reparación se activaron simultáneamente (causando la inactivación mutua).

El análisis de trayectoria de la reparación de la DSB contexto silvestre (WT) se realizó iniciando la simulación con todos los nodos apagados (0) excepto el correspondiente a la DSB (1). El programa actualizó el estado de cada nodo en cada transición (simulación síncrona) hasta llegar al atractor. En la trayectoria se puede observar como la presencia de la DSB activa de manera secuencial a los nodos que representan la DDR (ATM y γ H2AX) y a las proteínas pro-resección (TRIP13,

BRCA1/FANCS, MRN_CtIP y NuA4), favoreciendo la transformación de los extremos romos de la DSB en un fragmento corto DNA de cadena sencilla (S-RES). S-RES es blanco de EXO1, quien se activa y extiende la resección (L-RES), generando el sustrato de las proteínas de recombinación representadas en el nodo de RAD51, concluyendo con la reparación por la HR (Figura 8C).

A) Cuencas de atracción



B) Atractores obtenidos

Attractor	Basin of attraction size (%)	DDR		c_NHEJ				S-RES				L-RES	HR	MMEJ	SSA								
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	NuA4	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
i	3.6																						
ii	8.3																						
iii	7.3																						
iv	4.0																						
v	76.9																						

C)

	DDR		c_NHEJ				S-RES				L-RES	HR	MMEJ	SSA									
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	NuA4	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							

FIGURA 8. EL MODELO REPRODUCE LA TRAYECTORIA DE LA REPARACIÓN DE DSB POR HR.

Atractores de punto fijo obtenido en condiciones basales. (A y B) Se obtuvieron cinco diferentes atractores tras simular todos los posibles estados de activación iniciales (2^{22}). Cuatro de los atractores pertenecen a alguna vía de reparación: (i) c-NHEJ, (ii) HR, (iii) MMEJ y (iv) SSA. La cuenca de atracción más grande pertenece a un atractor en el que ningún nodo está activo (v).

Trayectoria de reparación inducida por un pulso de DSB en contexto silvestre. (C) La simulación inició con un único nodo activo: DSB. La presencia de daño propició que la activación en cadena de las proteínas de señalización de daño al DNA (ATM y yH2AX), los elementos asociados a S-RES

(BRCA1/FANCS, MRN_CtIP) y L-RES (EXO1), para concluir con la activación de las proteínas de HR representadas en el nodo de RAD51 y la consecuente reparación por HR.

El daño constante se simuló cambiando los componentes de la regla lógica del nodo de la DSB (Tabla 3) por DSB= 1 (es decir, durante todas las simulaciones el DSB estará activo). Al hacer la simulación de todos los estados iniciales posibles (2^{21}) se obtuvieron cuatro cuencas de atracción. Todas compuestas por el nodo de la DSB y de alguna de las vías de reparación encendidos (Figura 9B). El 85.1% de las simulaciones finalizaron en la activación de HR (Figura 9A), mientras el 14.9% restante se repartió entre la c-NHEJ, MMEJ y SSA.

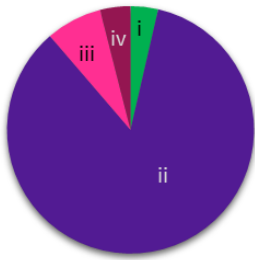
La trayectoria de reparación obtenida de la simulación de daño constante (DSB fijado en 1) fue similar a la observada tras el pulso de daño (Figura 8C), donde la presencia de la DSB desencadena la activación de los nodos representativos de la DDR, pro-resección corta y larga, culminando en la activación de la HR (Figura 9C).

Los resultados obtenidos de las simulaciones silvestres muestran que, en el contexto silvestre, las DSB son reparadas preferentemente por la vía fidedigna HR.

El contexto genético de las células altera la selección de la vía de reparación de DSB.

La activación de vías de reparación propensas a error sucede cuando elementos de pro HR se encuentran ausentes. Esto puede suceder a diferentes niveles de la reparación, como se ha observado en células deficientes en ATM, BRCA1/FANCS, EXO1 y RAD51. Realizamos simulaciones de las mutantes nulas de estos elementos, para evaluar si el modelo es capaz de reproducir los hallazgos biológicos previamente reportados. Las mutantes nulas de cada nodo fueron simuladas cambiando su regla lógica (Tabla 3) por 0 en un entorno de daño constante (DSB= 1)

A) Cuencas de atracción



■ c_NHEJ ■ HR ■ MMEJ ■ SSA

B) Atractores obtenidos

Attractor	Basin of attraction size (%)	DDR		c_NHEJ				S-RES				L-RES	HR	MMEJ	SSA							
		ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	NuA4	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
i	3.6																					
ii	85.1																					
iii	7.3																					
iv	4.0																					

C)

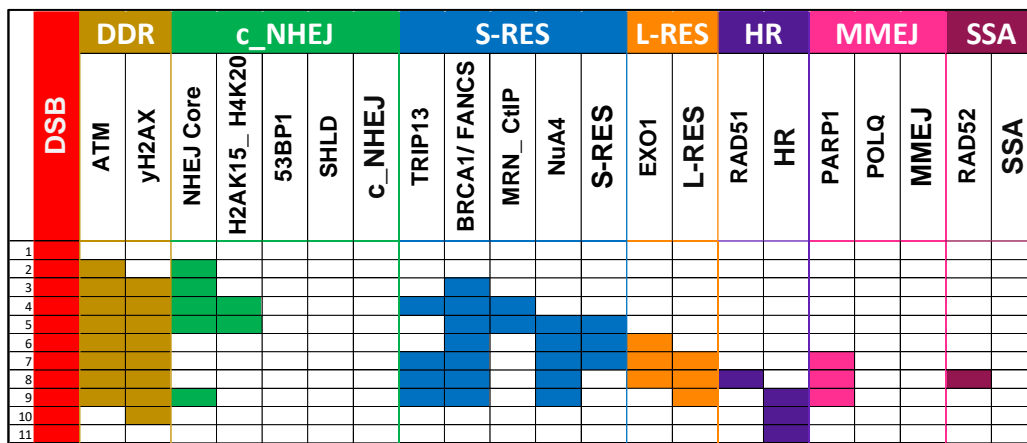


FIGURA 9. EL DAÑO CONTINUO FAVORECE LA REPARACIÓN POR HR.

Atractores de punto fijo obtenidos bajo daño continuo (DSB=1). (A y B) Se obtuvieron cuatro atractores a partir de la simulación de todos los posibles estados de activación iniciales (2^{21}) con el DSB=1. Todos los atractores tienen activo el DSB y alguna de las vías de reparación: (i) c-NHEJ, (ii) HR, (iii) MMEJ y (iv) SSA. En condiciones de daño continuo, la cuenca de atracción más grande fue la perteneciente a la HR.

Trayectoria de reparación inducida por daño constante (DSB=1) en contexto silvestre. (C) La activación constitutiva del daño (DSB=1) activa la vía HR.

Los nodos activos están representados por rectángulos con colores sólidos, mientras que los rectángulos blancos son los nodos inactivos.

La simulación de la mutante nula de *ATM* generó los mismos 4 atractores representativos de las vías de reparación observados en las simulaciones silvestres (Figura 9B). Sin embargo, el tamaño de las cuencas es distinta al de las simulaciones silvestres. Es notorio que la HR no tuvo la cuenca más grande, en contraste, el 80.9% de las simulaciones finalizaron con el atractor correspondiente a la c-NHEJ (Figura 10A). De la misma manera, la trayectoria simulada no favorece a la HR, sino que se observa la activación del NHEJ Core, seguida por el

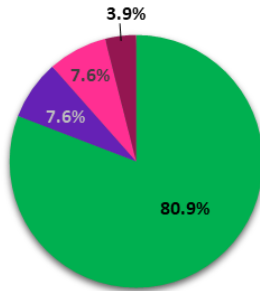
establecimiento del sitio de anclaje en cromatina de 53BP1 (H2AK15_H4K20) y el reclutamiento de este. La simulación finaliza tras la activación de la vía c-NHEJ (Figura 10B). Este resultado concuerda con lo observado en las células deficientes de ATM, en donde se reportó reducción en la resección de los extremos de la DSB e hiperactivación de la c-NHEJ ¹²⁸.

La interferencia de la resección corta, a través de la simulación de la mutante *BRCA1/FANCS* nula, también resultó en el incremento de la cuenca de atracción perteneciente a la c-NHEJ (Figura 10C). Sin embargo, a pesar de que, al igual que la mutante nula de *ATM*, más del 80% de las simulaciones culminaron en la activación de la c-NHEJ (Figura 10A), la trayectoria seguida durante la reparación de la DSB entre ambas mutantes difiere. Ante la ausencia de *BRCA1/FANCS* se observa cómo, tras la activación de los nodos pertenecientes a la DDR, se reclutan TRIP13, MRN_CtIP y TIP60, favoreciendo la resección de los extremos de la DSB. Sin embargo, la activación de SHLD revierte la S-RES, facilitando la reparación por c-NHEJ (Figura 10D). Este resultado es consistente con los reportes que indican que a pesar de que *BRCA1/FANCS* promueve y favorece la acción nucleasa sobre los extremos de la DSB, no es crucial para que se lleve a cabo la S-RES ^{129,130}. Además, se ha demostrado que en células deficientes en *BRCA1/FANCS*, la activación de 53BP1-SHLD promueve la reparación por c-NHEJ ⁸⁶.

Por otro lado, en ausencia de EXO1 se incrementó el tamaño de la cuenca correspondiente a la vía MMEJ por encima del 85% (Figura 11A). EXO1 es la nucleasa que genera la L-RES blanco de las proteínas de HR. En la simulación de la mutante nula de *EXO1* se observa cómo, tras la activación del nodo S-RES, PARP1 y POLQ se reclutan concluyendo la reparación por MMEJ (Figura 11B). El resultado concuerda con los hallazgos que muestran que existe disminución en la resección de largo rango y, en consecuencia, de HR cuando las nucleasas EXO1 o BLM están ausentes ¹³¹.

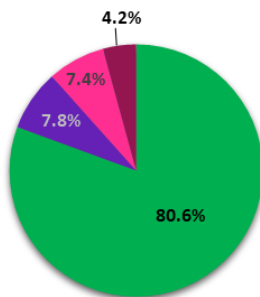
Cuencas de atracción

A)



Mutante nula de *ATM*

C)

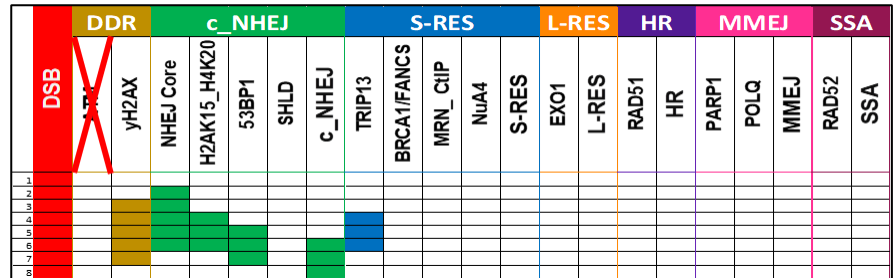


Mutante nula de *BRCA1/FANCS*



Trayectorias

B)



D)

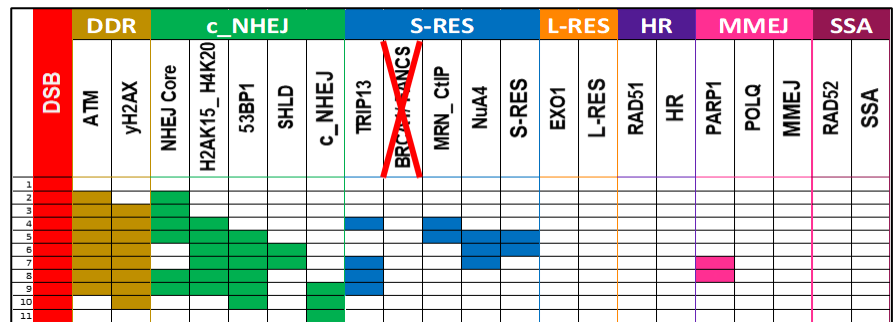


FIGURA 10. MUTACIONES NULAS EN *ATM* O *BRCA1/FANCS* FAVORECEN LA REPARACIÓN POR C-NHEJ.

La respuesta al daño de las mutantes nulas de *ATM* fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de *ATM* en 0. (A) La cuenca de atracción más grande en este contexto fue la c-NHEJ. (B) El análisis de trayectoria de las mutantes nulas de *ATM*, se observa que la ausencia de *ATM* previene de la activación de los nodos relacionados con S-RES, favoreciendo la activación de NHEJCore, 53BP1 y, consecuentemente, la reparación por c-NHEJ.

La respuesta al daño de las mutantes nulas de *BRCA1/FANCS* fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de *BRCA1/FANCS* en 0. (C) La vasija de atracción más grande en este contexto fue la c-NHEJ. (D) El análisis de trayectoria de las mutantes nulas de *BRCA1/FANCS* son capaces de activar la S-RES. Sin embargo, ante la ausencia de *BRCA1/FANCS*, 53BP1 y SHLD pueden ser reclutados, revertir la S-RES y promover la reparación por c-NHEJ.

Por último, el 82.6% de las simulaciones realizadas en durante la búsqueda de cuencas de atracción de la mutante nula de *RAD51*, culminaron en la activación de la vía de SSA (Figura 11C). La trayectoria de la reparación de la DSB en ausencia de *RAD51* mantuvo la secuencia de activación de la DDR, S-RES y L-RES. Sin embargo, este es el punto de inflexión, al no estar disponible *RAD51*, *RAD52* se activa y conduce la reparación hacia la SSA (Figura 11D). El resultado es esperado, ya que existe evidencia biológica que muestra a *RAD51* como un inhibidor de la

SSA, mientras que en ausencia de RAD51, RAD52 es un promotor del alineamiento de hebras ^{127,132}. Juntos, estos datos demuestran que el modelo reproduce comportamientos biológicos previamente descritos en la selección de vías de reparación de las DSB.

Se obtuvieron las cuencas de atracción y trayectorias de las mutantes nulas de todos los nodos en contexto de pulso de daño o daño continuo (anexo 2)

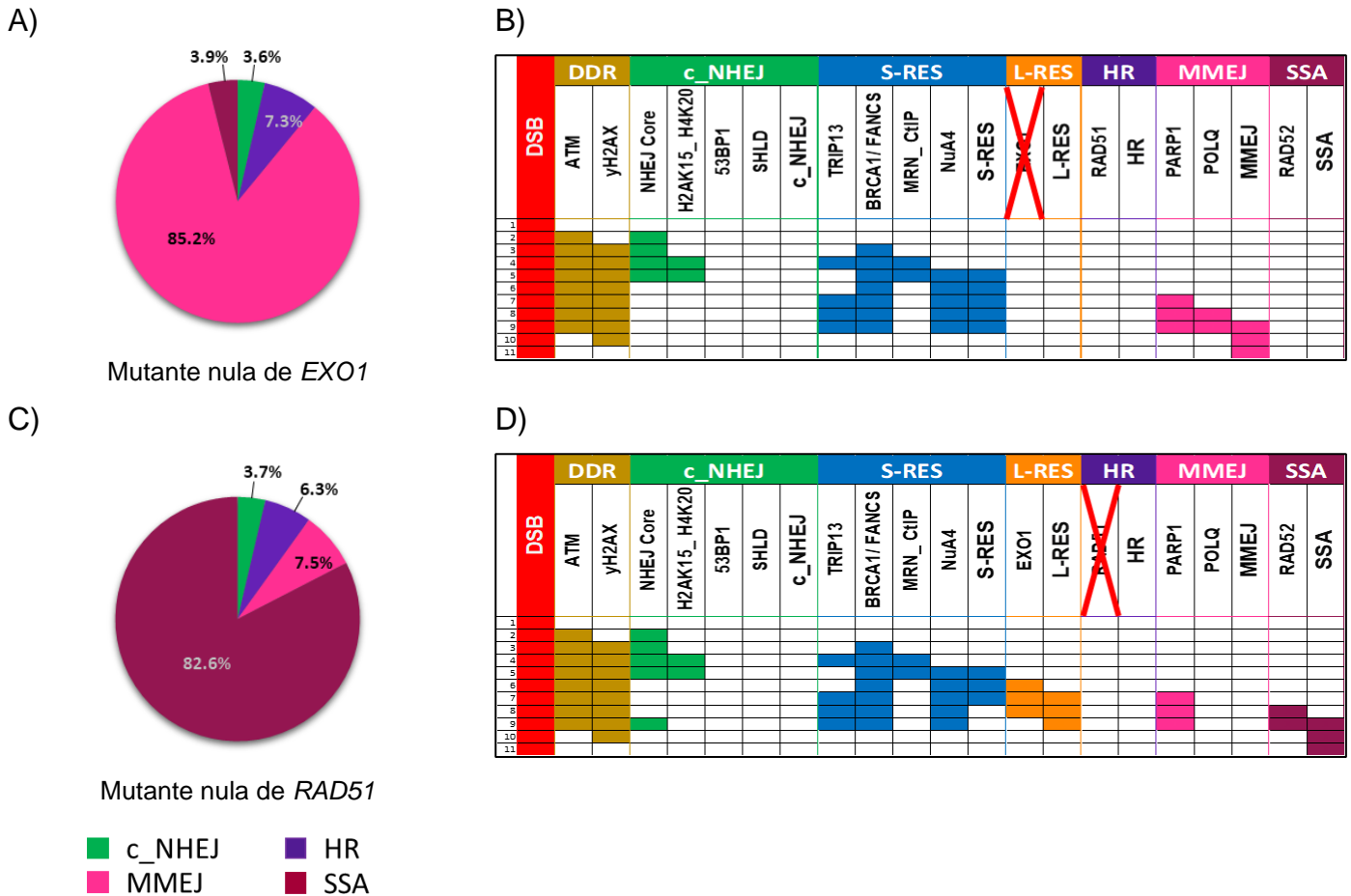


FIGURA 11. MUTACIONES NULAS EN *EXO1* O *RAD51* FAVORECEN LA REPARACIÓN POR MMEJ O SSA, RESPECTIVAMENTE.

La respuesta al daño de las mutantes nulas de *EXO1* fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de *EXO1* en 0. (A) La cuenca de atracción más grande en este contexto fue la MMEJ. (B) La trayectoria seguida muestra que la ausencia de *EXO1* evita que se pueda extender la resección (L-RES) favoreciendo la activación de PARP1, POLQ y, consecuentemente, la reparación por MMEJ.

La respuesta al daño de las mutantes nulas de *RAD51* fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de *RAD51* en 0. (C) La cuenca de atracción más grande en este contexto fue la SSA. (D) La trayectoria obtenida muestra que, en ausencia de *RAD51*, el DNA procesado (L-RES) es blanco de *RAD52*, favoreciendo la reparación por SSA.

Los nodos activos están representados por rectángulos con colores sólidos, mientras que los rectángulos blancos son los nodos inactivos.

Alteraciones en el contexto genético de las mutantes nulas *BRCA1/FANCS* modifican la selección de vías de reparación

Las células cancerosas con mutaciones en *BRCA1/FANCS* son deficientes en la vía HR, por lo que recurren a y se hacen dependientes de vías no fidedignas para reparar la DSB^{87,90,133,134}. Conocer la vía de reparación favorecida ante la falla en la HR ha sido de interés en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, que buscan bloquear la vía de reparación predilecta induciendo letalidad sintética^{135,136}. Sin embargo, la inestabilidad genómica consecuencia del uso recurrente de vías no fidedignas favorece la generación de nuevas mutaciones. Paradójicamente, estas mutaciones pueden matar o, como sucede con la restauración de la vía HR, darle ventajas de supervivencia a las células^{114,137}.

Se han reportado diferentes contextos genéticos en los que las células deficientes en *BRCA1/FANCS* mantienen o restauran la vía HR. Estos incluyen la ganancia de mutaciones que lleven a la sobreexpresión de *TRIP13* o la ausencia de *53BP1*. En contraste, la sobreexpresión de *POLQ* favorece la reparación por MMEJ. Para evaluar la capacidad del modelo para emular las interacciones y cambios en la selección de la vía de reparación en las mutantes dobles de *BRCA1/FANCS* (fijado en 0), se simuló la reparación de la DSB en un contexto de daño continuo (DSB fijado en 1) bajo la activación constitutiva de *TRIP13* (fijado en 1) o *POLQ* (fijado en 1) o la mutante nula de *53BP1* (fijado en 0).

La combinación de la mutante nula de *BRCA1/FANCS* con la activación constitutiva de *TRIP13*, resultó en la restauración de la vía HR. El resultado se observó tanto en la búsqueda de cuencas de atracción (El 85% de las simulaciones obtenidas culminaron en la activación de la HR), como en el análisis de trayectoria (Figura 12A). Resultado que contrasta con el obtenido en la mutante sencilla de *BRCA1/FANCS* donde la vía favorecida fue la c-NHEJ (Figura 10C), mientras que comparte similitud con trayectoria y predilección de la reparación de la DSB en contexto WT (Figura 9C), donde se activan secuencialmente la DDR, S-RES, L-RES

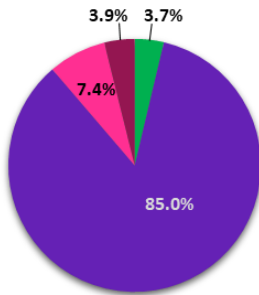
culminando con la activación de la HR. Al comparar las trayectorias obtenidas de la mutante de BRCA1/FANCS sencilla contra la doble, se observa que la presencia de TRIP13 evita la activación del nodo SHLD y, en consecuencia, el progreso de S-RES a L-RES (producto de la activación de EXO1), conduciendo el proceso a la HR (Figura 12B). Éste resultado reproduce lo previamente descrito en células cancerígenas deficientes en BRCA1/FANCS, donde la sobre expresión de *TRIP13* favorece la HR al inhibir a SHLD ⁸⁷.

La ausencia de concomitante de 53BP1 y BRCA1/FANCS resultó, al igual que en el caso previo, en la restauración de la HR como la cuenca de atracción más grande (85.3%). Sin embargo, el resultado no es producto de la inhibición directa de TRIP13 sobre el SHLD, sino que en la ausencia de 53BP1, el complejo no puede reclutarse a la zona de daño (Figuras 12C y D). La recuperación de la vía HR, como herramienta principal en la reparación de DSB en células cancerígenas deficientes en *BRCA1/FANCS* con pérdida de 53BP1, ha sido reportada como un marcador de mala respuesta/resistencia al tratamiento y se asocia con mal pronóstico ^{138,139}.

Por último, la sobre expresión de *POLQ* en contexto *BRCA1/FANCS* deficiente, contrario a lo observado en los dos mutantes previamente analizadas, puede representar un escenario positivo para pronóstico de supervivencia del paciente. Esto se debe a que la presencia constante de *POLQ* desvía la predilección a la c-NHEJ (favorecida en las mutantes *BRCA1/FANCS* sencillas) hacia la MMEJ. La hiperdependencia a la MMEJ generada representa un área de oportunidad terapéutica, ya que, interferir a la MMEJ en la doble mutante es letal ^{90,92}. Asertivamente, las simulaciones de nuestro modelo resultaron en lo previamente reportado tanto en la búsqueda de las cuencas de atracción (donde el 86% de las simulaciones concluyeron en la MMEJ) como en el análisis de trayectoria, donde se observa como la S-RES es blanco de PARP1 y *POLQ*, conduciendo a la reparación a hacia la MMEJ (Figuras 13A y B).

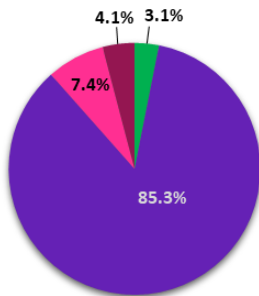
Cuencas de atracción

A)

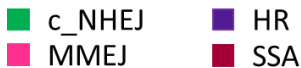


Mutante nula de *BRCA1/FANCS* y activación constitutiva de *TRIP13*

C)

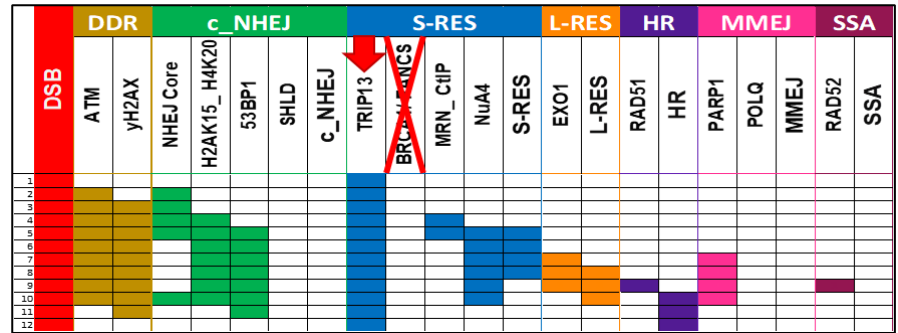


Mutante nula de *BRCA1/FANCS* y *53BP1*



Trayectorias

B)



D)

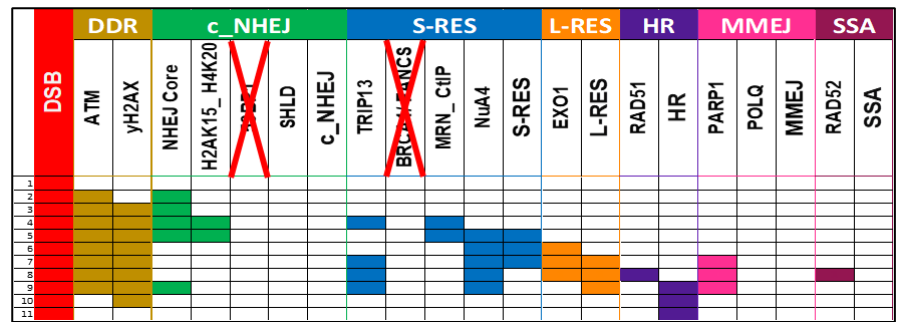


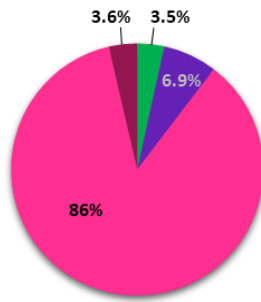
FIGURA 12. MUTACIONES SECUNDARIAS A *BRCA1/FANCS* PUEDEN RESTAURAR LA HR COMO VÍA PREFERENCIAL EN LA REPARACIÓN DE DSB.

La respuesta al daño de las doble mutantes nulas de *BRCA1/FANCS* y *53BP1* fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando los nodos de *BRCA1/FANCS* y *53BP1* en 0. (A) La cuenca de atracción más grande en este contexto fue la HR. (B) La trayectoria obtenida muestra que la ausencia de *53BP1* previene la activación de SHLD observada en las mutantes simples de *BRCA1/FANCS*, promoviendo la activación consecutiva de S-RES, L-RES y restaurando la HR.

La respuesta al daño de las mutantes nulas de *BRCA1/FANCS* con *TRIP13* constitutivamente activo fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de *BRCA1/FANCS* en 0 y el nodo de *TRIP13* en 1. (A) La cuenca de atracción más grande en este contexto fue la HR. (B) La trayectoria obtenida muestra que la activación constitutiva de *TRIP13* inhibe la activación de SHLD observada en las mutantes simples de *BRCA1/FANCS*, promoviendo la activación consecutiva de S-RES, L-RES y restaurando la HR.

En conjunto, estos resultados demuestran la capacidad de nuestro modelo para representar la vía de reparación favorecida en diferentes y complejos contextos genéticos, validando su capacidad de reproducir distintos escenarios biológicos.

A)



Mutante nula de *BRCA1/FANCS* y activación constitutiva de *POLQ*



B)

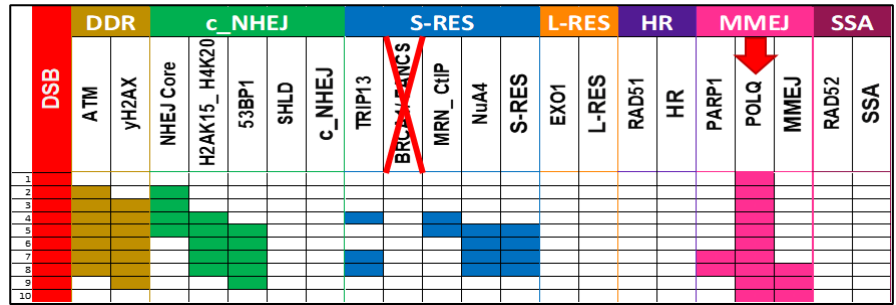


FIGURA 13. LA SOBREENEXPRESIÓN DE *POLQ* EN LAS MUTANTES NULAS DE *BRCA1/FANCS* PROMUEVE A LA MMEJ COMO LA VÍA PREFERENTE DE REPARACIÓN DE DSB.

La respuesta al daño de las mutantes nulas de *BRCA1/FANCS* con *POLQ* constitutivamente activo fueron simuladas en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de *BRCA1/FANCS* en 0 y el nodo de *POLQ* en 1. (A) La cuenca de atracción más grande en este contexto fue la MMEJ. (B) La trayectoria obtenida muestra que la activación constitutiva de *POLQ* establece un escenario que favorece la reparación por MMEJ, donde el DNA procesado (S-RES) es blanco de la polimerasa (*POLQ*) antes de que SHLD pueda activarse.

Los nodos activos están representados por rectángulos con colores sólidos, mientras que los rectángulos blancos son los nodos inactivos.

La selección de la vía de reparación de DSB es modificada en ausencia del complejo acetil transferasa NuA4

El DNA nuclear pertenece, es organizado y regulado por la cromatina, por lo que esta estructura nucleoprotéica participa activamente en la reparación de las DSB. Dentro de los reguladores epigenéticos que influyen en la reparación del DNA, la participación de las PTM de las histonas, así como la de sus escritores y lectores, ha sido ampliamente estudiadas, razón por la cual, el modelo les incluye en dos nodos. Por un lado, exploramos el resultado de mantener constitutivamente presentes a la H2AK15ub-H4K20me2 (fijando el nodo en 1), y por otro, simulamos la respuesta ante la ausencia del complejo acetil transferasa NuA4 (fijando el nodo en 0).

El reclutamiento a cromatina de 53BP1 requiere de la presencia concomitante de H2AK15ub y H4K20me2. El resultado de simular la activación

constitutiva del nodo que representa ambas PTM, preestableció el contexto epigenético necesario para el rápido reclutamiento de 53BP1, favoreciendo la reparación de las DSB por c-NHEJ. La activación de c-NHEJ sobre la HR (obtenida en las simulaciones WT, (Figura 9C) se obtuvo en 80.8% de las simulaciones, adicionalmente, la trayectoria de reparación generada en este contexto muestra el rápido reclutamiento de 53BP1, conduciendo a la c-NHEJ 4 transiciones (Figuras 15A y B). Este resultado reconstruye el incremento en la actividad de la c-NHEJ resultado de la sobreexpresión de *RNF168*, gen que codifica a la ubiquitin ligasa que durante la reparación de DSB ubiquitina a la H2AK15¹⁴⁰. En el modelo RNF168 se encuentra incluido en el nodo H2AK15ub-H4K20me2 (Tabla 2).

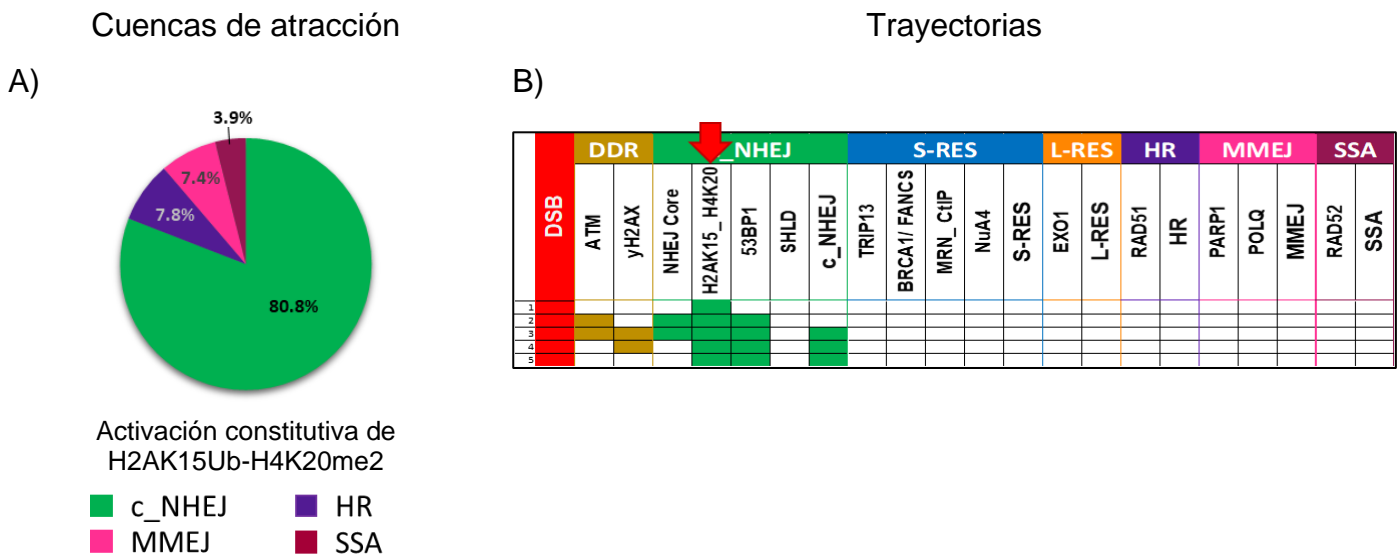


FIGURA 14. LA ALTERACIÓN EN EL EQUILIBRIO EPIGENÉTICO MODIFICA LA TRAYECTORIA Y VÍA DE REPARACIÓN DE DSB.

La activación constitutiva de las PTM H2AK15Ub y H4K20me2 fue simulada en un contexto de daño continuo ($DSB=1$) fijando el nodo de H2AK15_H4K20 en 1. (A) La cuenca de atracción más grande alcanzada en este contexto fue la c-NHEJ. (B) La trayectoria obtenida muestra que la preexistencia de las PTM H2AK15Ub y H4K20me2 establecen el sitio de anclaje de 53BP1, quién es reclutado a cromatina desde la transición 2, favoreciendo la reparación por c-NHEJ.

Los nodos activos están representados por rectángulos con colores sólidos, mientras que los rectángulos blancos son los nodos inactivos.

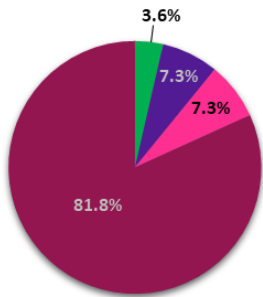
Se ha descrito al complejo NuA4 como un antagonista del reclutamiento de 53BP1, ya que, al acetilar los residuos de histonas H4K16 y H2AK15, bloquea su sitio de anclaje a cromatina. Pérdidas en el funcionamiento de NuA4 reducen la

actividad de HR, proponiendo a la acetiltransferasa como un complejo anti-c-NHEJ^{60,78,141,142}. Congruente con lo reportado, la ausencia de NuA4 resultó en la disminución del tamaño de la cuenca de atracción perteneciente a la HR. Sin embargo, la preferencia de la vía no mudó hacia la c-NHEJ, sino hacia la SSA (Figuras 15A y B). El análisis de trayectoria permite hipotetizar las razones que podrían estar llevando a este resultado. En la Figura 15 se observa que el reclutamiento de 53BP1 no depende únicamente de la presencia y permanencia de las PTM en cromatina favorecida por la ausencia de NuA4, sino de la participación de otros elementos de la red. En este caso, la activación de BRCA1/FANCS bloquea a 53BP1, promoviendo la resección de los extremos de la DSB y la consecuente activación del nodo S-RES. No obstante, la ausencia de NuA4 impactó en las últimas etapas de la reparación, donde favoreció la activación de RAD52 sobre la de RAD51, conduciendo a la SSA. Este resultado genera una hipótesis en la que extiende el papel de NuA4 durante la reparación de DSB más allá de la acetilación de histonas, sugiriéndole, además, como un antagonista de la SSA.

Para comprobar la hipótesis generada por el modelo, interferimos la actividad acetiltransferasa del complejo e indujimos DSB en un modelo celular. Usando un siRNA específico contra el mRNA de *TIP60/KAT5*, que codifica para la proteína con actividad acetiltransferasa NuA4 (Tabla 2), interferimos la actividad enzimática del complejo y retamos con un fármaco clastogénico (bleomicina) para evaluar la respuesta ante DSB. Tras el tratamiento de 10h de bleomicina evaluamos si la regulación a la baja de *TIP60/KAT5* impactaba en la presencia de γ H2AX y RAD52, y observamos el incremento de ambos marcadores en las células tratadas con el siRNA por inmunofluorescencias (Figuras 15C y D), confirmando que la interrupción de la acetiltransferasa interfiere con la reparación de las DSB. Por un lado, el aumento en la señalización de γ H2AX, indica una mayor presencia de DSB no reparadas, mientras que el incremento de la presencia de RAD52 correlaciona con la predicción del modelo, implicando el favorecimiento de la vía de SSA para reparar DSB en ausencia de *TIP60/KAT5*. Estos experimentos validan la predicción de nuestro modelo, indicando que es una herramienta confiable para predecir la vía de reparación favorecida en diferentes escenarios biológicos.

Cuencas de atracción

A)

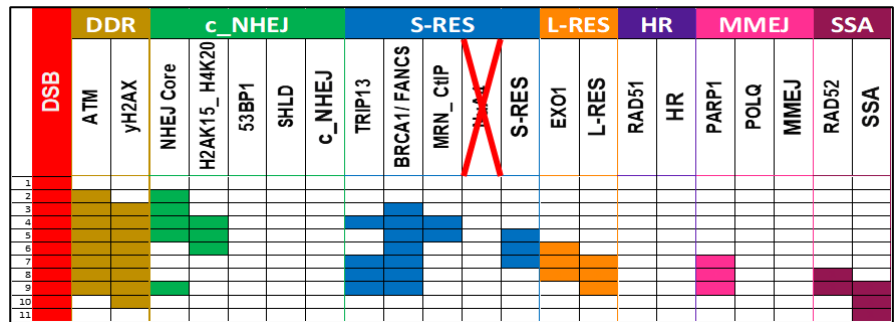


Mutante nula de NuAA4

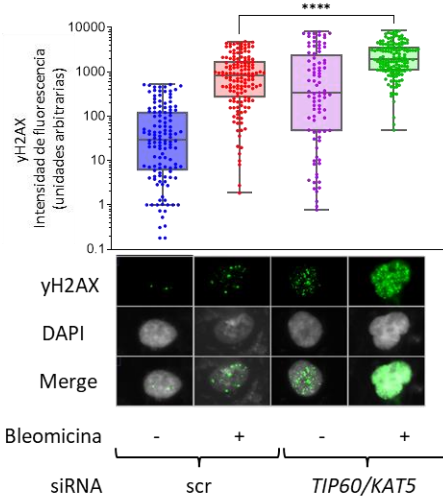


Trayectorias

B)



C)



D)

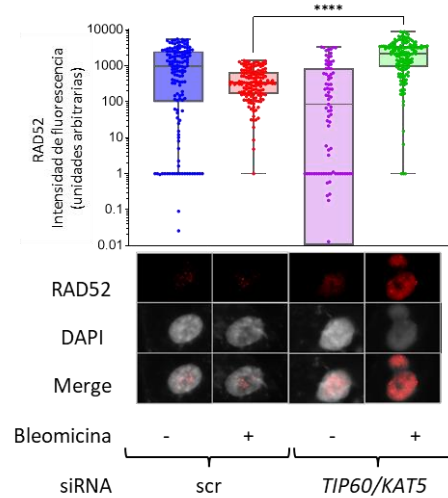


FIGURA 15. LA DEFICIENCIA DE NUA4 SE FAVORECE EL ESTABLECIMIENTO DE RAD52, Y EN CONSECUENCIA SE FAVORECE LA REPARACIÓN POR SSA.

La inhibición de la acetilación mediada por el complejo NuA4 fue simulada en un contexto de daño continuo (DSB=1) fijando el nodo de NuA4 en 0. (A) La cuenca de atracción más grande alcanzada en este contexto fue la SSA. (B) La inhibición de NuA4 altera la reparación de la DSB hacia el final de la trayectoria, donde la L-RES es blanco de RAD52 en lugar de RAD51, cambiando la preferencia por la vía SSA.

(C) La interferencia en la expresión de *TIP60/KAT5* (unidad con actividad acetil transferasa de NuA4) incrementa la señalización de DSB observada por yH2AX en células RPE tratadas con bleomicina.

(D) La interferencia de la expresión de *TIP60/KAT5* (unidad con actividad acetil transferasa de NuA4) incrementa la presencia observada de RAD52 en células RPE tratadas con bleomicina.

Los nodos activos están representados por rectángulos con colores sólidos, mientras que los rectángulos blancos son los nodos inactivos.

****p<0.0001

APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

La formación del complejo NuA4 aumenta en presencia de ICL en el DNA

La participación del complejo NuA4 en la reparación del daño al DNA ha sido descrita en sistemas en los que se inducen DSB empleando endonucleasas, radiación gamma, radiación ionizante o inhibidores de topoisomerasas ^{60,141,10}. Estos métodos inducen de manera directa las DSB, sin embargo, no hay evidencia de la participación del complejo NuA4 durante la reparación de ICL. Por lo que evaluamos si la formación del complejo se favorece tras el reto con MMC (20ng/ml durante 24h).

Con anticuerpos específicos contra P400 y TIP60/KAT5 identificamos los módulos de reclutamiento y HAT del complejo NuA4, respectivamente (Figura 16A). Usando el PLA evaluamos la formación del complejo en células WT y FA, donde observamos que en las células tratadas incrementa la interacción P400-TIP60/KAT5. El resultado apunta a que el ensamblaje del complejo NuA4 es inducido como respuesta a la presencia de ICL (Figura 16B).

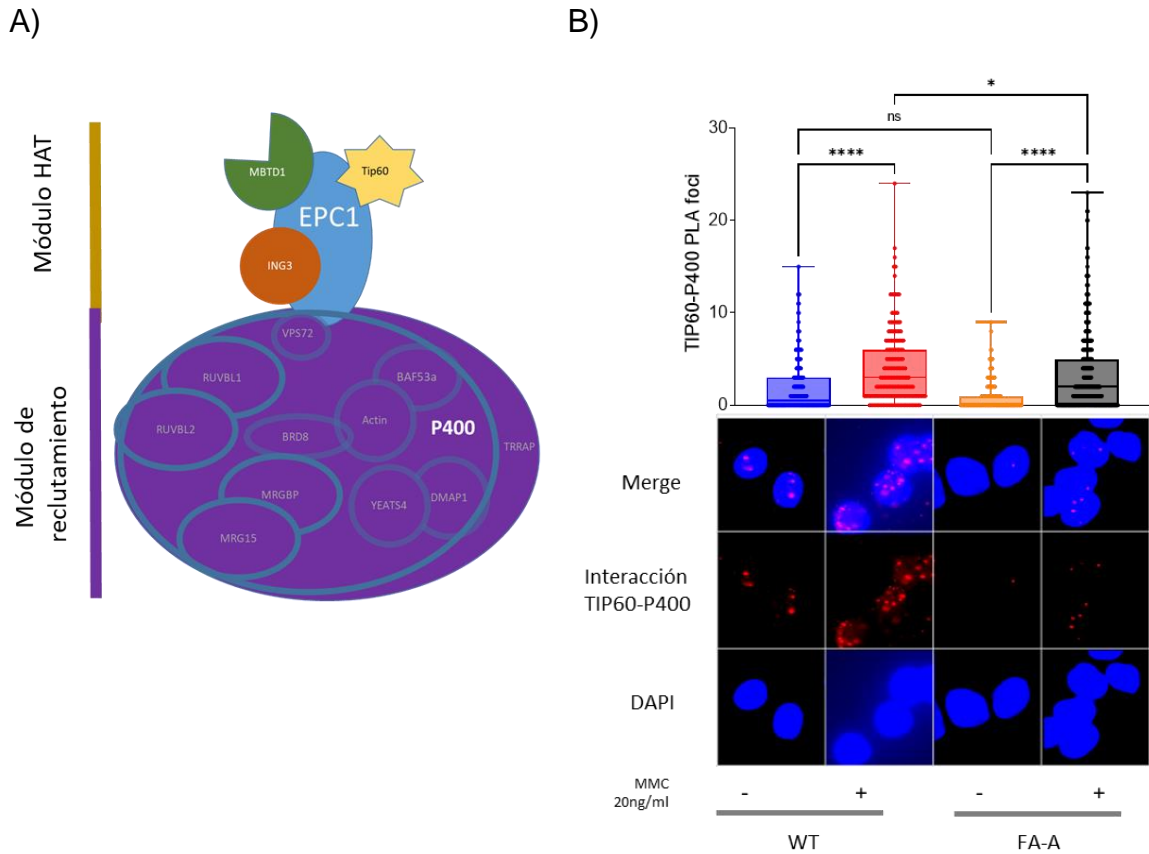


FIGURA 16. LA PRESENCIA DE ICL INDUCE EL ENSAMBLAJE DE NUA4

A) Representación gráfica del complejo NuA4. NuA4 es un compuesto multiprotéico donde las proteínas se agrupan en dos módulos: el módulo de reclutamiento (entre las proteínas que contiene se encuentra p400) y el módulo con actividad HAT (entre las proteínas que contiene se encuentra TIP60/KAT5). Los módulos se conectan a través de EPC1.

B) El ensamblaje del complejo NuA4 se induce durante la reparación de ICL. La interacción de p400 (proteína presente en el módulo de reclutamiento) y TIP60/KAT5 (proteína presente en el módulo HAT), evaluada a través del PLA, incrementa tras el reto con MMC. Las células AF tiene una baja expresión de EPC1, debido a lo cual, el ensamblaje del complejo NuA4 es menor en comparación con las células AF.

* $p < 0.1$, **** $p < 0.0001$

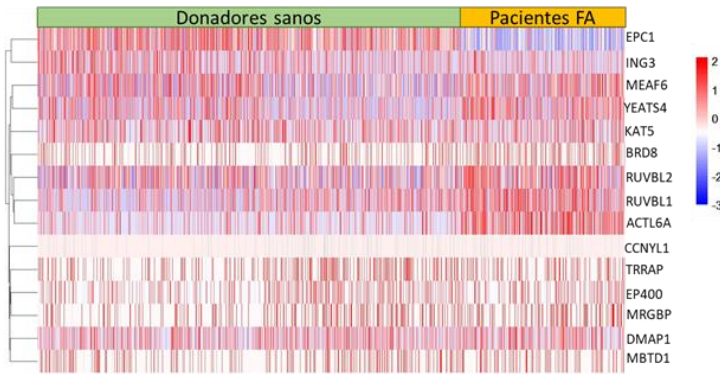
El proceso de reparación de ICL se ve afectado ante la ausencia de EPC1

Recientemente, Rodríguez y colaboradores ⁶⁷ realizaron la secuenciación unicelular de RNA (sc-RNAseq) de HSPC de individuos sanos y pacientes con FA. Dicho conjunto de datos fue reanalizado para este proyecto, dentro de los transcritos desregulados en las HSPC de los pacientes con FA, encontramos algunos genes

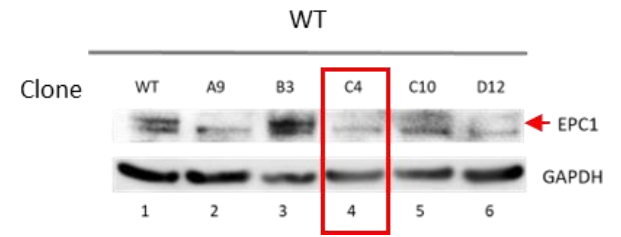
que codifican a proteínas del complejo reclutador de NuA4 como *MEAF6*, *YETS4*, *RUVBL1*, *RUVBL2* y *ACTL6A* sobre-expresados. Sin embargo, el transcrito con mayor diferencia significativa es *EPC1*, el cual se encuentra sub-expresado en las células de los pacientes con FA (Figura 17A). La proteína codificada por *EPC1* (también nombrada EPC1), es el puente que une al módulo reclutador con el módulo HAT del complejo (Figura 16A), por lo que su ausencia interfiere con el ensamblaje y actividad del complejo NuA4 en la reparación de DSB¹⁴². Tomando esto en cuenta nos preguntamos si la ausencia de EPC1 también afectaría la actividad del complejo en la reparación de ICL. Usando CRISPR-Cas9 generamos el *knock-out* de *EPC1* en una línea celular con la vía FA/BRCA funcional (WT) y seleccionamos una clona con ausencia de la proteína EPC1 para continuar los experimentos (Figura 17B).

Las células deficientes para EPC1 mostraron un incremento en la presencia de DSB, señalizadas por la presencia en cromatina de la γ H2AX, tras el reto con MMC (Figuras 17C y D, anexo III.a). Indicando que EPC1 es necesario para la reparación eficiente de ICL. Aunado a esto, al comparar el número de aberraciones cromosómicas observamos que la ausencia de EPC1 incrementa la inestabilidad cromosómica de las células (Figura 17E). Cabe destacar, que, si bien la mutación en *EPC1* tuvo un impacto en el aumento en el número de aberraciones cromosómicas, éste no alcanza la severidad observada ante la disfunción de la vía FA/BRCA (Figura 17E).

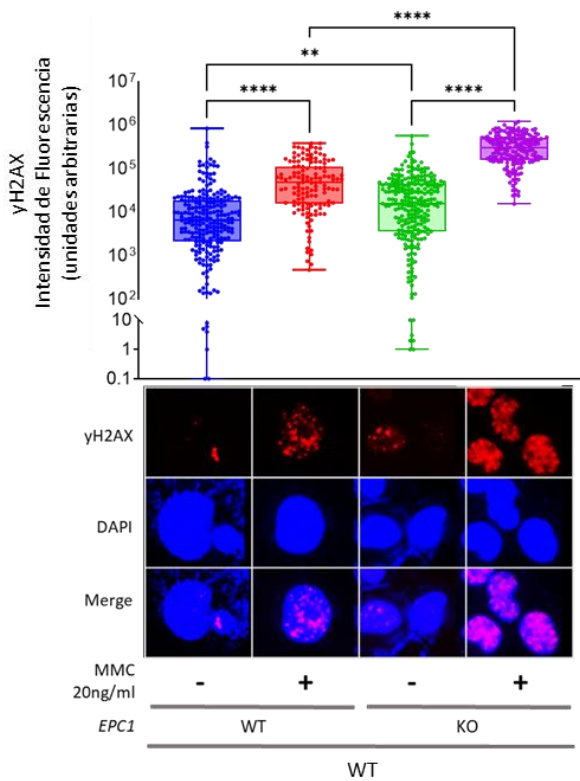
A)



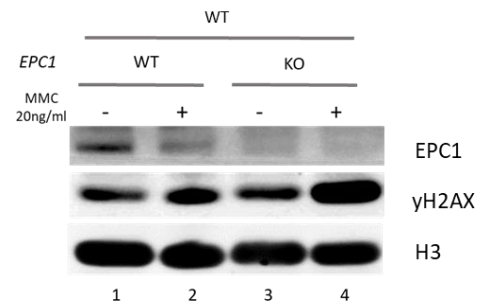
B)



C)



D)



E)

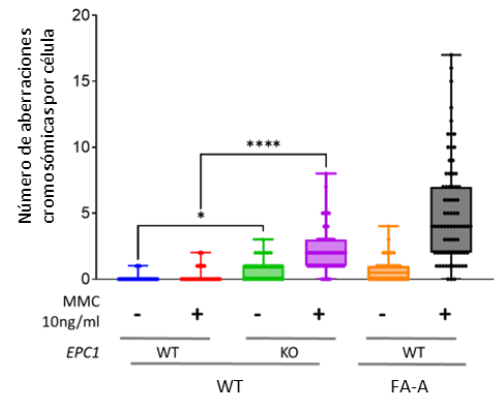


FIGURA 17. LA PRESENCIA DE EPC1 ES NECESARIA PARA LA APROPIADA REPARACIÓN DE ICL.

A) *EPC1* se encuentra regulado a la baja en las HSPC de los pacientes FA. Representación gráfica del perfil de expresión de los genes que codifican a las proteínas del complejo NuA4 en HSPC de donadores sanos (barra verde) y pacientes FA (barra amarilla). Se observa diferencia en la regulación de *EPC1* donde los donadores sanos tienen regulación al alta, mientras que en los pacientes FA está regulado a la baja. La información se obtuvo del sc-RNaseq publicado previamente⁶⁷, donde cada línea representa una célula secuenciada y el color el grado de transcripción (el rojo la representación de alta transcripción y azul de baja).

B) Se generaron clones de células deficientes en *EPC1*. Se realizó el *knock-out* de *EPC1* utilizando CRISPR-Cas9 en células con la vía FA/BRCA íntegra, a continuación, se seleccionó una clona en la

que no se observara presencia de EPC1 en extractos de proteína total. Se usó la clona denominada C4 para los experimentos posteriores.

C) La ausencia de EPC1 incrementa la señalización de DSB por γ H2AX en células retadas con MMC evidenciada por inmunofluorescencia.

D) La ausencia de EPC1 incrementa la presencia de DSB señalizados por γ H2AX en cromatina de células retadas con MMC. La densitometría del blot está graficada en el anexo III.a

E) La deficiencia de EPC1 incrementa la inestabilidad cromosómica. Las células deficientes en EPC1 tienen mayor número de aberraciones cromosómicas por célula comparadas con las silvestres al ser retadas con MMC. Sin embargo, el efecto es menor al ocasionado por la deficiencia en la vía FA/BRCA.

* $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

Una vez confirmado que la ausencia de EPC1 afecta la reparación de los ICL e incrementa la inestabilidad cromosómica de las células, evaluamos si lo observado era consecuencia de la interferencia en la formación del complejo NuA4 y un desequilibrio en la acetilación de histonas. Confirmamos que, ante la ausencia de EPC1, la interacción entre los módulos de reclutamiento (identificado a través de P400) y HAT (identificado a través de TIP60/KAT5) del complejo disminuye (Figura 18A). No obstante, esto no es consecuencia de falla en el reclutamiento a cromatina de P400 (Figura 18B). Sugiriendo que es el ensamblaje y no el reclutamiento del complejo lo que se ve afectado en las mutantes generadas.

Sorprendentemente, no observamos modificación en el nivel de acetilación de residuos de la histona H4 ni de la H2AK15 (Figura 18B), indicando que la acetilación global de histonas no fue alterada. Empero, esto no significa que la pérdida de EPC1 no afecta los niveles de acetilación durante el proceso de reparación de ICL, sino que, el impacto puede ser tan local y específico que la metodología no permita evidenciarlo. Para confirmar si la acetilación de histonas en las rupturas del DNA se modificó en las mutantes de *EPC1*, hicimos un ensayo de PLA y observamos que, a pesar de que la ausencia de EPC1 incrementa la señalización de γ H2AX (Figuras 17B y C) y no altera la H2AK15ac global (Figura 18B, anexo III.b), la coincidencia espacial entre ambas PTM está disminuida en las células mutantes (Figura 18C). Aunado a esto, observamos que, en las células WT, la inducción de ICL incrementa la acetilación de las histonas en las DSB, corroborando la actividad de NuA4 en la reparación de ICL (Figura 18C).

Estos resultados sugieren que la presencia de EPC1 es necesaria para el correcto ensamblaje del complejo NuA4, y consecuentemente necesario para la apropiada acetilación de histonas en la zona de rupturas.

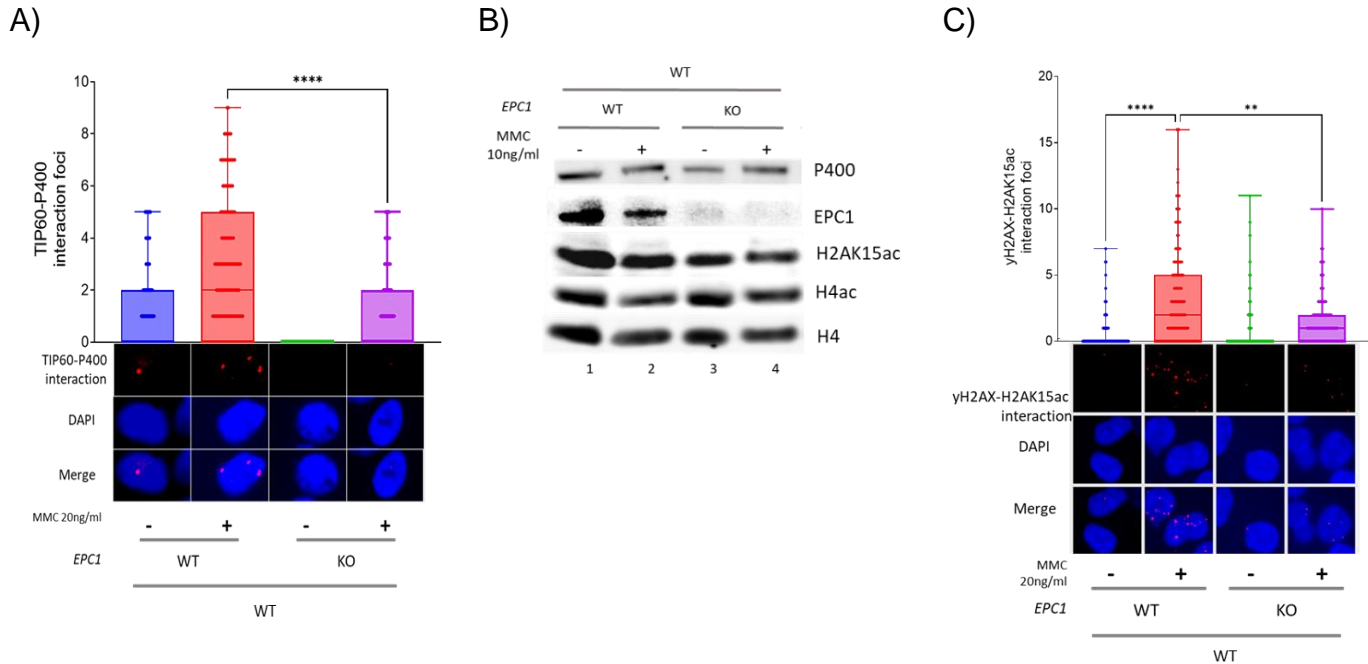


FIGURA 18. LA AUSENCIA DE EPC1 INTERFIERE CON ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO Y ACETILACIÓN DE HISTONAS EN ZONA DE DAÑO

A) El ensamblaje de NuA4 se interrumpe en ausencia de EPC1. La interacción de p400 (proteína presente en el módulo de reclutamiento) y TIP60/KAT5 (proteína presente en el módulo HAT), evaluada a través del PLA, disminuye en las células deficientes de EPC1.

B) Los niveles de acetilación global no se alteran ante la deficiencia de EPC1. Las células deficientes en EPC1 no tiene menor presencia de H2AK15ac ni H4ac en cromatina. La densitometría del blot está graficada en el anexo III.b.

C) La ausencia de EPC1 modifica la acetilación en la zona de daño señalizada por la yH2AX. La colocalización de H2AK15ac y yH2AX incrementa en las células silvestres tras la inducción de ICL. Sin embargo, el efecto disminuye en las células deficientes en EPC1.

p<0.01, **p<0.0001

La ausencia de EPC1 favorece a la SSA durante la reparación de ICL

La reparación de ICL inicia con la activación de la vía FA/BRCA, que recluta y ubiquitina al dímero FANCD2-I, este paso conduce al reclutamiento de las endonucleasas que realizan el corte para liberar al ICL, generando a la DSB (Figura 19A). La ubiquitinación de FANCD2-I es un marcador del funcionamiento río arriba de la vía, que se puede evidenciar al hacer una electroforesis prolongada de proteínas que permite separar a la forma no modificada de la ubiquitinada.

Se ha descrito que TIP60/KAT5 interactúa con FANCD2 durante la reparación de ICL, sin embargo, la inhibición de la acetiltransferasa no altera la relocalización de FANCD2 a cromatina^{143,144}. Los reportes no indican si la interacción de TIP60/KAT5-FANCD2 es independiente o sucede a través del complejo NuA4, por lo que corroboramos si la ausencia de EPC1 afecta la ubiquitinación de FANCD2 (Figura 19B). El resultado confirma que la participación del complejo NuA4 durante la reparación de ICL sucede durante la segunda parte de la vía: la reparación de la DSB.

Durante la reparación de DSB, la actividad acetiltransferasa de NuA4 interfiere con el reclutamiento de 53BP1, favoreciendo la reparación por HR¹⁴³. En los resultados obtenidos, ni el reto con MMC, ni la deficiencia de EPC1 influyeron en el reclutamiento a cromatina de 53BP1. Tampoco observamos diferencias en la presencia del antagonista de 53BP1: BRCA1 (Figura 19C, anexo III.c). Sin embargo, siguiendo la hipótesis generada por el modelo booleano (Figura 15B), evaluamos si la ausencia de EPC1 incide en el reclutamiento de RAD51 y RAD52. Acertadamente, los resultados corroboran la predicción del modelo al observarse que, ante la inducción de ICL, las mutantes de *EPC1* reclutan a RAD52 a cromatina, contrario a lo observado con RAD51 (Figura 19D, anexo III.d). Estos resultados demuestran que durante la reparación de ICL, el complejo NuA4 juega un papel importante en el bloqueo de la SSA, y que fallas en el ensamblaje de los módulos del complejo cambian la balanza, favoreciendo a la reparación por SSA.

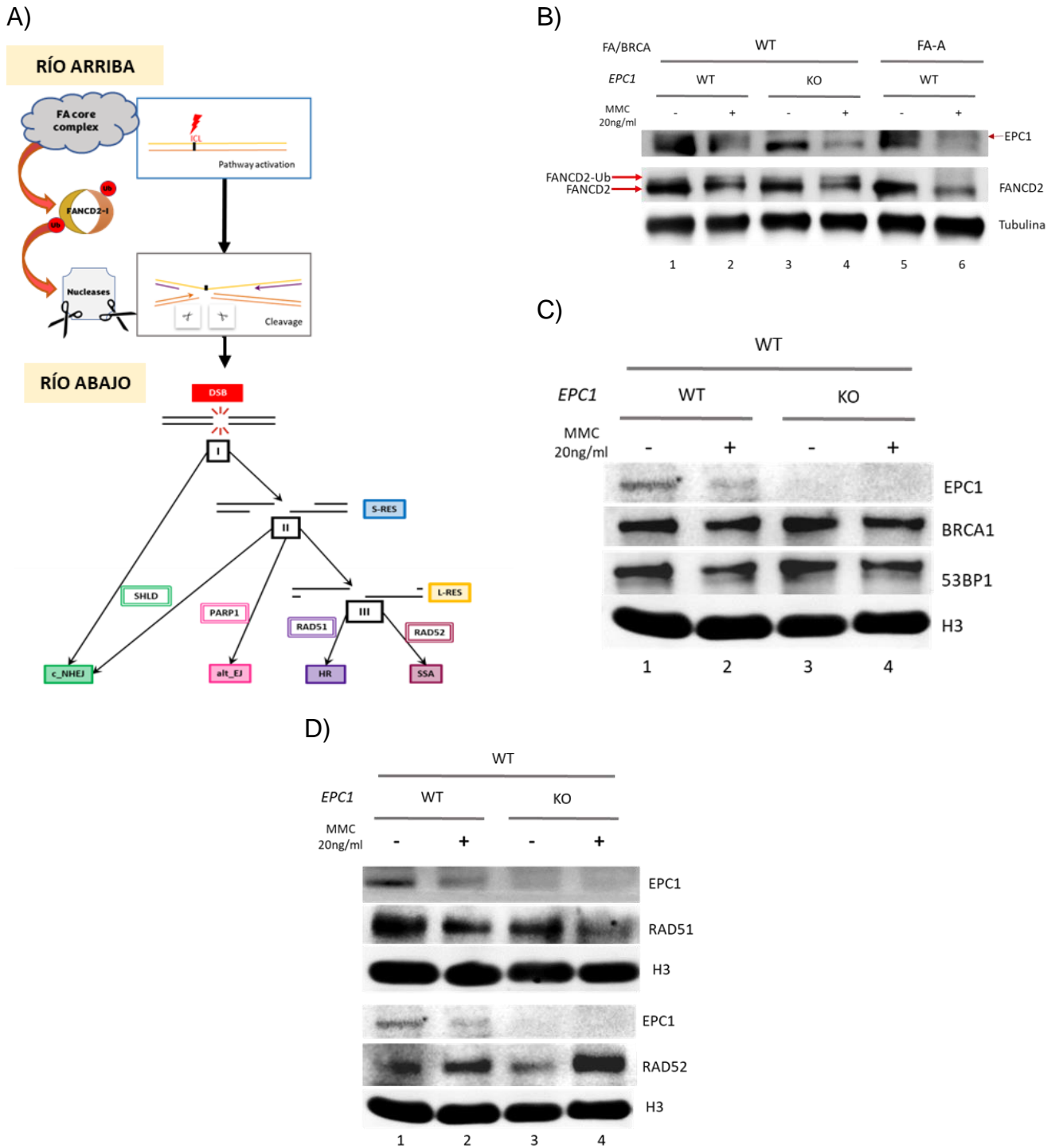


FIGURA 19. LA AUSENCIA DE EPC1 LA REPARACIÓN DE ICL POR SSA.

A) Durante la reparación de ICL se genera una DSB intermedia que debe ser reparada por HR. Cuando la horquilla de replicación no puede separar las dos hebras de DNA, los ICL son detectados, lo que activa al complejo multiprotéico FA core. El FA core monoubiquitina a FANCD2-I, promoviendo el reclutamiento y la activación de nucleasas que hacen dos cortes, sobre la misma hebra del DNA, liberando el ICL y generando una DSB. La DSB se repara preferentemente por HR,

sin embargo, cuando la vía FA/BRCA no funciona de manera adecuada, se pueden favorecer otras vías no fidedignas de reparación como la c-NHEJ, MMEJ o SSA.

B) La ubiquitinación de FANCD2 no se afecta ante la ausencia de EPC1. La ubiquitinación de FANCD2 se puede evidenciar a través de la electroforesis de extractos de proteína total. El reto con MMC induce la modificación de FANCD2 independientemente de la presencia de EPC1 (carriles 2 y 4), lo que no se observa en las células FA-A (carril 6).

D) El reclutamiento a cromatina de BRCA1 y 53BP1 no se altera ante la ausencia de EPC1. En extractos de cromatina global, no se observan diferencias en la presencia de BRCA1 y 53BP1 por el tratamiento con MMC, independientemente de si la célula es o no deficiente de EPC1. La densitometría del blot está graficada en el anexo III.c.

E) Durante la reparación de ICL, las células deficientes en EPC1 reclutan a cromatina a RAD52. Tras la inducción de daño, la cromatina de las células deficientes en EPC1 reclutan está enriquecida en RAD52, contrario a lo que sucede con RAD51 (carril 4). Sugiriendo que la célula está favoreciendo la reparación por SSA. La densitometría del blot está graficada en el anexo III.d.

La ausencia de EPC1 en células FA aumentan la inestabilidad cromosómica pero no favorece el reclutamiento de RAD52

EPC1 se encuentra regulado a la baja en las HSPC de los pacientes con FA (Figura 17A), por lo que evaluamos si las repercusiones de la ausencia de EPC1 durante la reparación de ICL se modifica cuando la vía FA/BRCA no es funcional. Por este motivo generamos un *knock-out* de *EPC1* (usando la tecnología CRISPR-Cas9) en células FA-A y seleccionamos una clona en la que EPC1 no se encontrara presente (Figura 20A) para continuar con los experimentos (línea celular que será referida como doble mutante).

La inestabilidad cromosómica de las células doble mutante escaló tras el reto con MMC, donde se observaron células con más de 20 aberraciones cromosómicas, superando incluso la cantidad de aberraciones cromosómicas observadas en las células FA-A (Figura 20B). Sin embargo, esto no implicó el incremento de DSB señalizadas por γ H2AX (Figura 20C, carriles 4 y 8), sugiriendo que las células doble mutante están reparando las lesiones a una tasa similar que las FA-A, pero están cometiendo más errores en el proceso.

Sorprendentemente, la presencia de RAD52 en la cromatina de las células con la doble mutación, tras la inducción de ICL, no se enriqueció (Figura 20C, carril 8). Este resultado contrasta con lo observado en las células FA-A (Figura 20C, carril 4) y las mutantes sencillas de *EPC1* (Figura 20C, carril 6), donde el tratamiento con

MMC favorece la presencia de RAD52 en cromatina, apuntando a que la ausencia concomitante de EPC1 y de la vía FA/BRCA no favorece la reparación por SSA. Estos resultados muestran que la ausencia de EPC1 en las células FA-A altera la vía de reparación favorecida (probablemente a la MMEJ o c-NHEJ), lo que incrementa la inestabilidad cromosómica de las células.

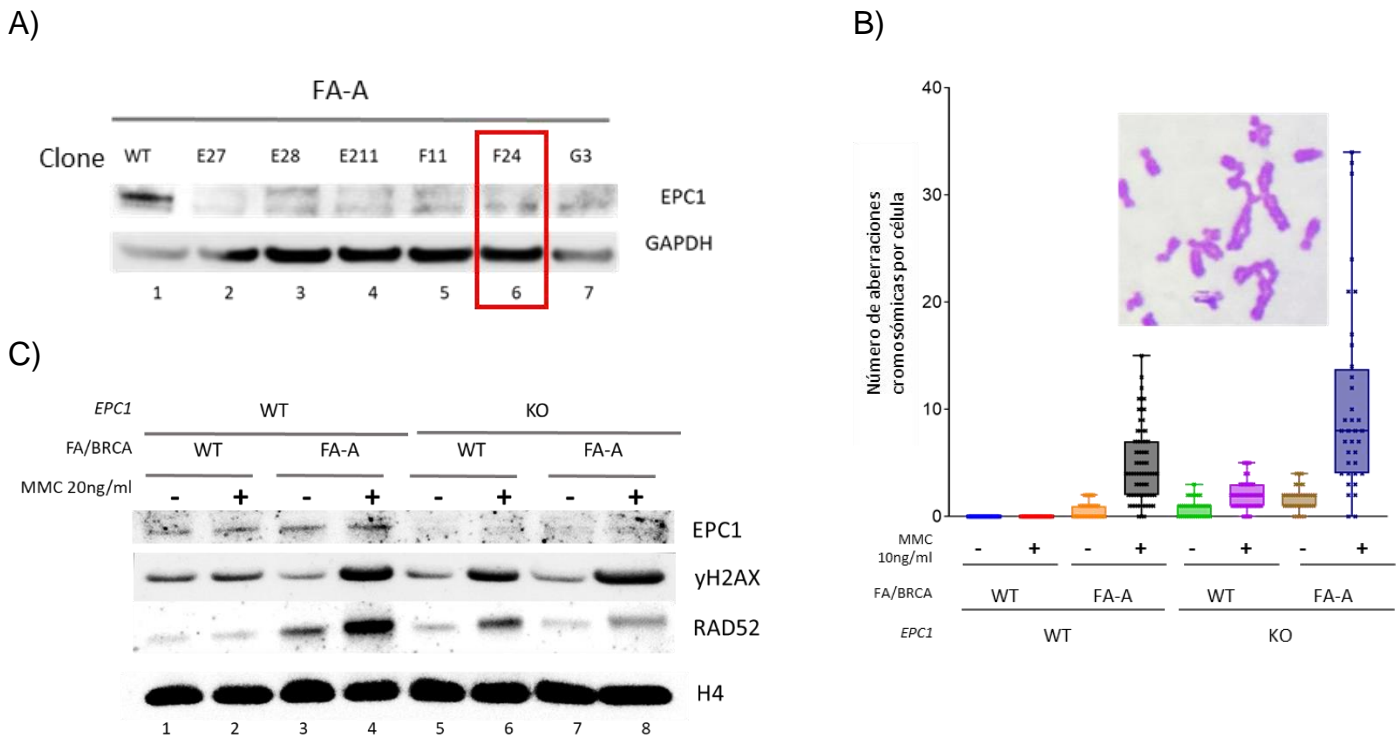


FIGURA 20. LA AUSENCIA DE EPC1 EN CÉLULAS DEFICIENTES DE LA VÍA FA/BRCA AMPLIFICA LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA SIN FAVORECER LA REPARACIÓN POR LA VÍA SSA

A) A partir de células FA-A, se generaron clones deficientes en *EPC1*. Se realizó el *knock-out* de *EPC1* utilizando CRISPR-Cas9 en células con la vía FA/BRCA no funcional (FA-A), a continuación, se seleccionó una clona en la que no se observara presencia de EPC1 en extractos de proteína total. Se usó la clona denominada F24 para los experimentos posteriores.

B) La ausencia de EPC1 en contexto FA, amplifica la inestabilidad cromosómica propia de la enfermedad. Tras el reto con MMC, el número de aberraciones cromosómicas por célula observadas en la línea celular doble mutante es mayor a la observada en las células FA-A sin deficiencia de EPC1.

C) Tras el reto con MMC, la presencia de γH2AX en la cromatina de las células doble mutante (carril 8) no se amplificó en comparación a lo observado en la cromatina de las células FA-A (carril 4) o las mutantes sencillas de *EPC1* (carril 6). La deficiencia de EPC1, en contexto FA-A, no favorece al reclutamiento a cromatina de RAD52 (carril 8) como mediador de la reparación de ICL. Contrastando con lo observado en la cromatina de las células FA-A (carril 4) y de las mutantes sencillas de *EPC1* (carril 6), donde el tratamiento con MMC induce el enriquecimiento de RAD52.

DISCUSIÓN

La vía FA/BRCA es una vía de reparación que identifica y repara ICL, con la singularidad que, durante la primera parte del proceso, genera una de las lesiones más nocivas en el DNA, una DSB. Ésta DSB es un intermediario de la reparación del ICL y es reparada por las proteínas río abajo de la vía, proteínas que pertenecen a la HR: RAD51C/FANCO, BRCA1/FANCS, BRCA2/FANCD1, PALB2/FANCN^{10,21,22}. La herencia de variantes patogénicas, mayormente bialélicas autosómicas recesivas, en los genes que codifican para los genes de la vía FA/BRCA genera un síndrome de inestabilidad cromosómica (FA) evidenciado por la presencia de figuras radiales y rupturas cromatídicas en metafases de células a las que se les induce la formación de ICL⁴. La presencia de estas aberraciones cromosómicas indica deficiencia en la reparación de la DSB intermediaria donde la vía de reparación favorecida no es la HR, haciendo a la FA un modelo biológico natural para estudiar la reparación de los ICL y las DSB. Además de la FA, la reparación de ICL y DSB, puede ser estudiada a través de modelos matemáticos que favorecen la comprensión de las interacciones entre las vías de reparación y generan hipótesis que pueden ser probadas en el laboratorio^{66,145}. En el trabajo presentado en esta tesis empleamos la aproximación matemática y experimental para abordar el impacto de la ausencia de la acetiltransferasa NuA4 durante la reparación de ICL y DSB.

La pérdida de continuidad de la molécula de DNA, generada por las DSB (intermediarios durante la reparación de ICL o con cualquier otro origen) es muy peligrosa, sin embargo, la existencia de diferentes vías de reparación que reúnen los extremos del DNA, permite la continuidad de la molécula. La HR y la c-NHEJ son las dos principales vías de reparación, con cualidades contrastantes. La HR es de alta fidelidad, pero con actividad limitada a la fase S del ciclo celular y un proceso largo en el que intervienen muchas proteínas; por otro lado, la c-NHEJ está activa durante todo el ciclo celular, es rápida y efectiva, sin embargo, es propensa a error. Además de las vías canónicas, en los últimos años se han descrito dos vías alternas: MMEJ y SSA. La actividad de vías alternas se ve favorecida ante la ausencia de alguna de las vías canónicas, lo que garantiza la supervivencia de la

célula a expensas del incremento en la tasa de mutaciones, deleciones y translocaciones a lo largo del genoma ^{42,146}.

Las proteínas y elementos que participan en las cuatro vías de reparación interactúan formando una red compleja, y nuestro conocimiento sobre dicha red crece y se nutre con nuevas investigaciones. A pesar de lo intrincado de la reparación del DNA, los modelos matemáticos han permitido comprender mejor y generar hipótesis sobre los procesos de decisión sobre qué vía de reparación se elige durante la reparación de las DSB. De hecho, la reparación de DSB se ha explorado usando diferentes aproximaciones matemáticas en las que se ha descrito el impacto de la complejidad de los extremos de la DSB ^{147,148}, el ambiente cromatínico ¹⁴⁸, la velocidad de la c-NHEJ ¹⁴⁹, la dependencia en el proceso de resección de DNA ¹⁵⁰, entre otros.

En este trabajo, usamos un modelo Booleano, una estrategia que ha sido útil en el estudio de redes grandes de sistemas complejos. Sin embargo, la construcción de este tipo de modelos conlleva la sobre simplificación del contexto biológico, lo que debe ser considerado al momento de hacer conclusiones, especialmente cuando se emplea un esquema de actualización síncrona. La dinámica síncrona no considera diferencias en la concentración de los elementos de la red ni el tiempo/velocidad de reacción, lo que le resta realismo biológico. De hecho, los modelos Booleanos asumen que todos los componentes de la red están presentes al momento de ser requeridos y que la velocidad y el momento en el que suceden todas las reacciones es el mismo. Como consecuencia, se pueden generar artefactos, como la formación de atractores cíclicos, que restan de confianza a los modelos. No obstante, los análisis asíncronos con redes muy grandes son complicados y poco eficaces, por lo que el uso de la actualización síncrona en redes sin atractores cíclicos se justifica ⁶³.

Nuestro modelo Booleano (Tabla 3) recapitula los eventos biológicos reportados durante la reparación del DNA en condiciones silvestres y mutantes, sin generar atractores cíclicos, por lo que demostró ser útil para emular escenarios biológicamente relevantes a pesar de las limitantes inherentes a este tipo de

simulaciones. Asimismo, las simulaciones obtenidas con el modelo permitieron generar hipótesis que pueden ser retadas/confirmadas en el laboratorio, como sucedió con la inhibición del complejo acetil transferasa NuA4.

En el contexto silvestre, la c-NHEJ y la HR son las vías que predominan en la reparación de las DSB. El modelo está diseñado para simular la reparación de las DSB en la fase S/G2 del ciclo celular, ya que presupone la presencia y disponibilidad de la cromátida hermana, además de la activación de proteínas dependientes de fase S, estableciendo el escenario existente durante la activación de la vía FA/BRCA. En este contexto, se espera que la vía preferentemente elegida sea la HR, como es recapitulado en nuestro modelo, donde se observa la activación consecutiva de la DDR, S-RES, L-RES y RAD51 (Figura 9C). El modelo también reconstruye las trayectorias y vía de reparación seleccionadas en diferentes entornos deficientes en la reparación (consecuencia de mutaciones en elementos de la red) previamente descritas en la literatura ^{128 129,130 131 127,132} (Figuras 10 y 11).

Se ha reconocido a la modificación en la selección de la vía de reparación del DNA (consecuencia del contexto genético y epigenético) como un elemento relevante en la transformación neoplásica, así como en la respuesta al tratamiento. Ante la deficiencia de la vía HR, la dependencia a las vías de reparación de DSB no fidedignas, especialmente las no canónicas (la MMEJ y la SSA), ha sido objeto del desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos ^{128,132}. Sin embargo, la inestabilidad cromosómica inherente de las células deficientes en la vía HR incrementa la probabilidad de generar nuevas mutaciones que modifiquen el contexto genético y la vía de reparación de DSB predilecta. Por lo que conocer los pormenores de las interacciones entre las vías, así como el contexto genético del tumor permite identificar nuevos blancos terapéuticos y, en consecuencia, mejorar las aproximaciones terapéuticas.

Las variantes patogénicas en los genes *BRCA1/FANCS* y *BRCA2/FANCD1* se encuentran entre las más comunes en los síndromes de cáncer hereditario de mama y ovario, donde hay riesgo incrementado a desarrollar tumores deficientes en la HR. Las opciones de tratamiento en los tumores con variantes patogénicas en

estos genes incluyen la cirugía, así como la radioterapia y quimioterapia estándar, sin embargo, un alto porcentaje de estos tumores desarrollan resistencia al tratamiento ¹⁵¹. Entre los mecanismos a través de los cuales ganan resistencia se encuentra la restauración de la actividad de la HR ^{152,153}, la cual puede ser ocasionada por la reactivación de *BRCA1/FANCS* (consecuencia de una mutación secundaria) o a la regulación a la baja de 53BP1 ^{139,153,154}, éste último reproducido por nuestro modelo (Figuras 12 C y D). La alta incidencia en los casos de resistencia a tratamiento ha motivado la investigación de la dinámica de la red de reparación, permitiendo desarrollar estrategias basadas en la letalidad sintética, como los inhibidores de PARP y POLQ ¹⁵¹.

La eficiencia de respuesta a tratamiento en tumores deficientes de la vía HR, como los que presentan mutaciones nulas en *BRCA1/FANCS* y *BRCA2/FANCD1*, depende del contexto genético de las células. Se ha descrito, que alteraciones genéticas adicionales pueden modificar la vía de reparación empleada por la célula y, en consecuencia, la respuesta al tratamiento. Ejemplo de esto es la sobre expresión de *TRIP13* y *POLQ* en pacientes con síndromes de cáncer hereditario de mama y ovario. Los escenarios generados en estos casos son muy distintos, por un lado, cuando *TRIP13* (un inhibidor de SHLD y, por ende, de la c-NHEJ) se sobre expresa, la predilección por la vía HR se restaura, haciendo la inhibición de PARP1 irrelevante para la supervivencia de la célula⁸⁷. La reconstitución de la HR fue recapitulada por nuestro modelo en las simulaciones donde el nodo de TRIP13 se mantuvo activo en la mutante nula de *BRCA1/FANCS* (Figuras 12A y B). En contraste, la sobre expresión de *POLQ* en células deficientes de *BRCA1/FANCS* no favorece la reparación por HR, sino que cambia la preferencia hacia la vía MMEJ, observación reproducida también por nuestro modelo (Figuras 13A y B). La dependencia de estas células por la vía MMEJ resulta fortuita para el pronóstico del paciente, ya que estos tumores son susceptibles a los tratamientos con inhibidores de PARP y POLQ ^{90,126,155}. El desarrollo de nuevos fármacos, con blanco en las debilidades específicas de las células tumorales, enfatiza la relevancia de entender las interacciones en la red de reparación de las DSB ante los diversos escenarios, y así impactar en el éxito de la aproximación terapéutica.

La participación de factores epigenéticos ha sido reconocida como un elemento relevante en la regulación y resultado de la reparación del DNA. Una limitante de nuestro modelo es que la influencia de la arquitectura, accesibilidad y movilización de la cromatina en el proceso de reparación no está del todo representadas ¹⁵⁶. Sin embargo, tampoco está excluida, ya que el modelo contempla de manera indirecta al remodelador de cromatina SMARCA5 (incluido en el nodo BRCA1/FANCS, (Tabla 2) y de manera directa a la γ H2AX (PTM requerida para la señalización del daño), la combinación de PTM requerida para el reclutamiento de 53BP1 (H2AK15ub-H4K20me2) y su antítesis, el complejo acetiltransferasa NuA4 ^{60,78,141,142}. Debido a que el antagonismo entre la presencia de la H2AK15ub-H4K20me2 y la H2AK15ac-H4K16ac (consecuencia de la actividad de NuA4) se ha asociado con el favorecimiento de la reparación de las DSB hacia la c-NHEJ o la HR (respectivamente), su consideración en el modelo fue ineludible ^{60,78,141,142}. Además, incluir la acetilación de histonas resulta interesante, no sólo por su participación directa en la reparación, sino porque ya existen inhibidores que interfieren/promueven la acetilación y tiene potencial terapéutico ^{157,158}. Nuestro modelo predijo que la inhibición del complejo acetiltransferasa NuA4 podría modificar la vía de reparación de DSB y cambiar la predilección de HR hacia SSA en una forma dependiente de RAD52, predicción que validamos experimentalmente (Figura 15). Esto se asemeja a reportes hechos en levaduras, donde ha descrito que durante la reparación de DSB, NuA4 acetila a pRPA, favoreciendo el reclutamiento de Rad51. Además, se ha sugerido que NuA4 favorece las vías de reparación basadas en resección (como la HR, MMEJ y SSA) al promover la resección del DNA ^{61,159}.

Nuestro modelo tiene el potencial de ser implementado para entender, no sólo la reparación de DSB en tumores, sino síndromes de inestabilidad genómica como ataxia telangiectasia (representado en nuestro modelo por el nodo de ATM), los síndromes de Nijmegen y ataxia telangiectasia-*like* (representados en nuestro modelo por el nodo MRN) y la FA (representado en nuestro modelo por los nodos BRCA1/FANCS y RAD51), donde la reparación del DNA se encuentra de alguna manera comprometida ²². En el caso particular de la FA, la aplicación del modelo no

se limita a su representación en los nodos BRCA1/FANCS y RAD51, sino que puede emplearse para entender la dinámica de reparación de la DSB intermediaria de la reparación de ICL.

La vía FA/BRCA se activa cuando la horquilla de replicación se encuentra con el impedimento físico de la unión covalente entre ambas hebras del DNA (ICL), implicando la activación de las proteínas dependientes de fase S y la existencia, cercanía y disponibilidad de la cromátida hermana. Este escenario es el contemplado en el modelo generado, además, es sabido que la reparación de la DSB intermediaria es reparada por HR, resultado reproducido por nuestro modelo (Figura 9).

La participación de factores epigenéticos en la vía FA/BRCA ha sido poco explorada, sin embargo, existe evidencia de que la acetilación juega un papel importante en la sensibilidad a ICL, siendo TIP60/KAT5 la principal acetiltransferasa involucrada ^{143,144,160}. La mayoría de las estrategias experimentales empleadas en estos estudios implican intervenir la acetilación a través de inhibir a la expresión de *TIP60/KAT5* o bloquear la actividad de histonas deacetilasas (HDAC) para garantizar la conservación de la marca ^{143,144,160}. Sin embargo, es importante recalcar que la actividad enzimática de TIP60/KAT5 no está limitada a su presencia en el complejo, sino que se le ha asociado con la acetilación de proteínas no histonas como ATM, p53, cMyc y el receptor de andrógenos. Razón por la cual su inactivación también afecta la señalización del daño al DNA, la progresión del ciclo celular, expresión de genes y la respuesta esteroidea. Por otro lado, el uso de inhibidores de HDAC afecta de manera global el estado de acetilación de histonas y proteínas no histonas, afectando la apertura de la cromatina y la activación transcripcional. Si bien, ambas aproximaciones han sido útiles para establecer la relevancia de la acetilación en la reparación de ICL, es importante considerar sus implicaciones ¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

TIP60/KAT5 actúa durante la reparación de DSB formando parte del complejo NuA4 (Figura 16A), el cual, ahora sabemos, también se ensambla ante la presencia de ICL (Figura 16B). Esto sugiere que el reclutamiento a cromatina de

dicha acetiltransferasa, consecuencia de la activación de la vía FA/BRCA ^{12,13}, no es independiente, sino que está mediado por el complejo NuA4. Nuestra aproximación experimental no se basó en inhibir directamente a TIP60/KAT5, sino que el blanco fue EPC1, la proteína puente entre TIP60/KAT5 y el resto del complejo (Figura 18A). La razón no se limita a la participación estructural de EPC1, sino a su regulación a la baja en las HSPC de pacientes FA ⁶⁷ (Figura 17A), lo que hace sospechar de su relevancia en la vía FA/BRCA. Por lo tanto, el bloqueo del reclutamiento de TIP60/KAT5 al inhibir a EPC1 es una herramienta que permite estudiar el papel de la acetilación en la reparación de ICL sin afectar de manera global el estado de acetilación de la cromatina. Esto se observa en los resultados donde, si bien la acetilación a nivel global no se vio afectada en las células con deficiencia de EPC1 (Figura 18B), el efecto se observó a nivel local en la zona marcada con γ H2AX (Figura 18C). Indicando un bloqueo específico de la acetilación asociada al complejo NuA4 y asociada al daño en el DNA.

La acetilación influye en la estabilidad cromosómica de las células durante la reparación de ICL. Un estudio hecho en monocitos de pacientes con FA, por ejemplo, mostró que la promoción de la acetilación (usando inhibidores de HDAC), redujo el número de células con aberraciones cromosómicas ¹⁶⁰. Este efecto correlaciona de manera inversa con lo observado en los experimentos de las células con deficiencia de EPC1, donde la obstrucción de la acetilación, aun en células con la vía FA/BRCA funcional, incrementa la inestabilidad cromosómica (Figura 17E). Si bien el incremento no es tan severo como en las células FA-A (Figura 17E), la deficiencia en la reparación es clara. El resultado se complementa con el aumento de DSB señalizadas por la γ H2AX en la ausencia de EPC1 (Figura 17C-D), apuntando que la acetilación derivada del ensamblaje apropiado NuA4 favorece la reparación fidedigna durante la reparación de ICL.

De manera general, podemos dividir la reparación de los ICL en dos partes: 1) la activación de la vía FA/BRCA que, a través de la ubiquitinación de FANCD2-I, promueve la liberación del ICL provocando una DSB intermediaria y 2) la reparación de la DSB por proteínas mediadoras de la HR y que pertenecen a la vía FA/BRCA

(Figura 19A). La participación del complejo NuA4 durante la reparación de ICL no ha sido reportada previamente, sin embargo, nuestros hallazgos muestran que la ausencia de EPC1 (Figura 19B) no afecta la activación de la vía FA/BRCA. El mismo efecto se observó tras la inhibición de la acetil transferasa TIP60/KAT5 ¹⁴⁴, sugiriendo que la inferencia de NuA4 durante la reparación de ICL es posterior a la ubiquitinación de FANCD2-I.

A pesar de que el reclutamiento de NuA4 durante la reparación de ICL no ha sido descrito, ni la inhibición de TIP60/KAT5 ¹⁴⁴ ni la ausencia de EPC1 modifican la activación de la vía (Figura 19B), corroborando que la participación de NuA4 está en el segundo segmento de la reparación de ICL.

La actividad pro HR de TIP60/KAT5 durante la reparación de ICL, al igual que sucede con NuA4 y la reparación de DSB, se ha asociado al bloqueo del reclutamiento de 53BP1 derivado de la acetilación de histonas ¹⁴³. Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias en la presencia de 53BP1 o BRCA1 en la cromatina tras el tratamiento con MMC en ausencia de EPC1 (Figura 19C). Si bien no descartamos que empleando una aproximación que permita evaluar eventos puntuales con resolución de célula única (PLA de 53BP1 y γ H2AX, por ejemplo) podrían mostrar un aumento en el reclutamiento de 53BP1, nuestros experimentos muestran un enriquecimiento en cromatina de RAD52 (Figura 19D), corroborando la predicción del modelo (Figura 15). Estos resultados fortalecen la hipótesis de que, durante la reparación, la acetilación mediada por NuA4 tiene actividad anti SSA.

La ausencia de EPC1, en células deficientes en FANCA, amplificó la deficiencia en la reparación de ICL, generando más inestabilidad cromosómica que la observada en las células deficientes únicamente en la vía FA/BRCA (Figura 20B). Lo sorprendente fue que este aumento en el número de aberraciones cromosómicas no fue acompañado del incremento la señalización de DSB por γ H2AX (Figura 20C). Lo que podría resultar un tanto contradictorio, sin embargo, cabe la posibilidad de que estas células estén recurriendo a vías de reparación más eficientes, que resuelvan la discontinuidad de la DSB rápido, a costa de la fidelidad, generando más aberraciones cromosómicas. Las vías candidatas son la c-NHEJ y la MMEJ,

las cuales requieren de un mínimo de homología y procesamiento de extremos de la DSB (Figura 6). La hipótesis se fortalece al contrastar el enriquecimiento de RAD52 tras el reto con MMC, donde las células FA-A deficientes en EPC1 no están reclutando a RAD52 (Figura 20C, carril 8), sugiriendo que la SSA no es la vía favorecida en estas células. La hipótesis no es descabellada, ya que el incremento en la inestabilidad cromosómica en FA, especialmente dada por la formación de figuras radiales, se ha asociado históricamente a la actividad de la c-NHEJ y, recientemente, a la MMEJ también ⁴¹.

De ser así, la regulación a la baja de *EPC1* en las HSPC de pacientes FA, indicaría que la inhibición de la acetilación mediada por NuA4 reduce todavía más las posibilidades de vías de reparación de una célula que por se tiene defectos en la reparación del DNA. Este contexto favorece el escenario en el que aquellas células que no logran reparar el daño mueran (promoviendo el desarrollo de la falla medular a la que son propensos de estos pacientes), mientras que aquellas que reparen de manera no fidedigna acumulen mutaciones que incrementen el riesgo a desarrollar leucemia mieloide aguda.

Es por esto que estudiar los procesos de reparación del DNA a partir de distintas aproximaciones genera conocimiento valioso que puede ser utilizado para entender la biología de enfermedades como la FA, pero también para buscar mejores aproximaciones terapéuticas en procesos neoplásicos que involucren dependencia o alteración en una o más vías de reparación. En el trabajo presentado en esta tesis se abordó la reparación de DSB e ICL desde dos aproximaciones diferentes, la matemática y la experimental.

El modelo booleano desarrollado en el trabajo doctoral sirve para estudiar la reparación de las DSB en un contexto post replicativo, generando información útil de la reparación del DNA en escenarios neoplásicos, pero también en la reparación del DSB intermediario de la reparación de ICL. Demostró ser acertado al reproducir la dinámica de reparación de DSB donde la HR fue la vía favorecida. Además, probamos que, ante la modificación del contexto genético, la dinámica y la vía de reparación predilecta cambia, obteniendo resultados que concuerdan con reportes

previos. El modelo, además, reprodujo el cambio en la vía de reparación seleccionada de mutantes dobles de relevancia terapéutica, validando su capacidad de reproducir escenarios biológicos complejos. Por otro lado, retomamos experimentalmente la hipótesis generada induciendo daño en células deficientes de NuA4, como resultado observamos el incremento el reclutamiento de RAD52, corroborando la hipótesis generada por el modelo.

La relevancia de NuA4 en la reparación no se limita a las DSB, sino que su formación también se induce y es necesaria para la reparación adecuada de los ICL. Inhabilitar la acetilación promovida por NuA4 (al inhibir a EPC1) disminuyó la acetilación en la zona de las DSB, incrementó la inestabilidad cromosómica y aumentó el reclutamiento a cromatina de RAD52, corroborando que la hipótesis generada por el modelo también predice lo ocurrido durante la reparación de ICL.

El escenario cambia cuando hay una deficiencia concomitante de la vía FA/BRCA, si bien la inestabilidad cromosómica se amplifica, las células FA deficientes en EPC1 no reclutan a RAD52 como respuesta al daño, lo que nos hace pensar que la reparación de la DSB intermediaria es conducida por la c-NHEJ y/o la MMEJ, una hipótesis que aún requiere validación.

CONCLUSIONES

Nuestro BNM recapitula la vía de empleada para reparar DSB reportada en modelos biológicos, tanto en contexto silvestre, como en escenarios con mutaciones.

El modelo predijo que la ausencia de la acetiltransferasa NuA4 favorece el reclutamiento de RAD52 y en consecuencia la reparación de la DSB por SSA. La hipótesis fue corroborada experimentalmente.

El ensamblaje y actividad HAT de NuA4 se promueve durante la reparación de ICL.

EPC1, integrante clave en el ensamblaje de NuA4, está regulado a la baja en individuos FA.

El *knock out* de *EPC1* interfiere con el ensamblaje del complejo NuA4, su actividad HAT y con la reparación de los ICL, disminuyendo la acetilación de histonas en la zona de daño, incrementando la señalización de DSB (γ H2AX) y la inestabilidad cromosómica.

El reclutamiento a cromatina de RAD52 durante la reparación de ICL se incrementa en las células deficientes en *EPC1*, favoreciendo la reparación por SSA.

La inestabilidad cromosómica inherente a la FA se exagera con la ausencia concomitante de *EPC1* y la vía de reparación FA/BRCA. Sin embargo, no se favorece la reparación por SSA, sugiriendo la activación de otra vía de reparación propensa a error como la c-NHEJ o la MMEJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garaycochea, J.I., Crossan, G.P., Langevin, F., Daly, M., Arends, M.J., and Patel, K.J. (2012). Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* 489, 571-575. 10.1038/nature11368.
2. Parmar, K., and D'Andrea, A.D. (2012). Stressed Out: Endogenous Aldehydes Damage Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 11, 583-584. 10.1016/j.stem.2012.10.007.
3. Legerski, R.J. (2010). Repair of DNA interstrand cross-links during S phase of the mammalian cell cycle. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51, 540-551. 10.1002/em.20566.
4. Garcia-de-Teresa, B., Rodriguez, A., and Frias, S. (2020). Chromosome Instability in Fanconi Anemia: From Breaks to Phenotypic Consequences. *Genes (Basel)* 11. 10.3390/genes11121528.
5. Gupta, S., McManus, L.M., and Mitchell, R.N. (2014). Aplastic Anemia. In *Pathobiology of Human Disease*, (Academic Press), pp. 1446-1461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07901-6>.
6. Knies, K., Inano, S., Ramirez, M.J., Ishiai, M., Surralles, J., Takata, M., and Schindler, D. (2017). Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFW3 cause Fanconi anemia. *Journal of Clinical Investigation* 127, 3013-3027. 10.1172/jci92069.
7. Apostolou, S., Whitmore, S.A., Crawford, J., Lennon, G., Sutherland, G.R., Callen, D.F., Lanzano, L., Savino, M., Dapolito, M., Notarangelo, A., et al. (1996). Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nature Genetics* 14, 324-328. 10.1038/ng1196-324.
8. Meetei, A.R., Levitus, M., Xue, Y.T., Medhurst, A.L., Zwaan, M., Ling, C., Rooimans, M.A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., et al. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics* 36, 1219-1224. 10.1038/ng1458.
9. Strathdee, C.A., Duncan, A.M.V., and Buchwald, M. (1992). Evidence for at least 4 Fanconi Anemia genes including FANCC on chromosome-9. *Nature Genetics* 1, 196-198. 10.1038/ng0692-196.
10. Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., de Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., et al. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609. 10.1126/science.1073834.
11. Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'Andrea, A.D., et al. (2001). Positional cloning of a novel fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular Cell* 7, 241-248. 10.1016/s1097-2765(01)00172-1.
12. de Winter, J.P., Rooimans, M.A., van der Weel, L., van Berkel, C.G.M., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., de Groot, J., Zhi, Y., Waisfisz, Q., Pronk, J.C., et al. (2000). The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature Genetics* 24, 15-16.
13. Dorsman, J.C., Levitus, M., Rockx, D., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Haitjema, A., Bakker, S.T., Steltenpool, J., Schuler, D., Mohan, S., et al. (2007). Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cellular Oncology* 29, 211-218.
14. Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., et al. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics* 37, 934-935. 10.1038/ng1625.
15. Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z.J., Ling, C., Bishop, C.E., et al. (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genetics* 35, 165-170. 10.1038/ng1241.
16. Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y.T., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C.G., et al. (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nature Genetics* 37, 958-963. 10.1038/ng1626.
17. Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., et al. (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature Genetics* 39, 162-164. 10.1038/ng1947.

18. Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., et al. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics* 42, 406-409. 10.1038/ng.570.
19. Kim, Y., Lach, F.P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A.D., and Smogorzewska, A. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genetics* 43, 142-U191. 10.1038/ng.750.
20. Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J.P., Minguillon, J., Ramirez, M.J., Pujol, R., et al. (2013). Mutations in ERCC4, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia. *American Journal of Human Genetics* 92, 800-806. 10.1016/j.ajhg.2013.04.002.
21. Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., van de Vrugt, H.J., van Rossum-Fikkert, S.E., Ristic, D., Williams, G.J., Balk, J., Rockx, D., Li, H., et al. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications* 6, 1-11, 8829. 10.1038/ncomms9829.
22. Sawyer, S.L., Tian, L., Kahkonen, M., Schwartzentruber, J., Kircher, M., Majewski, J., Dymant, D.A., Innes, A.M., Boycott, K.M., Moreau, L.A., et al. (2015). Biallelic Mutations in BRCA1 Cause a New Fanconi Anemia Subtype. *Cancer Discovery* 5, 135-142. 10.1158/2159-8290.cd-14-1156.
23. Virts, E.L., Jankowska, A., Mackay, C., Glaas, M.F., Wiek, C., Kelich, S.L., Lottmann, N., Kennedy, F.M., Marchal, C., Lehnert, E., et al. (2015). AluY-mediated germline deletion, duplication and somatic stem cell reversion in UBE2T defines a new subtype of Fanconi anemia. *Human Molecular Genetics* 24, 5093-5108. 10.1093/hmg/ddv227.
24. Park, J.-Y., Virts, E.L., Jankowska, A., Wiek, C., Othman, M., Chakraborty, S.C., Vance, G.H., Alkuraya, F.S., Hanenberg, H., and Andreassen, P.R. (2016). Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene. *Journal of Medical Genetics* 53, 672-680.
25. Bluteau, D., Masliah-Planchon, J., Clairmont, C., Rousseau, A., Ceccaldi, R., Dubois d'Enghien, C., Bluteau, O., Cucuini, W., Gachet, S., Peffault de Latour, R., et al. (2016). Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *The Journal of Clinical Investigation* 126, 337-349. 10.1172/JCI88010.
26. Zhang, J.Q., Dewar, J.M., Budzowska, M., Motnenko, A., Cohn, M.A., and Walter, J.C. (2015). DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 242-247. 10.1038/nsmb.2956.
27. Niraj, J., Farkkila, A., and D'Andrea, A.D. (2019). The Fanconi Anemia Pathway in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, Vol 3 3, 457-478. 10.1146/annurev-cancerbio-030617-050422.
28. Bogliolo, M., and Surralles, J. (2015). Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Current Opinion in Genetics & Development* 33, 32-40. 10.1016/j.gde.2015.07.002.
29. Roy, U., and Scharer, O.D. (2016). Involvement of translesion synthesis DNA polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *DNA Repair* 44, 33-41. 10.1016/j.dnarep.2016.05.004.
30. Waters, L.S., Minesinger, B.K., Wiltrot, M.E., D'Souza, S., Woodruff, R.V., and Walker, G.C. (2009). Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 134-154. 10.1128/mnbr.00034-08.
31. Katsuki, Y., and Takata, M. (2016). Defects in HR repair behind the human diseases: FA and HBOC. *Endocrine-Related Cancer* 23, T19-T37. 10.1530/ERC-16-0221.
32. Michl, J., Zimmer, J., and Tarsounas, M. (2016). Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *Embo j* 35, 909-923. 10.15252/embj.201693860.
33. Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genois, M.M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., et al. (2014). DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Molecular Cell* 53, 7-18. 10.1016/j.molcel.2013.11.003.

34. Chen, L.C., Nievera, C.J., Lee, A.Y.L., and Wu, X.H. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7713-7720. 10.1074/jbc.M710245200.
35. Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479, 241-U123. 10.1038/nature10515.
36. Liu, S., and Kong, D. (2021). End resection: a key step in homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Genome Instability & Disease* 2, 39-50. 10.1007/s42764-020-00028-5.
37. Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T.K., Burma, S., and Khanna, K.K. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 38, 1821-1831. 10.1093/nar/gkp1164.
38. Walsh, C.S. (2015). Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecologic Oncology* 137, 343-350. 10.1016/j.ygyno.2015.02.017.
39. Liu, Y.L., and West, S.C. (2004). Timeline - Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 937-944. 10.1038/nrm1502.
40. Kee, Y., and D'Andrea, A.D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *Journal of Clinical Investigation* 122, 3799-3806. 10.1172/jci58321.
41. Rogers, C.B., Kram, R.E., Lin, K.V., Myers, C.L., Sobock, A., Hendrickson, E.A., and Bielinsky, A.K. (2023). Fanconi anemia-associated chromosomal radial formation is dependent on POL theta-mediated alternative end joining. *Cell Reports* 42, 112428. 10.1016/j.celrep.2023.112428.
42. Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* 26, 52-64. 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
43. Betermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *Plos Genetics* 10, e1004086. 10.1371/journal.pgen.1004086.
44. van Holde, K., and Zlatanova, J. The nucleosome core particle: does it have structural and physiologic relevance?
45. Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. 421, 448-453.
46. Ferrand, J., Plessier, A., and Polo, S.E. (2021). Control of the chromatin response to DNA damage: Histone proteins pull the strings. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 113, 75-87. 10.1016/j.semcd.2020.07.002.
47. Caron, P., Choudhary, J., Clouaire, T., Bugler, B., Daburon, V., Aguirrebengoa, M., Mangeat, T., Iacovoni, J.S., Alvarez-Quilon, A., Cortes-Ledesma, F., and Legube, G. (2015). Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Reports* 13, 1-12. 10.1016/j.celrep.2015.10.024.
48. Soria, G., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2012). Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 46, 722-734. 10.1016/j.molcel.2012.06.002.
49. Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gamma H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *Embo Journal* 29, 1446-1457. 10.1038/emboj.2010.38.
50. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5858-5868. 10.1074/jbc.273.10.5858.
51. Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of Cell Biology* 146, 905-915. 10.1083/jcb.146.5.905.
52. Collins, P.L., Purman, C., Porter, S.I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K.E., Gurewitz, G.L., Sleckman, B.P., Bednarski, J.J., Bassing, C.H., and Oltz, E.M. (2020). DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nature Communications* 11. 10.1038/s41467-020-16926-x.

53. Dekker, J., and Misteli, T. (2015). Long-Range Chromatin Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, a019356. 10.1101/cshperspect.a019356.
54. Simonetta, M., de Krijger, I., Serrat, J., Moatti, N., Fortunato, D., Hoekman, L., Bleijerveld, O.B., Altelaar, A.F.M., and Jacobs, J.J.L. (2018). H4K20me2 distinguishes pre-replicative from post-replicative chromatin to appropriately direct DNA repair pathway choice by 53BP1-RIF1-MAD2L2. *Cell Cycle* 17, 124-136. 10.1080/15384101.2017.1404210.
55. Acs, K., Luijsterburg, M.S., Ackermann, L., Salomons, F.A., Hoppe, T., and Dantuma, N.P. (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 1345-U1355. 10.1038/nsmb.2188.
56. Mallette, F.A., Mattioli, F., Cui, G.F., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., and Richard, S. (2012). RNF8-and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *Embo Journal* 31, 1865-1878. 10.1038/emboj.2012.47.
57. Aleksandrov, R., Hristova, R., Stoynov, S., and Gospodinov, A. (2020). The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair. *Cells* 9, 1853. doi: 10.3390/cells9081853.
58. Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M.T., Young, J.T.F., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al. (2013). A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 49, 872-883. 10.1016/j.molcel.2013.01.001.
59. Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 147-154. 10.1016/j.gde.2004.02.009.
60. Jacquet, K., Fradet-Turcotte, A., Avvakumov, N., Lambert, J.-P., Roques, C., Pandita, Raj K., Paquet, E., Herst, P., Gingras, A.-C., Pandita, Tej K., et al. (2016). The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation. *Molecular Cell* 62, 409-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.031>.
61. Cheng, X., Jobin-Robitaille, O., Billon, P., Buisson, R., Niu, H.Y., Lacoste, N., Abshiru, N., Cote, V., Thibault, P., Kron, S.J., et al. (2018). Phospho-dependent recruitment of the yeast NuA4 acetyltransferase complex by MRX at DNA breaks regulates RPA dynamics during resection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 10028-10033. 10.1073/pnas.1806513115.
62. Nakamura, K., Saredi, G., Becker, J.R., Foster, B.M., Nguyen, N.V., Beyer, T.E., Cesa, L.C., Faull, P.A., Lukauskas, S., Frimurer, T., et al. (2019). H4K20meO recognition by BRCA1-BARD1 directs homologous recombination to sister chromatids. *Nature Cell Biology* 21, 311-+. 10.1038/s41556-019-0282-9.
63. Schwab, J.D., Kühlwein, S.D., Ikononi, N., Kühl, M., and Kestler, H.A. (2020). Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean? *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, 571-582. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.001>.
64. Mussel, C., Hopfensitz, M., and Kestler, H.A. (2010). BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* 26, 1378-1380. 10.1093/bioinformatics/btq124.
65. Rodriguez, A., Torres, L., Juarez, U., Sosa, D., Azpeitia, E., Garcia-de Teresa, B., Cortes, E., Ortiz, R., Salazar, A.M., Ostrosky-Wegman, P., et al. (2015). Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 12, 19. 10.1186/s12976-015-0011-4.
66. Rodriguez, A., Naveja, J.J., Torres, L., de Teresa, B.G., Juarez-Figueroa, U., Ayala-Zambrano, C., Azpeitia, E., Mendoza, L., and Frias, S. (2019). WIP1 Contributes to the Adaptation of Fanconi Anemia Cells to DNA Damage as Determined by the Regulatory Network of the Fanconi Anemia and Checkpoint Recovery Pathways. *Frontiers in Genetics* 10, 411. 10.3389/fgene.2019.00411.
67. Rodriguez, A., Zhang, K., Farkkila, A., Filiatrault, J., Yang, C., Velazquez, M., Furutani, E., Goldman, D.C., Garcia de Teresa, B., Garza-Mayen, G., et al. (2021). MYC Promotes Bone

- Marrow Stem Cell Dysfunction in Fanconi Anemia. *Cell Stem Cell* 28, 33-47 e38. 10.1016/j.stem.2020.09.004.
68. Searle, N.E., and Pillus, L. (2018). Critical genomic regulation mediated by Enhancer of Polycomb. *Current Genetics* 64, 147-154. 10.1007/s00294-017-0742-3.
 69. Dhar, S., Gursoy-Yuzugullu, O., Parasuram, R., and Price, B.D. (2017). The tale of a tail: histone H4 acetylation and the repair of DNA breaks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 372, 20160284. 10.1098/rstb.2016.0284.
 70. Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M.K., and Price, B.D. (2015). Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 7507-7512. 10.1073/pnas.1504868112.
 71. Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2021). Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22, 796-814. 10.1038/s41580-021-00394-2.
 72. Zahid, S., El Dahan, M.S., Iehl, F., Fernandez-Varela, P., Le Du, M.H., Ropars, V., and Charbonnier, J.B. (2021). The Multifaceted Roles of Ku70/80. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 23, 4134. 10.3390/ijms22084134.
 73. Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42462-42467. 10.1074/jbc.C100466200.
 74. Scully, R., and Xie, A.Y. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 750, 5-14. 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007.
 75. Salguero, I., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Sczaniecka-Clift, M., Demir, M., Jhujh, S., Wilson, M.D., and Jackson, S.P. (2019). MDC1 PST-repeat region promotes histone H2AX-independent chromatin association and DNA damage tolerance. *Nature Communications* 10, 5191. 10.1038/s41467-019-12929-5.
 76. Pei, H.D., Zhang, L., Luo, K.T., Qin, Y.X., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L.W., You, Z.S., and Lou, Z.K. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470, 124-U144. 10.1038/nature09658.
 77. Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J.J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373. 10.1016/j.cell.2006.10.043.
 78. Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C.Y., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., and Durocher, D. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499, 50-+. 10.1038/nature12318.
 79. Tuzon, C.T., Spektor, T., Kong, X.D., Congdon, L.M., Wu, S.M., Schotta, G., Yokomori, K., and Rice, J.C. (2014). Concerted Activities of Distinct H4K20 Methyltransferases at DNA Double-Strand Breaks Regulate 53BP1 Nucleation and NHEJ-Directed Repair. *Cell Reports* 8, 429-437. 10.1016/j.celrep.2014.06.013.
 80. Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527, 389-+. 10.1038/nature15401.
 81. McElhinny, S.A.N., Snowden, C.M., McCarville, J., and Ramsden, D.A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Molecular and Cellular Biology* 20, 2996-3003. 10.1128/mcb.20.9.2996-3003.2000.
 82. Goodarzi, A.A., Yu, Y.P., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R.Q., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., and Lees-Miller, S.P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *Embo Journal* 25, 3880-3889. 10.1038/sj.emboj.7601255.
 83. Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.Y., Obuse, C., Nishi, R., et al. (2017). BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Reports* 18, 520-532. 10.1016/j.celrep.2016.12.042.

84. Densham, R.M., Garvin, A.J., Stone, H.R., Strachan, J., Baldock, R.A., Daza-Martin, M., Fletcher, A., Blair-Reid, S., Beesley, J., Johal, B., et al. (2016). Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 647-655. 10.1038/nsmb.3236.
85. Noordermeer, S.M., Adam, S., Setiapura, D., Barazas, M., Pettitt, S.J., Ling, A.K., Olivieri, M., Alvarez-Quilon, A., Moatti, N., Zimmermann, M., et al. (2018). The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* 560, 117-+. 10.1038/s41586-018-0340-7.
86. Mirman, Z., Sasi, N.K., King, A., Chapman, J.R., and de Lange, T. (2022). 53BP1-shieldin-dependent DSB processing in BRCA1-deficient cells requires CST-Pol alpha-primase fill-in synthesis. *Nature Cell Biology* 24, 51-+. 10.1038/s41556-021-00812-9.
87. Clairmont, C.S., Sarangi, P., Ponniselvan, K., Galli, L.D., Csete, I., Moreau, L., Adelmant, G., Chowdhury, D., Marto, J.A., and D'Andrea, A.D. (2020). TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change. *Nature Cell Biology* 22, 87-+. 10.1038/s41556-019-0442-y.
88. Saito, S., Maeda, R., and Adachi, N. (2017). Dual loss of human POLQ and LIG4 abolishes random integration. *Nature Communications* 8, 16112. 10.1038/ncomms16112.
89. Wang, M.L., Wu, W.Z., Wu, W.Q., Rosidi, B., Zhang, L.H., Wang, H.C., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research* 34, 6170-6182. 10.1093/nar/gkl840.
90. Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I.R., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J., et al. (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol theta-mediated repair. *Nature* 518, 258-U306. 10.1038/nature14184.
91. Carvajal-Garcia, J., Cho, J.E., Carvajal-Garcia, P., Feng, W.J., Wood, R.D., Sekelsky, J., Gupta, G.P., Roberts, S.A., and Ramsden, D.A. (2020). Mechanistic basis for microhomology identification and genome scarring by polymerase theta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 8476-8485. 10.1073/pnas.1921791117.
92. Luedeman, M.E., Stroik, S., Feng, W.J., Luthman, A.J., Gupta, G.P., and Ramsden, D.A. (2022). Poly(ADP) ribose polymerase promotes DNA polymerase theta-mediated end joining by activation of end resection. *Nature Communications* 13, 4547. 10.1038/s41467-022-32166-7.
93. Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y., and Chen, J.J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7155-7160. 10.1073/pnas.0811159106.
94. Zhao, W.X., Steinfeld, J.B., Liang, F.S., Chen, X.Y., Maranon, D.G., Ma, C.J., Kwon, Y., Rao, T., Wang, W.B., Sheng, C., et al. (2017). BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature* 550, 360-365. 10.1038/nature24060.
95. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *Plos Genetics* 4, e1000110. 10.1371/journal.pgen.1000110.
96. Duckworth-Rysiecki G Fau - Toji, L., Toji L Fau - Ng, J., Ng J Fau - Clarke, C., Clarke C Fau - Buchwald, M., and Buchwald, M. Characterization of a simian virus 40-transformed Fanconi anemia fibroblast cell line.
97. Näf, D., Kupfer Gm Fau - Suliman, A., Suliman A Fau - Lambert, K., Lambert K Fau - D'Andrea, A.D., and D'Andrea, A.D. Functional activity of the fanconi anemia protein FAA requires FAC binding and nuclear localization.
98. Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 197-210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>.
99. Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554. 10.1126/science.1108297.
100. Lee, J.H., Mand, M.R., Deshpande, R.A., Kinoshita, E., Yang, S.H., Wyman, C., and Paull, T.T. (2013). Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) Kinase Activity Is Regulated by ATP-

- driven Conformational Changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) Complex. *Journal of Biological Chemistry* 288, 12840-12851. 10.1074/jbc.M113.460378.
101. Kobayashi, J., Tsuchi, H., Chen, B., Bruma, S., Tashiro, S., Matsuura, S., Tanimoto, K., Chen, D.J., and Komatsu, K. (2009). Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380, 752-757. 10.1016/j.bbrc.2009.01.109.
 102. An, J., Huang, Y.C., Xu, Q.Z., Zhou, L.J., Shang, Z.F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.D., Wu, D.C., and Zhou, P.K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *Bmc Molecular Biology* 11, 18. 10.1186/1471-2199-11-18.
 103. Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10, 886-895. 10.1016/s0960-9822(00)00610-2.
 104. Urtishak, K.A., Smith, K.D., Chanoux, R.A., Greenberg, R.A., Johnson, F.B., and Brown, E.J. (2009). Timeless Maintains Genomic Stability and Suppresses Sister Chromatid Exchange during Unperturbed DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8768-8776. 10.1074/jbc.M806103200.
 105. Liaw, H., Lee, D., and Myung, K. (2011). DNA-PK-Dependent RPA2 Hyperphosphorylation Facilitates DNA Repair and Suppresses Sister Chromatid Exchange. *Plos One* 6, e21424. 10.1371/journal.pone.0021424.
 106. Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Molecular and Cellular Biology* 19, 3267-3277.
 107. DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo Journal* 21, 3192-3200. 10.1093/emboj/cdf299.
 108. Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R.Z., Cowan, M.J., and Yannone, S.M. (2007). Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by artemis nuclease. *Journal of Biological Chemistry* 282, 3547-3558. 10.1074/jbc.M607745200.
 109. Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Molecular Cell* 67, 891-+. 10.1016/j.molcel.2017.08.002.
 110. Zhang, J.R., Ma, Z.F., Treszezamsky, A., and Powell, S.N. (2005). MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 902-909. 10.1038/nsmb991.
 111. Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* 207, 855-865. 10.1084/jem.20100244.
 112. Jeong, H., Wie, M., Baek, I.J., Sohn, G., Um, S.H., Lee, S.G., Seo, Y., Ra, J., Lee, E.A., Kim, S., et al. (2022). TRIP13 Participates in Immediate-Early Sensing of DNA Strand Breaks and ATM Signaling Amplification through MRE11. *Cells* 11, 4095. 10.3390/cells11244095.
 113. Bertwistle, D. (1999). ATM phosphorylates BRCA1. *Breast Cancer Research* 2, 666-41. 10.1186/bcr-1999-66641.
 114. Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* 141, 243-254. 10.1016/j.cell.2010.03.012.
 115. Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509-U506. 10.1038/nature06337.
 116. Shibata, A., and Jeggo, P.A. (2021). ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Genes* 12, 1370. 10.3390/genes12091370.
 117. Wang, H.L., Shi, L.Z., Wong, C.C.L., Han, X.M., Hwang, P.Y.H., Truong, L.N., Zhu, Q.Y., Shao, Z.P., Chen, D.J., Berns, M.W., et al. (2013). The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *Plos Genetics* 9, e1003277. 10.1371/journal.pgen.1003277.

118. Han, J.H., Wan, L., Jiang, G.X., Cao, L.P., Xia, F.Y., Tian, T., Zhu, X.M., Wu, M.J., Huen, M.S.Y., Wang, Y., et al. (2021). ATM controls the extent of DNA end resection by eliciting sequential posttranslational modifications of CtlP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *118*, e2022600118. 10.1073/pnas.2022600118.
119. West, A.G., and van Attikum, H. (2006). Chromatin at the crossroads - Meeting on signalling to chromatin epigenetics. *Embo Reports* *7*, 1206-1210. 10.1038/sj.embor.7400834.
120. Paiano, J., Zolnerowich, N., Wu, W., Pavani, R., Wang, C., Li, H.Z., Zheng, L., Shen, B.H., Sleckman, B.P., Chen, B.R., and Nussenzweig, A. (2021). Role of 53BP1 in end protection and DNA synthesis at DNA breaks. *Genes & Development* *35*, 1356-1367. 10.1101/gad.348667.121.
121. Epum, E.A., Mohan, M.J., Ruppe, N.P., and Friedman, K.L. (2020). Interaction of yeast Rad51 and Rad52 relieves Rad52-mediated inhibition of de novo telomere addition. *Plos Genetics* *16*, e1008608. 10.1371/journal.pgen.1008608.
122. Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* *467*, 678-U662. 10.1038/nature09399.
123. Yang, G., Liu, C., Chen, S.H., Kassab, M.A., Hoff, J.D., Walter, N.G., and Yu, X.C. (2018). Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Research* *46*, 3446-3457. 10.1093/nar/gky088.
124. Caron, M.C., Sharma, A.K., O'Sullivan, J., Myler, L.R., Ferreira, M.T., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Ethier, C., Gagne, J.P., Langelier, M.F., et al. (2019). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nature Communications* *10*, 2954. 10.1038/s41467-019-10741-9.
125. Wang, J.H., Ding, Q.S., Fujimori, H., Motegi, A., Miki, Y., and Masutani, M. (2016). Loss of CtlP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors. *Oncotarget* *7*, 7701-7713. 10.18632/oncotarget.6715.
126. Mateos-Gomez, P.A., Gong, F.D., Nair, N., Miller, K.M., Lazzerini-Denchi, E., and Sfeir, A. (2015). Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* *518*, 254-U285. 10.1038/nature14157.
127. So, A., Dardillac, E., Muhammad, A., Chailleux, C., Sesma-Sanz, L., Ragu, S., Le Cam, E., Canitrot, Y., Masson, J.Y., Dupaigne, P., et al. (2022). RAD51 protects against nonconservative DNA double-strand break repair through a nonenzymatic function. *Nucleic Acids Research* *50*, 2651-2666. 10.1093/nar/gkac073.
128. Cai, M.Y., Dunn, C.E., Chen, W.X., Kochupurakkal, B.S., Nguyen, H., Moreau, L.A., Shapiro, G.I., Parmar, K., Kozono, D., and D'Andrea, A.D. (2020). Cooperation of the ATM and Fanconi Anemia/BRCA Pathways in Double-Strand Break End Resection. *Cell Reports* *30*, 2402-2415. 10.1016/j.celrep.2020.01.052.
129. Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A., and Huertas, P. (2014). BRCA1 Accelerates CtlP-Mediated DNA-End Resection. *Cell Reports* *9*, 451-459. 10.1016/j.celrep.2014.08.076.
130. Reczek, C.R., Szabolcs, M., Stark, J.M., Ludwig, T., and Baer, R. (2013). The interaction between CtlP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. *Journal of Cell Biology* *201*, 693-707. 10.1083/jcb.201302145.
131. Truong, L.N., Li, Y.J., Shi, L.D.Z., Hwang, P.Y.H., He, J., Wang, H.L., Razavian, N., Berns, M.W., and Wu, X.H. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 7720-7725. 10.1073/pnas.1213431110.
132. Lok, B.H., Carley, A.C., Tchang, B., and Powell, S.N. (2013). RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene* *32*, 3552-3558. 10.1038/onc.2012.391.
133. Green, A.R., Caracappa, D., Benhasouna, A.A., Alshareeda, A., Nolan, C.C., Macmillan, R.D., Madhusudan, S., Ellis, I.O., and Rakha, E.A. (2015). Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* *149*, 353-362. 10.1007/s10549-014-3230-1.

134. Jin, T.Y., Park, K.S., Nam, S.E., Yoo, Y.B., Park, W.S., and Yun, I.J. (2022). BRCA1/2 Serves as a Biomarker for Poor Prognosis in Breast Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 3754. 10.3390/ijms23073754.
135. Zhou, J., Gelot, C., Pantelidou, C., Li, A., Yucel, H., Davis, R.E., Farkkila, A., Kochupurakkal, B., Syed, A., Shapiro, G.I., et al. (2021). A first-in-class polymerase theta inhibitor selectively targets homologous-recombination-deficient tumors. *Nature Cancer* 2, 598-+. 10.1038/s43018-021-00203-x.
136. Zatreanu, D., Robinson, H.M.R., Alkhatib, O., Boursier, M., Finch, H., Geo, L., Grande, D., Grinkevich, V., Heald, R.A., Langdon, S., et al. (2021). Pol theta inhibitors elicit BRCA-gene synthetic lethality and target PARP inhibitor resistance. *Nature Communications* 12, 3636. 10.1038/s41467-021-23463-8.
137. Xu, G.T., Chapman, J.R., Brandsma, I., Yuan, J.S., Mistrik, M., Bouwman, P., Bartkova, J., Gogola, E., Warmerdam, D., Barazas, M., et al. (2015). REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* 521, 541-U308. 10.1038/nature14328.
138. Hurley, R.M., Hendrickson, A.E.W., Visscher, D.W., Ansel, P., Harrell, M.I., Wagner, J.M., Negron, V., Goergen, K.M., Maurer, M.J., Oberg, A.L., et al. (2019). 53BP1 as a potential predictor of response in PARP inhibitor-treated homologous recombination-deficient ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 153, 127-134. 10.1016/j.ygyno.2019.01.015.
139. Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q.F., et al. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 688-U656. 10.1038/nsmb.1831.
140. Chroma, K., Mistrik, M., Moudry, P., Gursky, J., Liptay, M., Strauss, R., Skrott, Z., Vrtel, R., Bartkova, J., Kramara, J., and Bartek, J. (2017). Tumors overexpressing RNF168 show altered DNA repair and responses to genotoxic treatments, genomic instability and resistance to proteotoxic stress. *Oncogene* 36, 2405-2422. 10.1038/onc.2016.392.
141. Tang, J.B., Cho, N.W., Cui, G.F., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., and Greenberg, R.A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 317-325. 10.1038/nsmb.2499.
142. Zhang, H., Devoucoux, M., Song, X.S., Li, L., Ayaz, G., Cheng, H., Tempel, W., Dong, C., Loppnau, P., Cote, J., and Min, J.R. (2020). Structural Basis for EPC1-Mediated Recruitment of MBTD1 into the NuA4/TIP60 Acetyltransferase Complex. *Cell Reports* 30, 3996-+. 10.1016/j.celrep.2020.03.003.
143. Renaud, E., Barascu, A., and Rosselli, F. (2016). Impaired TIP60-mediated H4K16 acetylation accounts for the aberrant chromatin accumulation of 53BP1 and RAP80 in Fanconi anemia pathway-deficient cells. *Nucleic Acids Research* 44, 648-656. 10.1093/nar/gkv1019.
144. Hejna, J., Holtorf, M., Hines, J., Mathewson, L., Hemphill, A., Al-Dhalimy, M., Olson, S.B., and Moses, R.E. (2008). Tip60 Is Required for DNA Interstrand Cross-link Repair in the Fanconi Anemia Pathway*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 9844-9851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709076200>.
145. Rodriguez, A., Sosa, D., Torres, L., Molina, B., Frias, S., and Mendoza, L. (2012). A Boolean network model of the FA/BRCA pathway. *Bioinformatics* 28, 858-866. 10.1093/bioinformatics/bts036.
146. Trenner, A., and Sartori, A.A. (2019). Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. *Frontiers in Oncology* 9, 1388. 10.3389/fonc.2019.01388.
147. Friedland, W., Jacob, P., and Kundrat, P. (2011). MECHANISTIC SIMULATION OF RADIATION DAMAGE TO DNA AND ITS REPAIR: ON THE TRACK TOWARDS SYSTEMS RADIATION BIOLOGY MODELLING. *Radiation Protection Dosimetry* 143, 542-548. 10.1093/rpd/ncq383.
148. Hu, A.K., Zhou, W.Y., Wu, Z., Zhang, H., Li, J.L., and Qiu, R. (2022). Modeling of DNA Damage Repair and Cell Response in Relation to p53 System Exposed to Ionizing Radiation. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 11323. 10.3390/ijms231911323.

149. Rouhani, M. (2019). Modeling the interplay between DNA-PK, Artemis, and ATM in non-homologous end-joining repair in G1 phase of the cell cycle. *Journal of Biological Physics* *45*, 127-146. 10.1007/s10867-018-9519-2.
150. Qi, Y.P., Warmenhoven, J.W., Henthorn, N.T., Ingram, S.P., Xu, X.G., Kirkby, K.J., and Merchant, M.J. (2021). Mechanistic Modelling of Slow and Fast NHEJ DNA Repair Pathways Following Radiation for G0/G1 Normal Tissue Cells. *Cancers* *13*, 2202. 10.3390/cancers13092202.
151. Lee, A., Moon, B.I., and Kim, T.H. (2020). BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Annals of Laboratory Medicine* *40*, 114-121. 10.3343/alm.2020.40.2.114.
152. Imyanitov, E., and Sokolenko, A. (2021). Mechanisms of acquired resistance of BRCA1/2-driven tumors to platinum compounds and PARP inhibitors. *World Journal of Clinical Oncology* *12*. 10.5306/wjco.v12.i7.544.
153. Rose, M., Burgess, J.T., O'Byrne, K., Richard, D.J., and Bolderson, E. (2020). PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* *8*, 564601. 10.3389/fcell.2020.564601.
154. Callen, E., Zong, D.L., Wu, W., Wong, N., Stanlie, A., Ishikawa, M., Pavani, R., Dumitrache, L.C., Byrum, A.K., Mendez-Dorantes, C., et al. (2020). 53BP1 Enforces Distinct Pre- and Post-resection Blocks on Homologous Recombination. *Molecular Cell* *77*, 26-+. 10.1016/j.molcel.2019.09.024.
155. Feng, W.J., Simpson, D.A., Carvajal-Garcia, J., Price, B.A., Kumar, R.J., Mose, L.E., Wood, R.D., Rashid, N., Purvis, J.E., Parker, J.S., et al. (2019). Genetic determinants of cellular addiction to DNA polymerase theta. *Nature Communications* *10*, 4286. 10.1038/s41467-019-12234-1.
156. Goodarzi, A.A., Jeggo, P., and Lobrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair* *9*, 1273-1282. 10.1016/j.dnarep.2010.09.013.
157. Marmorstein, R., and Zhou, M.M. (2014). Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *6*, a018762. 10.1101/cshperspect.a018762.
158. Dang, F.B., and Wei, W.Y. (2022). Targeting the acetylation signaling pathway in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* *85*, 209-218. 10.1016/j.semcancer.2021.03.001.
159. Ahmad, S., Cote, V., Chengid, X., Bourriquen, G., Sapountzi, V., Altafid, M., and Cote, J. (2021). Antagonistic relationship of NuA4 with the non-homologous end-joining machinery at DNA damage sites. *Plos Genetics* *17*, e1009816. 10.1371/journal.pgen.1009816.
160. Belo, H., Silva, G., Cardoso, B.A., Porto, B., Minguillon, J., Barbot, J., Coutinho, J., Casado, J.A., Benedito, M., Saturnino, H., et al. (2015). Epigenetic Alterations in Fanconi Anaemia: Role in Pathophysiology and Therapeutic Potential. *Plos one* *10*, e0139740.
161. Sun, Y.L., Jiang, X.F., Chen, S.J., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 13182-13187. 10.1073/pnas.0504211102.
162. Tang, Y., Luo, J.Y., Zhang, W.Z., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Molecular Cell* *24*, 827-839. 10.1016/j.molcel.2006.11.021.
163. Patel, J.H., Du, Y.P., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., et al. (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 10826-10834. 10.1128/mcb.24.24.10826-10834.2004.
164. Gaughan, L., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2002). Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 25904-25913. 10.1074/jbc.M203423200.

ANEXO I.
Reactivos utilizados

Anticuerpos

Anticuerpo	Casa comercial	Número de catálogo
Anti-H4ac pan acetilado (K5, K8, K12)	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific	Cat# PA05-40083
Anti-H4	Abcam	Ab10158
Anti-H2AK15ac	Epigenetek	A68385-100
Anti-γH2AX	Millipore	05-636
Anti-γH2AX	Abcam	Cat# ab81299
Anti-γH2AX	CellSignal	2577S
Anti-EPC1	Abcam	Ab112043
Anti-TIP60/KAT5	Santa Cruz	sc-166323
Anti-EP400	Bethyl	A3541A
Anti-RAD51	Genetex	Cat# GTX70230
Anti-RAD52	Santa Cruz	Cat# sc-365341
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™488	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11008
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™555	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21422
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling	Cat# 7074
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling	Cat# 7076

Reactivos químicos

Reactivo	Casa comercial	Número de catálogo
Bleomicina		Cat#
Mitomicina C (MMC)	Sigma-Aldrich	Cat# 10107409001

Transfecciones

Compuesto	Casa comercial	Número de catálogo
siRNA SCR	Dharmacon	Cat# D-001210-02-20
siRNA vs <i>TIP60/KAT5</i>	Dharmacon	Cat# D-006301-01-0005
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen	Cat# 13778
sgRNA vs <i>EPC1</i> (TrueGuide™ Synthetic sgRNA)	Invitrogen	Cat# A35533 Assay ID: CRISPR708387_SGM CRISPR708406_SGM CRISPR918493_SGM
TrueCut™ Cas9 Protein v2	Invitrogen	Cat#
Lipofectamine™ CRISPRMAX™	Invitrogen	Cat# 100835630
Cas9 Transfection Reagent	Invitrogen	Cat# 100835635

Reactivos ensayos comerciales

Reactivo	Casa comercial	Número de catálogo
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92005
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92001
Duolink® In Situ Detection Reagents Red	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92008
10% Normal Goat Serum	Life technologies	Cat# 50062Z
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories	Cat# H-1200
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	Thermo Scientific	Cat# 78840
RIPA 10X		
NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0–1.5 mm, Mini Protein Gels	Invitrogen™	Cat# NP0322BOX
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen™	Cat# NP0002
NuPAGE™ Transfer Buffer (20X)	NP00061	Cat# NP00061
ECL™ system Prime Western Blotting Detection Reagents	Amersham™ GE	Cat# RPN2232
Blotting-Grade Blocker	BioRad	Cat# 1706404
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	Cat# 46430
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich	Cat# I8896

Softwares

Software	Fuente	Identificador
FIJI	Open source	Schindelin et al. 2012 (42)
Prism (v10)	GraphPad	https://www.graphpad.com
Zen	Zeiss group	https://www.zeiss.com

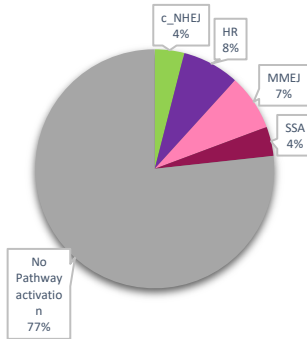
ANEXO II.

Simulaciones de todas las mutantes con un pulso de daño y daño continuo

Simulaciones con pulso de daño. Cuencas de atracción y análisis de trayectoria de simulaciones con la mutación nula de alguno de los nodos (iniciando con el DSB activo). El nodo inactivado está especificado debajo de la gráfica de pai.

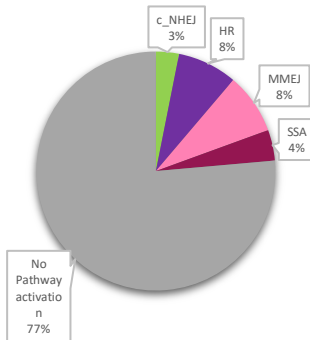
Cuenca de atracción

Análisis de trayectoria



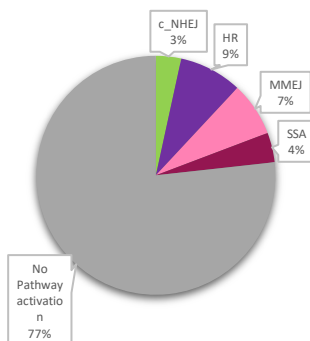
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							

ATM mutante nula



	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							

NHEJ Core mutante nula



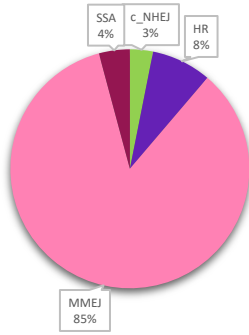
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							

H2AK15-H4K20 mutante nula

Daño continuo. Cuencas de atracción y análisis de trayectoria de simulaciones con la mutación nula de alguno de los nodos en contexto de daño continuo (el nodo del DSB se fija en 1). El nodo inactivado está especificado debajo de la gráfica de pai

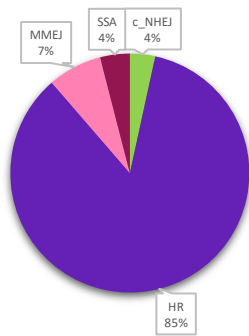
Cuenca de atracción

Análisis de trayectoria



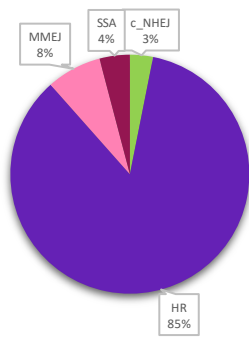
DSB	ATM		c_NHEJ				sRES				IRES	HR	MMEJ		SSA						
	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EX01	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					

NHEJ Core mutante nula



DSB	ATM		c_NHEJ				sRES				IRES	HR	MMEJ		SSA						
	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EX01	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

H2AK15-H4K20 mutante nula



DSB	ATM		c_NHEJ				sRES				IRES	HR	MMEJ		SSA						
	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EX01	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

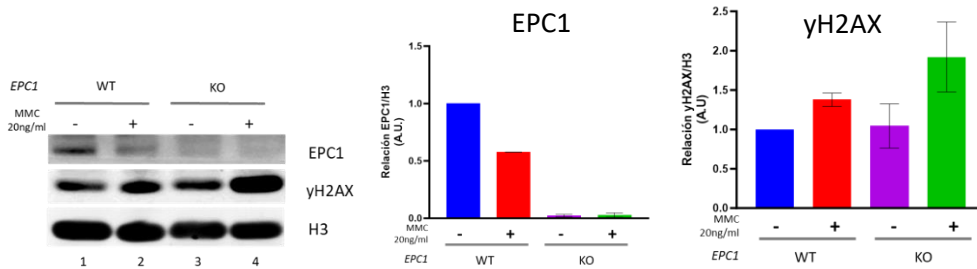
53BP1 mutante nula

ANEXO III.

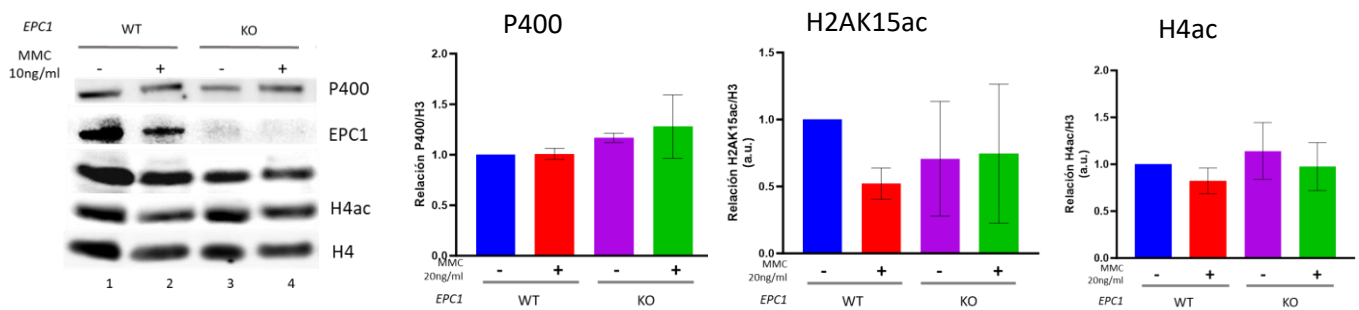
Densitometrías de los Western Blots

ANEXO III. El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas de los Western Blots se realizó normalizando la densidad de la banda objetivo con la densidad de la banda correspondiente al control de carga. A partir de la normalización se calculó la tasa de cambio dividiendo la densidad normalizada de cada banda entre la densidad normalizada de las células WT sin tratamiento.

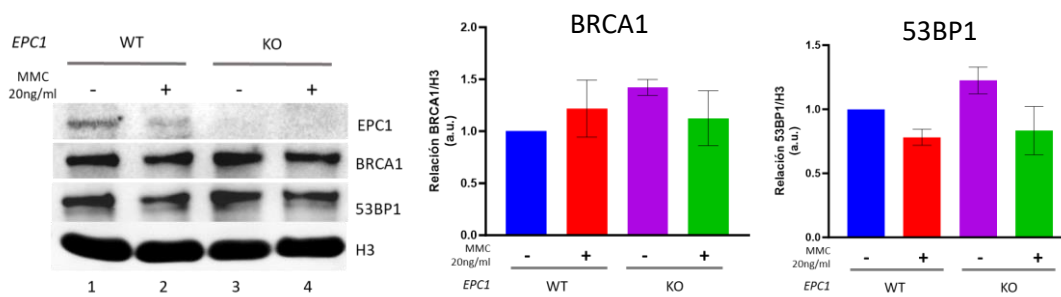
a)



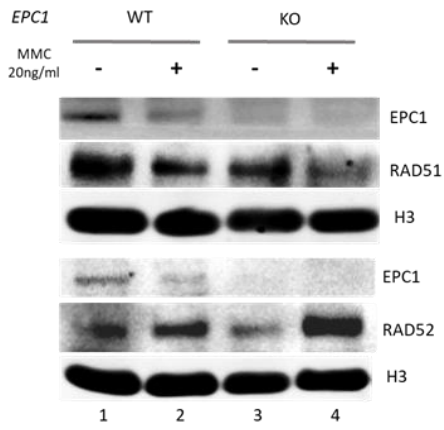
b)



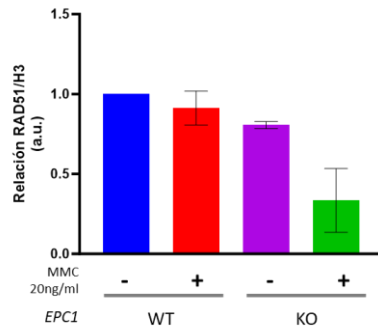
c)



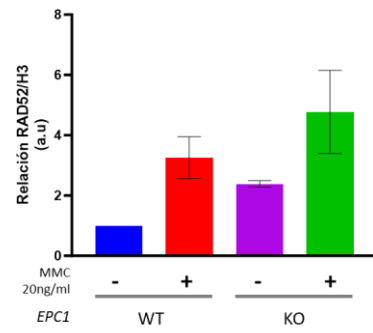
d)



RAD51



RAD52



ANEXO VI.
Artículo requisito



A Boolean network model of the double-strand break repair pathway choice

Cecilia Ayala-Zambrano^{a,b}, Mariana Yuste^c, Sara Frias^{a,d}, Benilde Garcia-de-Teresa^a, Luis Mendoza^e, Eugenio Azpeitia^c, Alfredo Rodríguez^{d,f,*}, Leda Torres^{a,*}

^a Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México 04530, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

^c Centro de Ciencias Matemáticas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Mexico

^d Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad de México 04510, Mexico

^e Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad de México 04510, Mexico

^f Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México 04530, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA damage
Mathematical modeling
Single-strand annealing
Synthetic lethality
TIP60

ABSTRACT

Double strand break (DSB) repair is critical to maintaining the integrity of the genome. DSB repair deficiency underlies multiple pathologies, including cancer, chromosome instability syndromes, and, potentially, neurodevelopmental defects. DSB repair is mainly handled by two pathways: highly accurate homologous recombination (HR), which requires a sister chromatid for template-based repair, limited to S/G2 phases of the cell cycle, and canonical non-homologous end joining (c-NHEJ), available throughout the cell cycle in which minimum homology is sufficient for highly efficient yet error-prone repair. Some circumstances, such as cancer, require alternative highly mutagenic DSB repair pathways like microhomology-mediated end-joining (MMEJ) and single-strand annealing (SSA), which are triggered to attend to DNA damage. These non-canonical repair alternatives are emerging as prominent drivers of resistance in drug-based tumor therapies. Multiple DSB repair options require tight inter-pathway regulation to prevent unscheduled activities. In addition to this complexity, epigenetic modifications of the histones surrounding the DSB region are emerging as critical regulators of the DSB repair pathway choice. Modeling approaches to understanding DSBs repair pathway choice are advantageous to perform simulations and generate predictions on previously uncharacterized aspects of DSBs response.

In this work, we present a Boolean network model of the DSB repair pathway choice that incorporates the knowledge, into a dynamic system, of the inter-pathways regulation involved in DSB repair, i.e., HR, c-NHEJ, SSA, and MMEJ. Our model recapitulates the well-characterized HR activity observed in *wild-type* cells in response to DSBs. It also recovers clinically relevant behaviors of *BRCA1/FANCS* mutants, and their corresponding drug resistance mechanisms ascribed to DNA repair gain-of-function pathogenic variants. Since epigenetic modifiers are dynamic and possible druggable targets, we incorporated them into our model to better characterize their involvement in DSB repair. Our model predicted that loss of the TIP60 complex and its corresponding histone acetylation activity leads to activation of SSA in response to DSBs. Our experimental validation showed that TIP60 effectively prevents activation of RAD52, a key SSA executor, and confirms the suitable use of Boolean network modeling for understanding DNA DSB repair.

1. Introduction

The cell is equipped with multiple DNA repair pathways needed to maintain the genome's integrity and the inheritance of accurate genetic

information. If these pathways fail, damage accumulates in the form of DNA point mutations and/or structural variants. Excessive apoptotic response to DNA damage can lead to accelerated tissue aging (Schumacher et al., 2021; Zhang et al., 2005), whereas the DNA damage

* Corresponding authors at: Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México 04530, Mexico (L. Torres). Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad de México 04510, Mexico (A. Rodríguez).

E-mail addresses: alfredo.rodriguez@iibiomedicas.unam.mx (A. Rodríguez), ledatorres@ciencias.unam.mx (L. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2023.111608>

Received 11 April 2023; Received in revised form 29 July 2023; Accepted 9 August 2023

Available online 16 August 2023

0022-5193/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

tolerance mechanism can lead to neoplasia, where large chromosome rearrangements, as well as gains and losses of chromosome segments, are commonly found. DNA repair pathways are, therefore, critical for maintaining tissue and organ homeostasis (Kim et al., 2012; Nussenzweig and Nussenzweig, 2010; Bignell et al., 2007).

The consequences of DNA repair deficiency range from accelerated aging to tumor formation and, when the DNA repair deficiency is congenital, chromosome instability syndromes (CISs). CISs are characterized by inherited pathogenic variants in genes critical for the repair of DNA damage; Fanconi anemia (FA), ataxia telangiectasia (AT), and xeroderma pigmentosum (XP) are prototypical examples of these diseases. In the CISs, the impact of DNA repair deficiency leads to congenital malformations and bone marrow failure (FA) (García-de-Teresa et al., 2020; Ceccaldi et al., 2012), cerebellar hypoplasia (AT) (Nissenkorn et al., 2015; Reiman et al., 2011), and increased cancer risk (FA, AT, and XP) (García-de-Teresa et al., 2020; Reiman et al., 2011; Alter et al., 2018; Kraemer et al., 1984; Nikolaev et al., 2022). Most of our knowledge on the multiple DNA repair mechanisms has been gathered from the study of cancer, aging, and these CIS, in return, this scientific knowledge should seek to be transformed into better clinical approaches for patients.

Among the multiple types of DNA lesions, double-strand breaks (DSBs) are known as the most lethal. DSBs are abrupt discontinuities of the double-stranded DNA phosphodiester backbone. In the context of cancer, DSBs have opposing roles, where they drive carcinogenesis through genomic instability (breakage and reunion of chromosome segments) while their induction, through radiotherapy, is one of the best current cancer treatments (Sage and Shikazono, 2017). DSBs are mainly repaired by any of four different pathways: homologous Recombination (HR), canonical non-homologous end joining (c-NHEJ), microhomology-mediated end joining (MMEJ), and single-strand annealing (SSA). HR is a high-fidelity pathway that uses the sister chromatid as a template, for copying and recovering the genetic information potentially lost in the DSB region, and thus its activity is limited to the post-replicative cell cycle phases (S and G2), thus ensuring proficient DNA repair. In contrast, the molecular executors of the other three DNA repair pathways do not use the sister chromatid as a template and directly rejoin the ends of the DSB, this ensures the continuity of the DNA molecule but at higher mutagenic propensity (García-de-Teresa et al., 2020; Ceccaldi et al., 2016).

Therapeutic opportunities to develop new drugs have emerged from the critical roles that DNA repair proteins have in maintaining cell viability. In this regard, a subject of intense research in the cancer field is synthetic lethality, where genetic defects or defective proteins, in two genes/proteins together, but not alone, result in cell death (Tewari et al., 2015). For example, *BRCA1/FANCS* deficient tumors frequently become hyper-dependent on proteins from alternative DNA repair pathways, such as Pol θ promoting MMEJ; the use of specific chemical inhibitors against these proteins results in synthetic lethality and tumor cell death, providing an excellent therapeutic opportunity to target these cancers (Zhou et al., 2021).

Change from HR to a low-fidelity repair pathway (like c-NHEJ, MMEJ, and SSA), as the primary repair process, are well-known mechanism underlying genome instability in *BRCA1/FANCS* and *BRCA2/FANCD1* mutant tumors. Moreover, *BRCA1/FANCS* tumor cells can gain resistance to treatment by restoring the HR pathway through the inactivation of c-NHEJ proteins, like 53BP1 (Callen et al., 2020; Bouwman et al., 2010). Novel combination therapy approaches that exploit DNA repair-based synthetic lethality are currently under scrutiny (Clairmont et al., 2020; Lemee et al., 2010; Ceccaldi et al., 2015). Additional examples include the development of ATM inhibitors (M3541) (Zimmermann et al., 2018; Waqar et al., 2022) and PARP inhibitors (Olaparib) for the treatment of *BRCA1/FANCS* and *BRCA2/FANCD1* mutated tumors (Tewari et al., 2015).

Other drugs design approach has focused in targeting the acetylation-deacetylation equilibrium, since it is involved in the function and stability of tumor suppressors (p53, Rb, PTEN) and oncogenes

(c-MYC, AKT1, SKP2) proteins (Sakaguchi et al., 1998; Tang et al., 2008; Tang et al., 2006; Frank et al., 2003; Liu et al., 2003; Patel et al., 2004; Dang and Wei, 2022). Targeting histone deacetylases (HDAC) and histone acetyl transferases (HAT) with small molecular inhibitors such as SAHA, MS-275, EML-425, C646, among others, have proven to be effective in delaying tumorigenesis (Dang and Wei, 2022; Grabarska et al., 2017; Bharathy et al., 2019; Milite et al., 2015; Ono et al., 2021). Moreover, histone acetylation has also been associated with the DSB repair pathway choice. DSBs trigger the recruitment of TIP60 acetyltransferase complex to chromatin, which in turn acetylates the histone tails H2AK15 and H4K16. These posttranslational modifications (PTMs) favor the open chromatin structure for recruitment of HR proteins and actively inhibit the recruitment of c-NHEJ- proteins (Fradet-Turcotte et al., 2013; Jacquet et al., 2016; Cheng et al., 2018; Cheng et al., 2021).

The proteins that participate in the above-described pathways cross-interact, either inhibiting or promoting their activities in an intricate network; therefore, every DSB repair pathway is an integral part of a network and should not be thought-of as isolated entities. Mathematical approaches have been developed to describe the impact of DSBs, ranging from models aimed to understand the complex nature of DNA DSBs (Friedland et al., 2011; Hu et al., 2022), chromatin environment (Hu et al., 2022); c-NHEJ fast and slow phases (Rouhani, 2019), resection dependency (Qi et al., 2021) and SSA biochemistry over the repair kinetics (Taleei et al., 2011). Our research group has previously developed Boolean network models that reconstruct the FA/BRCA DNA repair pathway and explore cell survival mechanisms in the face of DNA damage (Rodríguez et al., 2015; Rodríguez et al., 2019). In this work, we present a Boolean network model of the DSB repair pathway choice and explore its dynamics regarding DSB repair decisions in *wild-type* and mutant conditions. In contrast with previous DSB modeling mathematical approaches, this model does not focus on the kinetics or specific characteristics of the DSB repair process but aims to reach a broader scenario. Our network includes the main participants of the four DSB repair pathways, detailing the reported interactions that influence the repair pathway choice. It also reproduces multiple scenarios of DSB repair, including single mutants and multiple mutant combinations, simulating synthetic viability scenarios.

The model proposed in this work incorporates the participation of epigenetic mechanisms associated with the DSB repair pathway choice: the acetyltransferase complex TIP60 and the posttranslational modifications (PTMs) of the histone tails H2A and H4. The recruitment of TIP60 as a response to DSB presence has been described as an anti-c-NHEJ complex, and it has been associated with the promotion of HR (Fradet-Turcotte et al., 2013; Jacquet et al., 2016; Cheng et al., 2018; Cheng et al., 2021). Interestingly, our model simulations showed that absence of TIP60 favors SSA pathway selection, a prediction that we experimentally validated in human cell lines. In these experiments interfering with the expression of TIP60 acetyltransferase subunit (TIP60/KAT5), led to increased DNA damage and increased RAD52 foci formation, as a key SSA executor. These results show that our model is a useful tool to generate hypotheses on potential new drugs targeting DNA repair processes. In addition, the model can be updated with relevant information in the future.

2. Materials and methods

2.1. The network for DSB repair pathway choice

During the DSB repair process, multiple proteins interact to promote or inhibit three key decision points that prepare the broken DNA for rejoining: 1) DSB short resection, 2) DSB long resection, and 3) sister chromatid invasion (Fig. 1).

2.2. DSB signaling

After DSB formation, two key events are integral to the DNA damage

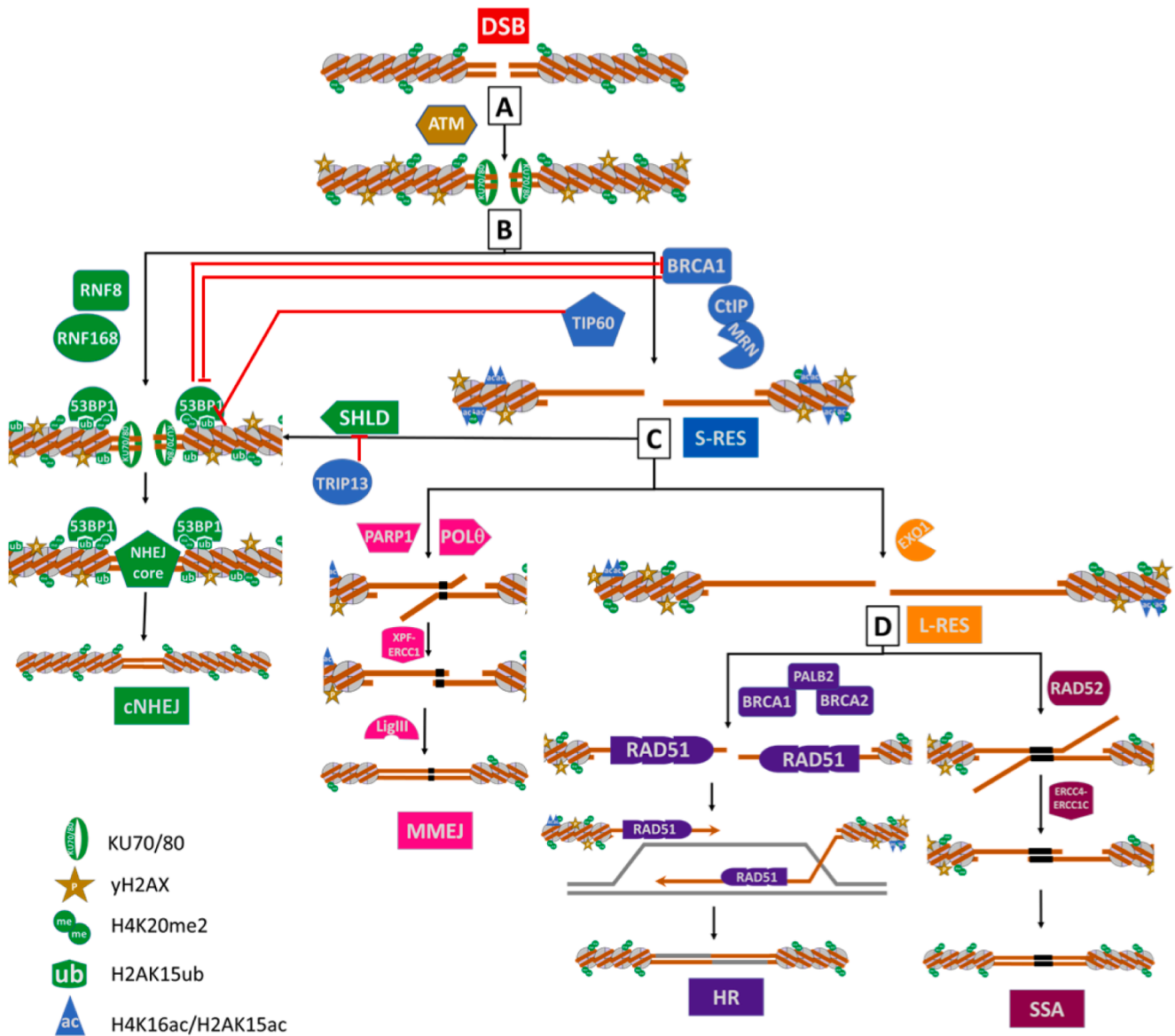


Fig. 1. DSB repair pathway choice. (A) Detection of DSBs activates a biochemical pathway aimed to protect the integrity of the DNA molecule and to repair its disruption. Immediately after DNA damage, ATM is activated and the KU70/KU80 heterodimer binds to the DNA ends protecting them from degradation. (B) ATM phosphorylates cell cycle arrest proteins and the histone variant H2AX, producing γ H2AX, helping in the spread of DNA damage signaling and promoting the recruitment of DNA repair proteins. The above mentioned constitutes a first decision point where the DNA ends can be rejoined by the cNHEJ machinery (green) or processed by S-RES nucleases (blue). (C) ssDNA formation is the second point of decision during DSB repair. If the ssDNA is hijacked by SHLD this will return the repair to cNHEJ (green), whereas PARP1-POLQ will promote MMEJ (pink) or EXO1 will promote ssDNA track extension (L-RES, orange), which will continue the further processing of the DNA ends toward HR. (D) The last decision point is the process of the L-RES intermediate, where the recombination proteins activate HR (purple); however, in cases where the HR pathway is not functional, RAD52 can take over the L-RES intermediate and promote the SSA pathway (plum).

response (DDR): 1) DNA damage detection and signaling by the serine-threonine kinases ATM or DNA-PKc; and 2) protection of DNA ends by the KU70-80 heterodimer (Fig. 1A) (Lee and Paull, 2021; Zahid et al., 2021).

ATM activation leads to the phosphorylation of histone variant H2AX on serine 139 (Burma et al., 2001), known thereafter as γ H2AX, and other downstream proteins like CtIP, MRE11, BRCA1/FANCS and EXO1 (Lee and Paull, 2021). The γ H2AX signal is established and propagated by ATM, or DNA-PKc on the chromatin neighboring the DSB (approximately 1–2 Mb) (Collins et al., 2020; Scully and Xie, 2013); γ H2AX is therefore considered the best surrogate for DSB detection. γ H2AX works as a docking place for the DDR mediator MDC1 (Salguero et al., 2019), which in turn recruits MRN (MRE11, RAD51 and NBS1 trimer) and RNF8. The coordinated activity of the MRN complex, responsible for

end-resection and the formation of ssDNA, and RNF8, the initiator of the ubiquitin cascade signaling in chromatin, promotes the arrival of the repair machinery to the DSB site to carry out the ulterior short-range resection (Scully and Xie, 2013; Salguero et al., 2019) (Fig. 1B).

2.3. Short-range resection

DNA end-resection at DSBs is a critical event during the DDR, where anti-resection proteins promote the retention of KU70/80 at the DSB ends, whereas pro-resection proteins work to evict this complex. The two best-known competitors at this point are 53BP1 and BRCA1/FANCS (Fig. 1B).

The presence of KU70/80 and 53BP1 at the DSB site allows the execution of c-NHEJ by DNA-PKc, Artemis, XRCC4, and ligase IV (NHEJ

Core, Fig. 1 green) (McElhinny et al., 2000; Goodarzi et al., 2006). The 53BP1 protein is a bivalent histone-mark reader that tethers to chromatin by recognizing two specific histone modifications: H2AK15ub and H4K20me2 (Fradet-Turcotte et al., 2013; Pei et al., 2011; Botuyan et al., 2006). The first mark, H2AK15ub, is part of the multistep ubiquitin signaling cascade stimulated in response to DNA damage, whereby MDC1 docks to chromatin by recognizing γ H2AX, allowing the successive recruitment of ubiquitin ligases RNF8 and RNF168, which results in the ubiquitination of lysin 15 of histone H2A (Fradet-Turcotte et al., 2013; Thorslund et al., 2015). The second one, H4K20me2, is abundant in the chromatin and becomes exposed during the DDR (Fig. 1, green) (Acs et al., 2011; Mallette et al., 2012), although there are reports describing active methylation of H4K20 during the DDR by H4K20 methyltransferases (SET8 and SUV4.10H1/2) (Pei et al., 2011; Tuzon et al., 2014).

However, 53BP1 recruitment can be antagonized by the activity of BRCA1/FANCS. During the S/G2 cell cycle phases, BRCA1/FANCS excludes 53BP1 from chromatin by facilitating its dephosphorylation (Isono et al., 2017) and enabling the recruitment of the chromatin remodeler SMARCA1 which displaces 53BP1 (Densham et al., 2016).

In addition, BRCA1/FANCS activates the enzyme complex responsible for initiating DSB ends resection: MRN and CtIP. The MRN-CtIP complex acts as an endo and exonuclease that cleaves the 5' DNA strand (close to the DSB) and uses this self-generated nick as the entry point for DNA resection towards the DSB end (3'→5'). This short-range resection (S-RES) leads to KU70-80 eviction (Fig. 1C) (Shibata et al., 2014; Chen et al., 2008; Garcia et al., 2011; Liu and Kong, 2021). Additionally, MRN activation triggers the recruitment of the acetyltransferase multiprotein complex TIP60, which acetylates H2AK15 and H4K16 histones tails. TIP60 also binds to H2AK20me2 and obstructs 53BP1 chromatin association, thereby, favors DNA end-resection (Jacques et al., 2016; Cheng et al., 2018) (Fig. 1B).

2.4. Long-range resection

Following S-RES, a second key decision step during DSB repair occurs. At this point the 3' ssDNA overhang can be processed in three different ways with distinct repair outcomes. The Shieldin complex (SHLD) can drive it into c-NHEJ, PARP1-Pol θ can channel it into MMEJ and, EXO1/BLM-DNA2 nucleases might drive it into extension of the DNA resection (L-RES). Therefore, the decision made at this stage is critical for DSB repair pathway choice/outcome (Fig. 1C).

For a long time, it was thought that the S-RES step was a point of no-return for the c-NHEJ; however, the discovery of the SHLD complex has changed this paradigm. SHLD is a multiprotein complex that binds to 53BP1 and, by using CST-Pol α polymerase complex, has the capacity to fill-in the already resected ssDNA gap to generate the DNA blunt ends needed for c-NHEJ (Noordermeer et al., 2018; Mirman et al., 2022). Nevertheless, assembly of the SHLD complex can be inhibited by the TRIP13 ATPase during the S/G2 phases, preventing c-NHEJ (Fig. 1C, green) and allowing the long-range nucleases, like EXO1 to recognize the 3' ssDNA overhang (Fig. 1C, orange) (Clairmont et al., 2020; Bolderson et al., 2010).

In scenarios of HR or c-NHEJ deficiency, the S-RES intermediate can be a substrate for PARP1 and Pol θ , the proteins in charge of MMEJ (Ceccaldi et al., 2015; Saito et al., 2017; Wang et al., 2006). PARP1 favors Pol θ recruitment to the damaged site (Luedeman et al., 2022), and Pol θ then aligns the two ssDNA 3' overhangs using regions of microhomology (approximately 2–6 bases of complementary sequences). Remotion of the DNA overhangs, that were not included in the microhomology-mediated alignment, together with the strand displacement leads to deletions, chromosome translocations, and locally templated insertions (Fig. 1C, pink) (Ceccaldi et al., 2016; Carvajal-Garcia et al., 2020; Mateos-Gomez et al., 2015).

2.5. Sister chromatid invasion

Selection between HR and SSA is the final step in the DSB repair pathway choice. At this step, the L-RES intermediate is initially coated by RPA protein complexes, which are subsequently replaced by RAD51 in a BRCA1/FANCS-BRCA2/FANCD1-PALB2/FANCN complex dependent-manner. RAD51 is a recombinase that catalyzes search for DNA homology and strand invasion that leads to the final steps of the HR repair pathway (Fig. 1D, purple) (Sy et al., 2009; Zhao et al., 2017). If RAD51 is not recruited, the RPA-coated L-RES DNA stretch can be taken over by RAD52. This protein mediates a homology-directed repair, known as single strand annealing (SSA) that uses homologous repeats around the DSB to anneal DNA stretches over 30 bp length, this leaves ssDNA overhangs out of the alignments that are cleaved by ERCC1-ERCC4, leading to deletions of large DNA stretches (Fig. 1D, plum) (Ceccaldi et al., 2016; Bennardo et al., 2008).

2.6. Reconstruction of the network for DSB repair pathway choice

To reconstruct the DSB repair pathway choice network, we focused on the three key decision points: (I) rejoin or processing of the DSB blunt-ends favoring the c-NHEJ pathway or the generation of S-RES; (II) S-RES being the target of the c-NHEJ or MMEJ pathways or the activation of the extend resection (L-RES); (III) activation of the HR or SSA pathways (Fig. 2A). Taking the former into consideration we selected the proteins and events involved in this process and incorporate them into 22 nodes, grouping the proteins and elements sharing redundant activities or belonging to the same protein complex during the repair decision (Table 1). Our model simulates DSB repair transactions during G2/S cell cycle phases, therefore, the post-translational modifications needed for protein activation in a cell cycle dependent manner are assumed. The connection of the network was established by incorporating the reported interactions between the elements related to the DSB repair decision (Fig. 2B).

2.7. The network for DSB repair pathway choice as a discrete dynamical system

Boolean network models are discrete dynamical systems where each node represents a biological entity. The relationships among the nodes in the network are described by mathematical equations constructed with Boolean functions. Boolean functions use three different operators: “AND” represented by the symbol $\&$, “OR” represented by the symbol $|$, and “NOT” represented by the symbol $!$. In Boolean network models, the activation state of every node can exist only in two possible states 1 or 0, which indicate a switch-ON or switch-OFF state, respectively. The change in the state of every node in the network depends on its corresponding Boolean function, which can be updated until the network reaches an attractor (Schwab et al., 2020).

All visited states in a simulation, from an initial state until reaching an attractor, correspond to a trajectory, whereas all the initial states leading to the same attractor are known as its basin of attraction. A Boolean network model can have multiple attractors. Simulations starting with all the possible initial states of the network (2^n , where n equals the number of nodes) are performed, and the proportion of the different attractors are obtained. Importantly, the size of every basin of attraction can be biologically meaningful, for instance, large basins of attraction are linked to a higher probability to be real, and therefore allow the formulation of hypothesis about the network regulatory system (Schwab et al., 2020).

Based on literature-reported interactions, we used Boolean logical operators to construct mathematical rules describing the conditions necessary for activation of every node in the network (Table 2). We established Boolean functions for the 22 nodes composing the DSB repair pathway choice network, leading to 142 interactions (the rational for developing every Boolean rule is shown in the Supplementary

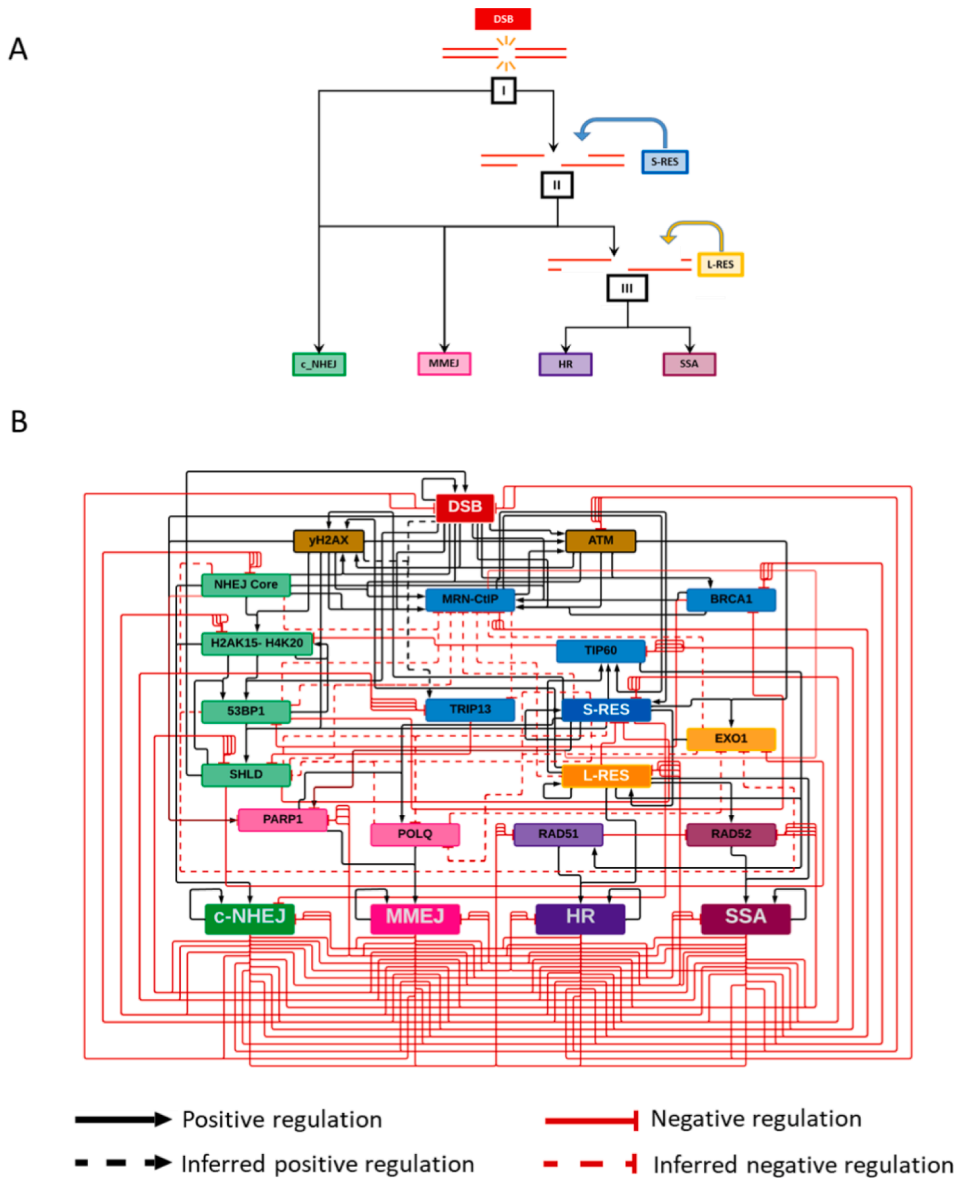


Fig. 2. The DSB repair pathway network. (A) Overview of the current knowledge on the network of DSB repair pathways. The presence of a DSB engages multiple interacting and seemingly opposing DNA repair pathways with the capacity to restore DNA continuity. The activity of these pathways follows a behavior resembling a decision tree for DSB repair pathway choice. (I) The first decision occurs at the blunt-ended DSB, which can be directly rejoined by the c-NHEJ pathway or be processed by DNA exonucleases, which will perform a short DNA end-resection and generate ssDNA. (II) The second decision occurs at the ssDNA level, ssDNA tracks of less than 300 bp (S-RES) can be captured by the c-NHEJ and MMEJ machineries or further processed by DNA exonucleases that will extend DNA resection and generate long-ssDNA tracks (L-RES). (III) A third decision point occurs at the L-RES DNA tracks, which can be repaired by either the HR or SSA pathways. Among all these pathways, HR is the only one considered to be error-free. (B) The reconstructed DSB repair pathway network. We reconstructed a network composed of 22 nodes and 159 interactions, each node represents essential proteins, protein complexes, or repair elements belonging to the c-NHEJ, MMEJ, HR, and SSA pathways (Table 1). Colors indicate DNA damage (red), DNA damage signaling (brown); S-RES (blue); L-RES (yellow); c-NHEJ (green); MMEJ (pink); HR (purple); and SSA (red). Positive interactions are indicated as black arrows, whereas negative interactions are indicated as red arrows. Inferred positive interactions are represented as dashed black arrows and inferred negative interactions are represented as dashed red arrows. c-NHEJ: canonical Non-Homologous End Joining; MMEJ, Microhomology Mediated End Joining; HR, Homologous Recombination; SSA, Single Strand Annealing.

Table S1). We integrated 17 regulatory interactions not reported previously (Fig. 2B, dashed lines; Table 2, blue rules, Supplementary Table S1). These interactions were inferred during the construction of the network and are considered as predictions of our model (Fig. 2B, Table 2 and Supplementary Table S1).

Using BoolNet (Müssel et al., 2010) we performed simulations of DNA damage in the form of a DSB with the Boolean functions shown in Table 2. Simulations of the *wild-type* network and all possible *loss-of-function* mutants were performed using a synchronous update (where all the nodes are simultaneously updated at each time step). Simulations of the *wild-type* network that started from 10,000 random initial states (with and without $DSB = 1$) were performed using an asynchronous updating scheme with the BoolNet function `getAttractors()` type="asynchronous".

Trajectory and attractor analyses were used to test the consistency of the model and to formulate predictions after evaluating the outcome in the *wild-type* and all possible mutants of the network (Klarner et al., 2020). *Wild-type* simulations were run using the rules that appear in the Table 2, whereas null or constitutive activation mutants for every node, in this case repair protein, were simulated by fixing the node at 0 or 1, respectively. The response to a DSB pulse (DSB start on 1) and to a

continuous damage exposure (DSB node fixed state to 1) were tested for every mutant.

2.8. Robustness analysis

Using BoolNet (Müssel et al., 2010), the robustness of the network was evaluated through three different methods: analysis of edge removal perturbations, bitflip perturbations and comparison with random networks.

Perturbations on the edges of the network were performed by removing one by one the regulators of a node's Boolean function and retrieving the attractors and basins of attraction that each of these perturbations generate.

Bitflip perturbations involved changing the outcome of each row in the truth table for every node. The resulting attractors and trajectories for each perturbation were analyzed.

Additionally, 100 random Boolean networks were generated using the BoolNet's `generateRandomNKNetwork` function. Importantly, these networks had a similar structure to the original network, i.e. they had the same number of nodes and incoming regulatory interactions per node. The effect of 250 randomly selected bitflip perturbations was

Table 1
Nodes in the network of the DSB repair pathway choice.

	Node name	Elements included in the node	Activity
DSB	DSB	DSB	Double strand break
DDR	ATM	ATM	Phosphorylates DDR effectors
	γ H2AX	γ H2AX, MDC1	Amplifies DSB signaling
C-NHEJ	NHEJCore	KU70-KU80, DNA PKc, Artemis, LIGIV	Protection of DSB ends and NHEJ effectors
	H2AK15_H4K20	RNF8, H1-Ub, RNF168, H2AK15Ub SET8, SUV4-20H1/2, accessible H2AK20me2	53BP1 chromatin anchor
	53BP1	53BP1-Ph, RIF1	Protection of DSB ends
	SHLD	REV7, SHLD1, SHLD2, SHLD3, CST complex, DNA POL α	S-RES reversion
	c-NHEJ	DSB repair with 0 - 4 nt deletions	End of the process
S-RES	TRIP13	TRIP13	SHLD inhibitor
	BRCA1/FANCS	BRCA1/FANCS-BARD1, SMARCAD1	Facilitate S-RES and impedes 53BP1 activity
	MRN-CtIP	MRN: MRE11-Ph, RAD50, NBS1-Ub CtIP: CtIP-Ph	Generate the 3' ssDNA overhang (S-RES)
	TIP60	H4K16ac, H2AK15ac TIP60 complex: Recruitment module: TRRAP, P400, BRD8, YL1, RUBVL1/2, MRG15, MRGBP, hEaf6, DAMP, BAF53a, ACTIN, GAS41 Piccolo NuA4: EPC1, TIP60/KAT5, ING3, MBTD1	Impedes 53BP1 recruitment Facilitates RAD51 loading
	sRES	<300 nt 3' ssDNA, pRPA	SHLD, EXO1, and PARP1-POLQ substrate
L-RES	EXO1	EXO1-Ph, BLM-DNA2	Extends the 3' ssDNA overhang (L-RES)
	L-RES	>300 nt of 3' ssDNA, pRPA	RAD51 and RAD52 substrate
HR	RAD51	BRCA2/FANCD1, PALB2/FANCN, BRCA1/FANCS, RAD51	RAD51 loading and HR effectors
	HR	DSB accurate repair, may produce loss of heterocigosity (LOH)	End of the process
MMEJ	PARP1	PARP1	Facilitates MMEJ
	POLQ	POL θ , DNA LIGIII	Detects microhomology (2 – 20 nt) in the 3' ssDNA
	MMEJ	Mutagenesis rearrangement (insertions/deletions)	End of the process
SSA	RAD52	RAD52, ERCC4-ERCC1C	Anneals DNA stretches over 30 bp length and cleaves overhangs
	SSA	Long deletions	End of the process

Ph: Phosphorylated; Ub: Ubiquitinated; me: Methylated; ac: Acetylated.

analyzed for each random network to determine the percentage of perturbations that maintained the original attractors.

2.9. Immunofluorescence

RPE cells were seeded on coverslips and transfected with 25 pmol of a non-targeting siRNA (Dharmacon, cat D-001210-02-20) or a TIP60-targeting siRNA (Dharmacon, cat D-006301-01-0005) according to the Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, cat 13778) protocol. For induction of DSBs, cells were treated with bleomycin (1 μ g/ml) for 10 h. Next, cells were fixed (Formaldehyde 4%), permeabilized (Triton 0.1%), blocked (10% Normal Goat Serum, ThermoFisher, cat 50062Z), and incubated overnight with primary antibodies anti- γ H2AX (CellSignal, cat. 2577S) and anti-RAD52 (Santa Cruz, cat. sc-365341). The next day

the coverslips were washed three times with PBS and incubated for 1 h with anti-rabbit (Invitrogen, cat. A-32731) or anti-mouse (Invitrogen, cat. A-31570) secondary antibodies, respectively. After incubation, the coverslips were washed three times with PBS and mounted with DAPI and Vectashield antifade solution. Images were acquired using a Zeiss Z1 microscope and analyzed using ImageJ to determine fluorescence intensity per nucleus.

3. Results

3.1. Homologous recombination is the pathway of choice in the network for DSB repair

We assessed the number and size of attractors obtained by our model

Table 2

Boolean functions of the DSB repair pathway choice network. Inferred interactions are shown highlighted with blue.

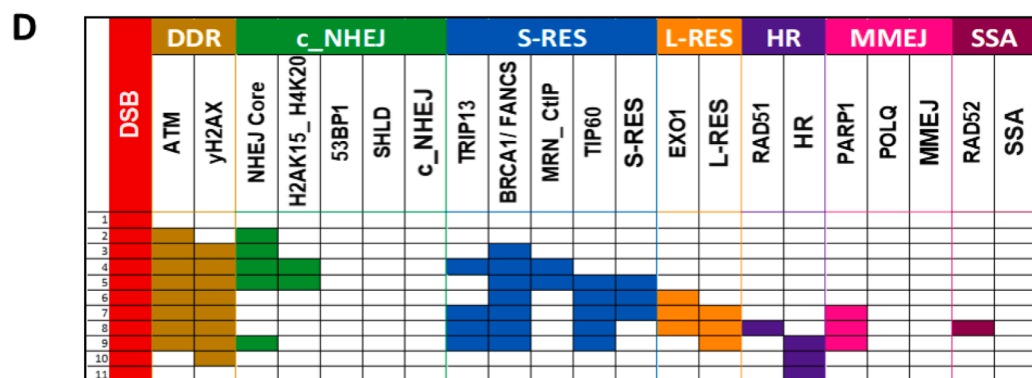
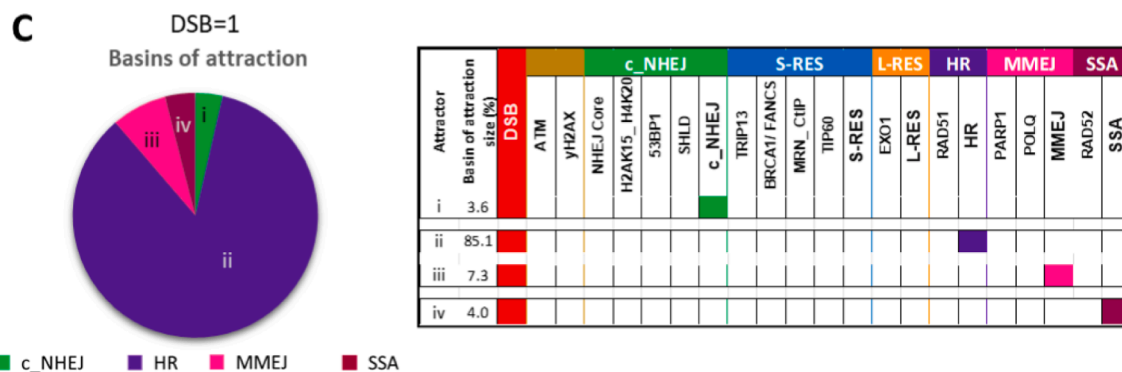
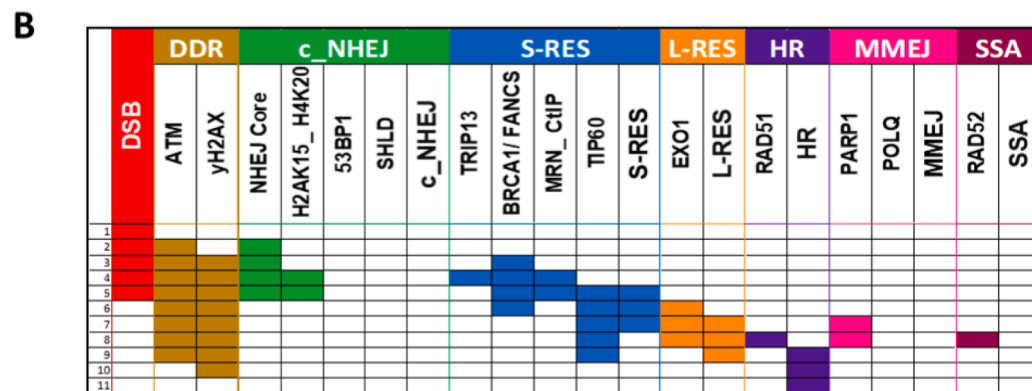
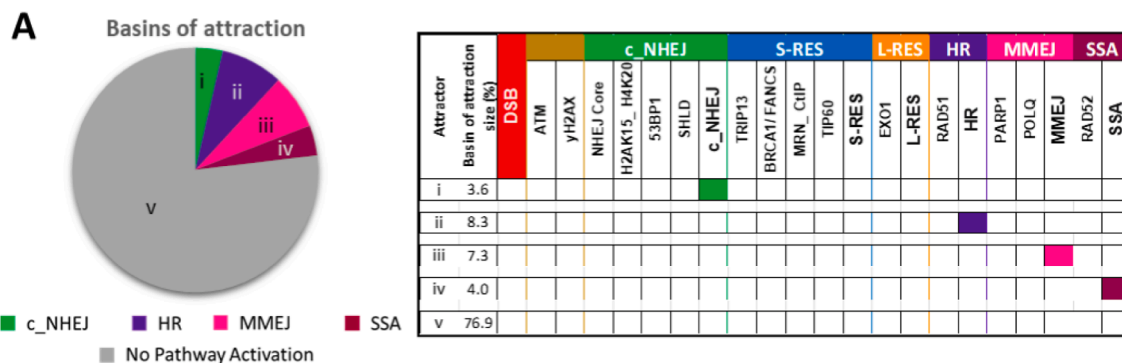
	Nodes name	Node Boolean function	References
DSB	DSB	(DSB SHLD) & ! (sRES c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Mirman et al., 2022; Noordermeer et al., 2018)
DDR	ATM	(DSB MRN_CtIP γ H2AX) & ! (c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Kobayashi et al., 2009; Lee and Paull, 2021; Lee and Paull, 2005; Lee et al., 2013; Shiloh and Ziv, 2013)
	γ H2AX	((DSB & (ATM NHEJCore)) (sRES IRES))	An et al., 2010b; Burma et al., 2001; Paull et al., 2000)
c-NHEJ	NHEJCore	(DSB SHLD) & ! (sRES c_NHEJ HR MMEJ SSA)	DeFazio et al., 2002; Mirman et al., 2022; Noordermeer et al., 2018; Povirk et al., 2007; Singleton et al., 1999)
	H2AK15-H4K20	(((γ H2AX & NHEJCore) & ! (TIP60)) (H2AK15_H4K20 & 53BP1)) & ! (c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Jacquet et al., 2016; Mallette et al., 2012; Pei et al., 2011; Tuzon et al., 2014; Zhang et al., 2005)
	53BP1	((DSB SHLD) & H2AK15_H4K20) & ! (BRCA1/FANCS)	Fradet-Turcotte et al., 2013; Isono et al., 2017; Mallette et al., 2012; Noordermeer et al., 2018; Pei et al., 2011; Tuzon et al., 2014)
	SHLD	(53BP1 & γ H2AX & sRES) & ! (TRIP13 (sRES & POLQ) c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Clairmont et al., 2020; Mirman et al., 2022; Noordermeer et al., 2018)
	C-NHEJ	((NHEJCore & 53BP1) c_NHEJ) & ! (sRES HR MMEJ SSA)	Bothmer et al., 2010; Goodarzi et al., 2006; McElhinny et al., 2000)
S-RES	TRIP13	(γ H2AX & DSB) & ! (MRN_CtIP c_NHEJ HR MMEJ SSA)	
	BRCA1/FANCS	(DSB & ATM) & ! (53BP1 c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Bertwistle, 1999; Bunting et al., 2010)
	MRN-CtIP	(DSB & (ATM c_NHEJ) & (BRCA1/FANCS γ H2AX)) & ! (sRES IRES (53BP1 & (SHLD NHEJCore)) EXO1 c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Celeste et al., 2003; Chen et al., 2008; Deshpande et al., 2020; Sartori et al., 2007; Shibata et al., 2014)
	TIP60	(MRN_CtIP sRES IRES) & ! (c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Cheng et al., 2018)
	S-RES	(MRN_CtIP sRES) & ! (IRES SHLD c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Mirman et al., 2022; Noordermeer et al., 2018; Shibata et al., 2014)
L-RES	EXO1	(ATM & sRES) & ! ((53BP1 & NHEJCore) SHLD POLQ)	Bolderson et al., 2010; Myler et al., 2017; Paiano et al., 2021)
	L-RES	((sRES & EXO1) IRES) & ! (HR SSA c_NHEJ MMEJ)	Bolderson et al., 2010; Myler et al., 2017)
HR	RAD51	(IRES & TIP60) & ! (RAD52 SHLD POLQ HR)	Ceccaldi et al., 2015; Cheng et al., 2018; Epum et al., 2020; Zhao et al., 2017)
	HR	((RAD51 & IRES) HR) & ! (c_NHEJ MMEJ SSA)	Zhao et al., 2017)
MMEJ	PARP1	((((DSB & γ H2AX) & ! NHEJCore) (sRES & ! (MRN_CtIP SHLD))) & ! (c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Caron et al., 2019; Wang et al., 2006; Yang et al., 2018)
	POLQ	(PARP1 & sRES) & ! ((sRES & SHLD) (EXO1 & sRES) MMEJ)	Ceccaldi et al., 2015; Mateos-Gomez et al., 2015)
	MMEJ	((PARP1 & POLQ) MMEJ) & ! (c_NHEJ HR SSA)	Ceccaldi et al., 2015; Wang et al., 2006)
SSA	RAD52	IRES & ! (RAD51 c_NHEJ HR MMEJ SSA)	Bennardo et al., 2008; So et al., 2022)
	SSA	((IRES & RAD52) SSA) & ! (RAD51 c_NHEJ HR MMEJ)	Bennardo et al., 2008; So et al., 2022)

under all possible initial states (2^{22}) in *wild-type* conditions and with no DNA damage. We obtained five fixed-point attractors: four of them (*i-iv*) have basins of attraction of similar size and represent activation of the different DNA repair pathways incorporated into our model: c-NHEJ, HR, MMEJ and SSA. Together these attractors represent less than 25% of the total state-space of our dynamical model. Attractor *v*, has the largest basin of attraction and does not lead to activation of any DNA repair pathway, implying that under no-damage scenarios, where DSB is mostly absent and repair is not needed, most of the multiple initial states of the network nodes would not trigger any DNA repair process (Fig. 3A left). In this model, the five fixed-point attractors have no overlap among the nodes that define each of them, thus implying a strong inhibitory activity among the pathways (Fig. 3A right).

Next, we tested the capacity of our model to reproduce the trajectory for DSB repair in *wild-type* conditions. Initial conditions for simulating a DSB pulse started with DSB = 1 and all other nodes in 0, letting the simulations to update according to the Boolean rules of our model (Table 2). The DSB pulse simulation in *wild-type* conditions recapitulates

the sequential activation of the DDR elements, as reported in the literature: the DSB is recognized by the ATM kinase and the NHEJ core, ATM phosphorylates γ H2AX, followed by the recruitment of resection elements to perform S-RES (BRCA1/FANCS, MRN-CtIP and TIP60). Activation of the extension nucleases (EXO1) produces resected DNA (L-RES), the substrate of HR proteins (RAD51). This leads to activation of the HR node and switches-off the rest of the DNA damage signaling elements concluding the HR repair process. PARP1 and RAD52 appear to become activated but the presence of HR rapidly inactivates them (Fig. 3B).

We further analyzed the behavior of our model in face of a continuous DSB stimulus by fixing DSB to 1. In this simulation we observed a change in the number and type of attractors and the size of their basins (Fig. 3C): the no-damage scenario disappeared, and four DNA repair pathway attractors (*i-iv*) were obtained. For each attractor two nodes are active: the expected fixed DSB node, and the node corresponding to every DSB repair pathway (Fig. 3C right). The HR attractor had the largest basin of attraction (85%), implying the correct activation of HR



(caption on next page)

Fig. 3. HR is the pathway of choice in the Boolean network model of DSB repair. (A) Fixed-point attractors of the DSB repair pathway network. Five different fixed-point attractors were obtained for the DSB repair pathway network by simulating all possible (2^{22}) initial activation states, when using a synchronous updating scheme, or 10,000 random initial activation states, when using an asynchronous scheme, respectively. Four of these attractors correspond to the activation of each of the DSB repair pathways best known so far: (i) c-NHEJ, (ii) HR, (iii) MMEJ and (iv) SSA pathways. The largest attractor (v) shows no pathway activation, indicating those initial states with no activation of the DSB node, simultaneous activation of two pathways thus causing mutual inactivation, inhibition of L-RES, or inhibition of HR. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (B) Dynamical behavior of the DSB repair pathway network, simulating the response to a pulse of DSB. In wild-type conditions, a DSB is repaired by HR via activation of a cascade of proteins including DNA damage signaling proteins (ATM and γ H2AX), activation of S-RES elements (BRCA1/FANCS, MRN, CtIP) activation of L-RES elements (EXO1), and activation of HR recombinase (RAD51). The DNA damage signaling elements are turned off once the repair is completed by HR. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (C) Fixed-point attractors of the DSB repair pathway network under continuous damage. The constitutive activation of the DSB scenario led to four different fixed-point attractors in the simulation of all possible (2^{21}) initial activation states, when using a synchronous updating scheme, or 10,000 random initial activation states, when using an asynchronous scheme. The analysis shows that the pathway preferentially selected in this context is the HR attractor (ii), which had the largest basin. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (D) Dynamical behavior of the wild-type DSB repair pathway network, simulating the response to constant DSB activation (DSB fixed to 1). In wild-type conditions, constitutive DSB activation (DSB fixed to 1) activates the HR pathway. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white.

in *wild-type* conditions. The remaining 15% was distributed between the c-NHEJ, MMEJ, and SSA pathways (Fig. 3C left), probably representing the proportion of initial states where the nodes of each pathway, or the combinations of nodes that compromise each pathway development, were ON. Trajectory analysis of a continuous DSB damage simulation showed a similar behavior to the simulations with a pulse of DSB in *wild-type* conditions. (Fig. 3D).

Additionally, we performed simulations of the *wild-type* network using an asynchronous updating scheme that started from 10,000 random initial states, with and without DSB fixed to 1. As expected, we obtained the same attractors as with the synchronous simulation (Fig. 3A and 3C).

3.2. The network for DSB repair pathway choice is robust

The robustness of the network was evaluated using three different approximations: edge removal perturbations, bitflip perturbations and comparison against random networks.

First, we analyzed if the attractors were modified when the edges of the network were removed. Of a total of 161 edges composing the network, perturbation of most of them, namely 138 (85.7%), preserved the same attractors observed in the non-perturbed *wild-type* network. Perturbation of 51 (31.68%) edges resulted in preservation of the attractors and basin of attraction size, whereas perturbations of 87 (54.04%) edges preserved the attractors but modified the basin of attraction size (Supplementary Table S2).

In the second analysis, a total of 20,240 bitflip perturbations were performed, from which 20,111 (99.36%) preserved the original attractors without any changes (Supplementary Table S3). We analyzed the trajectories resulting from these bitflip changes and found that only 0.31% of the perturbations generated a trajectory different from the one observed in the original network (Supplementary Fig. S1). When constitutive DSB simulations were evaluated (DSB fixed to 1), from a total of 20,112 bitflip perturbations, 19,986 (99.37%) preserved the original attractor (Supplementary Table S4), from which 0.28% of the trajectories were affected (Supplementary Fig. S2).

Finally, in the comparison of the DSB repair pathway choice network against random networks, the average percentage of perturbations that maintained the original attractors after randomly generating 100 networks were $71.8\% \pm 4.3$ SD. Together, these findings indicate that the network for DSB repair pathway choice displays greater robustness than expected by fate.

3.3. Selection of the DSB repair pathway changes in the presence of DNA repair null-mutants

Activation of error-prone DNA repair pathways occurs when HR fails, including the absence of proteins promoting different stages of HR like ATM, BRCA1/FANCS, EXO1, and RAD51. To test the model's

capacity to reproduce these biological behaviors, we simulated null mutants for every node of interest under continuous DNA damage (DSB fixed to 1) (Fig. 4).

We first tested the ATM null mutant. In contrast to the *wild-type*, simulations of the ATM null mutant resulted in 80% of the basins of attraction reaching c-NHEJ (Fig. 4A right). In the trajectory analysis, no activation of the resection-related nodes (S-RES and L-RES) occurred in the absence of ATM, while the c-NHEJ-related nodes were consecutively activated (Fig. 4A left). These results are in agreement with the reduced DSB end-resection and the c-NHEJ hyperactivation reported in ATM knock-down cells (Cai et al., 2020).

Next, we simulated BRCA1/FANCS absence. During HR, BRCA1/FANCS promotes S-RES, inhibits 53BP1 chromatin recruitment, and participates in the loading of RAD51 along with BRCA2/FANCD1 and PALB2/FANCN (Isono et al., 2017; Shibata et al., 2014; Zhang et al., 2009). Once again, c-NHEJ is the largest basin of attraction (Fig. 4B left). However, the trajectories are different, in this mutant, the S-RES-related nodes became activated, but completion of the HR process was interfered by 53BP1 recruitment, SHLD activation, and blunt-end rejoining (Fig. 4B right). Our results are consistent with data showing that BRCA1/FANCS promotes but is not crucial for S-RES (Cruz-García et al., 2014; Reczek et al., 2013). Additionally, others have shown that c-NHEJ activation in BRCA1-deficient cells occurs through 53BP1-SHLD (Mirman et al., 2022).

In the EXO1 null mutant our simulations show that inhibition of this L-RES effector favors the MMEJ repair pathway (Fig. 4C left). Trajectory analysis in this mutant showed that DDR and upstream HR pathway activation generates the S-RES intermediate, but in the absence of EXO1, this S-RES intermediate is hijacked by PARP1 and POLQ, leading to MMEJ. This result is in agreement with previous findings, showing that absence of EXO1 or BLM results in decreased long-range resection and HR, and increased MMEJ activity (Truong et al., 2013).

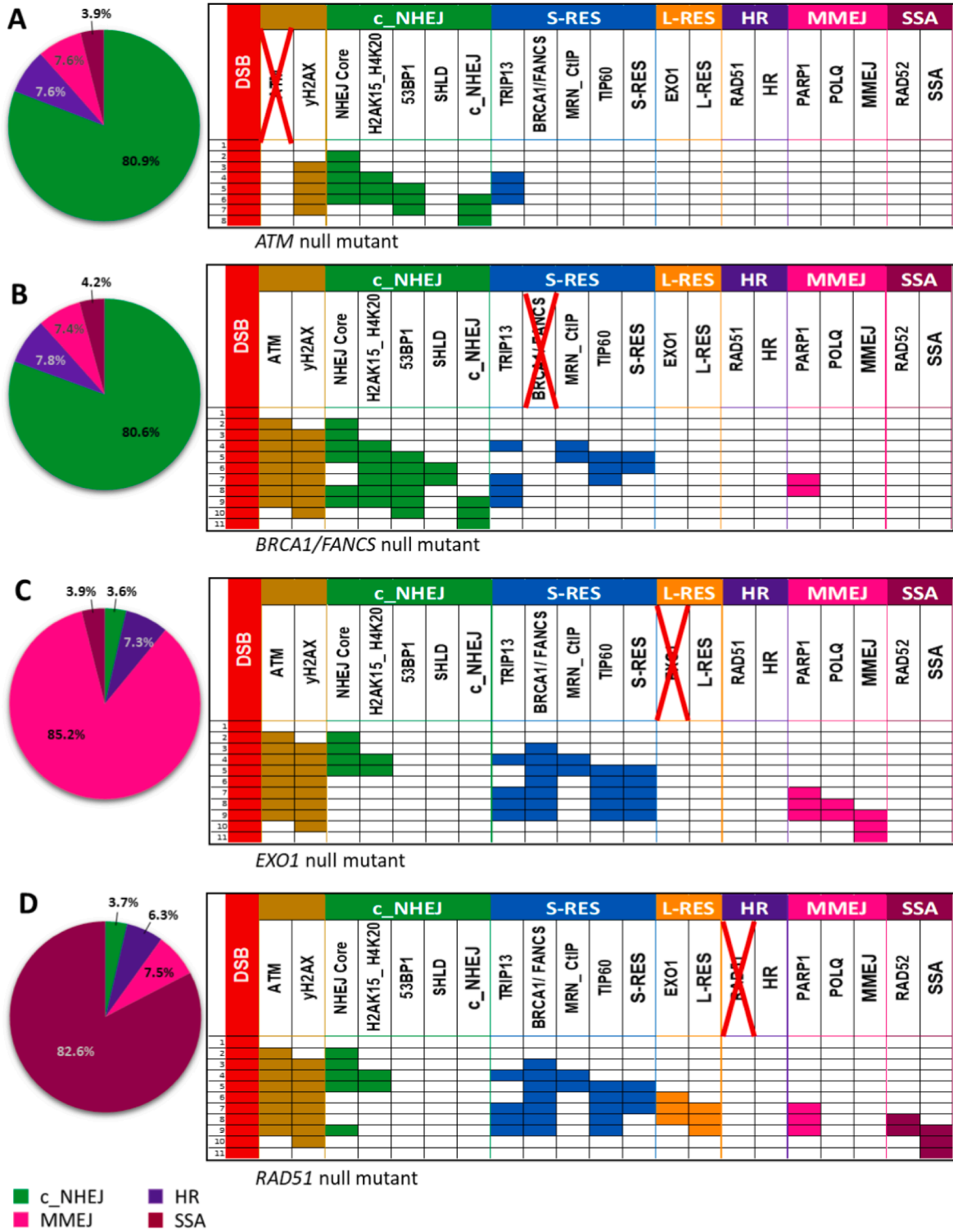
Finally, the RAD51 null mutant showed a shift toward SSA, as shown by its largest basin of attraction (Fig. 4D left). In the trajectory analysis, the absence of RAD51, is taken over by RAD52, tilting the L-RES balance toward SSA (Fig. 4D right). This result was expected since biological evidence has established that RAD51 is a SSA inhibitor (So et al., 2022), and that RAD52 is a strand annealing promoter in the absence of RAD51 (Lok et al., 2013). Taken together, all these simulations demonstrate that our model reproduces previously described outcomes in DSB repair pathway selection in HR mutants.

Loss-of-function simulations with the remaining nodes are shown in Supplementary Fig. S3 and Supplementary Fig. S4.

3.4. Recapitulation of synthetic lethal combinations in the context of BRCA1/FANCS mutants

Cancer cells mutant for BRCA1/FANCS are HR deficient, and frequently carry additional mutations that impact their DSB repair

Basins of attraction



(caption on next page)

Fig. 4. The behavior of archetypical DSB repair mutants is recovered by the Boolean network model of DSB repair. (A) The *ATM* null mutant was simulated by fixing the *ATM* node to 0 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions belongs to c-NHEJ. *Right.* Trajectory analysis of the *ATM* null mutant shows that the absence of *ATM* prevents the S-RES node from becoming activated, and the system reaches the c-NHEJ process through activation of the NHEJ Core and 53BP1 nodes. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (B) The *BRCA1/FANCS* null mutant was simulated by fixing the *BRCA1/FANCS* node to 0 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions belongs to c-NHEJ. *Right.* Trajectory analysis of the *BRCA1/FANCS* null mutant, showing activation of the S-RES node, implying DSB end-resection. In absence of *BRCA1/FANCS*, activation of the SHLD node reverses resection and allows c-NHEJ activity. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (C) The *EXO1* null mutant was simulated by fixing the *EXO1* node to 0 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions belongs to the MMEJ pathway. *Right.* Trajectory analysis of the *EXO1* null mutant shows that L-RES is not activated in absence of *EXO1*, leading to MMEJ activation. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (D) The *RAD51* null mutant was simulated by fixing the *RAD51* node to 0 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions belongs to the SSA pathway. *Right.* Trajectory analysis of the *RAD51* null mutant shows that in absence of *RAD51*, the system cannot activate HR and, therefore, the long ssDNA resected fragment (L-RES) activates *RAD52* and SSA. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white.

pathway choice (Clairmont et al., 2020; Ceccaldi et al., 2015; Green et al., 2015; Jin et al., 2022). A cornerstone of antineoplastic treatment resides in the use of drugs that lead to synthetic lethality by blocking available repair pathways to perpetuate unrepaired DNA (Zhou et al., 2021; Zatreanu et al., 2021). Nevertheless, in this context of important genomic instability, this approach elicits multiple mechanisms that restore HR activity resulting in treatment resistant *BRCA1/FANCS* mutant cells (Bunting et al., 2010; Xu et al., 2015).

To test if our model reproduces these outcomes, we simulated double mutants of *BRCA1/FANCS* in combination with three different clinically relevant HR proficient mutants: 1) *TRIP13* constitutive activation (*TRIP13* node fixed to 1), whereby the HR has the largest basin of attraction (Fig. 5A left). Our trajectory analysis showed that the constant presence of *TRIP13* prevents activation of the SHLD node (contrary to what is seen in the *BRCA1/FANCS* single mutants) (Fig. 4B) leading to *EXO1* and L-RES activation, followed by *RAD51* and HR activation (Fig. 5A right). This simulation reproduces a well described phenomenon whereby overexpressed *TRIP13* inhibits SHLD in *BRCA1/FANCS* deficient cancer cells favoring HR (Clairmont et al., 2020) 2) *POLQ* constitutive activation (*POLQ* node fixed to 1), leads to the largest basin of attraction for the MMEJ pathway (Fig. 5B left). Trajectory analysis of this mutant showed that *POLQ* constant presence did not interfere with the activation of the DDR and S-RES nodes; however, as soon as it became activated, PARP triggered MMEJ (Fig. 5B right). This mimics experimental data showing that *BRCA1/FANCS* deficient cancer cells become hyper-dependent on MMEJ through *POLQ* overexpression (Ceccaldi et al., 2015; Luedeman et al., 2022); and 3) *53BP1* null mutant (*53BP1* node fixed to 0) resulted, as expected, in HR as the largest basin of attraction (Fig. 5C left). HR restoration was achieved by preventing SHLD activation, allowing the S-RES to progress to L-RES and HR (Fig. 5A right). Nonetheless, in this case, SHLD is not actively inhibited, but indirectly blocked by the absence of its recruiter, 53BP1. This difference is not trivial, even though the outcome in both scenarios is the restoration of the HR repair pathway.

Together, these results demonstrate the capacity of our model to reproduce different biological scenarios, allowing the generation of predictions on the DSB repair pathway choice.

3.5. TIP60, a histone acetylation complex, influences the DSB repair pathway choice

DSBs are embedded in the context of chromatin. Importantly, histone PTMs have been shown to play an integral part of the DSB response; therefore, we incorporated PTMs well-known to be associated with DDR into our model. Using simulations with our BNM, we explored the outcomes of constitutive activation for H2AK15ub-H4K20me2 (node fixed to 1) and the absence of the TIP60 acetyltransferase complex (node fixed to 0).

Constitutive activation of H2AK15ub and H4K20me2 sets the environment for 53BP1 recruitment, leading to a large c-NHEJ basin of attraction (Fig. 6A left) and a trajectory that quickly selects c-NHEJ

(Fig. 6A right). In this simulation, any attempt of S-RES is inhibited by the quick activation of 53BP1 and c-NHEJ. This simulation resembles the c-NHEJ increased activity resulting from overexpression of *RNF168*, the H2AK15 ubiquitin ligase, which is part of the H2AK15ub-H4K20me2 node (See Table 1) (Chroma et al., 2017).

Next, we assessed the influence of TIP60 over the DSB repair pathway choice. TIP60 is considered an anti-c-NHEJ complex, since its acetyltransferase enzymatic activity blocks the recruitment of 53BP1 to chromatin and promotes HR, importantly, TIP60 loss has been shown to reduce HR (Fradet-Turcotte et al., 2013; Jacquet et al., 2016; Zhang et al., 2020; Tang et al., 2013). As expected, simulations of the TIP60 null mutant showed decreased HR, but surprisingly, the largest basin of attraction was not c-NHEJ but SSA (Fig. 6B left). The trajectory analysis shed light on why: even when the H2AK15-4K20 node was activated, the presence of *BRCA1* blocked 53BP1 activation, suggesting that the presence of H2AK15ub-H4K20me2 is not enough to recruit 53BP1 in the absence of TIP60. Importantly, lack of TIP60 impacted the last step in the DSB decision tree (Fig. 1A) favoring *RAD52* over *RAD51* activation (Fig. 6B right). This result suggests that TIP60 is an antagonist of the SSA pathway.

The TIP60 complex is formed by 16 different proteins (see Table 1), and the TIP60/KAT5 subunit is responsible for its acetyltransferase activity. To evaluate the effect of losing TIP60 enzymatic activity on *RAD52* abundance in response to DSBs, we knocked down *TIP60/KAT5* in RPE cells using siRNAs, and induced DSBs by treating the cells with 1 $\mu\text{g/ml}$ of bleomycin for 10 h. We assessed γH2AX and *RAD52* presence using immunofluorescence and found that, bleomycin treatment in *TIP60/KAT5* knockdown cells increased the level of γH2AX signal, indicating an increase in the amount of unrepaired DSBs (Fig. 6C), and increased the amount of *RAD52* signal (Fig. 6D). These results support our model-derived hypothesis that the absence of TIP60 favors *RAD52* loading and selection of the SSA pathway in response to DSBs. Moreover, these experimental results validate that simulation of mutants with our Boolean network model can correctly predict the DSB repair pathway choice.

4. Discussion

Maintaining genomic integrity is critical for homeostasis at the tissue and organismal levels. The cell has evolved multiple repair mechanisms that ensure the maintenance of the DNA molecule. DSBs are among the most harmful DNA lesions, and our cells have multiple pathways that resolve DSBs by rejoining the DNA ends. Some of these pathways entail high fidelity, such as HR, or high capacity, such as c-NHEJ. Recently, research focused on better characterizing previously poorly understood DNA repair pathways, such as MMEJ and SSA (Ceccaldi et al., 2015; Wang et al., 2006; Lok et al., 2013; Feng et al., 2011). The activity of alternative DSB repair mechanisms ensures cell survival at the expense of increasing the rate of mutations, deletions, and translocations across the genome. Keeping these alternative low-fidelity DSB repair pathways tightly regulated is critical for maintaining a healthy genome (Mateos-

Basins of attraction

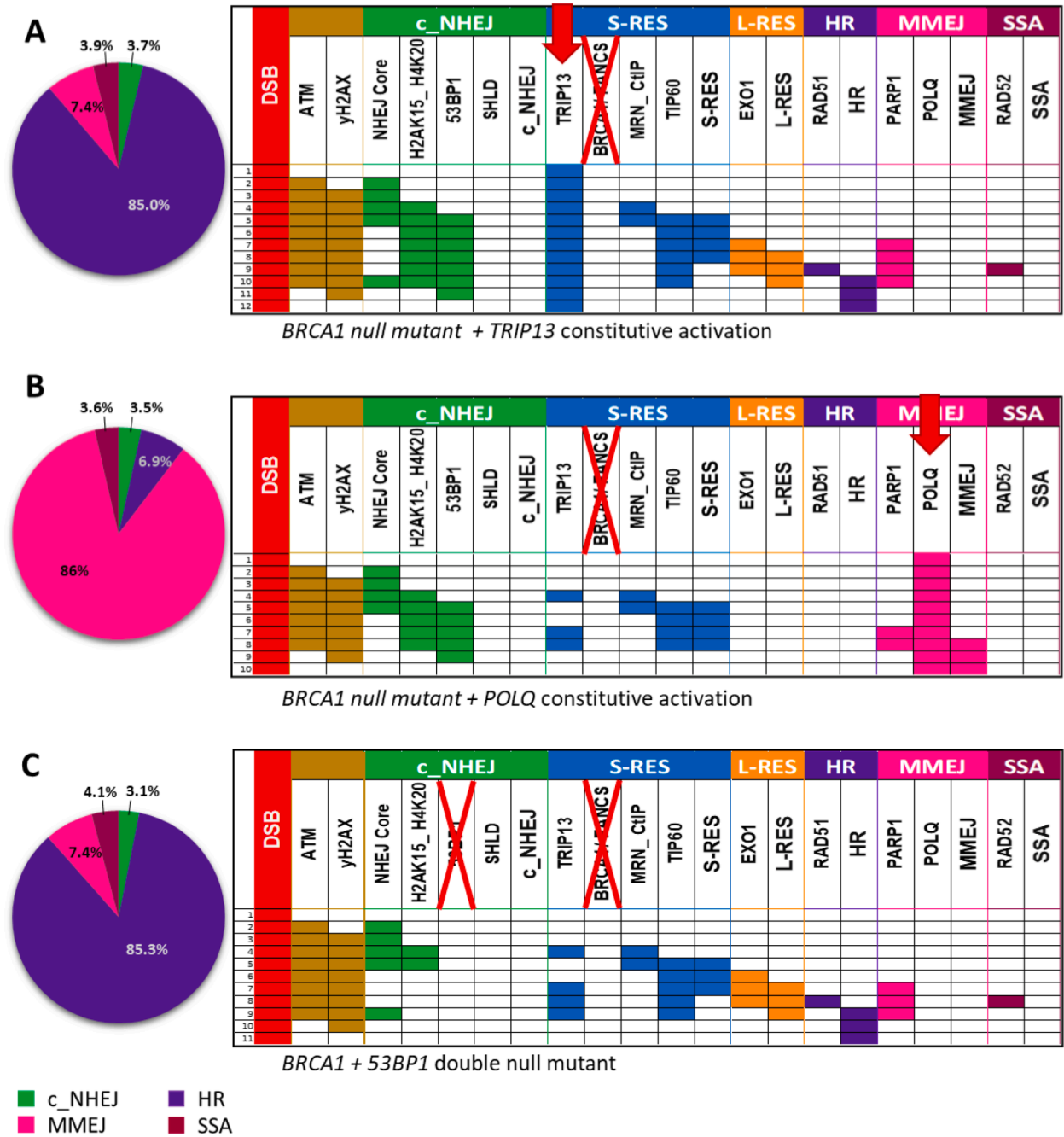
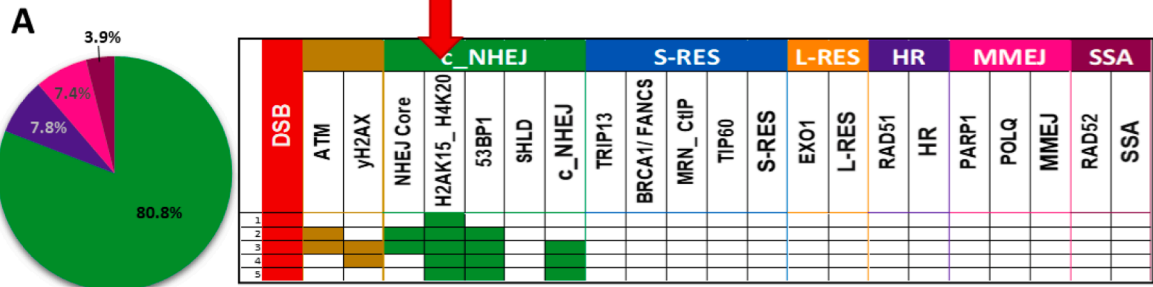
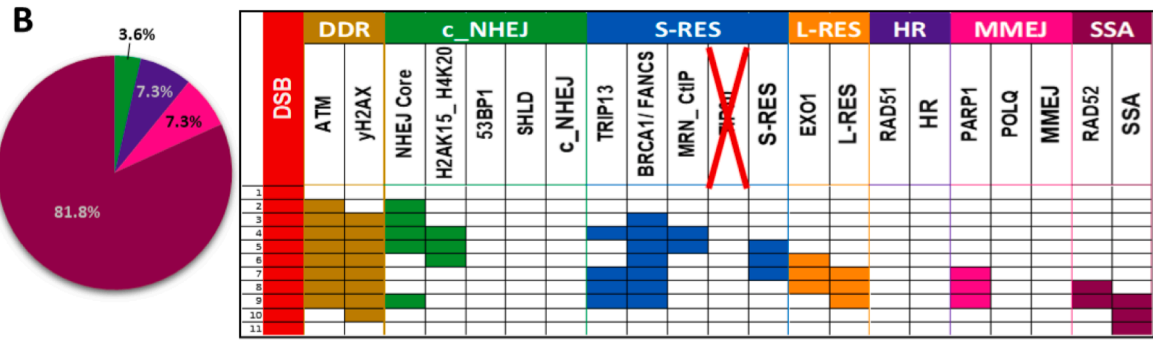


Fig. 5. The genetic context in *BRCA1/FANCS* null mutants is critical for the DSB repair pathway selection. (A) A *BRCA1/FANCS* null mutant with constitutive activation of *TRIP13* was simulated by fixing *BRCA1/FANCS* to 0 and *TRIP13* to 1 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions is HR. *Right.* Trajectory analysis shows that in a *BRCA1/FANCS* null mutant, *TRIP13* constitutive activity inhibits the SHLD complex, and promotes HR completion. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (B) A *BRCA1/FANCS* null mutant with constitutive activation of *POLQ* was simulated by fixing *BRCA1/FANCS* to 0 and *POLQ* to 1 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions is MMEJ. *Right.* Constant activation of *POLQ* promotes MMEJ by outcompeting the SHLD complex. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (C) A double null mutant for *BRCA1/FANCS* and *53BP1* was simulated by fixing both nodes to 0 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* HR is the largest basin of attraction of the *BRCA1/FANCS-53BP1* double null mutant. *Right.* Trajectory analysis shows that the *BRCA1/FANCS-53BP1* double null mutant recovered the HR activity lost in the single *BRCA1/FANCS* mutant. The absence of *53BP1* prevents SHLD complex activation and S-RES reversion, thus allowing L-RES and HR. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white.

Basins of attraction



H2AK15Ub-H4K20me2 constitutive activation



TIP60 null mutant

■ c_NHEJ ■ HR
■ MMEJ ■ SSA

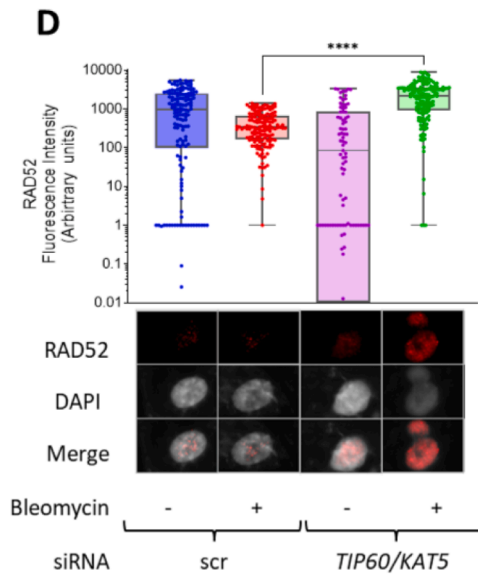
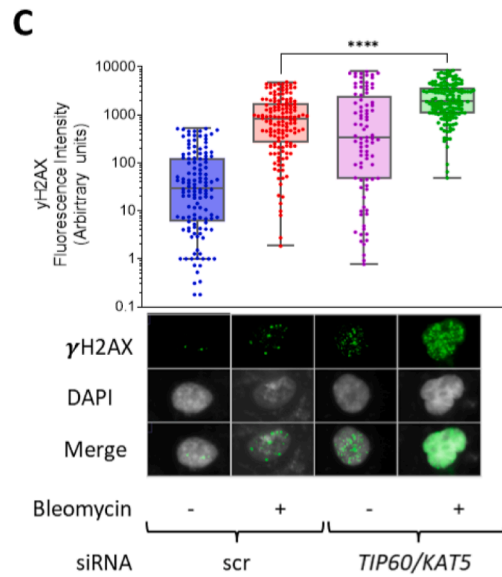


Fig. 6. Altered epigenetic equilibrium influences the DSB repair pathway choice. (A) A constitutive activation mutant for H2AK15Ub-H4K20me2 was simulated by fixing the H2AK15-H4K20 node to 1 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions belongs to the c-NHEJ pathway. *Right.* Trajectory analysis shows that the continuous presence of H2AK15Ub-H4K20me2 allows 53BP1 rapid activation over S-RES nodes. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (B) The TIP60 null mutant was simulated by fixing the TIP60 node to 0 under continuous DNA damage (DSB fixed to 1). *Left.* The largest basin of attraction under these conditions belongs to the SSA pathway. *Right.* Trajectory analysis shows that RAD51 is not activated in the absence of TIP60, leading to RAD52 and SSA activation. The active nodes are represented by solid color rectangles while the inactive nodes appear in white. (C) siRNA interference of *TIP60/KAT5* increases the amount of DNA damage, measured by γ H2AX immunofluorescence, in RPE cells treated with bleomycin. (D) siRNA interference of *TIP60/KAT5* increases the activity of the SSA pathway, measured by RAD52 immunofluorescence, in RPE cells treated with bleomycin. **** $p < 0.0001$

Gomez et al., 2015; Manthey et al., 2010; Ghezraoui et al., 2014).

Although intricate, the DSB repair pathway network can be studied using mathematical approaches, which include understanding DSB end complexity, chromatin environment, and G1 impact over the repair kinetics (Friedland et al., 2011; Hu et al., 2022; Rouhani, 2019). Mathematical models are useful tools for understanding the interactions and outcomes of complex biological networks (Rouhani, 2019; Rodriguez et al., 2019; Ratushny et al., 2011).

In this work, we used a Boolean network-based modeling, a strategy proven to be useful to study large networks of complex systems. However, when Boolean network models are built, oversimplification of the biological context must be considered in the moment of making conclusions, especially when a synchronous updating schemes are used. The synchronous dynamic regime might lack biological realism by not considering differences in the concentration of the elements of the network, or the time needed for a given reaction. In fact, Boolean modeling assumes that all components of the network are present and need an equivalent amount of time to change their value, which can lead to artefacts, like cyclic attractors (Schwab et al., 2020). Nonetheless, synchronous updating facilitates the analysis of large networks when cyclic attractors are not present. To confirm the results obtained with our synchronous updated simulations, we performed asynchronous simulations in the *wild-type* conditions and obtained the same attractors as in the asynchronous simulations.

Our Boolean network model (Tables 1 and Table 2) recapitulates the DSB repair outcomes under *wild-type* conditions and under scenarios of DSB repair mutants. It even goes further as *in-silico* simulations with our modeling approach allowed the generation of hypotheses that were later tested in the wet laboratory.

In a *wild-type* context, DSBs are preferentially repaired by either c-NHEJ or HR. Our model has the capacity to reproduce the preferential election of HR as the main DSB repair pathway during S/G2 phase, by recovering the consecutive activation of DDR, S-RES, L-RES and RAD51 in response to DSB induction (Fig. 3B). Our model also recapitulates the trajectories and DSB repair pathway selection in a background of DNA repair mutants described in the scientific literature (Fig. 4). It has been recognized that DNA repair pathway selection is swayed by the genetic contexts of cells, often driving neoplastic transformation. Since DSB pathways that compensate HR deficiency, like MMEJ and SSA, are well-known mechanisms of resistance to tumor therapy, targeting these non-canonical pathways is currently being used advantageously to improve therapeutic approaches (Cai et al., 2020; Lok et al., 2013).

Our model approach has the potential to be implemented to understand not only tumors but also clinical conditions with underlying DNA repair deficiencies, including classic genome instability syndromes, such as ataxia telangiectasia (represented in our model by the ATM node), Nijmegen breakage syndrome and ataxia telangiectasia-like syndrome (represented in our model by the MRN node), as well as Fanconi anemia (FA). The HR elements of the FA pathway are an integral part of the DSB repair network and are represented in our Boolean network model by the BRCA1/FANCS node. Importantly, these chromosome instability syndromes are *de facto* models for understanding how the DSB pathway choice works (Sawyer et al., 2015). Most of these syndromes are caused by inheritance of biallelic pathogenic variants (PVs) in critical DNA maintenance genes, causing cancer predisposition in all of them and specifically bone marrow failure in FA, and neurodevelopment delay in the ataxia telangiectasia and ataxia telangiectasia-like syndromes.

Of note, inherited single allele germline PVs in the BRCA1/FANCS and BRCA2/FANCD1 genes are among the most common PVs in the familial breast and ovarian cancer syndrome, and this clinical relevance has been a source of knowledge to further dissect the DSB repair pathways (Lee et al., 2020). The treatment options of tumors with BRCA1/FANCS and BRCA2/FANCD1 pathogenic variants include surgery as well as standard radiotherapy and chemotherapy (Lee et al., 2020). However, despite initial effective treatment of these tumors, a high percentage of tumors develop resistance to treatment through mechanisms including

restoration of HR activity (Imyanitov and Sokolenko, 2021; Rose et al., 2020). Specifically, HR can be reactivated by a secondary mutation that restores BRCA1/FANCS function or due to 53BP1 downregulation (Callen et al., 2020; Bouwman et al., 2010; Rose et al., 2020), both mechanisms for HR restitution are reproduced by our model (Fig. 4C). This high rate of treatment resistance has motivated intensive research in the field to develop strategies based on synthetic lethality and, in recent years, has led to the approval of PARP inhibitors in the clinical setting.

In addition, BRCA1/FANCS and BRCA2/FANCD1 null cancer cells usually carry additional genetic alterations that modify the response to treatment in patients with familial breast and ovarian cancer syndrome; this is the case for TRIP13 and POLQ overexpression. On the one hand, when TRIP13, a SHLD inhibitor, is highly expressed in tumors they become resistant to PARP inhibitors due to increased HR activity (Clairmont et al., 2020), a finding that is recapitulated by our model (Fig. 5A). In fact, TRIP13 constitutive activation results in HR reconstitution, similar to 53BP1 downregulation, although it occurs through different biochemical routes. On the other hand, POLQ overexpression shifts the BRCA1/FANCS pathway choice to the MMEJ pathway, an observation that is also reproduced by our model (Fig. 5B). POLQ overexpression makes the tumor dependent on MMEJ, therefore making it susceptible to PARP and POLQ inhibitors treatments (Ceccaldi et al., 2015; Mateos-Gomez et al., 2015; Feng et al., 2019). Acknowledging these differences can impact the success of the treatment approach, new drugs are being developed targeting specific weaknesses of the tumor cells, making the understanding of the interactions in the DSB repair pathway network even more relevant.

The epigenetic landscape is increasingly being recognized as a relevant player in DSB repair. Histone PTMs have been shown to play a pivotal role in DSB repair pathway choice by providing docking sites for specific repair proteins. This is exemplified by, the role of H2AK15ub-H4K20me2 in 53BP1 recruitment, and, its antagonistic node, is the acetyltransferase TIP60 complex, whose action shifts the balance to HR by acetylating the H2AK15 and H4K16 (Fradet-Turcotte et al., 2013; Jacquet et al., 2016; Zhang et al., 2020; Tang et al., 2013). Histone acetylation is a particularly interesting PTM, not only because it is highly abundant in the chromatin, but also because it is a potentially druggable target that may favor one repair pathway over another (Dang and Wei, 2022; Marmorstein and Zhou, 2014). In fact, our model predicted that switching-OFF the acetyl transferase complex TIP60 would modify the DNA repair pathway choice toward the SSA pathway in a RAD52-dependent manner, a prediction that was validated experimentally (Fig. 6). Indeed, TIP60 complex activity has been well-described in yeast models, where it has been implicated in facilitating Rad51 recruitment by acetylating pRPA. It has also been suggested that the presence of TIP60 promotes DNA resection, favoring resection-based repair pathways like HR, MMEJ, and SSA (Cheng et al., 2018; Ahmad et al., 2021). This is only an initial exercise in considering epigenetic influence in the DSB repair decision and it may well be improved by taking into consideration its limitations as it does not fully consider chromatin architecture, accessibility, and mobilization influence (Goodarzi et al., 2010).

5. Conclusion

The BNM presented in this work reproduces the *wild-type* dynamics of the DSB repair pathway choice under post replicative conditions, where HR is the preferential pathway. Our model recapitulates, in addition, diverse genetic scenarios of single and double DNA repair mutants, where the DNA repair pathway choice is diverted from the canonical HR selection. Simulations with our model proposed the TIP60 complex as negative regulator of the SSA pathway, predicting a new role for this complex during the DSB repair pathway selection, which was successfully validated experimentally. Together, these results support our model as a useful tool to understand and predict outcomes in the context of DNA damage and repair.

CRediT authorship contribution statement

Cecilia Ayala-Zambrano: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Mariana Yuste:** Methodology, Validation, Formal analysis, Visualization. **Sara Frias:** Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Benilde Garcia-de-Teresa:** Writing – review & editing. **Luis Mendoza:** Formal analysis, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Eugenio Azpeitia:** Resources, Formal analysis, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Alfredo Rodríguez:** Conceptualization, Investigation, Resources, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Leda Torres:** Conceptualization, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This project was funded by the project Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico FORDECYT-PRONACES/194183/2020. Instituto Nacional de Pediatría (INP), Mexico INP 2023/03, INP 2020/012, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) IA205022, IN205120 and IN202721. BGT received scholarship 574025 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. This work is part of the requirements for obtaining a Doctoral degree at the Posgrado en Ciencias Biológicas (Biomedicina), UNAM de CAZ. CAZ received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico CVU 630709, scholarship 747486.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2023.111608>.

References

- Acs, K., Luijsterburg, M.S., Ackermann, L., Salomons, F.A., Hoppe, T., Dantuma, N.P., 2011. The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1345–1355. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2188>.
- Ahmad, S., Côté, V., Cheng, X., Bourriquet, G., Sapountzi, V., Altaf, M., Côté, J., Symington, L.S., 2021. Antagonistic relationship of NuA4 with the non-homologous end-joining machinery at DNA damage sites. *PLoS Genet.* 17 (9), e1009816. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009816>.
- Alter, B.P., Giri, N., Savage, S.A., Rosenberg, P.S., 2018. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica* 103, 30–39. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178111>.
- An, J., Huang, Y.C., Xu, Q.Z., Zhou, L.J., Shang, Z.F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.D., Wu, D.C., Zhou, P.K., 2010. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol. Biol.* 11, 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-18>.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., Stark, J.M., Haber, J.E., 2008. Alternative-NHEJ Is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* 4 (6), e1000110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000110>.
- Bertwistle, D., 1999. ATM phosphorylates BRCA1. *Breast Cancer Res.* 2, 66641. <https://doi.org/10.1186/bcr-1999-66641>.
- Bharathy, N., Berlow, N.E., Wang, E., Abraham, J., Settelmeier, T.P., Hooper, J.E., Svalina, M.N., Bajwa, Z., Goros, M.W., Hernandez, B.S., Wolff, J.E., Pal, R., Davies, A.M., Ashok, A., Bushby, D., Mancini, M., Noakes, C., Goodwin, N.C., Ordentlich, P., Keck, J., Hawkins, D.S., Rudzinski, E.R., Mansoor, A., Perkins, T.J., Vakoc, C.R., Michalek, J.E., Keller, C., 2019. Preclinical rationale for entinostat in embryonal rhabdomyosarcoma. *Skelet. Muscle* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0198-x>.
- Bignell, G.R., Santarius, T., Pole, J.C.M., Butler, A.P., Perry, J., Pleasance, E., Greenman, C., Menzies, A., Taylor, S., Edkins, S., Campbell, P., Quail, M., Plumb, B., Mathews, L., McLay, K., Edwards, P.A.W., Rogers, J., Wooster, R., Futreal, P.A.,

- Stratton, M.R., 2007. Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence-level resolution. *Genome Res.* 17 (9), 1296–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.6522707>.
- Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T.K., Burma, S., Khanna, K.K., 2010. Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 38, 1821–1831. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1164>.
- Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2010. 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J. Exp. Med.* 207, 855–865. [10.1084/jem.20100244](https://doi.org/10.1084/jem.20100244).
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J.J., Mer, G., 2006. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4–K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361–1373. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.043>.
- Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., Haffty, B.G., Tommiska, J., Blomqvist, C., Drapkin, R., Adams, D.J., Nevanlinna, H., Bartek, J., Tarsounas, M., Ganesan, S., Jonkers, J., 2010. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (6), 688–695. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1831>.
- Bunting, S.F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C.-X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J.M., Nussenzweig, A., 2010. 53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141 (2), 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J., 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>.
- Cai, M.Y., Dunn, C.E., Chen, W.X., Kochupurakkal, B.S., Nguyen, H., Moreau, L.A., Shapiro, G.L., Parmar, K., Kozono, D., D'Andrea, A.D., 2020. Cooperation of the ATM and fanconi anemia/BRCA pathways in double-strand break end resection. *Cell Rep.* 30, 2402–2415. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.052>.
- Callen, E., Zong, D., Wu, W., Wong, N., Stanlie, A., Ishikawa, M., Pavani, R., Dumitriche, L.C., Byrum, A.K., Mendez-Dorantes, C., Martinez, P., Canela, A., Maman, Y., Day, A., Kruhlak, M.J., Blasco, M.A., Stark, J.M., Mosammaparast, N., McKinnon, P.J., Nussenzweig, A., 2020. 53BP1 enforces distinct pre- and post-resection blocks on homologous recombination. *Mol. Cell* 77 (1), 26–38.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.024>.
- Caron, M.-C., Sharma, A.K., O'Sullivan, J., Myler, L.R., Ferreira, M.T., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Ethier, C., Gagné, J.-P., Langelier, M.-F., Pascal, J.M., Finkelstein, I.J., Hendzel, M.J., Poirier, G.G., Masson, J.-Y., 2019. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nat. Commun.* 10 (1) <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10741-9>.
- Carvajal-Garcia, J., Cho, J.E., Carvajal-Garcia, P., Feng, W.J., Wood, R.D., Sekelsky, J., Gupta, G.P., Roberts, S.A., Ramsden, D.A., 2020. Mechanistic basis for microhomology identification and genome scarring by polymerase theta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 8476–8485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921791117>.
- Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q.-S., Ponderre, C., Peffault de Latour, R., Gluckman, E., Cavazzana-Calvo, M., Leblanc, T., Larghero, J., Grompe, M., Socié, G., D'Andrea, A., Soulier, J., 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., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I.R., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J., et al., 2015. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol theta-mediated repair. *Nature* 518, 258–U306. <https://doi.org/10.1038/nature14184>.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D'Andrea, A.D., 2016. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol.* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., Nussenzweig, A., 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5, 675–U651. <https://doi.org/10.1038/ncb1004>.
- Chen, L.C., Nievera, C.J., Lee, A.Y.L., Wu, X.H., 2008. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 283, 7713–7720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710245200>.
- Cheng, X., Côté, V., Côté, J., 2021. NuA4 and SAGA acetyltransferase complexes cooperate for repair of DNA breaks by homologous recombination. *bioRxiv*, 2021.2003.2004.433861. [10.1101/2021.03.04.433861](https://doi.org/10.1101/2021.03.04.433861).
- Cheng, X., Jobin-Robitaille, O., Billon, P., Buisson, R., Niu, H., Lacoste, N., Abshiru, N., Côté, V., Thibault, P., Kron, S.J., Sung, P., Brandl, C.J., Masson, J.-Y., Côté, J., 2018. Phospho-dependent recruitment of the yeast NuA4 acetyltransferase complex by MRX at DNA breaks regulates RPA dynamics during resection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (40), 10028–10033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806513115>.
- Chroma, K., Mistrik, M., Moudry, P., Gursky, J., Liptay, M., Strauss, R., Skrott, Z., Vrte, R., Bartkova, J., Kramara, J., Bartek, J., 2017. Tumors overexpressing RNF168 show altered DNA repair and responses to genotoxic treatments, genomic instability and resistance to proteotoxic stress. *Oncogene* 36, 2405–2422. <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.392>.
- Clairmont, C.S., Sarangi, P., Ponnieselvan, K., Galli, L.D., Csese, I., Moreau, L., Adelmant, G., Chowdhury, D., Marto, J.A., D'Andrea, A.D., 2020. TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change. *Nat. Cell Biol.* 22 (1), 87–96. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0442-y>.

- Collins, P.L., Purman, C., Porter, S.I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K.E., Gurewitz, G.L., Sleckman, B.P., Bednarski, J.J., Bassing, C.H., Oltz, E.M., 2020. DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nat. Commun.* 11 <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16926-x>.
- Cruz-Garcia, A., Lopez-Saavedra, A., Huertas, P., 2014. BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep.* 9, 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.076>.
- Dang, F.B., Wei, W.Y., 2022. Targeting the acetylation signaling pathway in cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* 85, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.001>.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., Chu, G., 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192–3200. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf299>.
- Densham, R.M., Garvin, A.J., Stone, H.R., Strachan, J., Baldock, R.A., Daza-Martin, M., Fletcher, A., Blair-Reid, S., Beesley, J., Johal, B., Pearl, L.H., Neely, R., Keep, N.H., Watts, F.Z., Morris, J.R., 2016. Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (7), 647–655. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3236>.
- Deshpande, R.A., Myler, L.R., Soniat, M.M., Makharshvili, N., Lee, L., Lees-Miller, S.P., Finkelstein, I.J., Paull, T.T., 2020. DNA-dependent protein kinase promotes DNA end processing by MRN and CtIP. *Sci. Adv.* 6, eaay0922. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay0922>.
- Epum, E.A., Mohan, M.J., Ruppe, N.P., Friedman, K.L., Symington, L.S., 2020. Interaction of yeast Rad51 and Rad52 relieves Rad52-mediated inhibition of de novo telomere addition. *PLoS Genet.* 16 (2), e1008608. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008608>.
- Feng, Z., Scott, S.P., Bussen, W., Sharma, G.G., Guo, G., Pandita, T.K., Powell, S.N., 2011. Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2), 686–691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010959107>.
- Feng, W., Simpson, D.A., Carvajal-Garcia, J., Price, B.A., Kumar, R.J., Mose, L.E., Wood, R.D., Rashid, N., Purvis, J.E., Parker, J.S., Ramsden, D.A., Gupta, G.P., 2019. Genetic determinants of cellular adaptation to DNA polymerase theta. *Nat. Commun.* 10 (1) <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12234-1>.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escibano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C.Y., Huang, H., Landry, M.-C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sichei, F., Durocher, D., 2013. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499 (7456), 50–54. <https://doi.org/10.1038/nature12318>.
- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D. M., Amati, B., 2003. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep.* 4, 575–580. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor861>.
- Friedland, W., Jacob, P., Kundrat, P., 2011. Mechanistic simulation of radiation damage to dna and its repair: on the track towards systems radiation biology modelling. *Radiat. Prot. Dosim.* 143, 542–548. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq383>.
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., Neale, M.J., 2011. Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479, 241–U123. <https://doi.org/10.1038/nature10515>.
- García-de-Teresa, B., Rodríguez, A., Frias, S., 2020. Chromosome instability in fanconi anemia: from breaks to phenotypic consequences. *Genes (Basel)* 11 (12), 1528.
- Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.-B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E., Giovannangeli, C., Jasin, M., Brunet, E., 2014. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol. Cell* 55 (6), 829–842. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.002>.
- Goodarzi, A.A., Yu, Y.P., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R.Q., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., Lees-Miller, S.P., 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 25, 3880–3889. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255>.
- Goodarzi, A.A., Jeggo, P., Loblrich, M., 2010. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair* 9, 1273–1282. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.013>.
- Grabarska, A., Luszczki, J.J., Nowosadzka, E., Gumbarewicz, E., Jeleniewicz, W., Dmoszynska-Graniczka, M., Kowalczyk, K., Kupisz, K., Polberg, K., Stępałak, A., 2017. Histone deacetylase inhibitor SAHA as potential targeted therapy agent for larynx cancer cells. *J. Cancer* 8, 19–28. <https://doi.org/10.7150/jca.16655>.
- Green, A.R., Caracappa, D., Benhasoua, A.A., Alshareeda, A., Nolan, C.C., Macmillan, R. D., Madhusudan, S., Ellis, I.O., Rakha, E.A., 2015. Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 149, 353–362. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3230-1>.
- Hu, A.K., Zhou, W.Y., Wu, Z., Zhang, H., Li, J.L., Qiu, R., 2022. Modeling of DNA damage repair and cell response in relation to p53 system exposed to ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 11323. <https://doi.org/10.3390/ijms231911323>.
- Imyanov, E., Sokolenko, A., 2021. Mechanisms of acquired resistance of BRCA1/2-driven tumors to platinum compounds and PARP inhibitors. *World J. Clin. Oncol.* 12 (7), 544–556. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i7.544>.
- Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.-Y., Obuse, C., Nishi, R., Petricci, E., Nakada, S., Nakano, T., Shibata, A., 2017. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. *Cell Rep.* 18 (2), 520–532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042>.
- Jacquet, K., Fradet-Turcotte, A., Avvakumov, N., Lambert, J.-P., Roques, C., Pandita, R., Paquet, E., Herst, P., Gingsar, A.-C., Pandita, T., Legube, G., Doyon, Y., Durocher, D., Côté, J., 2016. The TIP60 complex regulates bivalent chromatin recognition by 53BP1 through direct H4K20me binding and H2AK15 acetylation. *Mol. Cell* 62 (3), 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.031>.
- Jin, T.Y., Park, K.S., Nam, S.E., Yoo, Y.B., Park, W.S., Yun, I.J., 2022. BRCA1/2 serves as a biomarker for poor prognosis in breast carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3754. <https://doi.org/10.3390/ijms23073754>.
- Kim, T.M., Ko, J.H., Hu, L.C., Kim, S.A., Bishop, A.J.R., Vijj, J., Montagna, C., Hasty, P., 2012. RAD51 mutants cause replication defects and chromosomal instability. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3663–3680. <https://doi.org/10.1128/mcb.00406-12>.
- Klärner, H., Heintz, F., Nee, S., Siebert, H., 2020. Basins of attraction, commitment sets, and phenotypes of Boolean networks. *IEEE-ACM Trans. Comput. Biol. Bioinf.* 17, 1115–1124. <https://doi.org/10.1109/tcbb.2018.2879097>.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Chen, B., Bruma, S., Tashiro, S., Matsuura, S., Tanimoto, K., Chen, D.J., Komatsu, K., 2009. Histone H2Ax participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 752–757. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.109>.
- Kraemer, K.H., Lee, M.M., Scotto, J., 1984. DNA-repair protects against cutaneous and internal neoplasia - evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5, 511–514. <https://doi.org/10.1093/carcin/5.4.511>.
- Lee, J.H., Mand, M.R., Deshpande, R.A., Kinoshita, E., Yang, S.H., Wyman, C., Paull, T.T., 2013. Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex. *J. Biol. Chem.* 288, 12840–12851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460378>.
- Lee, A., Moon, B.I., Kim, T.H., 2020. BRCA1/BRCA2 pathogenic variant breast cancer: treatment and prevention strategies. *Ann. Lab. Med.* 40, 114–121. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.2.114>.
- Lee, J.H., Paull, T.T., 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551–554. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>.
- Lee, J.-H., Paull, T.T., 2021. Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 796–814. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00394-2>.
- Lemee, F., Bergoglio, V., Fernandez-Vidal, A., Machado-Silva, A., Pillaire, M.J., Bieth, A., Gentil, C., Baker, L., Martin, A.L., Leduc, C., et al. 2010. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910759107>.
- Liu, S., Kong, D., 2021. End resection: a key step in homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Genome Instab. Dis.* 2, 39–50. <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00028-5>.
- Liu, X.H., Tesfai, J., Evrard, Y.A., Dent, S.Y.R., Martinez, E., 2003. C-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J. Biol. Chem.* 278, 20405–20412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211795200>.
- Lok, B.H., Carley, A.C., Tchang, B., Powell, S.N., 2013. RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene* 32, 3552–3558. <https://doi.org/10.1038/ncr.2012.391>.
- Luedeman, M.E., Stroik, S., Feng, W.J., Luthman, A.J., Gupta, G.P., Ramsden, D.A., 2022. Poly(ADP) ribose polymerase promotes DNA polymerase theta-mediated end joining by activation of end resection. *Nat. Commun.* 13, 4547. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32166-7>.
- Mallette, F.A., Mattioli, F., Cui, G.F., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., Richard, S., 2012. RNF8 and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J.* 31, 1865–1878. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.47>.
- Manthey, G.M., Bailis, A.M., Kirkpatrick, D.T., 2010. Rad51 inhibits translocation formation by non-conservative homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5 (7), e11889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011889>.
- Marmorstein, R., Zhou, M.M., 2014. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 6, a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>.
- Mateos-Gomez, P.A., Gong, F.D., Nair, N., Miller, K.M., Lazzarini-Denchi, E., Sfeir, A., 2015. Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* 518, 254–U285. <https://doi.org/10.1038/nature14157>.
- McElhinny, S.A.N., Snowden, C.M., McCarville, J., Ramsden, D.A., 2000. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2996–3003. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.2996-3003.2000>.
- Milite, C., Feoli, A., Sasaki, K., La Pietra, V., Balzano, A.L., Marinelli, L., Mai, A., Novellino, E., Castellano, S., Tosco, A., Sbardella, G., 2015. A novel cell-permeable, selective, and noncompetitive inhibitor of KAT3 histone acetyltransferases from a combined molecular pruning/classical isosterism approach. *J. Med. Chem.* 58, 2779–2798. <https://doi.org/10.1021/jm5019687>.
- Mirman, Z., Sasi, N.K., King, A., Chapman, J.R., de Lange, T., 2022. 53BP1-shieldin-dependent DSB processing in BRCA1-deficient cells requires CST-Pol alpha-primase fill-in synthesis. *Nat. Cell Biol.* 24, 51. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00812-9>.
- Mussel, C., Hopfensitz, M., Kestler, H.A. 2010. BoolNet—an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* 26, 1378–1380. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq124>.
- Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., Finkelstein, I.J., 2017. Single-molecule imaging reveals how Mre11-Rad50-Nbs1 initiates DNA break repair. *Mol. Cell* 67 (5), 891–898.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.002>.
- NCI's Dictionary of Cancer Terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/synthetic-lethality>.
- Nikolaev, S., Yurchenko, A.A., Sarasin, A., 2022. Increased risk of internal tumors in DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients: analysis of four international

- cohorts. *Orphanet J. Rare Dis.* 17, 104. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02203-1>.
- Nissenkorn, A., Ben-Zeev, B., Islam, M.P., Roach, E.S. 2015. Chapter 14 - Ataxia telangiectasia. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 199-214. 10.1016/B978-0-444-62702-5.00014-7.
- Noordermeer, S.M., Adam, S., Setiapatra, D., Barazas, M., Pettitt, S.J., Ling, A.K., Olivieri, M., Álvarez-Quilón, A., Moatti, N., Zimmermann, M., Annunziato, S., Krastev, D.B., Song, F., Brandsma, I., Frankum, J., Brough, R., Sherker, A., Landry, S., Szilard, R.K., Munro, M.M., McEwan, A., Goulet de Rugy, T., Lin, Z.-Y., Hart, T., Moffat, J., Gingras, A.-C., Martin, A., van Attikum, H., Jonkers, J., Lord, C.J., Rottenberg, S., Durocher, D., 2018. The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* 560 (7716), 117–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0340-7>.
- Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2010. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell* 141, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.016>.
- Ono, H., Kato, T., Murase, Y., Nakamura, Y., Ishikawa, Y., Watanabe, S., Akahoshi, K., Ogura, T., Ogawa, K., Ban, D., Kudo, A., Akiyama, Y., Tanaka, S., Ito, H., Tanabe, M., 2021. C646 inhibits G2/M cell cycle-related proteins and potentiates anti-tumor effects in pancreatic cancer. *Sci. Rep.* 11 (1) <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89530-8>.
- Paiano, J., Zolnerowich, N., Wu, W., Pavani, R., Wang, C., Li, H.Z., Zheng, L., Shen, B.H., Sleckman, B.P., Chen, B.R., Nussenzweig, A., 2021. Role of 53BP1 in end protection and DNA synthesis at DNA breaks. *Genes Dev.* 35, 1356–1367. <https://doi.org/10.1101/gad.348667.121>.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.-J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A., McMahon, S.B., 2004. The c-MYC oncogene is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol. Cell Biol.* 24 (24), 10826–10834. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.24.10826-10834.2004>.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00610-2).
- Pei, H.D., Zhang, L., Luo, K.T., Qin, Y.X., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L.W., You, Z.S., Lou, Z.K., 2011. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470, 124–U144. <https://doi.org/10.1038/nature09658>.
- Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R.Z., Cowan, M.J., Yannone, S.M., 2007. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by artemis nuclease. *J. Biol. Chem.* 282, 3547–3558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607745200>.
- Qi, Y.P., Warmenhoven, J.W., Henthorn, N.T., Ingram, S.P., Xu, X.G., Kirkby, K.J., Merchant, M.J., 2021. Mechanistic modelling of slow and fast NHEJ DNA repair pathways following radiation for G0/G1 normal tissue cells. *Cancers* 13, 2202. <https://doi.org/10.3390/cancers13092202>.
- Ratushny, A.V., Ramsey, S.A., Aitchison, J.D., 2011. Mathematical modeling of biomolecular network dynamics. *Network Biology: Methods and Applications* 781, 415–433. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-276-2_21.
- Reczek, C.R., Szabolcs, M., Stark, J.M., Ludwig, T., Baer, R. 2013. The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. *J. Cell Biol.* 201, 693-707. 10.1083/jcb.201302145.
- Reiman, A., Srinivasan, V., Barone, G., Last, J.L., Wootton, L.L., Davies, E.G., Verhagen, M.M., Willemsen, M.A., Weemaes, C.M., Byrd, P.J., Izatt, L., Easton, D.F., Thompson, D.J., Taylor, A.M., 2011. Lymphoid tumours and breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours. *Br. J. Cancer* 105 (4), 586–591. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.266>.
- Rodríguez, A., Naveja, J.J., Torres, L., de Teresa, B.G., Juárez-Figueroa, U., Ayala-Zambrano, C., Azpeitia, E., Mendoza, L., Frias, S., 2019. WIP1 contributes to the adaptation of fanconi anemia cells to DNA damage as determined by the regulatory network of the fanconi anemia and checkpoint recovery pathways. *Front. Genet.* 10, 411. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00411>.
- Rodríguez, A., Torres, L., Juárez, U., Sosa, D., Azpeitia, E., Teresa, B.-d., Cortés, E., Ortiz, R., Salazar, A.M., Ostrosky-Wegman, P., Mendoza, L., Frias, S., 2015. Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theor. Biol. Med. Model.* 12 (1) <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0011-4>.
- Rose, M., Burgess, J.T., O'Byrne, K., Richard, D.J., Bolderson, E., 2020. PARP inhibitors: clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 564601 <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564601>.
- Rouhani, M., 2019. Modeling the interplay between DNA-PK, Artemis, and ATM in non-homologous end-joining repair in G1 phase of the cell cycle. *J. Biol. Phys.* 45, 127–146. <https://doi.org/10.1007/s10867-018-9519-2>.
- Sage, E., Shikazono, N., 2017. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 107, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>.
- Saito, S., Maeda, R., Adachi, N., 2017. Dual loss of human POLQ and LIG4 abolishes random integration. *Nat. Commun.* 8, 16112. <https://doi.org/10.1038/ncomms16112>.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., Appella, E., 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* 12, 2831–2841. <https://doi.org/10.1101/gad.12.18.2831>.
- Salguero, I., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Sczaniecka-Clift, M., Demir, M., Jhujh, S., Wilson, M.D., Jackson, S.P., 2019. MDC1 PST-repeat region promotes histone H2AX-independent chromatin association and DNA damage tolerance. *Nat. Commun.* 10, 5191. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12929-5>.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., Jackson, S.P., 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509–U506. <https://doi.org/10.1038/nature06337>.
- Sawyer, S.L., Tian, L., Kahkonen, M., Schwartzentruber, J., Kircher, M., Majewski, J., Dymant, D.A., Innes, A.M., Boycott, K.M., Moreau, L.A., et al. 2015. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new fanconi anemia subtype. *Cancer Discov.* 5, 135–142. 10.1158/2159-8290.cd-14-1156.
- Schumacher, B., Pothof, J., Vijg, J., Hoeijmakers, J.H.J., 2021. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature* 592, 695–703. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03307-7>.
- Schwab, J.D., Kühlwein, S.D., Ikonomi, N., Kühl, M., Kestler, H.A., 2020. Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.001>.
- Scully, R., Xie, A.Y., 2013. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 750, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007>.
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A., Perry, J., Harding, S., Genois, M.-M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kortokalo, A., Romoli, F., Ismail, A., Ismalaj, E., Petricci, E., Neale, M., Bristow, R., Masson, J.-Y., Wyman, C., Jeggo, P., Tainer, J., 2014. DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell* 53 (1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>.
- Shiloh, Y., Ziv, Y., 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>.
- Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., Jeggo, P.A., 1999. The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol. Cell Biol.* 19 (5), 3267–3277.
- So, A., Dardillac, E., Muhammad, A., Chailleux, C., Sesma-Sanz, L., Ragu, S., Le Cam, E., Canitrot, Y., Masson, J.Y., Dupaigne, P., et al. 2022. RAD51 protects against nonconservative DNA double-strand break repair through a nonenzymatic function. *Nucleic Acids Res.* 50, 2651–2666. 10.1093/nar/gkac073.
- Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y., Chen, J.J., 2009. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7155–7160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811159106>.
- Talei, R., Weinfeld, M., Nikjoo, H., 2011. A kinetic model of single-strand annealing for the repair of dna double-strand breaks. *Radiat. Prot. Dosim.* 143, 191–195. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncq535>.
- Tang, J.B., Cho, N.W., Cui, G.F., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., Greenberg, R.A., 2013. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 317–325. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2499>.
- Tang, Y., Luo, J.Y., Zhang, W.Z., Gu, W., 2006. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell* 24, 827–839. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.021>.
- Tang, Y., Zhao, W.H., Chen, Y., Zhao, Y.M., Gu, W., 2008. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133, 612–626. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.025>.
- Tewari, K.S., Eskander, R.N., Monk, B.J. 2015. Development of olaparib for BRCA-deficient recurrent epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 3829-3835. 10.1158/1078-0432.ccr-15-0088.
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., 2015. Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527 (7578), 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature15401>.
- Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., Wu, X., 2013. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (19), 7720–7725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213431110>.
- Tuzon, C.T., Spector, T., Kong, X.D., Congdon, L.M., Wu, S.M., Schotta, G., Yokomori, K., Rice, J.C., 2014. Concerted activities of distinct H4K20 methyltransferases at DNA double-strand breaks regulate 53BP1 nucleation and NHEJ-directed repair. *Cell Rep.* 8, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.013>.
- Wang, M.L., Wu, W.Z., Wu, W.Q., Rosidi, B., Zhang, L.H., Wang, H.C., Iliakis, G., 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 34, 6170–6182. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl840>.
- Waqar, S.N., Robinson, C., Olszanski, A.J., Spira, A., Hackmaster, M., Lucas, L., Sponton, L., Jin, H., Hering, U., Cronier, D., Grinberg, M., Seithel-Keuth, A., Diaz-Padilla, I., Berlin, J., 2022. Phase I trial of ATM inhibitor M3541 in combination with palliative radiotherapy in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* 40 (3), 596–605. <https://doi.org/10.1007/s10637-022-01216-8>.
- Xu, G., Chapman, J.R., Brandsma, I., Yuan, J., Mistrik, M., Bouwman, P., Bartkova, J., Gogola, E., Warmerdam, D., Barazas, M., Jaspers, J.E., Watanabe, K., Pieterse, M., Kersbergen, A., Sol, W., Celie, P.H.N., Schouten, P.C., van den Broek, B., Salman, A., Nieuwland, M., de Rink, I., de Ronde, J., Jalink, K., Boulton, S.J., Chen, J., van Gent, D.C., Bartek, J., Jonkers, J., Borst, P., Rottenberg, S., 2015. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* 521 (7553), 541–544. <https://doi.org/10.1038/nature14328>.
- Yang, G., Liu, C., Chen, S.H., Kassab, M.A., Hoff, J.D., Walter, N.G., Yu, X.C., 2018. Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Res.* 46, 3446–3457. <https://doi.org/10.1093/nar/gky088>.
- Zahid, S., El Dahan, M.S., Iehl, F., Fernandez-Varela, P., Le Du, M.H., Ropars, V., Charbonnier, J.B., 2021. The multifaceted roles of Ku70/80. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (23), 4134. <https://doi.org/10.3390/ijms22084134>.
- Zatreanu, D., Robinson, H.M.R., Alkhatib, O., Boursier, M., Finch, H., Geo, L., Grande, D., Grinkevich, V., Heald, R.A., Langdon, S., et al., 2021. Pol theta inhibitors elicit

- BRCA-gene synthetic lethality and target PARP inhibitor resistance. *Nat. Commun.* 12, 3636. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23463-8>.
- Zhang, H., Devoucoux, M., Song, X., Li, L.I., Ayaz, G., Cheng, H., Tempel, W., Dong, C., Loppnau, P., Côté, J., Min, J., 2020. Structural basis for EPC1-mediated recruitment of MBTD1 into the NuA4/TIP60 acetyltransferase complex. *Cell Rep.* 30 (12), 3996–4002.e4.
- Zhang, X.L., Li, J., Sejas, D.P., Pang, Q.S., 2005. Hypoxia-reoxygenation induces premature senescence in FA bone marrow hematopoietic cells. *Blood* 106, 75–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3033>.
- Zhang, J.R., Ma, Z.F., Treszezamsky, A., Powell, S.N., 2005. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 902–909. <https://doi.org/10.1038/nsmb991>.
- Zhang, F., Ma, J.L., Wu, J.X., Ye, L., Cai, H., Xia, B., Yu, X.C., 2009. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.* 19, 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.018>.
- Zhao, W., Steinfeld, J.B., Liang, F., Chen, X., Maranon, D.G., Jian Ma, C., Kwon, Y., Rao, T., Wang, W., Sheng, C., Song, X., Deng, Y., Jimenez-Sainz, J., Lu, L., Jensen, R. B., Xiong, Y., Kupfer, G.M., Wiese, C., Greene, E.C., Sung, P., 2017. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature* 550 (7676), 360–365. <https://doi.org/10.1038/nature24060>.
- Zhou, J., Gelot, C., Pantelidou, C., Li, A., Yücel, H., Davis, R.E., Färkkilä, A., Kochupurakkal, B., Syed, A., Shapiro, G.I., Tainer, J.A., Blagg, B.S.J., Ceccaldi, R., D'Andrea, A.D., 2021. A first-in-class polymerase theta inhibitor selectively targets homologous-recombination-deficient tumors. *Nat. Cancer* 2 (6), 598–610. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00203-x>.
- Zimmermann, A., Zenke, F., Dahmen, H., Sirrenberg, C., Grombacher, T., Vassilev, L.T., Fuchss, T., Blaukat, A., 2018. A new investigational ATM Inhibitor, M3541, synergistically potentiates fractionated radiotherapy and chemotherapy in cancer cells and animal models. *Cancer Res.* 78 <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-338>.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Table S1. Logic rules rationale. Description of each rule rationale and its respective literature reference.

DSB: (DSB | SHLD) &! (sRES | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
DSB	Positive		
	DSB	DSB keeps present until it is processed by the endonucleases and/or is repaired.	
	SHLD	SHLD complex reverts the sRES by synthesizing the complementary DNA strand, leading to the initial DSB structure.	1,2
	Negative		
	sRES	Endonucleases' action over DNA ends changes the initial DSB structure, which is renamed as sRES.	
	c_NHEJ, HR, MMEJ, SSA	The DSB cannot exist if it was repaired.	

ATM: (DSB | MRN_CtIP | γH2AX) & ! (c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
ATM	Positive		
	DSB	ATM is activated in the presence of DSBs.	3,4
	MRN-CtIP	MRN complex recruits ATM to broken DNA molecules.	5,6
	γH2AX	During the DSB repair process, there is a retro alimantation cycle between γH2AX and ATM. ATM phosphorylates H2AX and γH2AX signal activates ATM.	7
	Negative		
	c_NHEJ, HR, MMEJ, SSA	The response signaling must be turned off once the damage is repaired.	

γH2AX: ((DSB & (ATM | NHEJCore)) | (sRES | IRES))

Node	Regulators	Rationale	References
γH2AX	Positive		
	DSB & ATM	In the presence of DSB, H2AX can be phosphorylated by ATM or DNA-PKc (present in the NHEJ Core node)	8
	DSB & NHEJ Core		8,9
	sRES, IRES	γH2AX propagates and remains around the damaged site until is repaired. Colocalizing with ssDNA and repair proteins along all the DDR processes.	10-12

NHEJ Core: (DSB | SHLD) & ! (sRES | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
NHEJ Core	Positive		
	DSB	NHEJ Core proteins are recruited to protect the DSB ends and start the DDR signaling.	13,14
	SHLD	Recovery of the blunt ends (by SHLD activity) favors the activation and recruitment of the NHEJ Core complex	1,2
	Negative		
	sRES	DNA ends process by endonucleases expel NHEJ Core proteins from the DSB ends	15,16
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

H2AK15_H4K20: (((gH2AX & NHEJCore) & ! (TIP60)) | (H2AK15_H4K20 & DYNLL1_53BP1)) &!(c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
H2AK15_H4K20	Positive		
	yH2AX& NHEJ Core & ! TIP60	NHEJ Core proteins bind to yH2AX and promote H2AK20me2 and H2AK15Ub establishment. The process is blocked by the presence of TIP60 acetyltransferase activity.	17-20
	H2AK15_H4K20 & 53BP1	The histone marks are protected while 53BP1 is anchored to them.	21
	Negative		
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	The response signaling must be turned off once the damage is repaired.	

53BP1 : ((DSB | SHLD) & H2AK15_H4K20) & ! (BRCA1/FANCS)

Node	Regulators	Rationale	References
53BP1	Positive		
	DSB& H2AK15_H4K20	53BP1 is recruited to the DSB surrounded chromatin by binding to H2AK15Ub and H4K20me2 histone PTMs.	17,18,21,22
	SHLD& H2AK15_H4K20	SHLD recovers the DSB blunt ends, therefore 53BP1 can be anchor to the chromatin through the histone PTMs.	1
	Negative		
	BRCA1/FANCS	53BP1 recruitment and activity is inhibited by BRCA1/FANCS.	23,24

SHLD: (53BP1 & yH2AX & sRES) & !(TRIP13 | (sRES & POLQ) | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
SHLD	Positive		
	53BP1 & yH2AX & sRES	SHLD binds to 53BP1 in the damage site marked with yH2AX	1,2
	Negative		
	TRIP13	TRIP13 inactivates SHLD.	25
	sRES&POLQ	SHLD cannot occupied the sRES if POLQ is already there.	
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

cNHEJ: ((NHEJCore & 53BP1) | c_NHEJ) & !(sRES | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
c-NHEJ	Positive		
	NHEJCore & 53BP1	c-NHEJ is achieved when the DSB ends are protected and the NHEJ proteins lead to the ligation of the ends. For that NHEJCore proteins and 53BP1 work together.	26-28
	c_NHEJ	Once the damage is repair by a pathway, it cannot be changed.	
	Negative		
	sRES	c-NHEJ requires the DSB blunt ends to be achieve, therefore the sRES is an antagonist of the c-NHEJ.	1,2
	HR MMEJ SSA	If the DSB is repaired by another pathway, it cannot be also repaired by c-NHEJ.	

TRIP13: (γH2AX & DSB) & !(MRN_CtIP | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
TRIP13	Positive		
	γH2AX & DSB	The recruitment and permanence of TRIP13 to the damage site is not yet clear, however, it was reported that it is rapidly recruited after damage is induced. Therefore, it could be induced (directly or indirectly) by the DSB presence and the γH2AX signaling.	29
	Negative		
	MRN_CtIP	TRIP13 interacts with MRE11 (member of MRN complex), in the early stages of DNA damage signaling. However, it's has not been reported if the interaction can capture TRIP13 from interact with other proteins, inhibiting it.	29
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

BRCA1/FANCS : (DSB & ATM) & !(53BP1 | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
BRCA1/FANCS	Positive		
	DSB & ATM	ATM phosphorylates BRCA1/FANCS in reaction to DSB presence.	30
	Negative		
	53BP1	53BP1 is an antagonist of BRCA1/FANCS.	31
	c-NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

MRN-CtIP: (DSB & ATM & (BRCA1/FANCS | γ H2AX)) &! (sRES | IRES | (53BP1 & (SHLD | NHEJCore) | EXO1 | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
MRN-CtIP	Positive		
	DSB & ATM & BRCA1/FANCS	The DSB presence activates DDR signaling, and the consequence phosphorylation of MRN-CtIP members by ATM and other kinases. The phosphorylation of CtIP together with BRCA1/FANCS activates the MRN-CtIP complex.	32-37
	DSB & ATM & γ H2AX	The DSB triggers MRN recruitment mediated by γ H2AX and CtIP phosphorylation by ATM.	31,38
	Negative		
	sRES IRES	After DSB ends are processed by MRN-CtIP complex and the sRES is achieved it is unloaded from the damage site. That way, over resection is prevented.	37
	53BP1 & SHLD	The reconstitution of the DSB blunt ends structure, consequence of 53BP1 and SHLD, interfere with MRN-CtIP.	
	53BP1 & NHEJCore	MRN-CtIP is blocked when 53BP1 together with NHEJCore safeguard the DSB blunt ends.	
	EXO1	EXO1 exonuclease activity follow MRN-CtIP action, however, they cannot be actively processing DNA at the same time in the same place.	
c-NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.		

TIP60: (MRN_CtIP | sRES | IRES) &! (c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
TIP60	Positive		
	MRN_CtIP	During the DSB repair process, TIP60 complex is recruited by interacting with MRN.	39
	sRES IRES	TIP60 complex remains in the damage and colocalizes with γ H2AX signal until RAD51 is loaded.	39
	Negative		
c_NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.		

sRES: (MRN_CtIP | sRES) &! (IRES | SHLD | c_NHEJ | HR | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
sRES	Positive		
	MRN_CtIP	MRN-CtIP process DSB ends generating a short-range ssDNA overhang (sRES).	32,34
	sRES	The sRES remains like that until its modified by other enzymes.	
	Negative		
	IRES	The consecutive process of the ssDNA overhang by long-range endonucleases transforms sRES into IRES.	16,40
	SHLD	SHLD reverts ssDNA transforming the ssDNA overhang (sRES) into a blunt ends DSB.	1,2
c_NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.		

EXO1: (ATM & sRES) & ! (53BP1 & NHEJCore) | SHLD | POLQ)

Node	Regulators	Rationale	References
EXO1	Positive		
	ATM & sRES	ATM phosphorylates and activates EXO1, which recognizes the 3' ssDNA overhang (sRES).	16,40
	Negative		
	53BP1 & NHEJCore	The presence of 53BP1 and NHEJCore protects the DNA from exonucleases activity.	41
	SHLD	SHLD presence and activity over ssDNA overhang (sRES) blocks EXO1 recruitment.	41
POLQ	POLQ competes with EXO1 from the same substrate (sRES).		

IRES :((sRES & EXO1) | IRES) & ! (HR | SSA | c_NHEJ | MMEJ)

Node	Regulators	Rationale	References
L-RES	Positive		
	sRES & EXO1	EXO1 recognizes sRES and transform it into an extended ssDNA overhang (IRES).	16,40
	IRES	The IRES remains like that until its modified by other enzymes.	
	Negative		
	HR SSA c_NHEJ MMEJ	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

RAD51, (IRES & TIP60) & !((RAD52 | SHLD | POLQ | HR)

Node	Regulators	Rationale	References
RAD51	Positive		
	IRES & TIP60	RAD51 recognizes and is loaded to the IRES in cooperation with TIP60 complex.	39,42
	Negative		
	RAD52	RAD52 and RAD51 compete for the same substrate during de DDR.	43
	SHLD	SHLD is an antagonist of RAD51.	
	POLQ	POLQ activity interferes with RAD51 activation.	44
	HR SSA c_NHEJ MMEJ	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

HR: ((RAD51&IRES) | HR) & ! (c_NHEJ | MMEJ | SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
HR	Positive		
	RAD51&IRES	IRES coated with RAD51 search for the homologous region in the chromatid sister, leading to the end of the HR repair.	42,45
	HR	Once the damage is repair by a pathway, it cannot be changed.	
	Negative		
	c_NHEJ MMEJ SSA	If the DSB is repaired by another pathway, it cannot be also repaired by HR.	

PARP1 : (((DSB & gH2AX) &! NHEJCore)|(sRES & !(MRN_CtIP | SHLD))) & ! (c_NHEJ | HR |MMEJ |SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
PARP1	Positive		
	(DSB & gH2AX) &! NHEJCore	PARP1 is rapidly recruited to the damage site, signaled by γH2AX, however, the presence of NHEJCore proteins inactivate it.	46,47 48
	sRES & ! MRN_CtIP	It has been reported that the absence of CtIP increases the sensitivity to PARP inhibitors, consequently, CtIP is a negative regulator of PARP1.	49
	sRES & ! SHLD	SHLD and PARP1 work over the same substrate, therefore, the presence of SHLD prevents the activation of PARP1.	
	Negative		
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

POLQ, (PARP1 & sRES) &! ((sRES & SHLD) |(EXO1 & sRES) | MMEJ)

Node	Regulators	Rationale	References
POLQ	Positive		
	(PARP1 & sRES)	POLQ together with PARP1 coordinate the process of the sRES that lead to the MMEJ.	44,50
	Negative		
	sRES & SHLD	POLQ and SHLD work over the same substrate, therefore, the presence of SHLD prevents the activation of PARP1.	
	EXO1 & sRES	POLQ and EXO1 work over the same substrate, therefore, the presence of SHLD prevents the activation of PARP1.	
	MMEJ	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

MMEJ: ((PARP1 & POLQ) | MMEJ) & ! (c_NHEJ | HR |SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
MMEJ	Positive		
	PARP1 & POLQ	POLQ together with PARP1 coordinate the process of the sRES that lead to the MMEJ.	44,46
	MMEJ	Once the damage is repair by a pathway, it cannot be changed.	
	Negative		
	c_NHEJ HR SSA	If the DSB is repaired by another pathway, it cannot be also repaired by MMEJ.	

RAD52: IRES & ! (RAD51 | c_NHEJ | HR |MMEJ |SSA)

Node	Regulators	Rationale	References
RAD52	Positive		
	IRES	RAD52 binds to IRES.	51
	Negative		
	RAD51	RAD51 activity blocks RAD52 activation.	52
	c_NHEJ HR MMEJ SSA	The damage response must be turned off once the damage is repaired.	

SSA: ((IRES & RAD52) | SSA) & !(RAD51 | c_NHEJ | HR | MMEJ)

Node	Regulators	Rationale	References
SSA	Positive		
	IRES & RAD52	SSA is achieved by the action of RAD52 over the IRES.	51
	SSA	Once the damage is repair by a pathway, it cannot be changed.	
	Negative		
	RAD51	RAD51 is a SSA antagonist.	52
	c_NHEJ HR MMEJ	If the DSB is repaired by another pathway, it cannot be also repaired by SSA.	

- Noordermeer, S.M., Adam, S., Setiaputra, D., Barazas, M., Pettitt, S.J., Ling, A.K., Olivieri, M., Alvarez-Quilon, A., Moatti, N., Zimmermann, M., et al. (2018). The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* 560, 117-+. 10.1038/s41586-018-0340-7.
- Mirman, Z., Sasi, N.K., King, A., Chapman, J.R., and de Lange, T. (2022). 53BP1-shieldin-dependent DSB processing in BRCA1-deficient cells requires CST-Pol alpha-primase fill-in synthesis. *Nature Cell Biology* 24, 51-+. 10.1038/s41556-021-00812-9.
- Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2021). Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22, 796-814. 10.1038/s41580-021-00394-2.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554. 10.1126/science.1108297.
- Lee, J.H., Mand, M.R., Deshpande, R.A., Kinoshita, E., Yang, S.H., Wyman, C., and Paull, T.T. (2013). Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) Kinase Activity Is Regulated by ATP-driven Conformational Changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) Complex. *Journal of Biological Chemistry* 288, 12840-12851. 10.1074/jbc.M113.460378.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Chen, B., Bruma, S., Tashiro, S., Matsuura, S., Tanimoto, K., Chen, D.J., and Komatsu, K. (2009). Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380, 752-757. 10.1016/j.bbrc.2009.01.109.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42462-42467. 10.1074/jbc.C100466200.
- An, J., Huang, Y.C., Xu, Q.Z., Zhou, L.J., Shang, Z.F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.D., Wu, D.C., and Zhou, P.K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *Bmc Molecular Biology* 11, 18. 10.1186/1471-2199-11-18.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10, 886-895. 10.1016/s0960-9822(00)00610-2.
- Urtishak, K.A., Smith, K.D., Chanoux, R.A., Greenberg, R.A., Johnson, F.B., and Brown, E.J. (2009). Timeless Maintains Genomic Stability and Suppresses Sister Chromatid Exchange during Unperturbed DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8768-8776. 10.1074/jbc.M806103200.
- Liaw, H., Lee, D., and Myung, K. (2011). DNA-PK-Dependent RPA2 Hyperphosphorylation Facilitates DNA Repair and Suppresses Sister Chromatid Exchange. *Plos One* 6, e21424. 10.1371/journal.pone.0021424.
- Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Molecular and Cellular Biology* 19, 3267-3277.

14. DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo Journal* 21, 3192-3200. 10.1093/emboj/cdf299.
15. Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R.Z., Cowan, M.J., and Yannone, S.M. (2007). Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by artemis nuclease. *Journal of Biological Chemistry* 282, 3547-3558. 10.1074/jbc.M607745200.
16. Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Molecular Cell* 67, 891-+. 10.1016/j.molcel.2017.08.002.
17. Mallette, F.A., Mattioli, F., Cui, G.F., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., and Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *Embo Journal* 31, 1865-1878. 10.1038/emboj.2012.47.
18. Tuzon, C.T., Spektor, T., Kong, X.D., Congdon, L.M., Wu, S.M., Schotta, G., Yokomori, K., and Rice, J.C. (2014). Concerted Activities of Distinct H4K20 Methyltransferases at DNA Double-Strand Breaks Regulate 53BP1 Nucleation and NHEJ-Directed Repair. *Cell Reports* 8, 429-437. 10.1016/j.celrep.2014.06.013.
19. Jacquet, K., Fradet-Turcotte, A., Avvakumov, N., Lambert, J.-P., Roques, C., Pandita, Raj K., Paquet, E., Herst, P., Gingras, A.-C., Pandita, Tej K., et al. (2016). The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation. *Molecular Cell* 62, 409-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.031>.
20. Zhang, J.R., Ma, Z.F., Treszezamsky, A., and Powell, S.N. (2005). MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 902-909. 10.1038/nsmb991.
21. Pei, H.D., Zhang, L., Luo, K.T., Qin, Y.X., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L.W., You, Z.S., and Lou, Z.K. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470, 124-U144. 10.1038/nature09658.
22. Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C.Y., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., and Durocher, D. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499, 50-+. 10.1038/nature12318.
23. Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.Y., Obuse, C., Nishi, R., et al. (2017). BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Reports* 18, 520-532. 10.1016/j.celrep.2016.12.042.
24. Densham, R.M., Garvin, A.J., Stone, H.R., Strachan, J., Baldock, R.A., Daza-Martin, M., Fletcher, A., Blair-Reid, S., Beesley, J., Johal, B., et al. (2016). Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 647-655. 10.1038/nsmb.3236.
25. Clairmont, C.S., Sarangi, P., Ponnienselvan, K., Galli, L.D., Csete, I., Moreau, L., Adelmant, G., Chowdhury, D., Marto, J.A., and D'Andrea, A.D. (2020). TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change. *Nature Cell Biology* 22, 87-+. 10.1038/s41556-019-0442-y.
26. Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* 207, 855-865. 10.1084/jem.20100244.
27. McElhinny, S.A.N., Snowden, C.M., McCarville, J., and Ramsden, D.A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Molecular and Cellular Biology* 20, 2996-3003. 10.1128/mcb.20.9.2996-3003.2000.
28. Goodarzi, A.A., Yu, Y.P., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R.Q., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., and Lees-Miller, S.P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *Embo Journal* 25, 3880-3889. 10.1038/sj.emboj.7601255.
29. Jeong, H., Wie, M., Baek, I.J., Sohn, G., Um, S.H., Lee, S.G., Seo, Y., Ra, J., Lee, E.A., Kim, S., et al. (2022). TRIP13 Participates in Immediate-Early Sensing of DNA Strand Breaks and ATM Signaling Amplification through MRE11. *Cells* 11, 4095. 10.3390/cells11244095.
30. Bertwistle, D. (1999). ATM phosphorylates BRCA1. *Breast Cancer Research* 2, 66641. 10.1186/bcr-1999-66641.

31. Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* *141*, 243-254. 10.1016/j.cell.2010.03.012.
32. Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genois, M.M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokalio, A., Romoli, F., et al. (2014). DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Molecular Cell* *53*, 7-18. 10.1016/j.molcel.2013.11.003.
33. Chen, L.C., Nievera, C.J., Lee, A.Y.L., and Wu, X.H. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 7713-7720. 10.1074/jbc.M710245200.
34. Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509-U506. 10.1038/nature06337.
35. Shibata, A., and Jeggo, P.A. (2021). ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Genes* *12*, 1370. 10.3390/genes12091370.
36. Wang, H.L., Shi, L.Z., Wong, C.C.L., Han, X.M., Hwang, P.Y.H., Truong, L.N., Zhu, Q.Y., Shao, Z.P., Chen, D.J., Berns, M.W., et al. (2013). The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *Plos Genetics* *9*, e1003277. 10.1371/journal.pgen.1003277.
37. Han, J.H., Wan, L., Jiang, G.X., Cao, L.P., Xia, F.Y., Tian, T., Zhu, X.M., Wu, M.J., Huen, M.S.Y., Wang, Y., et al. (2021). ATM controls the extent of DNA end resection by eliciting sequential posttranslational modifications of CtIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *118*, e2022600118. 10.1073/pnas.2022600118.
38. West, A.G., and van Attikum, H. (2006). Chromatin at the crossroads - Meeting on signalling to chromatin epigenetics. *Embo Reports* *7*, 1206-1210. 10.1038/sj.embor.7400834.
39. Cheng, X., Jobin-Robitaille, O., Billon, P., Buisson, R., Niu, H.Y., Lacoste, N., Abshiru, N., Cote, V., Thibault, P., Kron, S.J., et al. (2018). Phospho-dependent recruitment of the yeast NuA4 acetyltransferase complex by MRX at DNA breaks regulates RPA dynamics during resection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *115*, 10028-10033. 10.1073/pnas.1806513115.
40. Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T.K., Burma, S., and Khanna, K.K. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* *38*, 1821-1831. 10.1093/nar/gkp1164.
41. Paiano, J., Zolnerowich, N., Wu, W., Pavani, R., Wang, C., Li, H.Z., Zheng, L., Shen, B.H., Sleckman, B.P., Chen, B.R., and Nussenzweig, A. (2021). Role of 53BP1 in end protection and DNA synthesis at DNA breaks. *Genes & Development* *35*, 1356-1367. 10.1101/gad.348667.121.
42. Zhao, W.X., Steinfeld, J.B., Liang, F.S., Chen, X.Y., Maranon, D.G., Ma, C.J., Kwon, Y., Rao, T., Wang, W.B., Sheng, C., et al. (2017). BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature* *550*, 360-365. 10.1038/nature24060.
43. Epum, E.A., Mohan, M.J., Ruppe, N.P., and Friedman, K.L. (2020). Interaction of yeast Rad51 and Rad52 relieves Rad52-mediated inhibition of de novo telomere addition. *Plos Genetics* *16*, e1008608. 10.1371/journal.pgen.1008608.
44. Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I.R., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J., et al. (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol theta-mediated repair. *Nature* *518*, 258-U306. 10.1038/nature14184.
45. Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* *467*, 678-U662. 10.1038/nature09399.
46. Wang, M.L., Wu, W.Z., Wu, W.Q., Rosidi, B., Zhang, L.H., Wang, H.C., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research* *34*, 6170-6182. 10.1093/nar/gkl840.

47. Yang, G., Liu, C., Chen, S.H., Kassab, M.A., Hoff, J.D., Walter, N.G., and Yu, X.C. (2018). Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Research* *46*, 3446-3457. [10.1093/nar/gky088](https://doi.org/10.1093/nar/gky088).
48. Caron, M.C., Sharma, A.K., O'Sullivan, J., Myler, L.R., Ferreira, M.T., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Ethier, C., Gagne, J.P., Langelier, M.F., et al. (2019). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nature Communications* *10*, 2954. [10.1038/s41467-019-10741-9](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10741-9).
49. Wang, J.H., Ding, Q.S., Fujimori, H., Motegi, A., Miki, Y., and Masutani, M. (2016). Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors. *Oncotarget* *7*, 7701-7713. [10.18632/oncotarget.6715](https://doi.org/10.18632/oncotarget.6715).
50. Mateos-Gomez, P.A., Gong, F.D., Nair, N., Miller, K.M., Lazzerini-Denchi, E., and Sfeir, A. (2015). Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* *518*, 254-U285. [10.1038/nature14157](https://doi.org/10.1038/nature14157).
51. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *Plos Genetics* *4*, e1000110. [10.1371/journal.pgen.1000110](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000110).
52. So, A., Dardillac, E., Muhammad, A., Chailleux, C., Sesma-Sanz, L., Ragu, S., Le Cam, E., Canitrot, Y., Masson, J.Y., Dupaigne, P., et al. (2022). RAD51 protects against nonconservative DNA double-strand break repair through a nonenzymatic function. *Nucleic Acids Research* *50*, 2651-2666. [10.1093/nar/gkac073](https://doi.org/10.1093/nar/gkac073).

Supplementary Table S2. Detailed results from the perturbations made by removing one by one the edges of the Boolean functions.

Node	Number of interactions (edges) per node	Perturbations preserving the attractor (%)	Perturbations resulting in new attractors (%)
DSB	7	3 (42.9%)	4 (57.1%)
ATM	7	7 (100%)	0 (0%)
yH2AX	5	4 (80%)	1 (20%)
NHEJCore	7	7 (100%)	0 (0%)
H2AK15_H4K20	9	8 (88.9%)	1 (11.1%)
53BP1	4	4 (100%)	0 (0%)
SHLD	10	10 (100%)	0 (0%)
c_NHEJ	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)
TRIP13	7	7 (100%)	0 (0%)
BRCA1/FANCS	7	7 (100%)	0 (0%)
MRN_CtIP	15	13 (86.7%)	2 (13.3%)
TIP60	7	7 (100%)	0 (0%)
sRES	8	3 (37.5%)	5 (62.5%)
EXO1	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)
IRES	7	3 (42.9%)	4 (57.1%)
RAD51	6	6 (100%)	0 (0%)
HR	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)
PARP1	10	10 (100%)	0 (0%)
POLQ	7	7 (100%)	0 (0%)
MMEJ	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)
RAD52	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)
SSA	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)
Total	161	138 (85.7%)	23 (14.3%)

Supplementary Table S3. Results from the bitflip perturbations made to the truth tables of the network.

Node	Number of regulators	Total perturbations (100%)	Perturbations without changes on the attractors
DSB	7	$2^7 = 128$	119 (92.97%)
ATM	7	128	123 (96.09%)
yH2AX	5	32	30 (93.75%)
NHEJCore	7	128	123 (96.09%)
H2AK15_H4K20	9	512	502 (98.05%)
53BP1	4	16	14 (87.50%)
SHLD	9	512	505 (98.63%)
c_NHEJ	7	128	122 (95.31%)
TRIP13	7	128	122 (95.31%)
BRCA1/FANCS	7	128	122 (95.31%)
MRN_CtIP	14	16,384	16,375 (99.95%)
TIP60	7	128	123 (96.09%)
s-RES	8	256	246 (96.09%)
EXO1	6	64	62 (96.88%)
I-RES	7	128	118 (92.19%)
RAD51	6	64	61 (95.31%)
HR	6	64	58 (90.63%)
PARP1	10	1,024	1,019 (99.51%)
POLQ	5	32	29 (90.62%)
MMEJ	6	64	58 (90.63%)
RAD52	6	64	58 (90.63%)
SSA	7	128	122 (95.31%)
Total		20,240	20,111 (99.36%)

Supplementary Figure S1. Trajectories that changed due to bitflip perturbations to a specific node rule.

Trajectory of unperturbed network

Trajectory		Trajectory characteristic.
	<p>DSB is repaired by HR via activation of a cascade of proteins including DNA damage signaling proteins (ATM and gH2AX), activation of S-RES elements (BRCA1, MRN_CtIP), activation of L-RES elements (EXO1), and activation of HR recombinase (RAD51). The attractor is reached in 11 transitions where all the nodes are OFF except from HR.</p>	

Trajectories of perturbed network

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbed trajectory.
DSB		The DSB node is activated again in the transition 8 th and 9 th
		DSB node turns OFF in the 2 nd transition, therefore the DDR is interrupted.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
ATM		<p>The activation of ATM nodes in the transition 12th is the only difference with the non-perturbated trajectory.</p>
		<p>ATM node keeps active until the 11th transition.</p>
		<p>Delayed activation of ATM node led to the activation of the c-NHEJ related nodes and a late activation of the sRES related nodes, driving to simultaneous activation of the sRES and c-NHEJ nodes. The simulation ends with all the nodes turn OFF.</p>
		<p>ATM node turns ON and OFF, changing the pattern of activation of sRES and IRES. The modification in the resection trajectory led to the simultaneous activation of HR and MMEJ. The simulation ends with all the nodes turn OFF.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.																																																																																																																																																																																																																																																													
yH2AX	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	The attractor is reached in 10 transitions where yH2AX and HR are ON.
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																								
	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																								
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
yH2AX	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	yH2AX node is turn OFF earlier (transition 9).
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																								
	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																								
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
yH2AX	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ATM and NHEJ Core nodes activation is delayed, consequently, BRCA1/FANCS node is turn ON later (transition 3). However, neither the following trajectory, nor the attractor are not affected.
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																								
	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																								
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																									

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.																																																																																																																																																																																																																																						
NHEJ Core	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	NHEJ Core node is not turned ON. Therefore, PARP1 is prematurely activated, leading to the MMEJ promotion. The attractor is reached in 9 transitions where everything is OFF but MMEJ node.
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																	
	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																	
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																		

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
H2AK15-H4K20		H2AK15-H4K20 node is active since the beginning, favoring c-NHEJ promotion.
		The attractor is reached in the 12 th transition, where H2AK15-H4K20 and HR nodes are active.
		H2AK15-H4K20 node is activated in the 11 th transition. The attractor is reached in the 12 th transition, where the HR nodes is active.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
53BP1		<p>The premature activation of 53BP1 favors c-NHEJ promotion.</p> <p>The attractor is reached in 5 transitions where everything is OFF but c-NHEJ node.</p>

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							
12																							

53BP1 activation in the 4th transition promotes the c-NHEJ activation. However, it happened simultaneously with the sRES activation. The simulation ends with all the nodes turn OFF.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
SHLD	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								11																								12																								Difference with the non-perturbated trajectory.
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								SHLD is activated in the transition number 12. The attractor is reached in 12 transitions where every node is OFF but SHLD and HR.																																																
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								SHLD node is ON in transitions 4, 6 and 8, inhibiting S-RES progression to L-RES. Moreover, S-RES is reverted to DSB, however the repair process is not completed. The attractor is reached in 10 transitions where all the nodes are OFF except from DSB, ATM, yH2AX and NHEJ Core.																																																
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								11																								12																								SHLD node is active in transitions 10 and 11. The attractor is reached in 12 transitions.
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							

SHLD node is activated in transition number 5, inhibiting S-RES progression to L-RES. The repair process is not completed. The attractor is reached in 8 transitions where all the nodes are OFF.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																								
c-NHEJ	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>YH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>sRES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>c-NHEJ node is activated in the 2nd transition before the DDR is established. The attractor is reached in the 4th transition where c-NHEJ is the only node active.</p>		DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	sRES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								Difference with the non-perturbated trajectory.																																																																																																																																																
		DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	sRES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																		
	1																																																																																																																																																																																																																																																																								
2																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>YH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>sRES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>c-NHEJ node got activated in the 7th transition, interrupting the HR trajectory. The attractor is reached in the 10th transition, where all the nodes are OFF.</p>		DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	sRES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	sRES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>YH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>sRES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>c-NHEJ node is activated in the 3rd transition before the DDR is established. The attractor is reached in the 5th transition where c-NHEJ is the only node active.</p>		DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	sRES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	sRES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																									

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
BRCA1/FANCS		BRCA1/FANCS node is active since transition 1, therefore, the s-RES process is reached faster and c-NHEJ related nodes are inactivated. Consequently, the HR process is accelerated, and the attractor is reached in the 10 th transition.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
MRN-CtIP		MRN-CtIP node is re activated in the 12 th transition. The attractor is reached in 12 transitions where everything is OFF but the MRN-CtIP and HR nodes.
		MRN-CtIP node is re activated in the 11 th transition. The attractor is reached in 12 transitions.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1	1																						
2	1	1	1																				
3	1	1	1	1																			
4	1	1	1	1						1													
5	1	1	1	1						1													
6	1	1	1	1						1													
7	1	1	1	1						1													
8	1	1	1	1						1													
9	1	1	1	1						1													

MRN-CtIP is turned ON in transition 2 and turned OFF in the next transition. TIP60 and S-RES are activated in transition number 3. Accelerating the repair process. The attractor is reached in 9 transitions.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1	1																						
2	1	1	1																				
3	1	1	1	1																			
4	1	1	1	1						1													
5	1	1	1	1						1													
6	1	1	1	1						1													
7	1	1	1	1						1													
8	1	1	1	1						1													
9	1	1	1	1						1													
10	1	1	1	1						1													

MRN-CtIP is activated in the 3rd transition. TRIP13 is not activated. The attractor is reached in 10 transitions.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1	1																						
2	1	1	1	1																			
3	1	1	1	1																			
4	1	1	1	1						1													

MRN-CtIP is not activated. The attractor is reached in 4 transitions, where everything is OFF but DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, H2AK15-H4K20, TRIP13 and BRCA1/FANCS nodes.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																								
S-RES	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1	1																							2	1	1	1										1											3	1	1	1	1									1											4	1	1	1	1						1			1											5	1	1	1	1						1			1											6	1	1	1	1						1			1											7	1	1	1	1						1			1											8	1	1	1	1						1			1											<p>Difference with the non-perturbated trajectory.</p> <p>S-RES is activated in transition number 2, accelerating the HR process. The attractor is reached in 8 transitions.</p>
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																			
1	1																																																																																																																																																																																																																								
2	1	1	1										1																																																																																																																																																																																																												
3	1	1	1	1									1																																																																																																																																																																																																												
4	1	1	1	1						1			1																																																																																																																																																																																																												
5	1	1	1	1						1			1																																																																																																																																																																																																												
6	1	1	1	1						1			1																																																																																																																																																																																																												
7	1	1	1	1						1			1																																																																																																																																																																																																												
8	1	1	1	1						1			1																																																																																																																																																																																																												

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
11	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
12	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON

After being turned OFF, S-RES node is re activated in transition 10th. The attractor is reached in 12 transitions.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
11	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
12	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON

S-RES is not activated; therefore, the DDR process is interrupted. The attractor is reached in 6 transitions where all the nodes are off except from DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, BRCA1/FANCS, MRN-CtIP and TIP60.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
11	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON
12	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON

S-RES is turned OFF after 1 transition, in consequence the DDR is disrupted. The attractor is reached in 8 transitions where all the nodes are OFF.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
EXO1	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> <td>ON</td> </tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	11	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	12	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	<p>Difference with the non-perturbated trajectory.</p> <p>EXO1 node is ON only in the 6th transition. Lacking EXO1 presence facilitates MMEJ promotion, leading to the simultaneous activation of HR and MMEJ.</p> <p>The attractor</p>
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																							
1	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
2	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
3	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
4	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
5	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
6	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
7	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
8	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
9	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
10	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
11	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							
12	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON																																																																																																																																																																																																																																																																																							

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
RAD51		<p>RAD51 is activated since transition number 6. The attractor is reached in transition number 10.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
HR		<p>HR node is activated in the 2nd transition before the DDR is established. The attractor is reached in the 4th transition where HR is the only node active.</p>
		<p>L-RES node is turned OFF a transition earlier (9th). HR node is activated in transition number 8. The attractor is reached in 10 transitions.</p>
		<p>HR node is active only through one transition (9th). ATM turns ON and OFF in the 10th and 11th transition. The attractor is reached in the 12th transition where all the nodes are OFF.</p>

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							

HR is not activated.
L-RES and TIP60 are active longer, leading to the re activation of RAD51 and RAD52 in the 10th transition.
The attractor is reached in the 10th transition where ATM, yH2AX, TIP60, L-RES, RAD51 and RAD52 are ON.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
PARP1	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>Difference with the non-perturbated trajectory. PARP1 is re activated in the 12th transition. The attractor is reached in 12 transitions where everything is OFF but HR and PARP1 nodes.</p>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								11																								12																								
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>PARP1 is re activated in transition number 10. The attractor is reached in 12th transitions.</p>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								11																								12																								
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							
12																							

The first transition where PARP1 is turned ON is in the 5th transition, leading to the activation of POLQ. EXO1 and POLQ inactivate each other in transition number 7. Both nodes are reactivated again in the transition number 8. Thus, HR and MMEJ are simultaneously active in the 9th transition. The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes area OFF.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
POLQ	<table border="1"> <thead> <tr> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>Difference with the non-perturbated trajectory. POLQ node is activated from transition 2 to 5, and 11 to 12. The attractor is reached in 12 transitions where the only nodes active are HR and POLQ.</p>	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																							2																							3																							4																							5																							6																							7																							8																							9																							10																							11																							12																							<table border="1"> <thead> <tr> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>POLQ is prematurely activated at transition number 6. EXO1 and POLQ inactivate each other in the transition number 7. Both nodes are reactivated again in the transition number 8. Thus, HR and MMEJ are simultaneously active in the 9th transition. The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes area OFF.</p>	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																							2																							3																							4																							5																							6																							7																							8																							9																							10																							11																							12																						
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							

POLQ is activated before RAD51 node, favoring MMEJ pathway. The attractor is reached in 10 transitions, where all the nodes are OFF except from MMEJ node.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							

Perturbated node: Trajectory

MMEJ

MMEJ node is activated in the 8th transition. The attractor is reached in 10 transitions, where everything is OFF but MMEJ node.

POLQ is activated in the 8th transition, leading to the promotion of MMEJ. MMEJ is activated simultaneously with HR in the transition number 9. The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes are OFF.

Difference with the non-perturbated trajectory. MMEJ node is activated in the 2nd transition. The attractor is reached in 4 transitions, where everything is OFF but MMEJ node.

MMEJ node is activated in the 8th transition. The attractor is reached in 10 transitions, where everything is OFF but MMEJ node.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
RAD52		<p>RAD52 is activated since 2nd till 8th transition, inhibiting RAD51. The attractor is reached in 10 transitions, where all the nodes are OFF except from SSA.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
SSA		<p>SSA is activated in the 2nd transition, before the DDR is established. The attractor is reached in 4 transitions, where all the nodes are OFF but SSA.</p>
		<p>SSA is activated in transition 11th, simultaneously with HR node. The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes are OFF.</p>
		<p>SSA is activated in transition 9th, simultaneously with HR node. The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes are OFF.</p>

Supplementary Table S4. Results from the bitflip perturbations made to the truth tables of the network with the DSB=1.

Node	Number of regulators	Total perturbations	Perturbations without changes on the attractors (%)
ATM	7	128	118 (92.19%)
yH2AX	5	32	31 (96.88%)
NHEJCore	7	128	124 (96.88%)
H2AK15_H4K20	9	512	498 (96.27%)
53BP1	4	16	14 (87.5%)
SHLD	9	512	505 (98.63%)
c_NHEJ	7	128	120 (93.75%)
TRIP13	7	128	123 (96.09%)
BRCA1/FANCS	7	128	123 (96.09%)
MRN_CtIP	14	16,384	16,378 (99.96%)
TIP60	7	128	124 (96.88%)
s-RES	8	256	247 (96.48%)
EXO1	6	64	61 (95.31%)
l-RES	7	128	118 (92.19%)
RAD51	6	64	61 (95.31%)
HR	6	64	58 (90.63%)
PARP1	10	1,024	1,019 (99.51%)
POLQ	5	32	27 (84.38%)
MMEJ	6	64	58 (90.63%)
RAD52	6	64	59 (92.19%)
SSA	7	128	120 (93.75%)
Total		20,112	19,986 (99.37%)

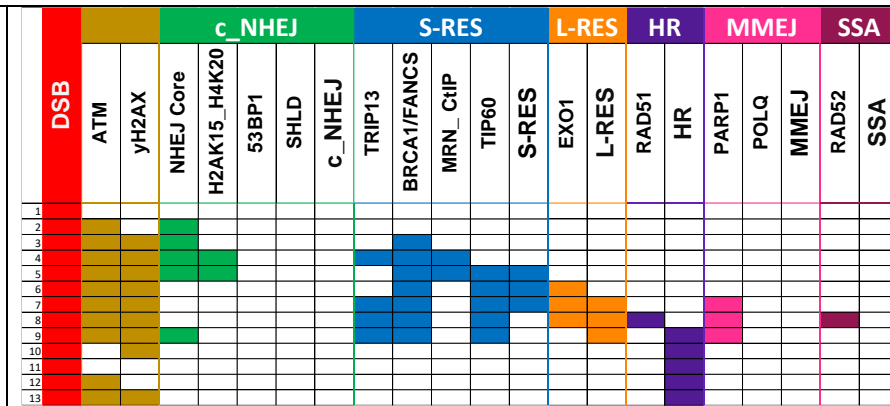
Supplementary Figure S2. Trajectories that changed due to bitflip perturbations to a specific node rule with the DSB=1.

Trajectory of unperturbed network

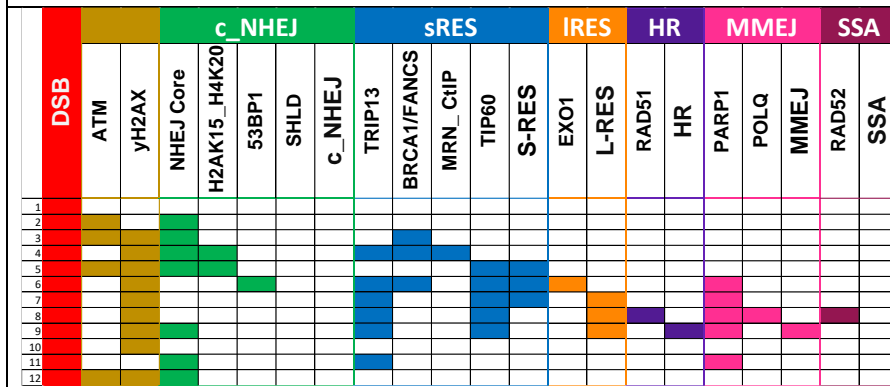
Trajectory		Trajectory characteristic.
		<p>DSB is repaired by HR via activation of a cascade of proteins including DNA damage signaling proteins (ATM and gH2AX), activation of S-RES elements (BRCA1, MRN_CtIP), activation of L-RES elements (EXO1), and activation of HR recombinase (RAD51).</p> <p>The attractor is reached in 11 transitions where all the nodes are OFF except from DSB and HR.</p>

Trajectories of perturbed network

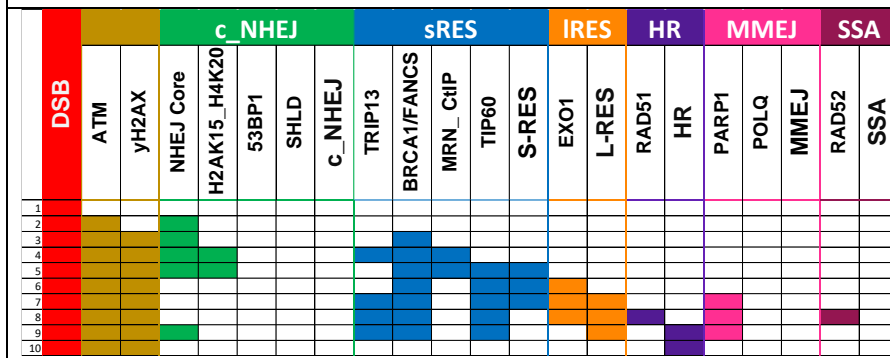
Perturbed node	Trajectory	Difference with the non-perturbed trajectory.
ATM		<p>Delayed activation of ATM node led to the activation of the c-NHEJ related nodes and a late activation of the sRES related nodes.</p> <p>The sRES and c-NHEJ nodes are simultaneously activated in transition 6th.</p> <p>The L-RES is not achieved; therefore, the DDR is interrupted.</p> <p>The attractor is reached in 9 transitions where all the nodes are OFF except from the DSB, yH2AX, NHEJ Core and BRCA1/FANCS nodes.</p>



ATM is re activated in transition number 12. Consequently, yH2AX node is also reactivated in transition number 13. The attractor is reached in 13 transitions, where all the nodes are OFF but DSB, ATM, yH2AX and HR nodes.



ATM node is turned OFF-ON-OFF (in the transitions 4th, 5th and 6th respectively), changing the pattern of activation of sRES and IRES. The modification in the resection trajectory led to the simultaneous activation of HR and MMEJ in the 9th transition. The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes are OFF, except from DSB, ATM, yH2AX and NHEJ Core nodes



Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
yH2AX	<p>DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, H2AK15_H4K20, 53BP1, SHLD, c_NHEJ, TRIP13, BRCA1/FANCS, MRN_CtIP, TIP60, S-RES, EXO1, L-RES, RAD51, HR, PARP1, POLQ, MMEJ, RAD52, SSA</p>	yH2AX node is active from transition 2 to 9, accelerating the repair process. The attractor is reached in 10 transitions where DSB, yH2AX and HR are the only nodes ON.
	<p>DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, H2AK15_H4K20, 53BP1, SHLD, c_NHEJ, TRIP13, BRCA1/FANCS, MRN_CtIP, TIP60, S-RES, EXO1, L-RES, RAD51, HR, PARP1, POLQ, MMEJ, RAD52, SSA</p>	yH2AX node is active from transition 3 to 9. The attractor is reached in 10 transitions.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
NHEJ Core	<p>DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, H2AK15_H4K20, 53BP1, SHLD, c_NHEJ, TRIP13, BRCA1/FANCS, MRN_CtIP, TIP60, S-RES, EXO1, L-RES, RAD51, HR, PARP1, POLQ, MMEJ, RAD52, SSA</p>	NHEJ Core node is not turned ON. Therefore, PARP1 is prematurely activated, leading to the MMEJ promotion. The attractor is reached in 9 transitions where everything is OFF but DSB and MMEJ nodes.
	<p>DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, H2AK15_H4K20, 53BP1, SHLD, c_NHEJ, TRIP13, BRCA1/FANCS, MRN_CtIP, TIP60, S-RES, EXO1, L-RES, RAD51, HR, PARP1, POLQ, MMEJ, RAD52, SSA</p>	NHEJ Core node kept active from transition 9 to 10. The attractor is reached in transition 10 where everything is OFF but DSB, yH2AX and HR nodes.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
		<p>H2AK15-H4K20 node is active since the beginning, favoring c-NHEJ promotion. The attractor is reached in 6 transitions where all the nodes are OFF but DSB and c-NHEJ nodes.</p>
H2AK15-H4K20		<p>H2AK15-H4K20 node is re activated in transition 12th, consequently, 53BP1 is turn ON in transition number 13. The attractor is reached in the 13th transition, where DSB, 53BP1 and HR are the only nodes active.</p>
H2AK15-H4K20		<p>H2AK15-H4K20 node is re activated in transition 11th, consequently, 53BP1 is turn ON in transition number 12. The attractor is reached in the 13th transition, where DSB, 53BP1 and HR are the only nodes active.</p>
H2AK15-H4K20		<p>H2AK15-H4K20 node is re activated in transition 10th, consequently, 53BP1 is turn ON in transition number 11. The attractor is reached in 12 transitions.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
53BP1		<p>The premature activation of 53BP1 favors c-NHEJ promotion. 53BP1 node kept active from transition 2 to 5, The attractor is reached in 5 transitions where everything is OFF but DSB, 53BP1 and c-NHEJ nodes.</p>
		<p>53BP1 activation in the 4th transition promotes the c-NHEJ activation. However, it happened simultaneously with the sRES activation. The attractor is reached in 7 transitions where all the nodes are OFF except for DSB, ATM, NHEJ Core, TRIP13 and PARP1 nodes.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
SHLD		<p>SHLD is activated in the transition number 12. The attractor is reached in 12 transitions where every node is OFF but DSB, SHLD and HR nodes.</p>
		<p>SHLD node is ON in transitions 4, 6 and 8, inhibiting S-RES progression to L-RES. Moreover, S-RES is reverted to DSB, however the repair process is not completed. The attractor is reached in 9 transitions where all the nodes are OFF except from DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, SHLD,</p>

		<p>TRIP13, BRCA1/FANCS, MRN-CtIP and PARP1 nodes.</p> <p>SHLD is activated in the transition number 11. The attractor is reached in 12 transitions.</p>
		<p>SHLD node is activated in transition number 5, inhibiting S-RES progression to L-RES. The repair process is not completed. The attractor is reached in 7 transitions where all the nodes are OFF except from DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, TRIP13, BRCA1/FANCS, MRN-CtIP, TIP60 and PARP1 nodes..</p>

Perturbed node	Trajectory	<p>Difference with the non-perturbed trajectory.</p> <p>c-NHEJ node is activated in the 2nd transition before the DDR is established. The attractor is reached in the 4 transitions where DSB and c-NHEJ are the only nodes active.</p>
c-NHEJ		<p>c-NHEJ node got activated in the 7th transition, interrupting the HR trajectory. The attractor is reached in the 9th transition, where all the nodes are OFF except for the DSB, ATM, NHEJ Core, TRIP13 and PARP1 nodes.</p>

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							
12																							

TRIP13 kept active from the transition 7th until 11th. The attractor is reached in 12 transitions.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																								
BRCA1/FANCS	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								<p>Difference with the non-perturbated trajectory.</p> <p>BRCA1/FANCS node is active since the 1st transition, accelerating the S-RES process. The attractor is reached in 10 transitions.</p>
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																			
1																																																																																																																																																																																																																																																																									
2																																																																																																																																																																																																																																																																									
3																																																																																																																																																																																																																																																																									
4																																																																																																																																																																																																																																																																									
5																																																																																																																																																																																																																																																																									
6																																																																																																																																																																																																																																																																									
7																																																																																																																																																																																																																																																																									
8																																																																																																																																																																																																																																																																									
9																																																																																																																																																																																																																																																																									
10																																																																																																																																																																																																																																																																									

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																
MRN-CtIP	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/FANCS</th> <th>MRN_CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								<p>Difference with the non-perturbated trajectory.</p> <p>MRN-CtIP is turned ON in transition 2 and turned OFF in the next transition. TIP60 and S-RES are activated in transition number 3. Accelerating the repair process. The attractor is reached in 9 transitions.</p>
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																											
1																																																																																																																																																																																																																																																	
2																																																																																																																																																																																																																																																	
3																																																																																																																																																																																																																																																	
4																																																																																																																																																																																																																																																	
5																																																																																																																																																																																																																																																	
6																																																																																																																																																																																																																																																	
7																																																																																																																																																																																																																																																	
8																																																																																																																																																																																																																																																	
9																																																																																																																																																																																																																																																	

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							
12																							
13																							
14																							
15																							
16																							
17																							
18																							
19																							
20																							
21																							
22																							
23																							
24																							
25																							
26																							
27																							
28																							
29																							
30																							
31																							
32																							
33																							
34																							
35																							
36																							
37																							
38																							
39																							
40																							
41																							
42																							
43																							
44																							
45																							
46																							
47																							
48																							
49																							
50																							
51																							
52																							
53																							
54																							
55																							
56																							
57																							
58																							
59																							
60																							
61																							
62																							
63																							
64																							
65																							
66																							
67																							
68																							
69																							
70																							
71																							
72																							
73																							
74																							
75																							
76																							
77																							
78																							
79																							
80																							
81																							
82																							
83																							
84																							
85																							
86																							
87																							
88																							
89																							
90																							
91																							
92																							
93																							
94																							

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
S-RES		<p>S-RES is activated in transition number 2, accelerating the HR process. The attractor is reached in 8 transitions.</p>
		<p>After being turned OFF, S-RES node is re activated in transition 10th. The attractor is reached in 12 transitions.</p>
		<p>S-RES is not activated; therefore, the DDR process is interrupted. The attractor is reached in 6 transitions where all the nodes are off except from DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, BRCA1/FANCS, MRN-CtIP and TIP60.</p>
		<p>S-RES is turned OFF after 1 transition, in consequence the DDR is disrupted. The attractor is reached in 7 transitions where all the nodes are OFF except for DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, TRIP13, BRCA1/FANCS and PARP1 are ON.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
EXO1		<p>EXO1 is activated before the S-RES is reached, inhibiting the DDR.</p> <p>The attractor is reached in the 4th transition where the DSB, ATM, yH2AX, NHEJ Core, H2AK15-H4K20, TRIP13, BRCA1/FANCS and EXO1 are ON.</p>
		<p>EXO1 node is activated a transition later (7th), delaying the repair process.</p> <p>The attractor is reached in 12 transitions.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
L-RES		<p>L-RES node is activated prematurely, before the S-RES is achieved, leading to RAD52 and SSA activation.</p> <p>The attractor is everything OFF but SSA and is reached in 6 interactions.</p>
		<p>L-RES node is not turned OFF.</p> <p>The attractor is reached in 10 transitions where everything is OFF but yH2AX, L-RES and HR nodes.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
HR	<p>Heatmap showing node activity over 15 transitions for HR perturbation. Nodes are active (colored) from transition 1 to 4. HR node is active from transition 2 to 4. The attractor is reached at transition 4.</p>	HR node is activated in the 2 nd transition before the DDR is established. The attractor is reached in the 4 th transition where HR is the only node active.
	<p>Heatmap showing node activity over 15 transitions for HR perturbation. Nodes are active from transition 1 to 10. HR node is active from transition 2 to 10. The attractor is reached at transition 10.</p>	The attractor is reached in 10 transitions.
	<p>Heatmap showing node activity over 15 transitions for HR perturbation. Nodes are active from transition 1 to 10. HR node is active from transition 2 to 10. L-RES node is turned OFF at transition 9. The attractor is reached at transition 10.</p>	L-RES node is turned OFF a transition earlier (9 th). HR node is activated in transition number 8. The attractor is reached in 10 transitions.

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
PARP1	<p>Heatmap showing node activity over 15 transitions for PARP1 perturbation. Nodes are active from transition 1 to 12. PARP1 node is re-activated at transition 12. The attractor is reached at transition 12.</p>	PARP1 is re activated in transition number 12. The attractor is reached in 12 th transitions where all the nodes are turned OFF but DSB, HR and PARP1 nodes.

	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							
12																							
13																							
14																							
15																							
16																							
17																							
18																							
19																							
20																							
21																							
22																							
23																							
24																							
25																							
26																							
27																							
28																							
29																							
30																							

PARP1 is re activated in transition number 11. The attractor is reached in 12th transitions.

Perturbated node	Trajectory																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
POLQ	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>15</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>16</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>17</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>18</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>19</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>20</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>21</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>22</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>23</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>24</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>25</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>26</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>27</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>28</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>29</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>30</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>Difference with the non-perturbated trajectory. POLQ node is activated from transition 2 to 5 and is reactivated in transition 12. PARP1 is activated from transition 7 to 10. The attractor is reached in 12 transitions where the only nodes active are DSB, HR and POLQ.</p>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								11																								12																								13																								14																								15																								16																								17																								18																								19																								20																								21																								22																								23																								24																								25																								26																								27																								28																								29																								30																								<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DSB</th> <th>ATM</th> <th>yH2AX</th> <th>NHEJ Core</th> <th>H2AK15_H4K20</th> <th>53BP1</th> <th>SHLD</th> <th>c_NHEJ</th> <th>TRIP13</th> <th>BRCA1/ FANCS</th> <th>MRN_ CtIP</th> <th>TIP60</th> <th>S-RES</th> <th>EXO1</th> <th>L-RES</th> <th>RAD51</th> <th>HR</th> <th>PARP1</th> <th>POLQ</th> <th>MMEJ</th> <th>MMEJ</th> <th>RAD52</th> <th>SSA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>15</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>16</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>17</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>18</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>19</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>20</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>21</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>22</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>23</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>24</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>25</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>26</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>27</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>28</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>29</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>30</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>POLQ is activated before RAD51 node, favoring MMEJ pathway. The attractor is reached in 10 transitions, where all the nodes are OFF except from DSB and MMEJ nodes.</p>		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA	1																								2																								3																								4																								5																								6																								7																								8																								9																								10																								11																								12																								13																								14																								15																								16																								17																								18																								19																								20																								21																								22																								23																								24																								25																								26																								27																								28																								29																								30																							
		DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
13																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
19																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
21																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
22																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
23																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
24																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
25																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
26																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
27																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
28																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
29																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
30																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	DSB	ATM	yH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_ CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
13																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
19																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
21																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
22																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
23																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
24																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
25																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
26																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
27																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
28																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
29																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
30																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
MMEJ		<p>Difference with the non-perturbated trajectory.</p> <p>MMEJ node is activated in the 2nd transition. The attractor is reached in 4 transitions, where everything is OFF but DSB and MMEJ nodes.</p>
		<p>MMEJ node is activated earlier in the 8th transition. The attractor is reached in 10 transitions, where everything is OFF but MMEJ node.</p>
		<p>MMEJ node is activated in transition number 10, simultaneously with HR node. The attractor is reached in 10 transitions where DSB, yH2AX, HR and MMEJ nodes are ON, while the rest are OFF.</p>

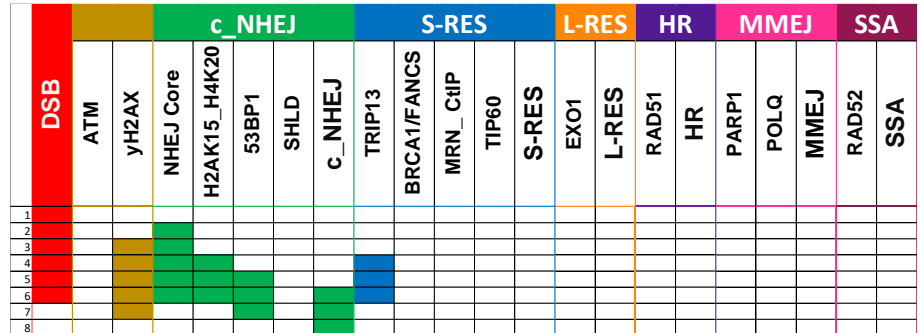
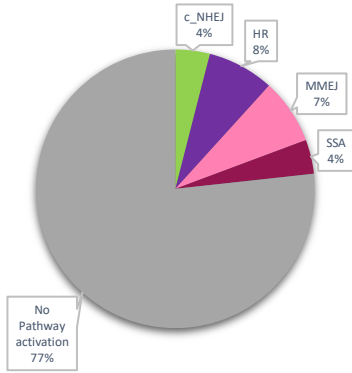
Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
RAD52		<p>Difference with the non-perturbated trajectory.</p> <p>RAD52 is activated since 2nd till 8th transition, inhibiting RAD51. The attractor is reached in 10 transitions, where all the nodes are OFF except from DSB and SSA nodes.</p>

Perturbated node	Trajectory	Difference with the non-perturbated trajectory.
		<p>SSA is activated in the 2nd transition, before the DDR is established.</p> <p>The attractor is reached in 4 transitions, where all the nodes are OFF but DSB and SSA nodes.</p>
SSA		<p>SSA is activated in transition 9th, simultaneously with RAD52 node, inhibiting HR pathway.</p> <p>The attractor is reached in 12 transitions, where all the nodes are OFF but DSB, ATM, NHEJ Core, TRIP13 and PARP1 nodes.</p>
		<p>SSA is activated in transition 10th, simultaneously with HR node.</p> <p>The attractor is reached in 10 transitions, where all the nodes are OFF except for DSB, yH2AX, HR and SSA nodes.</p>

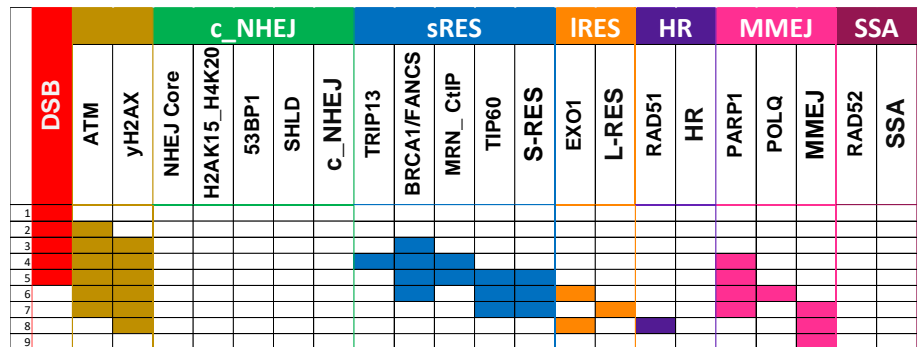
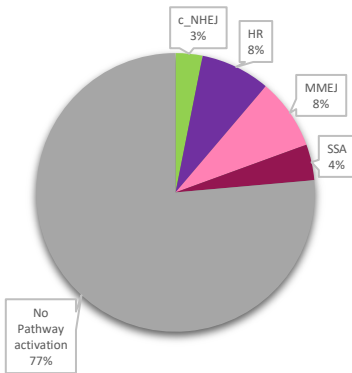
Supplementary Figure S3. DSB pulse simulations. Basins of attractions and Trajectory analysis, with a DSB pulse (DSB start on 1), from the single mutant simulations are shown. The node inactivated is specified under the pie graph.

Basin of attraction

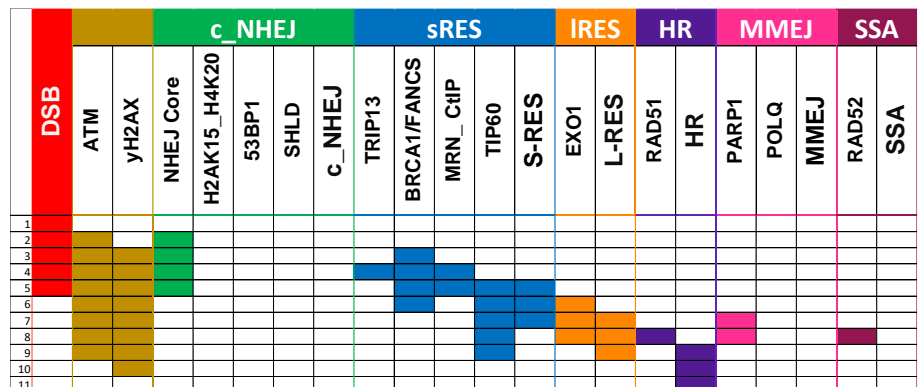
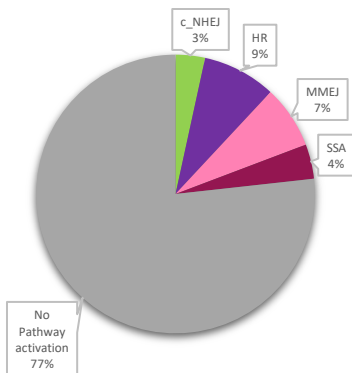
Trajectory analysis



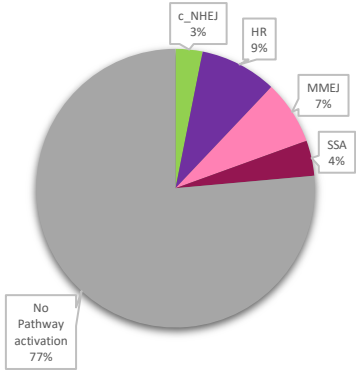
ATM null mutant



NHEJ Core null mutant

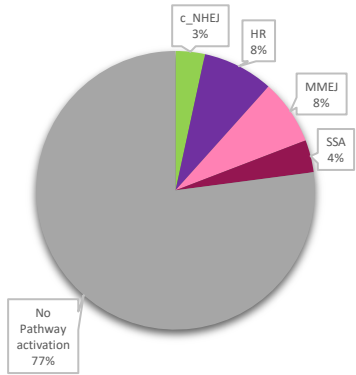


H2AK15-H4K20 null mutant



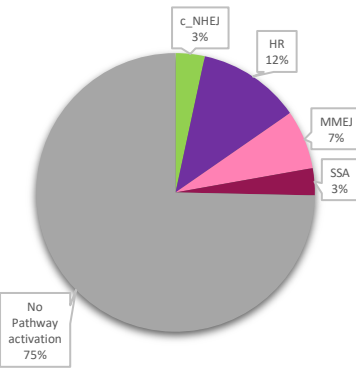
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						

53BP1 null mutant



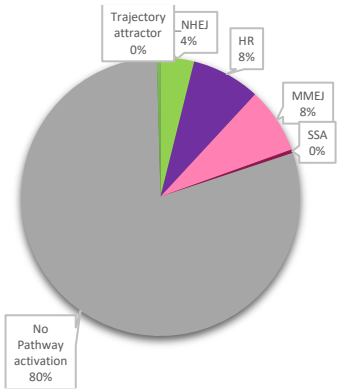
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						

SHLD null mutant



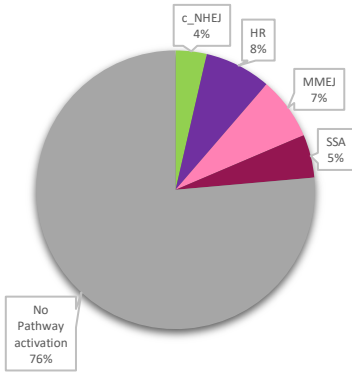
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						

TRIP13 null mutant



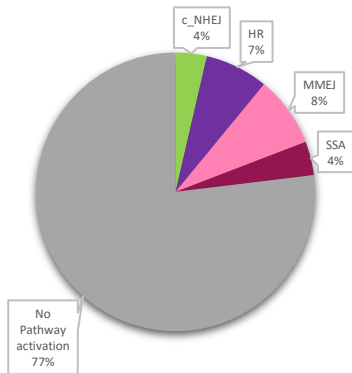
	DSB	c_NHEJ					S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA							
		ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																						
2																						
3																						
4																						

MRN-CtIP null mutant



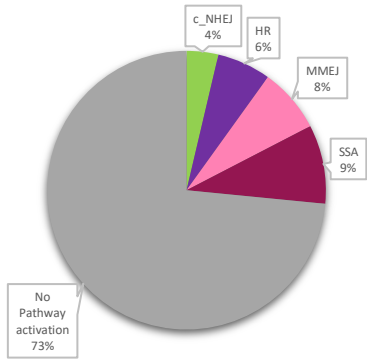
	DSB	DDR	c_NHEJ					S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA						
		ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						

TIP60 null mutant



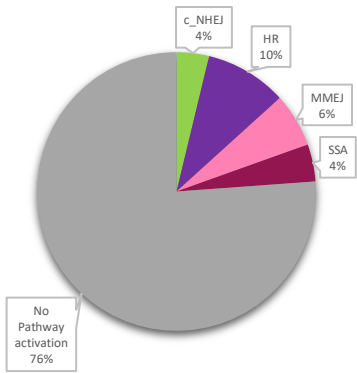
	DSB	ATM	YH2AX	c_NHEJ					S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA					
		YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						

EXO1 null mutant



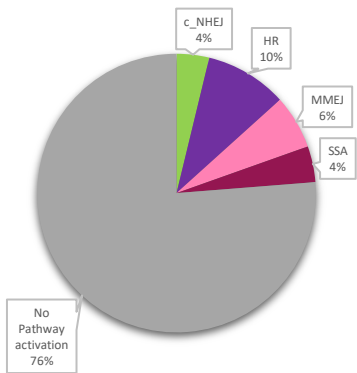
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							

RAD51 null mutant



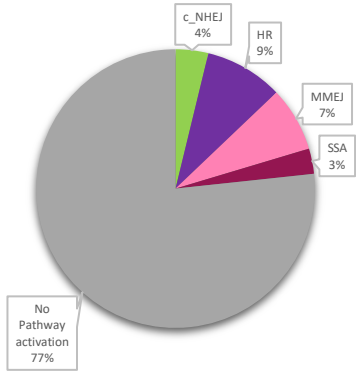
	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							

PARP1 null mutant



	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA	
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							
9																							
10																							
11																							

POLQ null mutant

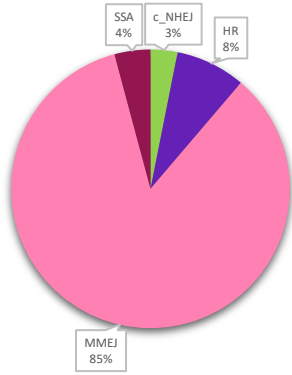


	DSB	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/ FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	MMEJ	RAD52	SSA	SSA
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
11																								

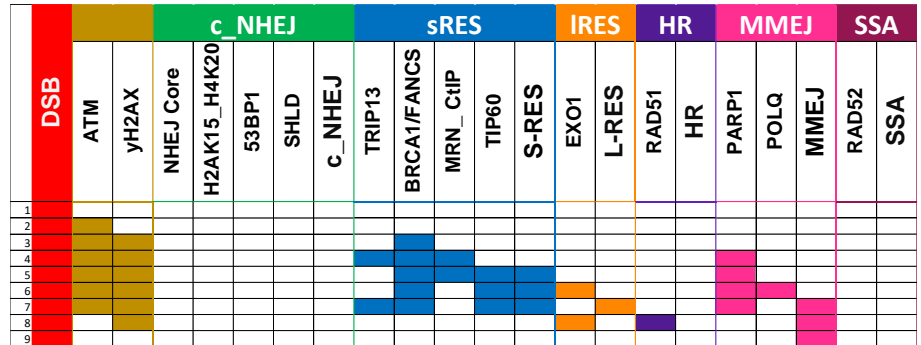
RAD52 null mutant

Supplementary Figure S4. DSB continuous damage. Basins of attractions and Trajectory analysis, under continuous damage (DSB fixed to 1), from the single mutant simulations are shown. The node inactivated is specified under the pie graph.

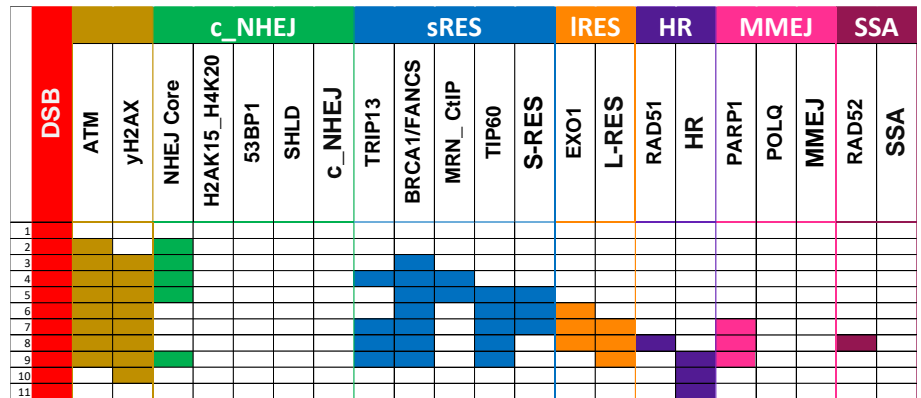
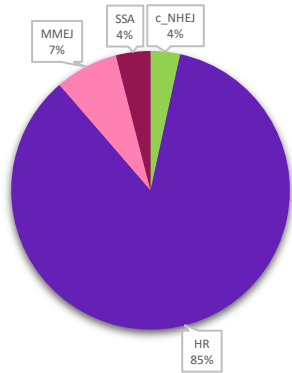
Basin of attraction



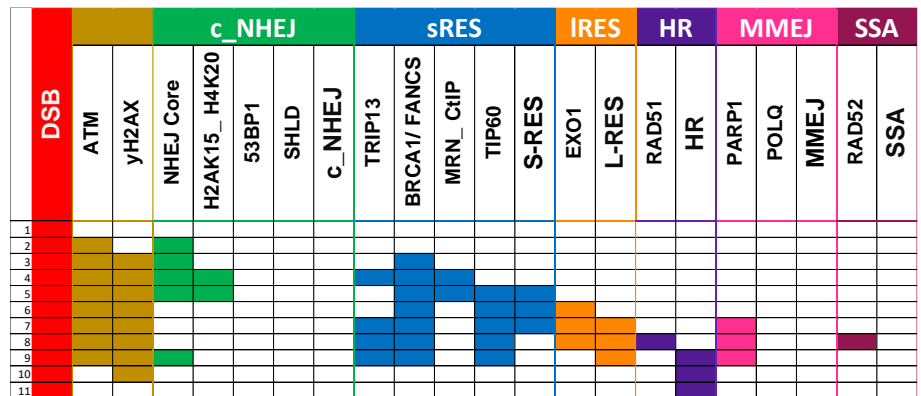
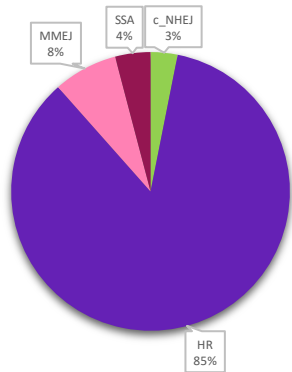
Trajectory analysis



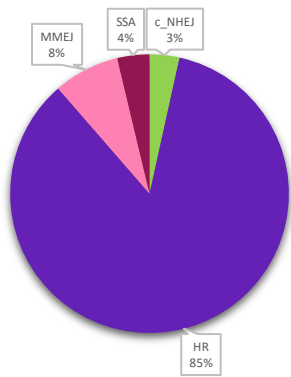
NHEJ Core null mutant



H2AK15-H4K20 null mutant

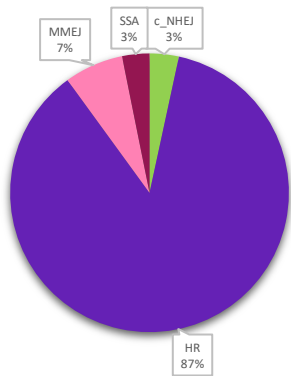


53BP1 null mutant



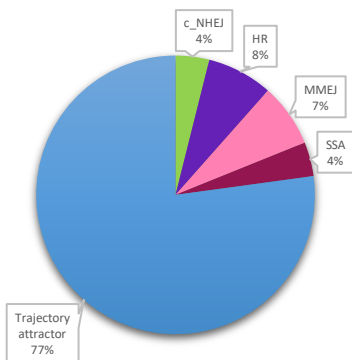
	DSB		c NHEJ				sRES				IRES	HR	MMEJ		SSA						
	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

SHLD null mutant



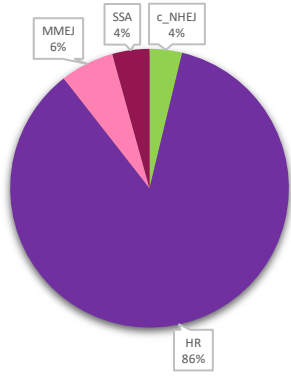
	DSB		c NHEJ				sRES				IRES	HR	MMEJ		SSA						
	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

TRIP13 null mutant



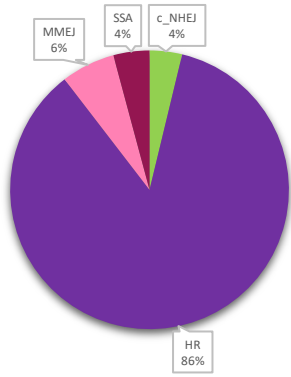
	DSB		c NHEJ				S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA						
	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					

MRN-CtIP null mutant



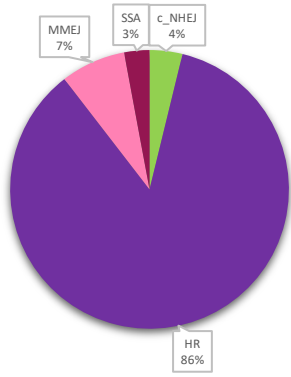
	DSB		c_NHEJ					S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA					
	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

PARP1 null mutant



	DSB		c_NHEJ					S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA					
	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

POLQ null mutant



	DSB		c_NHEJ					S-RES				L-RES	HR	MMEJ		SSA					
	ATM	YH2AX	NHEJ Core	H2AK15_H4K20	53BP1	SHLD	c_NHEJ	TRIP13	BRCA1/FANCS	MRN_CtIP	TIP60	S-RES	EXO1	L-RES	RAD51	HR	PARP1	POLQ	MMEJ	RAD52	SSA
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					

RAD52 null mutant