

Reconstrucción Modelamiento Y Caracterización De La Red De Regulación De Plk1, Involucrada En El Proceso De Inestabilidad Genómica

J. Suescum Holguín^{1,2}, M. Quimbaya Gómez^{3,4}, D. Clavijo Buriticá^{5,6}

¹ estudiante de pregrado en Biología, Pontificia Universidad Javeriana. ³ codirector del trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana. ⁵ directora del trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana

² jason5h@javerianacali.edu.co, ⁴ maquimbaya@javerianacali.edu.co ⁶ diana.clavijo@javerianacali.edu.co, ⁶

Resumen

La inestabilidad genómica describe una tendencia a acumular alteraciones en el genoma que es comúnmente encontrada en las células cancerígenas, razón por la cual, fue reconocida como una de las diez marcas distintivas del Cáncer, promoviendo su aparición y desarrollo. Recientemente las dinámicas detrás de los eventos de inestabilidad genómica han cobrado relevancia gracias a su vinculación con genes y mecanismos celulares específicos, los cuales se presentan como nuevas y potentes alternativas terapéuticas para la enfermedad. En este contexto, estudios anteriores encontraron al gen *plk1* como un candidato a inestabilidad genómica, sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el gen y su desregulación podrían inducir eventos de inestabilidad genómica no estaban del todo claros. Con el objetivo de dilucidar los mecanismos, circuitos génicos y proteínas involucradas en los eventos de inestabilidad genómica promovidos por PLK1 se adoptó una aproximación novedosa que involucra la reconstrucción y el modelamiento de la red de regulación del gen *plk1* con un énfasis en nueve procesos involucrados en el mantenimiento de la estabilidad del genoma en los que participa el gen. Posteriormente se realizó un modelamiento matemático de la red de regulación bajo una aproximación cinética de ley de acción de masas para generar un modelo con 1030 reacciones y 716 especies biológicas. Las simulaciones permitieron identificar tres circuitos de interacción entre proteínas que pueden potencialmente inducir un evento de inestabilidad genómica como producto de la desregulación de PLK1. Adicionalmente, se identificaron una serie de proteínas previamente asociadas a inestabilidad genómica dentro de los circuitos propuestos que pueden amplificar el evento de inestabilidad genómica y como novedad se postula a las proteínas KIF2C e INCENP como candidatas a participar en el proceso de inestabilidad genómica.

Introducción

Para responder al desconocimiento en torno a las dinámicas celulares, circuitos genéticos y genes asociados a la participación del gen *plk1* en el evento de inestabilidad genómica se realizó la

reconstrucción y modelamiento de la red de regulación del gen *plk1* en base a nueve procesos biológicos relevantes para la inestabilidad genómica. Los procesos biológicos fueron extraídos y curados de la literatura usando la herramienta de ELSEVIER PathwayStudio y literatura complementaria. Para la construcción y el modelamiento se usó la plataforma de construcción y simulación de redes biológicas CellDesigner, con el objetivo de identificar, mediante diferentes escenarios de simulación, las dinámicas, genes y circuitos relevantes para explicar la participación de Plk1 en inestabilidad genómica.

Fundamentación Teórica

La inestabilidad genómica se define como un incremento en la tendencia de adquirir mutaciones o que se generen alteraciones en el genoma y de la información allí contenida ^{1,2} y es comúnmente relacionada con la aparición de enfermedades en humanos, inviabilidad embrionaria y transformaciones malignas de las células en tumores o cáncer ^{3,4}. El rango de modificaciones o alteraciones en el genoma que ocurren por eventos de inestabilidad pueden ir desde sustituciones de nucleótidos en la cadena de ADN, también llamada inestabilidad de microsatélites, a una segregación anormal o modificación estructural de los cromosomas, conocida como inestabilidad cromosómica ⁵.

La inestabilidad genómica ha sido reconocida como un fenómeno estrechamente vinculado a la evolución del cáncer, presente en la mayoría de células cancerosas humanas, comúnmente en su forma de inestabilidad cromosómica ⁶. Con el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación y el aumento en los análisis de grandes conjuntos de datos fue posible por medio de perfiles de expresión diferencial, entre tejidos sanos y cancerígenos, identificar genes que se encuentran desregulados en el cáncer. Sumado a lo anterior, la nueva información de los genes y todo el esfuerzo de caracterización funcional acumulado a través de los años, se consiguieron crear listas de genes asociados al proceso de inestabilidad genómica y a otras de las marcas distintivas del cáncer (Carter et al., 2006; Hanahan & Weinberg, 2011; Pfau & Amon, 2012, D. Zhang et al., 2020). Entre los genes identificados bajo este enfoque se encuentra *plk1* (por sus siglas en inglés: Polo-Like Kinase 1), que codifica para una quinasa con múltiples roles a lo largo del ciclo celular y es esencial para una correcta segregación de los cromosomas, además su desregulación se correlaciona con eventos de carcinogénesis ¹¹

Los modelos biológicos generados desde la biología de sistemas, para representar los sistemas biológicos mediante modelos matemáticos, también se nutren de la abundancia de información. Gran parte de los modelos biológicos publicados han sido desarrollados a partir de organismos muy estudiados como las bacterias (Tindall et al., 2008), las levaduras (Alberghina et al., 2009; Verghese et al., 2012), y algunos animales modelo como *Xenopus sp.* ¹⁵. Los modelos en mamíferos han ganado representatividad en los últimos años, gracias a la publicación de algunos muy completos del ciclo celular, permitiendo incluso, el desarrollo de lineamientos para su construcción (Abroudi et al., 2017; Gauthier & Pohl, 2011). Actualmente no existen modelos que intenten abordar el evento de inestabilidad genómica desde el entendimiento de la red de regulación de genes importantes, que hayan sido previamente vinculados a este proceso.

Resultados

Usando la herramienta PathwayStudio para extraer de la literatura disponible en SCOPUS las interacciones y procesos biológicos en los que participa PLK1, se consiguieron identificar nueve procesos biológicos en los que participa PLK1 y tienen relación con el evento de inestabilidad genómica, los cuales comprenden un total de 568 interacciones proteína-proteína debidamente curadas. Entre los nueve procesos, se encuentran dos vías de señalización en cáncer en base a FOXM1, eventos de transición entre fases (puntos de control del ciclo celular) y eventos mitóticos estrechamente vinculados con la maquinaria que posibilita una correcta segregación de los cromosomas y el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (tabla 1). También se identificaron las proteínas que participaban en el mayor número de interacciones, donde CDK1 fue la primera, PLK1 la segunda y Cohesina la tercera.

Tabla 1. Lista de procesos biológicos considerados para la reconstrucción de la red de regulación e interacción del gen *plk1*

Categoría	Proceso biológico	Número de especies biológicas/interacciones
Enfermedades	Señalización de FOXM1 en el cáncer de próstata	13/17
Procesos celulares	Transición de fase G2/M	47/65
Procesos celulares	Transición metafase/anafase	15/22
Procesos celulares	Condensación de los cromosomas	21/36
Procesos patológicos	Promoción de la progresión del ciclo celular en cáncer por el complejo DREAM y FOXM1/MYBL2	36/56
Procesos celulares	Cohesión de las cromátidas hermanas	27/41
Procesos celulares	Ensamblaje del huso	29/45
Procesos celulares	Ensamblaje de los cinetocoros	48/73
Procesos celulares	Resumen del ciclo celular	140/213

Los nueve procesos biológicos fueron integrados en forma de red de interacción y regulación usando la plataforma de construcción y simulación de redes biológicas, CellDesigner. Posterior al traspaso de las interacciones proteína-proteína curadas de los nueve procesos, se extendió la red para incluir también el proceso de transferencia de la información genética, la transcripción y traducción, así como los eventos de degradación de los componentes proteicos. La red reconstruida está compuesta por 1030 reacciones y 716 especies biológicas (185-genes, 185-ARNm, 247-proteínas, 70-complejos proteicos, 1-molécula simple y 28-procesos biológicos). Dentro de los 185 genes considerados para la reconstrucción, 62 de ellos habían sido previamente vinculados con inestabilidad genómica, y fueron puntos clave para explicar cómo Plk1 media los eventos de inestabilidad.

Para el modelamiento matemático se adoptó una aproximación determinística bajo una cinética elemental por ley de acción de masas. Los parámetros cinéticos necesarios para el modelamiento fueron directamente buscados y asignados de los reportes en la literatura. El modelo final para la

red de regulación e interacción del gen *plk1* está compuesta por 1030 reacciones y un sistema de 716 ecuaciones diferenciales que describen la tasa de cambio en la concentración para cada una de las especies. El modelo se inicializo, dándole a todos los genes una concentración inicial de 1,0 μM (figura 1), donde se observó que el sistema alcanzaba el estado de equilibrio en el intervalo 85 (equivalente a un ciclo celular completo de 24 horas) y posteriores escenarios de simulación demostraron su capacidad de autorregularse en respuesta a perturbaciones en las concentraciones de las moléculas más relevantes del modelo (CDK1, PLK1, Cohesina).

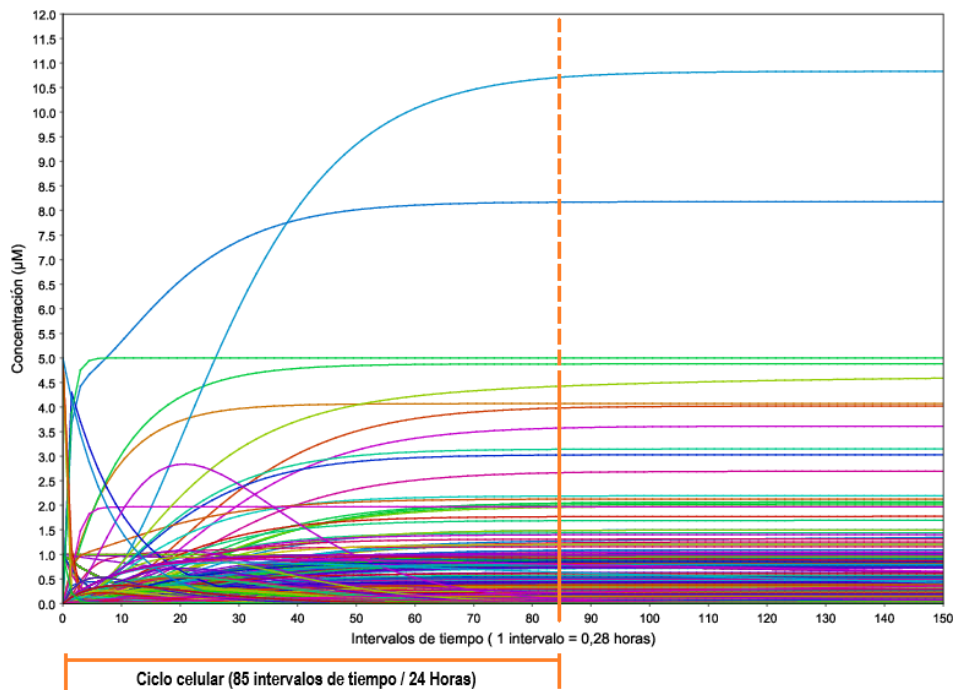


Figura 1. Simulación completa de la red de regulación e interacción de *plk1*. La línea naranja corta la gráfica en el intervalo de tiempo 85 y marca el fin del ciclo celular, así como la llegada del modelo a un estado de equilibrio

Para evaluar las dinámicas detrás de los eventos de inestabilidad genómica mediados por *plk1* se diseñó un escenario de simulación donde se aumentó la concentración del gen, debido a que *Plk1* es un conocido oncogén que se reporta sobre expresado en cáncer. El aumento en la concentración de *plk1* afectó a una gran variedad de proteínas dentro del modelo, expresado como variaciones en la curva de concentración de estas especies. Entre las proteínas que se vieron afectadas por el aumento de *Plk1* se encontraron seis (*BUB1B*, *BUB3*, *CENPE*, *CDCA8*, *ESPL1* y *AURKB*) que tenían una vinculación previa con eventos de inestabilidad genómica y fueron la base para proponer una serie de tres circuitos que describen como *Plk1* podría afectar a estas proteínas y promover el desarrollo o aparición de un evento de inestabilidad genómica.

Los circuitos en cuestión corresponden a la “vía de regulación de *AURKB* y el complejo pasajero cromosómico” para el caso del primer circuito, “la transición a anafase y la actividad de *ESPL1* (separasa)” para el segundo, y finalmente “la unión de los microtúbulos a los cromosomas, junto con la regulación del punto de control mitótico” para el tercero. Los tres circuitos contienen importantes proteínas y complejos para mantener la estabilidad del genoma que son regulados por

Plk1 y están categorizados como esenciales para el correcto funcionamiento y progresión de la mitosis.

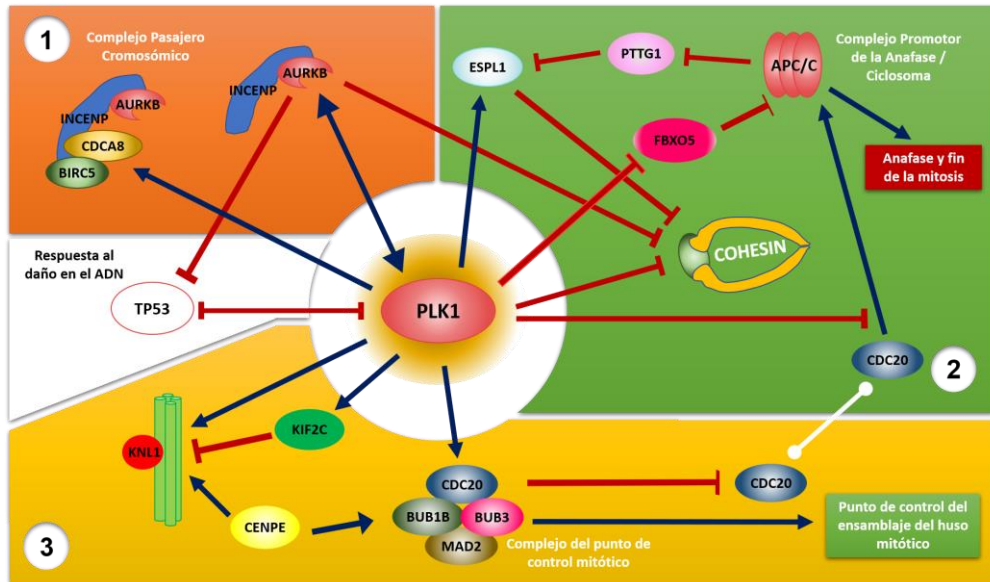


Figura 2. Circuitos propuestos para explicar el evento de inestabilidad genómica mediado por Plk1

Discusión y conclusiones

La participación de plk1 en el evento de inestabilidad genómica tiene asociada una diversidad de mecanismos que pueden aportar elementos para explicar el comportamiento novedoso como supresor tumoral del gen. Es necesario hacer estudios más profundos y evaluaciones in vitro de los resultados y circuitos aquí propuestos que permitan aumentar la capacidad predictiva del modelo.

Los eventos de inestabilidad genómica mediados por Plk1 aparentan ser exclusivos de la mitosis, mientras que los eventos de carcinogénesis tradicionales en los que participa el gen son exclusivos del ciclo celular no-mitótico. El modelo aquí propuesto consiguió capturar esta dinámica, expresada en la afectación en su mayoría de proteínas exclusivas de la mitosis durante las simulaciones. En adición a las proteínas previamente vinculadas con inestabilidad genómica identificadas, se postula a las proteínas KIF2C e INCENP como potencialmente asociadas a este evento, basándose en su participación dentro de los circuitos propuestos y anteriores reportes

Finalmente, la metodología de construcción y modelamiento utilizadas en este trabajo presenta una estrategia para integrar grandes cantidades de información biológica en forma de redes de interacción, o modelos, que permitan evaluar dinámicas celulares de interés.

Referencias

Langie, S. A. S. *et al.* Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis* **36**, S61–S88 (2015).

Yao, Y. & Dai, W. Genomic Instability and Cancer. *J. Carcinog. Mutagen.* **5**, (2014).

- Loeb, L. A., Springgate, C. F. & Battula, N. Errors in DNA Replication as a Basis of Malignant Changes. *Cancer Res.* **34**, (1974).
- Breivik, J. & Gaudernack, G. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 245–254 (1999).
- Aguilera, A. & Gómez-González, B. Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 204–217 (2008).
- Bakhom, S. F. & Cantley, L. C. The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. *Cell* **174**, 1347 (2018).
- Zhang, D. *et al.* CHG: A Systematically Integrated Database of Cancer Hallmark Genes. *Front. Genet.* **11**, (2020).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
- Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N. & Szallasi, Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* **38**, 1043–1048 (2006).
- Pfau, S. J. & Amon, A. Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO Rep.* **13**, 515 (2012).
- de Cárcer, G. *et al.* Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development. *Nat. Commun.* **2018** *9*, 1–14 (2018).
- Tindall, M., Porter, S., Maini, P., Gaglia, G. & Armitage, J. Overview of mathematical approaches used to model bacterial chemotaxis I: the single cell. *Bull. Math. Biol.* **70**, 1525–1569 (2008).
- Alberghina, L., Coccetti, P. & Orlandi, I. Systems biology of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*: From network mining to system-level properties. *Biotechnol. Adv.* **27**, 960–978 (2009).
- Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y. & Morano, K. A. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 115 (2012).
- Marlovits, G., Tyson, C. J., Novak, B. & Tyson, J. J. *Modeling M-phase control in Xenopus oocyte extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA.* (1998).
- Gauthier, J. H. & Pohl, P. I. A general framework for modeling growth and division of mammalian cells. *BMC Syst. Biol.* **5**, 3 (2011).
- Abroudi, A., Samarasinghe, S. & Kulasiri, D. A comprehensive complex systems approach to the study and analysis of mammalian cell cycle control system in the presence of DNA damage stress. *J. Theor. Biol.* **429**, 204–228 (2017).