



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**REVISITANDO EL MODELO DE RED DE REGULACIÓN  
GENÉTICA QUE SUBYACE LA DETERMINACIÓN DE  
LOS ÓRGANOS FLORALES DE *Arabidopsis thaliana***

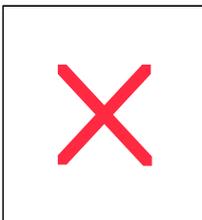
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**YARA ELENA SÁNCHEZ CORRALES**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del Jurado

Formato	
1. Datos del alumno	Sánchez Corrales Yara Elena 59703595 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 405048232
2. Datos del tutor	Dra Ma.Elena Alvarez-Buylla Roces
3. Datos del sinodal 1	Dr Pablo Padilla Longoria
4. Datos del sinodal 2	León Patricio Martínez Castilla
5. Datos del sinodal 3	Berenice García Ponce de León
6. Datos del sinodal 4	Luis Antonio Mendoza Sierra
7. Datos del trabajo escrito	Revisitando el modelo de red de regulación genética que subyace la determinación de los órganos florales <i>Arabidopsis thaliana</i> 85 2009

Índice	Página
Introducción.....	4
<b>I. Redes para desenredar problemas de biología de desarrollo</b>	
1.1 Los modelos de redes de regulación genética: una aproximación sistémica a problemas de biología del desarrollo.....	7
1.2 Enfoques top-down.....	10
1.3 Enfoques bottom-up.....	12
1.4 Modelos de redes dinámicos.....	12
1.4.1 Modelos de redes discretos y continuos.....	13
1.4.2 Modelos de redes determinísticas y estocásticas.....	15
1.4.3 Actualización sincrónicas y asincrónicas.....	16
<b>II. Revisitando el Modelo de Red de Regulación Genética para la especificación de los primordios de los órganos florales en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b>	
2.1 Cómo construir un modelo de RRG de este tipo.....	19
2.2 Justificación y actualización de las Reglas Lógicas para la Red de Regulación Genética de acuerdo a Espinosa-Soto, et al., (2004).....	20
2.3 Versión booleana del modelo de RRG revisado.....	53
2.4. Relevancia de las nuevas interacciones propuestas.....	55
2.5 Resultados.....	58
2.5.1 Simulación de mutantes.....	57
2.6 Contraste de los resultados obtenidos con un enfoque booleano y con un enfoque continuo.....	60

2.7	Discusión y perspectivas.....	62
<b>III. Reflexiones finales</b>		
3.1	La importancia y la utilidad de los modelos matemáticos.....	67
3.2	Sobre los diferentes enfoques.....	68
3.3	Redes para contestar preguntas evolutivas.....	69
<b>Fuentes de consulta.....</b>		<b>75</b>
<b>Apéndices</b>		
A1.	Reglas lógicas para la RRG actualizada.....	81
A2.	Tabla de interacciones relevantes en la RRG revisitada.....	82

## Introducción

Desde hace algunos años, se ha acumulado una gran cantidad de información relevante sobre diversos procesos biológicos. A la par ha surgido la necesidad de combinar e integrar esta información mediante enfoques multidisciplinarios, que permitan tomar en cuenta la acción concertada de los factores que forman parte de algún proceso biológico. Así como la emergencia de nuevas propiedades, resultado de este comportamiento colectivo de los elementos implicados.

Así, ha surgido la llamada “biología sistémica” o “biología de sistemas” y con ella se han ido desarrollando y cobrando cada vez mayor importancia herramientas cuantitativas e integrativas, tales como representaciones matemáticas y computacionales (Ventura, 2006; Albert, 2007). Como ejemplo de estos enfoques se encuentran los modelos de redes de regulación genética que han demostrado ser una excelente aproximación para entender procesos del desarrollo (Álvarez-Buylla et al., 2007).

Al respecto, existen varios enfoques encaminados a inferir y modelar dinámicamente redes de regulación genética relevantes en el desarrollo. A grandes rasgos pueden distinguirse dos enfoques. Uno de ellos usa los datos obtenidos con técnicas de genómica funcional para identificar posibles nodos y las relaciones entre ellos conocidos como enfoques “top-down”. La otra aproximación, el enfoque “bottom-up”, incluye el uso de información detallada de las interacciones de un determinado módulo obtenida experimentalmente para plantear modelos de redes dinámicas (por ejemplo, veáse en capítulo 2 un ejemplo para la especificación de los órganos florales y la inflorescencia en las primeras etapas de desarrollo en *Arabidopsis thaliana*). Además, pueden distinguirse los enfoques continuos y discretos, o los determinísticos y estocásticos.

En el presente trabajo, se revisa y actualiza el modelo de red de regulación genética que subyace la diferenciación temprana de células del meristemo de inflorescencia, o de primordios de sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Mendoza y Alvarez-Buylla 1998; Mendoza et al., 2000; Espinosa-Soto et al., 2004; Chaos et al., 2006).

Finalmente, se discute la importancia y utilidad de los modelos de redes de regulación genética. Además, se presentan perspectivas de este enfoque, elucubrando sobre su posible extensión hacia preguntas evolutivas y de morfogénesis.



## 1. Redes para desenredar problemas de biología de desarrollo

*En este capítulo se introduce a los modelos de redes de regulación genética como una herramienta para estudiar módulos en biología del desarrollo. Además, se presentan los diferentes enfoques que se han utilizado para su elaboración y las diferentes implementaciones en las que pueden presentarse (continuos, discretos, determinísticos y estocásticos).*

“Every object that biology studies is a system of systems.” Francois Jacob (1974).

## **1.1 Los modelos de redes de regulación genética: una aproximación sistémica a problemas de biología del desarrollo.**

Desde hace algunos años se ha acumulado una enorme cantidad de datos de los componentes moleculares de redes de regulación genética (RRG) y de sus interacciones provenientes de enfoques de genética, biología molecular, bioquímica y genómica funcional.

Por otro lado aunque el enfoque predominante en biología del siglo XX ha sido reducir un fenómeno biológico al comportamiento de sus moléculas (Hartwell et al., 1999) y a pesar de que este enfoque ha sido bastante exitoso, también es cierto que muchas funciones biológicas emergen de la interacción de sus componentes y por lo tanto, no pueden ser abordadas estudiando solo las propiedades de componentes aislados.

Es por ello que ha surgido la necesidad de combinar e integrar esta información mediante enfoques multidisciplinarios que permitan tomar en cuenta la acción concertada de los factores que forman parte de algún proceso biológico y la emergencia de nuevas propiedades resultado de este comportamiento colectivo. Así, han recobrado importancia los enfoques globales en forma de la llamada biología de sistemas, que esta permeando en muchas áreas de la biología incluido el estudio del desarrollo.

Además, es evidente que dada la complejidad espacial y temporal de las interacciones involucradas durante el desarrollo de un organismo, los modelos esquemáticos no son suficientes para entenderlos y entonces se necesita de enfoques holísticos para abordar el desarrollo en términos del conjunto de interacciones entre reguladores. De esta manera, herramientas cuantitativas e integrativas tales como representaciones matemáticas y computacionales han cobrado gran importancia (Ventura, 2006; Albert, 2007). Es aquí donde aparecen los modelos de redes de regulación genética que sin duda han demostrado ser una excelente aproximación para entender procesos del desarrollo (Álvarez-Buylla et al., 2007).

Sin embargo, aunque los primeros modelos de redes de regulación genética (RRG) relacionados con diferenciación celular fueron propuestos en los 60's (Jacob y Monod, 1961; Kauffman, 1969) solo hasta hace relativamente poco tiempo este tipo de enfoque ha recobrado importancia. En estos modelos, los genes, mRNA o proteínas corresponden a los nodos de la red y las interacciones de activación e inhibición son

representadas con funciones lógicas y esquematizadas en esquemas (conocidos como grafos) con las líneas o bordes que unen tales nodos (Álvarez-Buylla et al., 2007). De la misma manera, recientemente la teoría de grafos se ha aplicado a problemas biológicos y se ha sugerido que los procesos celulares están determinados por un sistema de redes (Barabási y Oltvai, 2004).

También, se ha propuesto que gran parte de la actividad celular y del desarrollo de un organismo esta organizada en módulos (Hartwell et al., 1999; Segal et al, 2003; Solé y Valverde, 2006; ejemplos de módulos en Von Dassow et al., 2000 para animales y Espinosa-Soto et al., 2004 para plantas) y los modelos de RRG han mostrado ser una excelente aproximación para estudiar dichos módulos. Un módulo puede entenderse como la serie de genes corregulados que responden a diferentes condiciones y que constituyen unidades funcionales que subyacen procesos celulares (Segal et al, 2003), de manera prácticamente independiente de otros módulos. Así, los modelos de redes de regulación genética han sido exitosamente empleados para discernir la dinámica de los módulos que subyacen la diferenciación. Por ejemplo, en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, se identificó un módulo de regulación que subyace la diferenciación de las células primordiales de sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Mendoza y Alvarez-Buylla 1998; Mendoza et al. 2000) y más recientemente se demostró que dicho módulo es robusto a perturbaciones aleatorias de las reglas lógicas que se han podido especificar con base en datos experimentales (Espinosa-Soto, et al.,2004). Otro módulo bien estudiado en el mismo laboratorio y en otros, es el que subyace tras la subdiferenciación celular en epidermis de raíz y hoja (Savage et al., 2008; Benitez et al., 2008).

La identificación de tales módulos y como se relacionan entre ellos es crucial para el entendimiento de procesos de desarrollo y respuestas celulares a señales internas y externas.

De esta manera, los modelos de RRG han permitido estudios dinámicos de ensamblajes complejos de genes interconectados, proteínas y otras moléculas (Álvarez-Buylla, 2007), proveyendo explicaciones acerca de los mecanismos que subyacen tras los procesos de desarrollo (en el caso de la diferenciación temprana del meristemo apical en regiones que corresponden a inflorescencia y a órganos florales veáse capítulo 2, Espinosa-Soto et al., 2004 y Chaos et al., 2006), y también las respuestas celulares (como el estudio de la señalización por ABA en el cierre de estomas en Li et al., 2006).

Estos modelos han probado tener potencial explicativo y predictivo (como en el caso de la predicción de un asa de autorregulación para el gen AG en el modelo revisado en este trabajo, por mencionar solo un ejemplo).

Por otro lado, el análisis de la dinámica de las RRG que subyacen tras los procesos de diferenciación y respuesta celular representan una manera de entender como los mecanismos y procesos de desarrollo conectan la información genética con la variación fenotípica, proporcionando una herramienta para abordar un problema aún no resuelto: cómo es que la información genética se traduce en características observables, en otras palabras, cómo el genotipo puede explicar el fenotipo.

Además, el uso de los modelos de RRG también puede extenderse a estudios de evolución fenotípica. Por ejemplo, se ha sugerido que el desarrollo del plan corporal es controlado por redes complejas de regulación genética y por lo tanto aspectos importantes de la evolución de los planes corporales debe depender de los cambios en la arquitectura de las redes genéticas (Davidson y Edwin, 2006), y la no linealidad de las redes implica que cambios en algunos nodos pueden tener efectos grandes en el fenotipo, mientras que otros cambios pueden no alterar el fenotipo. Si bien es cierto que “nada en biología tiene sentido, si no es a la luz de la evolución” (Dobzhansky, 1973), conforme se acumula e integra la evidencia de los mecanismos de desarrollo a la evolución va quedando claro que “nada en evolución tiene sentido si no es a la luz del desarrollo”.

Con respecto a cómo se construyen los modelos de RRG, a grandes rasgos se pueden distinguir dos principales enfoques. Uno de ellos usa los datos obtenidos con técnicas de genómica funcional para identificar posibles nodos y las relaciones entre ellos (por ejemplo, la identificación de módulos referidos en Segal et al, 2003) conocidos como enfoques top-down. La otra aproximación, el enfoque bottom-up, incluye el uso de información detallada de las interacciones de un determinado módulo obtenida experimentalmente (por ejemplo el módulo revisado en este trabajo y el módulo del ciclo celular de levadura en Li et al, 2004). Estas aproximaciones han permitido el análisis de la estructura o topología de las redes de regulación genética, así como de la dinámica de las mismas.

## 1.2 Enfoques top-down.

Este tipo de enfoque usa datos de expresión gene/proteína obtenidos por estudios genómicos en distintas condiciones y a partir de sus patrones de correlaciones se infiere la estructura de las redes en las cuales participan los distintos componentes. Así, genes con perfiles de expresión estadísticamente similares en el tiempo o entre varias condiciones experimentales pueden ser relacionados usando algoritmos de agrupamiento (Wen et al., 1998; Tavazoie et al., 1999). De esta manera, grupos de genes que responden de una manera similar a diversas condiciones, pueden estar co-regulados (Qian et al., 2001) y entonces tienen una alta probabilidad de estar funcionalmente relacionados (Bansal et al., 2007). Pero una limitante fuerte de este método para inferir las arquitecturas de las redes es que aún cuando dos nodos pertenecen al mismo grupo pueden no estar relacionados causalmente.

Se pueden distinguir tres tipos de métodos para inferir la arquitectura de las redes a partir de datos de microarreglos: los Bayesianos, los de información mutua y los que utilizan ecuaciones diferenciales (Alvarez-Buylla et al., 2007).

Los métodos Bayesianos buscan encontrar una red dirigida describiendo las dependencias causales entre los componentes de un sistema mediante una distribución de probabilidad conjunta que estadísticamente apunta a estas relaciones (Albert, 2007). Para inferir una red genética con un método bayesiano, se debe encontrar la red que mejor describa los datos de expresión (Alvarez-Buylla et al. 2007). Esto es posible, al atribuir un valor que evalúa cada red obtenida con respecto a los datos de expresión y entonces, se busca heurísticamente la red que tenga el valor mayor. Este método se ha aplicado con éxito en varios casos, por ejemplo para inferir módulos funcionales en *Saccharomyces cerevisiae* (Segal et al., 2003). Una desventaja de este método es su limitación para encontrar ciclos o asas de retroalimentación (Kim et al., 2003; Basal et al., 2007). Esta limitación es superada con el uso de redes dinámicas bayesianas (Kim et al., 2003).

Otro posible enfoque para inferir redes a partir de datos de microarreglos es una generalización de la correlación entre dos variables, llamada información mutua. La información mutua de dos variables es un valor que mide la interdependencia entre estas variables. De esta manera la información mutua de dos variables es cero si éstas son estadísticamente independientes (Steuer, 2002). A cada par de genes se le asigna un valor de información mutua, 0 ó 1, dependiendo de un umbral dado (Bansal

et al., 2007). Este enfoque es útil cuando se tienen datos de microarreglos en diferentes condiciones (experimentos independientes) y no cuando se tienen series de tiempo (Bansal et al., 2007). La desventaja es que las redes inferidas con este algoritmo no son dirigidas, es decir, no es posible saber si los genes inciden sobre otros de manera positiva o negativa (Basso et al., 2005).

Al respecto, el algoritmo más usado para determinar la información mutua de una serie de datos de microarreglos se llama ARACNE (de las siglas en inglés “Algorithm for the Reconstruction of Accurate Cellular Networks”). Este algoritmo primero identifica la co-regulación estadísticamente significativa entre genes por información mutua, eliminando relaciones indirectas. Por lo tanto, las relaciones incluidas en la red reconstruida tienen una alta probabilidad de representar regulaciones directas. Este algoritmo fue usado con éxito para reconstruir la red genética que participa en la respuesta inmune mediada por células B humanas, donde el gen MYC desempeña un papel fundamental; las interacciones predichas en este trabajo fueron corroboradas experimentalmente (Basso et al., 2005).

El tercer método para inferir redes asume que las RRG se encuentran cerca de un estado estable y aproxima su dinámica por medio de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias lineales (Álvarez-Buylla et al., 2007). Con el método de descomposición de un solo valor, se construyen varias soluciones que son consistentes con los datos disponibles, y posteriormente se escoge aquella donde las interacciones sean más dispersas (Yeung et al., 2002). Este enfoque es determinístico y las interacciones entre genes representan interacciones causales. Sin embargo, no es eficiente para inferir redes pequeñas (Yeung et al., 2002).

Existen diversas opiniones con respecto a qué método es el más certero en la inferencia de la topología de la red, pero tal parece que lo más importante es la cantidad de datos disponible y a las condiciones en las que se obtiene el microarreglo (series de tiempo o estados estables) (Bansal et al., 2007).

Cabe mencionar, que además de los datos obtenidos a partir de microarreglos, otra manera de inferir la topología de RRG es a partir del análisis de promotores y secuencias reconocidas por factores de transcripción. Aunque el análisis de promotores genera muchos falsos positivos, se puede combinar con análisis de secuencias ortólogas y otros criterios funcionales (como el encontrarse en la misma

región que otros sitios) que acotan las posibles interacciones, dejando solo aquellas que con mayor probabilidad son funcionales (Turatsinze et al., 2008).

Este análisis permite encontrar relaciones que muy probablemente sean directas, con la desventaja de que no es posible inferir todas las interacciones. Por ejemplo, cuando el factor de transcripción funciona como multímero, y tal vez no tiene una secuencia de reconocimiento al promotor aunque sí represente una interacción funcional, esta interacción no se podrá encontrar con esta aproximación. Otra desventaja es que el nivel de detalle de la topología obtenido con este método está limitado a saber qué tipo de factor de transcripción se podría unir y no exactamente cuál de éstos se une.

### **1.3 Enfoques bottom-up.**

Este tipo de aproximación incluye el discernimiento de redes de regulación genética a partir de datos experimentales que corroboran la relación directa entre los nodos de la red, y muchas veces también proporcionan información de cómo se relacionan entre ellos (es decir, si la relación es de activación o de inhibición). Por este motivo, la topología de las RRG inferidas por este tipo de enfoque es muy certera. Sin embargo, este enfoque se puede usar solo para módulos bien caracterizados funcionalmente que suelen ser relativamente pequeños.

Con la topología resuelta, este enfoque también ha permitido el estudio dinámico de módulos funcionales sustentados con evidencia experimental (un ejemplo detallado en el capítulo 2). Así, modelos de RRG construidos con este método han descrito con éxito sistemas celulares específicos y procesos tales como la determinación temprana de los órganos florales (Mendoza y Álvarez-Buylla, 1998; Mendoza et al., 2000; Espinosa-Soto et al., 2004; Chaos et al., 2006), el ciclo celular de la levadura (Li et al., 2004), el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* (Von Dawsson et al., 2000) y el desarrollo del patrón espacial de tricomas en raíz y tallo (Benitez et al., 2008). Este es el enfoque que se ha privilegiado en el laboratorio en el que se realizó esta tesis y ha demostrado ser un enfoque útil para elucidar estos módulos.

### **1.4 Modelos de redes dinámicos**

Los modelos dinámicos de RRG van más allá de la representación esquemática de la red de interacciones que subyace un proceso celular. Estas representaciones son necesarias porque el mRNA, proteínas o metabolitos cambian con el tiempo (por

ejemplo, en la expresión, concentración o actividad) y en respuesta a estímulos externos o internos (Albert et al., 2007).

Según Assmann S.M. y Albert, R., (2009) los modelos de RRG dinámicos deben tener 1) la red de interacciones o topología 2) las funciones que describen como el estado de cada nodo depende del estado de sus reguladores (por ejemplo, la cinética de acción de masas para una reacción química o funciones de Hill, las reglas lógicas o tablas de verdad, series de tiempo de datos de microarreglo, etc.); 3) un estado inicial para cada nodo del sistema, excepto cuando se prueben exhaustivamente todos los estados iniciales.

Mediante este enfoque, se pueden recuperar los sumideros (o atractores) que corresponden a estados estables del sistema. Éstos pueden ser de punto fijo, si es un solo valor o también cíclicos, si el sistema oscila entre varios valores. Los sumideros de punto fijo se han interpretado como tipos celulares (Kauffman, 1993; Espinosa-Soto et al, 2004; Huang e Inber, 2007), y estados estables en transducción de señales (Tyson et al.,2003; Mendoza y Xenarios, 2006). Mientras que los sumideros cíclicos se han interpretado como ritmos circadianos (Goldbeter, 2002), o en transducción de señales como respuestas oscilatorias en la presencia de una señal dada (Tyson et al., 2003). Un ejemplo típico de este último caso es el de los sumideros de ciclo "2" para la red o módulo que subyace tras el ciclo circadiano. Otra propiedad que se puede obtener de estos estados es la cuenca de atracción, que corresponde al número de condiciones iniciales que convergen en un mismo sumidero (Kauffman, 1993).

Los modelos dinámicos pueden ser clasificados como continuos o discretos, y como determinísticos o estocásticos. La primera clasificación se refiere al nivel del detalle en la representación del estado del nodo (las funciones cinéticas en función de las entradas de un nodo), mientras el segundo indica si las reglas lógicas de actualización de los nodos incorporan alguna incertidumbre o variabilidad aleatoria. También pueden diferir en el esquema de actualización que utilizan, y ser sincrónicos o asincrónicos (Albert, 2007).

#### **1.4.1 Modelos de redes discretos y continuos.**

Para estudiar la dinámica de un sistema se han usado modelos discretos y continuos.

Dentro de los modelos de RRG discretos que se basan en ecuaciones en diferencia y los booleanos. Los más sencillos son los modelos booleanos, pues el estado de los componentes de la red puede ser solo de dos maneras, 0 si está apagado ó 1 si está prendido. Así, el estado de los nodos es descrito por una variable binaria (prendido/apagado), y el comportamiento dinámico de cada variable, esto es, si el nodo estará prendido o apagado al siguiente tiempo, está determinado por el estado de sus reguladores, a través de una función booleana o regla lógica. En el caso más simple, la regla lógica puede ser representada como un estado actuando vía una función lógica usando los operadores “NOT”, “AND” o “OR” (Albert et al., 2008). Los modelos discretos son ideales en casos donde los datos cuantitativos no son suficientes para establecer un modelo continuo.

Aunque este tipo de enfoque parece sobreesimplificado, abstracciones tales como estas pueden ser útiles para probar el flujo de información en una RRG. En efecto, en algunos casos se ha demostrado que la dinámica global depende más de la topología de la red en lugar de valores específicos de los parámetros. Por ejemplo, en el trabajo de Von Dassow y colaboradores (2000) se muestra que existe una gran cantidad de combinaciones de parámetros que recuperan el mismo comportamiento dinámico de la red de segmentación en *Drosophila melanogaster*. Por lo tanto, no solo existe un amplio rango de combinaciones de parámetros sino que muchas soluciones son altamente robustas a variaciones en los valores de parámetros individuales (Dassow et al., 2000). Posteriormente, Albert y Othmer (2003) discretizan esta red y son capaces de recuperar el mismo comportamiento dinámico que con un sistema continuo. En el capítulo dos, de este trabajo se muestra cómo un enfoque discreto y otro continuo, rescatan el comportamiento dinámico de la red de regulación genética que determina la diferenciación temprana de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana*.

Además, dado que en los enfoques booleanos el siguiente estado depende de una función booleana y el espacio es finito, generalmente es posible explorar exhaustivamente las condiciones iniciales del sistema, representando una manera de estudiar sistemáticamente los estados estables (sumideros) y proporcionando una manera directa de probar la necesidad y suficiencia de esas interacciones. Estos enfoques también son útiles para entender la dependencia entre la topología y la función de las redes genéticas de regulación (Albert y Othmer, 2003). De esta manera, los modelos discretos booleanos han probado ser capaces de capturar los aspectos más importantes de la dinámica de regulación genética (ejemplo en el capítulo 2).

Una justificación adicional a uso de modelos discretos con dos o tres estados es que muchas interacciones describen un comportamiento sigmoideal (funciones de Hill), y los estados discretos representan una aproximación a una función de Hill en escalera cuando el coeficiente de Hill tiende a infinito (Alon, 2007). Entonces el supuesto de dos o tres estados tiene una relación directa con la dinámica real y captura el comportamiento esencial del sistema.

Aunque las predicciones de estos modelos son menos cuantitativas que las predicciones hechas con un modelo continuo (Albert, 2007), estos modelos son el punto de partida para desarrollar modelos cuantitativos que se pueden desarrollar cuando la información necesaria esté disponible.

Por otro lado, en los modelos RRG continuos, los estados de los nodos representan concentraciones y la tasa de producción o degradación de todos los componentes esta basada en ecuaciones diferenciales de acuerdo a la cinética de acción de masas (Albert, 2007; Alon, 2007). Este es un enfoque determinístico, y una serie de ecuaciones diferenciales ordinarias describen la regulación de los genes que conforman la red como función de otros (Albert et al., 2007). En este caso, las interacciones entre genes representan relaciones causales y no dependencias estadísticas como en otros casos (inferencia bayesiana e información mutua) (Bansal et al., 2007).

Estos modelos determinísticos continuos de RRG pueden ser acoplados con descripciones del crecimiento celular para explicar la formación de patrones espacio-temporales. Por ejemplo, Jonsson y colaboradores, (2005) proponen un modelo que acopla una pequeña RRG con la dinámica espacial de expresión de un gen que participa en la generación de células indiferenciadas del meristemo apical de *Arabidopsis thaliana* (WUSCHEL).

Se ha sugerido que los modelos híbridos pueden ser útiles en otros casos (Albert, 2007). Así, hay varias extensiones del formalismo booleano que permiten la incorporación de elementos estocásticos y continuos (Albert, et al., 2008).

#### **1.4.2 Modelos de redes deterministas y estocásticos.**

Las redes deterministas son aquellas donde las ecuaciones o reglas lógicas están fijas y, por lo tanto, determinar con exactitud el estado del sistema en una iteración

subsecuente en función del estado de los nodos en el estado anterior (por ejemplo los modelos con base en ecuaciones diferenciales ordinarias y en Espinosa-Soto et al., 2004).

Por otro lado, los modelos estocásticos consideran que las reglas lógicas varían de manera aleatoria debido a cambios de temperatura o al número reducido de moléculas que interactúan, etc., y que dan como resultado fluctuaciones aleatorias. También es posible mantener las reglas lógicas fijas, pero variar el orden de resolverlas o incorporar ruido en los estados estables y no en las reglas lógicas. Estos modelos consideran a los estados de los nodos como variables aleatorias y no determinísticos (ejemplo de un modelo que incluye la introducción de dichas variaciones estocásticas en la especificación de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana* en Álvarez-Buylla et al., 2008).

### **1.4.3 Actualización sincrónica y asincrónica.**

El orden en el cuál cada nodo es actualizado puede tener un efecto importante en la dinámica del sistema, por lo tanto es importante considerarlo. En general se pueden distinguir dos maneras de actualización, la sincrónica y la asincrónica

En la primera, todos los genes se actualizan de acuerdo a sus reglas lógicas al mismo tiempo (Garg et al., 2008), aunque el estado de cada nodo cambia solo al final de cada ronda de actualización. Este formalismo asume que los procesos que relacionan a los nodos (representados como líneas) tienen duración similar (Albert y Assmann, 2009). Este supuesto no es muy realista en biología, pero resulta práctico cuando hay poca información experimental para discernir el orden preciso de la activación de los genes (Garg et al., 2008).

En contraste, en una actualización asincrónica, las actualizaciones se realizan en diferente orden. En caso de que no haya información suficiente acerca de la secuencia de actualización de los nodos, el orden puede ser seleccionado al azar. Así, los estados de los nodos se actualizan en orden aleatorio y una vez que todos los nodos han sido actualizados, la salida (el estado de la red) es evaluada (Albert y Asshamann, 2009.). En ese tipo de actualización, la misma condición inicial puede llevar a diferentes estados estables o sumideros según el orden de actualización y el número de estados de transición pueden ser más que en la versión sincrónica (Garg et

al., 2008). Por lo tanto los modelos con actualización asincrónica al azar, por definición no son determinísticos.

Este tipo de actualización respeta que la escala de tiempo a la que suceden algunos eventos celulares no es necesariamente la misma. Este tipo de actualización ha sido exitosamente aplicado para modelar transducción de señales, pues éstas tienen la tendencia de ser direccionales (Albert y Asshamann 2009.).

Los modelos matemáticos revisados en este trabajo y otros similares, han probado ser útiles en la integración de la enorme cantidad de datos disponibles de diversos procesos de biología del desarrollo y la necesidad de evaluar el comportamiento del todo integrado, más que considerar que todo el proceso podrá entenderse al sumar el comportamiento de sus componentes individuales y aislados (Trewavas, 2006).



## **2. Revisitando el Modelo de Red de Regulación Genética para la especificación de los primordios de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana*.**

2.1 Cómo construir un modelo de RRG de este tipo

2.2 Justificación y actualización de las Reglas Lógicas para la Red de Regulación Genética de acuerdo a Espinosa-Soto, et al., (2004).

2.3 Versión booleana del modelo revisitado

2.4 Resultados

2.4.1 Simulación de mutantes

2.5 Contraste de los resultados obtenidos con un enfoque booleano y con un enfoque continuo.

2.6 Discusión y perspectivas

*En este capítulo se presenta una revisión detallada del modelo de RRG que subyace la diferenciación temprana de los órganos florales en Arabidopsis thaliana. Además se presenta una propuesta de actualización que rescata la información más relevante publicada hasta diciembre del 2008. Finalmente se analiza la versión continua de esta red.*

## **2.1 Cómo construir un modelo de RRG de este tipo**

De manera muy general y como ha sugerido el grupo de Reka Albert (Assmann y Albert, 2009) un resumen de los pasos necesarios para construir un modelo de RRG booleano dinámico, como el revisado en este capítulo, son:

- 1) Leer y asimilar la literatura relevante relacionada con el proceso de interés.
- 2) Construcción de las tablas de verdad que formalicen las relaciones de los genes o interactores de la red de regulación genética en cuestión.
- 3) Con base en las reglas lógicas y la topología de la red, se estudia el comportamiento dinámico de la red para encontrar el comportamiento estable de la red (sumideros). Para este efecto existen programas de computadora disponibles que pueden usarse para probar la dinámica del módulo caracterizado, por ejemplo SQUAD y BooleaNET, que se encuentran disponibles en la web. En este capítulo se utiliza el programa ATALIA que fue desarrollado en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas por A. Chaos.  
Si el modelo es asincrónico, entonces también se debe elegir condiciones iniciales para algunos nodos.
- 4) Se valida el modelo comparando los resultados experimentales con los predichos tanto para la red sin perturbar como para mutaciones de sus componentes.
- 5) Probar la robustez del modelo a cambios en las interacciones.
- 6) Hacer predicciones novedosas que pueden ser la base para nuevos experimentos que sirven para actualizar la red, y así sucesivamente.

## **2.2 Justificación y actualización de las reglas lógicas para la red de regulación Genética de acuerdo a Espinosa-Soto, et al (2004).**

En esta sección se presenta una revisión de los datos experimentales que sustentan las reglas lógicas para doce genes que se incluyeron en el modelo de red de regulación genética propuesto por Espinosa-Soto et al. 2004 y las posteriores actualizaciones (Chaos et al., 2006; capítulo de desarrollo floral en Álvarez-Buylla et al., 2008a). Además, se incluyen tres interacciones relevantes reportadas recientemente. La red representa un ejemplo del enfoque bottom-up, es de tipo booleano y las reglas lógicas que gobiernan su dinámica, están sustentadas en datos experimentales.

Se ha propuesto que la especificación en el desarrollo temprano de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana* está dado por la acción combinada de tres tipos de genes A, B y C. Así, los sépalos están determinados por la expresión de los genes A (*APETALA 1* y *APETALA 2*), los pétalos por la combinación de los genes A y B (*APETALA 3* y *PISTILATA*); los estambres por la expresión de los genes tipo B y C (*AGAMOUS*) y los carpelos, solo por la expresión del tipo C. Además, la expresión de los genes tipo A y tipo C son antagónicas y mutuamente excluyentes (Coen y Meyerowitz, 1991; una revisión muy reciente en el capítulo de desarrollo floral en “The Arabidopsis Book”, Álvarez-Buylla et al., 2009)

El modelo ABC establece que los genes de identidad de los órganos florales mencionados arriba, y sus combinaciones son necesarios para la especificación de las células primordiales de cada uno de los órganos de la flor. Sin embargo, este modelo por sí sólo, no es útil para entender cuál es la red de interacciones de los genes ABC entre ellos y con otros genes para dar de manera robusta la especificación de los órganos florales en el desarrollo temprano de la flor.

En Espinosa-Soto, et al. 2004, se consideran los genes ABC y otros genes importantes según la evidencia experimental. En este modelo, algunos genes tienen dos posibles estados: 0 (apagado) y 1 (encendido). Para otros genes, los datos experimentales son suficientes para establecer tres niveles de expresión, 0, 1 y 2, donde 1 representa un nivel intermedio, y 2 corresponde a la sobreexpresión. Sin embargo, en las posteriores actualizaciones (Chaos et al., 2006; Álvarez-Buylla et al., 2009), se demuestra que la versión booleana que permite 2 estados (0 – apagado y 1 – prendido) para todos los genes de la red se comporta dinámicamente igual.

En el presente trabajo se considera solo la versión booleana. Entonces, cada gen en la red es representado con una variable booleana  $x$  que toma el valor  $x=1$ , si el gen en cuestión se expresa y el valor  $x=0$  si no se expresa (Álvarez-Buylla et al., 2008b). El estado de expresión de la red completa es representado por el vector de los estados de expresión de todos los genes de la red  $\{x_1, x_2, \dots, x_N\}$ , donde  $x_n$  es el estado de expresión del gene  $n$  y  $N$  es el número total de genes en la red. El estado de expresión de cada gen cambia en el tiempo de acuerdo con la ecuación:

$$x_n(t + \tau) = F_n(x_{n_1}(t), x_{n_2}(t), \dots, x_{n_k}(t)). \quad (1)$$

Donde  $\{x_{n_1}(t), x_{n_2}(t), \dots, x_{n_k}(t)\}$  son los reguladores del gene  $x_n$ , y  $F_n$  es una función Booleana, o regla lógica, la cual está construida de acuerdo a la acción combinada de los reguladores de  $x_n$ . El parámetro  $\tau$  es el tiempo que tarda un gen para cambiar su estado de expresión dado el cambio de expresión de sus reguladores. Para este modelo,  $\tau = 1$ .

En esta tesis se hizo una revisión cuidadosa y una síntesis de las fundamentaciones experimentales de cada una de las tablas de verdad propuestas por Espinosa-Soto et al, 2004, además de algunas actualizaciones. En una segunda parte de la tesis se muestran datos de la dinámica de la red actualizada y finalmente se presentan datos de una aproximación continua de la red con base en un método modificado de Mendoza (Mendoza y Xenarios, 2006).

La tabla de verdad de cada gen captura 1) todas las posibles combinaciones de los genes de los que recibe alguna influencia (que se encuentran a la izquierda de cada tabla); y 2) el efecto que las combinaciones de "0"s y "1"s (estados de activación de los genes) tienen sobre el estado de activación del gen en cuestión (que se encuentra a la columna del extremo derecha de cada tabla). Las tablas de verdad se completan con datos reportados experimentalmente.

Así, el estado de expresión de un gen en un tiempo subsiguiente queda determinado completamente por la tabla de verdad correspondiente y del estado de los genes que lo afectan en el tiempo anterior.

En este estudio se añadieron tres interacciones novedosas de acuerdo a datos reportados recientemente (Fig. 1, nuevas interacciones marcadas en verde). Estas son que *APETALA3 (AP3)* y *PISTILATA (PI)* reprimen a *APETALA1 (AP1)* (Sundström et al., 2006) y que *EMBRIONIC FLOWER 1 (EMF1)* reprime a *AGAMOUS (AG)* (Calonje et al., 2008) (ver reglas lógicas actualizadas en el apéndice 1 y el Capítulo de Flor en el "Arabidopsis Book"; Álvarez-Buylla et al., 2009).

Posteriormente, se analizó la dinámica de la red actualizada y se encontró que el sistema describe una dinámica similar a la reportada en otras versiones (véase sección dinámica e interpretación de los resultados). También se probaron dos tipos de perturbaciones: 1) Mutantes de pérdida de función (en otro contexto, knock-out),

que representan el caso donde los genes están apagados y no participan en la dinámica de la red. En el modelo, esto se simula fijando el estado del gen en “0” (apagado). Y, 2) mutantes de ganancia de función o sobreexpresión, cuando un gen se expresa constitutivamente en tiempo y espacio. En la lógica booleana, el gene sobreexpresado permanece en estado “1” (prendido).

La red actualizada se muestra en la figura 1 y cuando se explora su dinámica siguiendo la trayectoria de todos los posibles estados iniciales de la red, se recupera los sumideros tanto para la red silvestre (sin perturbar), como para los mutantes probados en Espinosa-Soto et al (2004).

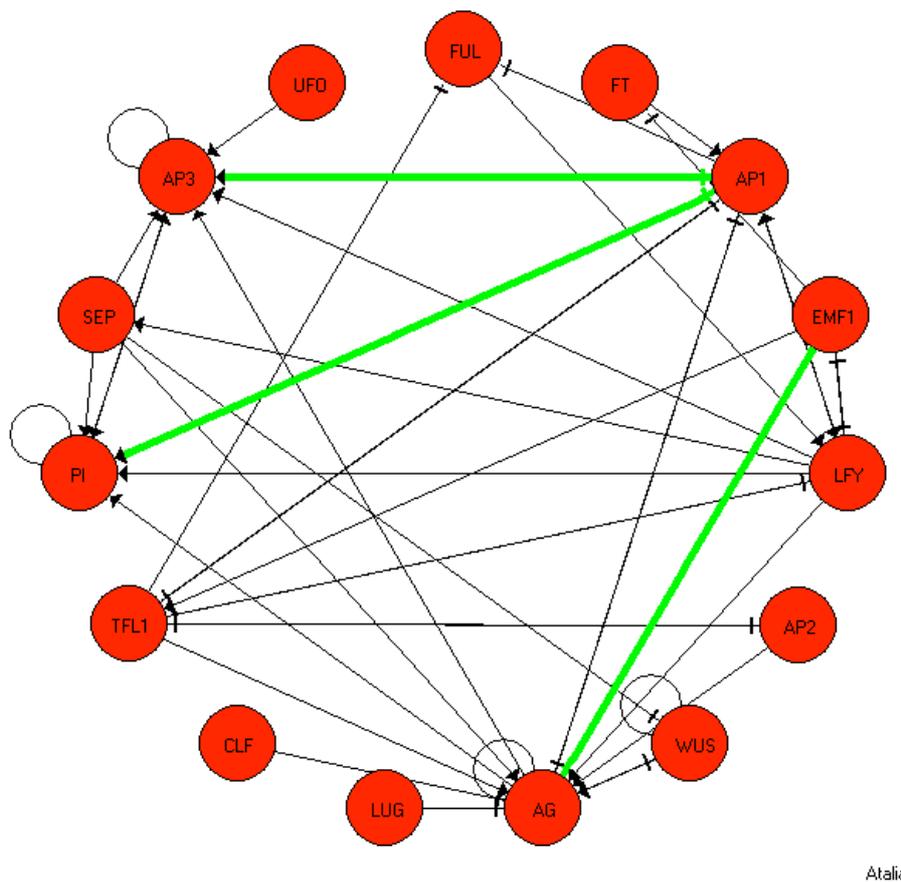


Figura. 1. Modelo de red de regulación genética actualizado que subyace la diferenciación temprana de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana*. Las nuevas interacciones se muestran en verde. Red dibujada con ATALIA (<http://www.ecologia.unam.mx/~achaos/Atalia/atalia.htm>).

### **FLOWERING LOCUS T (FT)**

El fenotipo del doble mutante *flowering locus t (ft) embryonic flower1 (emf1)* retarda el tiempo de floración comparado con el del mutante *emf1* (Haung and Yang, 1998). Esto quiere decir que *ft* es epistático a *emf1*.

Adicionalmente, el doble mutante *35S:LFY 35S:FT*, tiene una flor terminal que surge inmediatamente después de la germinación (Kardailky et al., 1999) y entonces fenotípicamente se parece a *emf1*. Esta observación también apoya que *EMF1* normalmente reprime a *FT*, pues la sobreexpresión de *FT* (y de *LFY*) tiene un fenotipo similar a la ausencia del represor de *FT*.

Otra observación que apoya que *EMF1* incide sobre *FT* es que en otros alelos de *emf1*, (*emf1-1*, *emf1-2*), el nivel de transcrito de *FT* tiende a incrementarse en comparación con plantas silvestres de 21 días después de la germinación (Moon Y. et al., 2003).

Recientemente, se demostró que durante el desarrollo vegetativo *CLF* y *FIE*, miembros del complejo represor Polycomb, reprimen la expresión de *FT* (Jian et al., 08) y *EMF1* se ha relacionado con éste complejo (Calonje et al., 2008). Entonces podría ser que si esta relación no es directa, al menos en la regulación global si es importante considerarla.



En la Tabla 1, se muestran la tabla de verdad para *FT* y en la tabla 2 los argumentos que apoyan dicha tabla. En este caso y para los siguientes genes, cada fila de la tabla de verdad es explicada en cada una de la correspondiente fila de la tabla del argumento de apoyo.

**Tabla 1. Tabla de verdad para FT**

	t	t+1
Fila	EMF1	FT
1	0	1
2	1	0

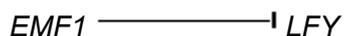
**Tabla 2. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de FT**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
------	--------------------	------------

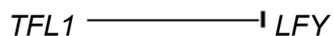
1	En el mutante <i>emf1-1</i> y <i>emf1-2</i> , el nivel de transcritos de <i>FT</i> se incrementa.	Moon Y. et al., 2003
2	Si está el represor, entonces <i>FT</i> esta apagado, y si no está, <i>FT</i> se sobreexpresa.	Supuesto del modelo

### LEAFY (LFY)

Las flores del doble mutante *emf1-1 lfy-1*, son fenotípicamente iguales a las del mutante *lfy* (Yang et al., 1995), lo que sugiere que para esta característica *LFY* es epistático a *EMF1*. Además, como estos genes tienen actividades antagónicas, se puede decir que *EMF1* reprime a *LFY*.



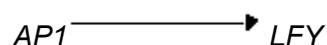
En el mutante *terminal flower1 (tfl1)*, *LFY* se expresa prematura y ectópicamente en el meristemo de inflorescencia (Ratcliffe et al., 1999), sugiriendo que *TFL1* normalmente inhibe a *LFY* en esa región.



Otra observación adicional apoyando que tanto *EMF1* como *TFL1* reprimen a *LFY* es que, éste último se expresa cuando los dos primeros están ausentes (Shannon y Meeks-Wagner, 1993).

En los mutantes *ap1* y el doble mutante *ap1cal*, la expresión de *LFY* esta reducida (Piñero y Coupland, 1998) sugiriendo que *LFY* requiere la actividad de *AP1*.

Adicionalmente, en líneas de sobreexpresión *35S::AP1*, *LFY* se expresa antes que en la planta silvestre y alcanza rápidamente su actividad máxima en el meristemo floral y en el ápice del tallo (Lijegren et al., 1999). Entonces, se puede decir que *AP1* induce a *LFY*.



Por otro lado, aunque en plantas *LFY::GUS ful-2* no se observa ningún cambio en la expresión de *LFY*, en el triple mutante *ful ap1 cal* la expresión de *LFY* esta reducida

en comparación al doble mutante *ap1 cal* (Ferrándiz et al., 2000), sugiriendo que *FUL* activa a *LFY* cuando *AP1* está inactivo. Además, en el mutante *ap1 cal*, *FUL* se expresa en el ápice y ectópicamente en todo el meristemo lateral, entonces *FUL* es requerido para el incremento de la expresión de *LFY*, solo en ausencia de *AP1*.



En la tabla 3 se muestran la tabla de verdad para *LFY* y en la tabla 4 los argumentos que apoyan dicha tabla.

**Tabla 3. Tabla de verdad para *LFY***

Fila	t				t+1
	AP1	FUL	TFL1	EMF1	LFY
1	X	X	0	0	2
2	0	0	0	1	1
3	0	0	1,2	0	1
4	0	0	1,2	1	0
5	0	1	1,2	0	1
6	0	1	0	1	1
7	0	2	0,1	0	2
8	0	2	0	1	1
9	0	2	2	0	1
10	0	2	1,2	1	1
11	0	1	0	1	0
12	1	X	0,1	0	2
13	1	X	2	1	0
14	1	X	0,1	1	1
15	1	X	2	0	1
16	2	X	2	1	1
17	2	X	0,1	X	2
18	2	X	X	0	2

**Tabla 4. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de *LFY***

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	Se valida porque cuando <i>TFL1</i> y <i>EMF1</i> no se expresan, <i>LFY</i> alcanza sus valores máximos.	Chen et al., 1999 Shannon y Meeks-

		Wagner, 1993.
2	En ausencia (inactividad) de <i>TFL1</i> , que no implica ausencia de <i>EMF1</i> , la expresión de <i>LFY</i> se adelanta, como en mutantes <i>emf1</i> . En esos momentos aún no se expresan <i>AP1</i> y <i>FUL</i> .	Chen et al., 1999
3	En el mutante <i>ful ap1 cal</i> , el dominio de expresión de <i>TFL1</i> se expande invadiendo el meristemo floral donde se expresa <i>LFY</i> . En este caso, <i>LFY</i> tiene niveles de expresión más bajos que en el silvestre y por eso se le da un valor de 1.	Ratcliffe et al., 1999. Ferrándiz et al., 2000
4	La plantas <i>emf1</i> tienen flores embrionarias, lo que supone la expresión de genes de meristemo floral, como <i>LFY</i> . Además, <i>LFY</i> alcanza un nivel de expresión alto cuando ambos represores ( <i>EMF1</i> y <i>TFL1</i> ) están apagados, entonces el caso contrario se considera válido.	Chen et al., 1999 Yang et al., 1995 Ratcliffe et al., 1999 Shannon y Meeks-Wagner, 1993
5	En mutantes <i>ap1 cal</i> , <i>FUL</i> aumenta la expresión de <i>LFY</i> . Además también en este mutante, la expresión de <i>LFY</i> y <i>TFL1</i> se sobrelapa, apoyando que <i>TFL1</i> esta prendido .	Ferrándiz et al., 2000
6	En el doble mutante <i>ap1 cal</i> , <i>FUL</i> se expresa ectopicamente en todo el meristemo floral y se ha asociado con el incremento de la expresión de <i>LFY</i> . Entonces <i>FUL</i> enciende a <i>LFY</i> en ausencia de <i>AP1</i> .  Además, como en las filas 2, 6 y 8, cuando <i>TFL1</i> no esta, la expresión de <i>LFY</i> se adelanta, sin importar <i>FUL</i> .	Ferrándiz et al., 2000  Ratcliffe et al., 1999
7	En el mutante <i>ap1 cal</i> , <i>FUL</i> se expresa ectópicamente e induce a <i>LFY</i> . Además, <i>TFL1</i> no esta completamente encendido. Por lo tanto, se considera que $LFY = 2$ .	Ferrándiz et al., 2000
8	En el mutante <i>ap1 cal</i> , <i>FUL</i> induce la expresión de <i>LFY</i> .	Ferrándiz et al.,

	Ver nota a hilera 6.	2000
9	Lo mismo que en 7. La diferencia está en el nivel de expresión de <i>TFL1</i> , que en este caso también está sobrexpresado, como posiblemente ocurre en otro momento del desarrollo en el mismo mutante.	Ferrándiz et al., 2000
10	En el mutante <i>ap1 cal</i> aumenta el nivel de expresión de <i>LFY</i> . Adicionalmente, el nivel de expresión de <i>TFL1</i> se sobrelapa con el de <i>LFY</i> . En esta combinación <i>EMF1</i> está encendido. Como no hay suficiente evidencia experimental de esta combinación, se probaron todas las posibles combinaciones para <i>LFY=0, 1, 2</i> y se obtuvo el mismo resultado.	Ferrándiz et al., 2000
11	<i>LFY</i> alcanza su nivel de expresión máximo cuando sus represores están apagados y por el contrario cuando los dos represores están encendidos, <i>LFY</i> está apagado.  Adicionalmente, en el mutante <i>ap1</i> , la expresión de <i>LFY</i> está reducida.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993.  Piñero y Coupland, 1998
12	Siempre que <i>AP1</i> está prendido, <i>LFY</i> también lo está, excepto cuando ambos inhibidores <i>TFL1</i> y <i>EMF1</i> están encendidos. Esto se apoya porque en mutantes <i>ap1</i> y <i>ap1 cal</i> , la expresión de <i>LFY</i> es menor que en el estado silvestre. Además, cuando <i>AP1</i> está sobrexpresado, <i>LFY</i> se expresa antes.	Piñero y Coupland, 1998  Liljegren et al., 1999
13	Aunque <i>AP1</i> está prendido, los dos represores <i>TFL1</i> y <i>EMF1</i> también lo están, y entonces se supone que <i>LFY</i> está apagado.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993.
14	Si <i>AP1</i> está prendido, <i>LFY</i> también lo está. Misma razón	Piñero y Coupland,

	que en 12. Pero como sus represores también están encendidos <i>LFY</i> no alcanza el nivel máximo 2.	1998
15	<p>En el mutante <i>ap1</i> el nivel de expresión de <i>LFY</i> está disminuido y en líneas <i>35S::AP1</i> se enciende primero, entonces suponemos que <i>AP1</i> activa a <i>LFY</i>. Entonces como <i>AP1</i> esta prendido, <i>LFY</i> también.</p> <p>En esta combinación, <i>LFY</i> no alcanza su nivel máximo porque el represor <i>TFL1</i> tiene un valor de expresión de 2. Se supone que la expresión de <i>LFY</i> depende de <i>AP1</i> y <i>TFL1</i>.</p>	<p>Piñero y Coupland, 1998</p> <p>Liljegren et al., 1999</p> <p>Ratcliffe et al., 1999</p>
16	En la línea que lleva la construcción <i>35S::AP1</i> , <i>LFY</i> se enciende rápido. Sin embargo, la sobreexpresión de <i>AP1</i> no es suficiente para que <i>LFY</i> alcance su máximo nivel de expresión (2), porque sus represores están encendidos.	Liljegren et al., 1999
17	Cuando <i>AP1</i> se expresa constitutivamente, <i>LFY</i> alcanza su máximo nivel antes que en la planta silvestre. Además, en la línea de sobreexpresión, los niveles de <i>TFL1</i> están disminuidos.	Liljegren et al., 1999
18	En la línea <i>35S::AP1</i> , <i>LFY</i> alcanza niveles altos antes que en el silvestre.	Liljegren et al., 1999

### **TERMINAL FLOWER LOCUS 1 (TFL1)**

En el doble mutante *emf1-2 tfl1*, la mutación *emf1* es epistática con respecto a la iniciación de la floración, ya que el doble mutante florece al mismo tiempo que el mutante sencillo *emf1* (Chen et al., 1997). Esto sugiere que la función de *TFL1* requiere la actividad de *EMF1*, y que la función de *TFL1* en el desarrollo de la inflorescencia puede estar mediada por la regulación positiva de *EMF1*. Dado que estos genes no tienen actividades antagónicas, se sugiere que *EMF1* es necesario para la actividad de *TFL1*.



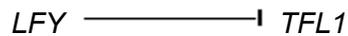
Las plantas transgénicas *35S::AP1* tienen un fenotipo similar a las mutantes *tfl1* (Liljegren et al., 1999); además, en estas plantas, la expresión de *TFL1* esta reducida (Liljegren et al., 1999). Por otra parte, en el doble mutante *ap1 cal*, *TFL1* se expresa ectópicamente (Liljegren et al., 1999). Esto sustenta que *AP1* reprime a *TFL1*.



En plantas *35S::LFY*, no se detecta expresión de *TFL1* (Ratcliffe et al., 1999). Además, el fenotipo de estas plantas con expresión constitutiva de *LFY* es similar al efecto de la reducción de la actividad de *TFL1*. También, se ha mostrado que *LFY* puede inhibir a *TFL1* a nivel transcripcional (Ratcliffe et al., 1999).

Asimismo, en mutantes *lfy*, *TFL1* se expresa ectopicamente (Liljegren et al., 1999).

Esto sugiere que *LFY* reprime a *TFL1*.



*AP2* también reprime a *TFL1* porque el mutante *tfl1-1* suprime parcialmente el fenotipo de inflorescencia del meristemo floral del mutante *ap2-1 ap1-1* (Shultz and Haughn, 1993; Shannon and Meeks-Wagner, 1993).



**Tabla 6. Tabla de verdad para TFL1. Las X, representan cualquier valor.**

	t				t+1
Fila	AP1	LFY	AP2	EMF1	TFL1
1	X	X	X	0	0
2	2	X	X	1	0
3	0,1	2	X	1	0
4	1	0,1	1	1	0
5	1	0,1	0	1	1
6	0	0,1	X	1	2

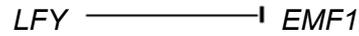
**Tabla 6. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de *TFL1***

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	La función de <i>TFL1</i> requiere la actividad de <i>EMF1</i> . Entonces, cuando <i>EMF1</i> es 0, <i>TFL1</i> también está apagado. La regla lógica, según la tabla de verdad para <i>TFL1</i> es que cuando <i>EMF1</i> está apagado, <i>TFL1</i> también lo está, tal y como ocurre en el desarrollo.	Chen et al., 1997
2	En plantas <i>35S::AP1</i> , el nivel de expresión de <i>TFL1</i> se reduce.	Lijegren et al., 1999
3	En líneas <i>35S::LFY</i> , el nivel de <i>TFL1</i> está reducido.	Ratcliffe et al., 1999
4	Si están prendidos los tres represores ( <i>AP1</i> , <i>AP2</i> y <i>LFY</i> ), como ocurre en el meristemo floral, <i>TFL1</i> no se expresa. Para esta combinación, se probó la opción alterna <i>TFL=1</i> , y los resultados finales no variaron.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
5	En esta posibilidad, se probó la opción alternativa y el resultado no fue diferente.	Supuesto del modelo
6	En el doble mutante <i>ap1 cal</i> , y <i>lfy</i> , <i>TFL1</i> se expresa ectopicamente. También, un alelo débil del mutante <i>LFY</i> podría asemejar un perfil de expresión así al principio del desarrollo, y <i>TFL1= 2</i> .	Liljegren et al., 1999

**EMBRYONIC FLOWER1 (EMF1)**

En el doble mutante *emf1-2 lfy-1*, *emf1* es epistático a *lfy* con respecto a la iniciación de la floración (Chen et al., 1999) y florece prematuramente igual que el primero.

Por otro lado, la sobreexpresión de *LFY* en *emf1-1* incrementa la severidad del fenotipo del mutante (Chen et al., 1999). Entonces, la conversión de *emf1-1* a un fenotipo fuerte como el de *emf1-2* por *35S::LFY*, sugiere que *LFY* regula negativamente a *EMF1*.



En la Tabla 7, se muestra la tabla de verdad para el gen en cuestión y en la tabla 8, los argumentos que le dan soporte a dicha tabla.

**Tabla 7. Tabla de verdad para EMF1**

	t	t+1
Fila	LFY	EMF1
1	0	1
2	1,2	0

**Tabla 8. Argumentos que le dan apoyo a la tabla de verdad de EMF1.**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	Como <i>LFY</i> , el represor esta apagado, <i>EMF1</i> esta prendido, caso alternativo de la fila 2.	Supuesto del modelo
2	En plantas <i>35S::LFY</i> , el fenotipo del alelo débil <i>emf1-1</i> se asemeja al alelo fuerte <i>emf1-2</i> , sugiriendo que <i>EMF1</i> esta apagado.	Chen et al., 1999

### **SEPALLATA 1-3 (SEP 1-3)**

Originalmente, se pensó que los genes *SEP 1-3* se expresan después de la inducción floral, desde la etapa 2 del desarrollo floral (Savidge et al., 1995; Mandel y Yanofsky, 1998; Pelaz et al., 2000) en los tres verticilos internos (Pelaz et al, 2000). Recientemente, con construcciones traduccionales con GFP, se ha demostrado que *SEP3* también se expresa en la epidermis del meristemo de inflorescencia y en la etapa 1 del desarrollo floral (Urbanus et al., 2009).

Los genes *SEP* son requeridos para especificar pétalos, estambres y carpelos, pues en el mutante triple todos los verticilos se transforman en sépalos (Pelaz et al, 2000).

En el trabajo Espinosa-Soto y colaboradores (2004) se consideró que como *TFL* se expresa en el meristemo de inflorescencia y actúa como represor floral, también reprime el nodo de *SEP*. Sin embargo, en Schmid et al. (2003), se muestra que es *LFY* quien activa a los cofactores transcripcionales *SEP1-3*. En Chaos et al, (2006) se demuestra que este cambio en las reglas lógicas no modifica los resultados obtenidos en Espinosa-Soto et al. (2004).



De la misma manera que en casos previos, en la tabla 9 se muestra la tabla de verdad para los genes *SEP* y en la tabla 10, los argumentos que le dan soporte.

**Tabla 9. Tabla de verdad para SEP1-3**

	t	t+1
Fila	LFY	SEP
1	0	0
2	1,2	1

**Tabla 10. Argumentos que le dan soporte**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	En resultados obtenidos de microarreglos, en el mutante <i>lfy</i> , la expresión de <i>SEP1-3</i> esta significativamente reducida. Un sustento adicional a esta relación entre <i>LFY</i> y <i>SEP1-3</i> es que en etapas tempranas del desarrollo, cuando <i>LFY</i> no se expresa, <i>SEP</i> tampoco.	Schimid et al. (2003)
2	Se supone que cuando <i>LFY</i> se sobreexpresa los <i>SEP1-3</i> también, pero este experimento no se ha reportado en la literatura.	Supuesto del modelo

### APETALA1 (AP1)

En mutantes *ag*, *AP1* mRNA se expresa ectopicamente en los dos verticilos más internos (Gustafson-Brown et al., 1994), sugiriendo que *AG* reprime la expresión de *AP1*.

*AG* —————| *AP1*

En mutantes *tfl1*, *AP1* se expresa ectopicamente en los meristemas laterales y en las flores terminales (Gustafson-Brown et al., 1994). Además, en el doble mutante *tfl1 ap1*, las flores terminales que se forman no tienen pétalos a diferencia del mutante sencillo *tfl1* sugiriendo que *AP1* es activo en el mutante *tfl1* (Shannon and Meeks-Wagner, 1993). Asimismo, en líneas *35S::TFL1* la expresión de *AP1* se retarda (Ratcliffe et al, 1998) y en mutantes *35S::TFL1 lfy-7*, *AP1* no se expresa, a diferencia del mutante sencillo *lfy-7* (Ratcliffe et al, 1999). En Ratcliffe et al, 1999, se sugiere que la actividad de *AP1* esta regulada por los niveles de expresión y el lugar de expresión de *LFY* y *TFL1*.

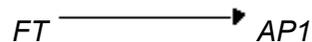
Por otro lado, el doble mutante *tfl1-10 lfy-16* forma meristemas con características de meristemo floral en vez de meristemas de inflorescencia, pero el triple mutante *tfl1 lfy-16 ap1-1* no forma este meristemo parecido al floral, indicando que el desarrollo del meristemo floral en lugar del meristemo de inflorescencia en el doble mutante se debe a la actividad de *AP1*, que en ausencia de su represor se expresa dando características de meristemo floral al meristemo de inflorescencia (Shannon and Meeks-Wagner, 1993). Toda la evidencia anterior sugiere que *TFL1* representa un regulador negativo de *AP1*.

*TFL1* —————| *AP1*

Por otro lado, se ha demostrado que *LFY* puede activar transcripcionalmente a *AP1* (Wagner et al., 1999). Además, en el mutante nulo *lfy-12*, la expresión de *AP1* esta retrasada y es menor que en la planta silvestre (Lijegren et al., 1999). También, en mutantes *35S::LFY*, *AP1* se expresa ectopicamente (Lijegren et al., 1999). Además, los niveles de *AP1* se incrementan en plantas con una construcción de *LFY* que hace a este gen transactivar de manera constitutiva (*LFY*, *LFY::VP16*; Percy et al., 1998). Por lo que se infiere que *LFY* es un activador transcripcional de *AP1*.



Por otra parte, el doble mutante *ft-1 lfy-6* no presenta estructuras florales sugiriendo que genes responsables de la inducción floral, como *AP1* podrían estar inactivos en esta doble mutante, y se comprueba porque en este mutante doble no se detecta *mRNA* de *AP1*, pero sí en los respectivos mutantes sencillos. Esto puede interpretarse como que cuando *LFY* esta ausente, *FT* es requerido para la función de *AP1* (Ruíz-García et al., 1997), y que al menos uno de estos genes debe estar presente para la activación de *AP1*.



Según experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP), la proteína *PI* se une a secuencias blanco en el promotor de *AP1* (Sundström et al., 2006). Además, en los mutantes *ap3-3* y *pi*, los transcritos de *AP1* son elevados comparados con el fenotipo silvestre y con la línea *35S::AP3* (Sundström et al., 2006). Estos datos experimentales, sugieren que *AP3* y *PI*, reprimen a *AP1* (ver Capítulo de Flor en el “Arabidopsis Book”; Álvarez-Buylla et al., 2008a).

En las reglas lógicas modificadas para *AP1*, se supuso que cuando *AP3* y *PI* están prendidos, *AP1* esta apagado excepto cuando *FT* y *LFY* están prendidos. Además, se supone que cuando en los dobles mutantes *ap3 pi*, así como en sus respectivos mutantes sencillos, *AP1* esta prendido excepto cuando: a) *AG* y *TFL1* están prendidos y b) cuando *LFY* y/o *FT* están apagados (véase reglas lógicas modificadas en el apéndice).



En la Tabla 11, se muestra la tabla de verdad para *AP1*, y en la tabla 12 los argumentos que apoyan esta tabla.

**Tabla 11. Tabla de verdad para *AP1*. Las X representan cualquier valor**

**Tabla 12.**  
apoyo para  
de *AP1*

	t				t+1
Fila	AG	LFY	TFL1	FT	AP1
1	2	X	X	X	0
2	0	X	X	2	2
3	1	X	X	2	1
4	0	LFY>=TFL1	LFY>=TFL1	0,1	2
5	1	LFY>=TFL1	LFY>=TFL1	0,1	1
6	0,1	LFY<TFL1	LFY<TFL1	0,1	0

**Argumentos de la tabla de verdad**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	En mutantes <i>ag</i> , <i>AP1</i> mRNA se expresa ectópicamente en los dos verticilos más internos. Entonces se supone que lo contrario también es cierto, es decir, que cuando <i>AG</i> está encendido, <i>AP1</i> , no lo está.	Gustafson-Brown et al., 1994
2	En mutantes <i>ft lfy</i> , <i>AP1</i> no se expresa, comparado con el mutante <i>lfy</i> por lo que al menos uno de estos dos factores es requerido para su expresión. Entonces, se supone que cuando <i>FT</i> está expresado a su máximo nivel (independientemente del nivel de expresión de <i>LFY</i> y <i>TFL1</i> ), <i>AP1</i> se enciende.	Ruíz-García et al., 1997
3	Cuando <i>FT</i> esta encendido, induce a <i>AP1</i> ; sin embargo, como <i>AG</i> que representa una señal inhibitoria también esta encendido, <i>AP1</i> no alcanza el nivel de expresión máximo.	Supuesto del modelo
4	Cuando el nivel de expresión de <i>LFY</i> es mayor que el de <i>TFL1</i> , como ocurre en el meristemo floral, <i>AP1</i> se induce positivamente.	Ratcliffe et al, 1999
5	Cuando el nivel de <i>LFY</i> es mayor que el de <i>TFL1</i> , <i>AP1</i> se expresa, pero como el represor <i>AG</i> también esta encendido, <i>AP1</i> no alcanza los mismos niveles de expresión que en el anterior.	Ratcliffe et al, 1999

6	Este caso puede asemejarse al mutante <i>35S::TFL1 lfy-7</i> , donde no hay expresión de <i>AP1</i> .	Ratcliffe et al.1999
---	---	----------------------

**APETALA2 (AP2)**

En mutantes *tfl1-1 ap2-1*, las flores terminales que se forman no tienen pétalos (Shannon y Meeks-Wagner, 1993). Entonces, se sugiere que *AP2* se expresa en las flores terminales del mutante *tfl1-1*. Estas observaciones sugieren que *AP2* es reprimido por *TFL1* (Shannon y Meeks-Wagner, 1993).



En Chen, (2004) y en Zhao y colaboradores, (2007) se apoya que *AP2* es post-transcripcionalmente reprimido por un tipo de *miRNA* (*miRNA 72*), cuya abundancia depende de la actividad de *HUA ENHANCER 1*, una proteína DICER-like (*HEN1*, Park y otros, 2002). Sin embargo, aunque *HEN1* se expresa en toda la planta (Chen y otros, 2002), la represión de *AP2* dependiente de *miRNA*, parece ocurrir sólo en los verticilos florales más internos (Chen, 2004). Esto sugiere que un cofactor, expresado en los verticilos internos, da especificidad a la represión de *AP2* por *HEN1*.

En el trabajo publicado en Chaos et al., (2006), se probó la posibilidad de que este factor estuviera por debajo de la actividad de *AG*, apoyando la represión mutua de los genes *A* y *C*, propuestos en el modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991). Así, se supuso que *HEN1* permanecía en estado 1, y en la regla lógica de *AP2* se añadió que *AG* debe estar inactivo para que *AP2* este prendido (Chaos, et al.2006). El único cambio que se encontró con esta modificación fue que en los sumideros de carpelo y estambre, *AP2* está apagado (Chaos, et al. 2006). Por lo tanto, *HEN1* se decidió dejar fuera de la red.



**Tabla 13. Tabla de verdad para *AP2***

	t	t+1
Fila	TFL1	AP2
1	0	1

2	1,2	0
---	-----	---

**Tabla 14. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de AP2**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	En mutantes <i>tfl</i> , <i>AP2</i> se expresa ectopicamente en las flores terminales.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
2	Se supone que lo contrario también es cierto. Además, <i>TFL1</i> es considerado como una señal represora para los genes de identidad de meristemo floral, incluido <i>AP2</i> .	Shannon y Meeks-Wagner, 1993

### **FRUITFUL (FUL)**

*FRUITFUL (FUL)* se expresa ectopicamente en mutantes *ap1* (Ferrándiz et al., 2000; Mandel y Yanofski, 1995) sugiriendo que *AP1* reprime a *FUL*. Adicionalmente, en el mutante *ap1 cal*, *FUL* se expresa en el ápice y ectopicamente en todo el meristemo floral.



Por otro lado, dado que *FUL* activa la expresión de *LFY* en ausencia de *AP1* (Ferrándiz et al., 2000), se podría esperar que los dominios de expresión de éstos se sobrelaparan. Sin embargo, mientras *FUL* se expresa en el meristemo de inflorescencia, *LFY* no se expresa en esta región (Mandel y Yanofski, 1995). Esto sugiere que hay un factor que impide la activación de *LFY* por *FUL* en la inflorescencia. Este factor, podría ser *TFL1*, quien representaría un regulador negativo de *FUL*. También es posible que otros factores representen esta señal inhibitoria, pues cuando no se considera esta regulación negativa, el estado estable de no-floración desaparece.



Adicionalmente, en Teper-Bamnlker y Samach. (2005), se muestra que la expresión de *FT* favorece la expresión de *FUL*. Sin embargo, esta interacción no se considera porque podría ser mediante los genes *LFY* y *TFL1* (Chaos et al. 2006).

En la tabla 15 se presenta la tabla de verdad para *FUL* y en la tabla 16, los argumentos que la apoyan.

**Tabla 15. Tabla de verdad para *FUL*. Las X representan cualquier valor**

	t		t+1
Fila	AP1	TFL1	<b>FUL</b>
1	X	1,2	0
2	0	0	2
3	1	0	1
4	2	0	0

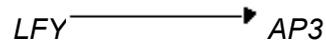
**Tabla 16. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de *FUL***

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	<i>TFL1</i> es un regulador negativo, y entonces mantiene apagado a <i>FUL</i> .	Supuesto del modelo
2	<i>FUL</i> esta fuertemente expresado en el meristemo vegetativo poco antes de la transición a la floración, cuando AP1 y TFL1 están apagados.	Ferrándiz et al., 2000
3	<i>FUL</i> disminuye su expresión en la transición a la floración, donde AP1 se empieza a expresar. Cuando solo un represor esta encendido, <i>FUL</i> esta parcialmente encendido.	Ferrándiz et al., 2000
4	Como <i>FUL</i> se expresa ectopicamente en <i>ap1</i> , se supone que el caso contrario también es cierto.	Mandel and Yanofski, 1995

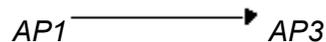
### **APETALA3 (AP3)**

En mutantes *lfy-6*, no se desarrollan estambres ni pétalos, pero éstos se desarrollan cuando se induce con glucocorticoides la expresión de *LFY* (Wagner et al. 1999). En mutantes *lfy-6*, la expresión de *AP3* esta reducida (Weigel and Meyerowitz, 1993). En el doble mutante *lfy-6 ap1-1*, no se detectan mRNAde *AP3*, pero en mutantes *ap1-1*, *AP3* se expresa como en la planta silvestre (Weigel and Meyerowitz, 1993).

Estos datos sugieren que *LFY* es un activador de *AP3*.



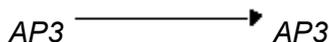
Aunque la pérdida de función de *AP1*, por sí sola no modifica la expresión temprana de *AP3*, *AP1* es requerido para la activación de *AP3*, pues en plantas *lfy ap1*, no se detecta expresión de *AP3* (Weigel and Meyerowitz, 1993).



Para la expresión ectópica de *AP3*, tanto *LFY* como *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*, tienen que estar sobreexpresados (Parcy et al., 1998), sugiriendo que la expresión de *UFO* es necesaria para la activación de *AP3* por *LFY*. Además, recientemente se demostró que *UFO* actúa como cofactor transcripcional junto con *LFY* para regular *AP3* (Chae et al., 2008).



Adicionalmente, la expresión de *AP3* también se mantiene por autoactivación pues en plantas *35S:AP3:GR*, *AP3* se sobreexpresa cuando se aplica dexametasona (Hill et al. 1998; Honma and Goto, 2000).



Por otro lado, *AG* puede mantener la expresión de *AP3*, porque en plantas *35S::PI 35S::AP3 35S::AG 35S::SEP3* las hojas caulinares se transforman en órganos estaminoides (Honma and Goto, 2001). Adicionalmente, en mutantes *ag-1 AP3:GUS*, la expresión de *AP3* se reduce en el tercer verticilo (Hill et al., 1998). Esto apoya que *AG* activa a *AP3*.



De manera similar, en líneas *35S::SEP3* se observa la expresión ectópica de *AP3::GUS* (Castillejo et al., 2005).



Asimismo, en la línea *AP3:GUS 35S::PI 35S::AP3 35S::AP1* la expresión de *GUS* se observa no sólo en órganos florales, sino también en raíz, cotiledones y hojas de roseta y caulinares; y en plantas *35S::PI 35S::AP3 35S::AG 35S::SEP3*, los órganos florales y las hojas caulinares se transforman en estambres o en órganos estaminoides (Honma y Goto, 2001). Además, cuando *AP3*, *PI*, *SEP* y *AP1* se expresan ectopicamente, se transforman hojas en órganos petaloides (Pelaz et al., 2001).

Estas observaciones sugieren que para la activación completa de los genes B, se requiere la formación de tetrámeros con *SEP*, *PI*, *AP3* y *AP1* o *AG*.



En la Tabla 17 y 18 se encuentran los argumentos que apoyan la tabla de verdad de *AP3*.

**Tabla 17. Tabla de verdad para *AP3*. Las X representan cualquier valor**

Fila	t							t+1
	SEP	LFY	UFO	AP3	PI	AG	AP1	AP3
1	1	X	X	1,2	1,2	1,2	X	2
2	1	X	X	1,2	1,2	X	1,2	2
3	0	1,2	1	X	X	X	X	1
4	X	1,2	1	0	X	X	X	1
5	X	1,2	1	X	0	X	X	1
6	X	1,2	1	X	X	0	0	1
7	0	X	0	X	X	X	X	0
8	X	X	0	0	X	X	X	0
9	X	X	0	X	0	X	X	0
10	X	X	0	X	X	0	0	0
11	0	0	X	X	X	X	X	0
12	X	0	X	0	X	X	X	0
13	X	0	X	X	0	X	X	0
14	X	0	X	X	X	0	0	0

**Tabla 18. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de AP3**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	En mutantes <i>AP3:GUS 35S::PI 35S::AP3 35S::AP1</i> y <i>35S::PI 35S::AP3 35S::AG 35S::SEP3</i> , <i>AP3</i> se expresa ectópicamente. Se requiere la formación de este tetrámero para la activación de los genes B.	Honma y Goto, 2001
2	En plantas <i>AP3:GUS 35S::PI 35S::AP3 35S::AP1</i> se observa la expresión ectópica de <i>AP3</i> .	Honma y Goto, 2001
3	La sobreexpresión de <i>LFY</i> y de <i>UFO</i> , inducen a <i>AP3</i> .	Parcy et al., 1998
4	Este caso se asemeja a la activación temprana de <i>AP3</i> , donde <i>LFY</i> y <i>UFO</i> son ambos necesarios para que se prenda <i>AP3</i> . La autoactivación de <i>AP3</i> , actúa en etapas posteriores.	Parcy et al., 1998 Honma y Goto, 2001
5	En plantas <i>35S::LFY 35S::UFO</i> , se detecta expresión ectópica de <i>AP3</i> . Ambas son suficientes para que se exprese <i>AP3</i>	Parcy et al., 1998
6	<i>LFY</i> y <i>UFO</i> son necesarios para la activación de <i>AP3</i> . Esta combinación podría representar un estado temprano del desarrollo donde <i>AG</i> y <i>AP1</i> aún no están encendidos.	Parcy et al., 1998
7	<i>LFY</i> puede activar <i>AP3</i> , solo en presencia de <i>UFO</i> . Si está ausente, <i>AP3</i> está apagado como sucede en las filas 7-10.	Parcy et al., 1998
8	Misma razón que el anterior. Además, <i>AP3</i> está apagado, eliminando la posibilidad de autoactivación.	Parcy et al., 1998 Honma y Goto, 2001
9	Mismo argumento que en 7. Además, se requiere la	Parcy et al., 1998

	expresión de <i>PI</i> para la expresión de <i>AP3</i> en su dominio normal.	Jack et al., 1992
10	Aunque <i>LFY</i> estuviera prendido, se necesita que <i>UFO</i> esté encendido para la activación de <i>AP3</i> . Adicionalmente, <i>AG</i> y <i>AP1</i> son necesarios para la función de <i>AP3</i> , entonces cuando están ausentes, <i>AP3</i> está apagado.	Parcy et al., 1998  Honma y Goto, 2001
11	En este caso, aunque <i>UFO</i> estuviera encendido se necesita la presencia de <i>LFY</i> para activar <i>AP3</i> . Esta restricción se usa en las filas 11-14.	Parcy et al., 1998
12	Mismo argumento que en el anterior, además se descarta la autoactivación porque <i>AP3</i> esta apagado.	Parcy et al., 1998  Honma y Goto, 2001
13	El argumento es el mismo que en 11. Adicionalmente, la expresión de <i>PI</i> es necesaria para la expresión normal de <i>AP3</i> .	Parcy et al., 1998 Jack et al., 1992
14	Para la expresión de <i>AP3</i> , es necesario que <i>UFO</i> y <i>LFY</i> estén encendidos, y como solo <i>UFO</i> puede estar encendido, <i>AP3</i> esta apagado. Además, este estado está apoyado porque <i>AG</i> y <i>AP1</i> están ausentes y son necesarios para la formación de tetrámeros con <i>AP3</i> .	Parcy et al., 1998  Honma y Goto, 2001

### **PISTILLATA (PI)**

En mutantes *lfy-6*, la expresión de *PI* está reducida (Weigel and Meyerowitz, 1993) y en flores *lfy PI:GUS*, no se detecta actividad de GUS (Honma and Goto, 2000). Además aunque los mutantes *lfy-6* pierden pétalos y estambres, éstos se recuperan en plantas *lfy-6 35S:LFY:GR* que expresan *LFY* ectopicamente (Wagner et al., 1999).

Estas observaciones apoyan el hecho de que *LFY* representa un regulador positivo para *PI*.



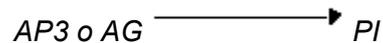
Adicionalmente, *PI* se autoactiva (Honma and Goto, 2000, 2001).



Para esta autoactivación, al igual que para *AP3*, se necesita la actividad de *AP3*, *PI*, *SEP* y *AP1* o *AG* (Honma and Goto, 2001).



En Espinosa-Soto y colaboradores, (2004) se asumió que la expresión de *PI* se mantiene solo cuando *AG* o *AP3* son activos, pues *PI* no es activo en sépalos que es el único órgano floral donde tanto *AG* como *AP3* están apagados.



En la tabla 20 se dan los argumentos necesarios para la construcción de la tabla de verdad de *PI* (tabla 19).

**Tabla 19. Tabla de verdad para *PI*. Las X representan cualquier valor**

Fila	t						t+1
	LFY	SEP	AP3	PI	AG	AP1	PI
1	X	X	0	X	0	X	0
2	X	1	1,2	1,2	1,2	X	2
3	X	1	1,2	1,2	X	1,2	2
4	1,2	0	1,2	1,2	1,2	X	1
5	1,2	1	0	1,2	1,2	X	1
6	1,2	1	1,2	0	1,2	X	1
7	1,2	1	1,2	1,2	0	0	1
8	0	0	1,2	1,2	1,2	X	0
9	0	1	0	1,2	1,2	X	0
10	0	1	1,2	0	1,2	X	0
11	0	1	1,2	1,2	0	0	0

**Tabla 20. Argumentos que apoyan la tabla de verdad de *PI***

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	Esta fila se asemeja a etapas tempranas de desarrollo, donde <i>AG</i> , <i>AP3</i> , y <i>PI</i> están apagados y también lo está.	Supuesto del modelo.
2	En plantas <i>35S::PI 35S::AP3 35S::AG 35S::SEP3</i> , los órganos florales y las hojas caulinares se transforman en estambres o en órganos estaminoides, sugiriendo la presencia de <i>PI</i> .	Honma y Goto, 2001.
3	En línea <i>35S::PI 35S::AP3 35S::AP1</i> , hojas caulinares se transforman en órganos petaloideos, sugiriendo que <i>PI</i> esta encendido.	Honma y Goto, 2001.
4	El tetrámero <i>AP3-PI-AG-SEP</i> es requerido para la expresión de <i>PI</i> . Sin embargo, como en esta combinación en la tabla de verdad <i>SEP</i> esta ausente, la expresión de <i>PI</i> esta reducida comparado con la combinación donde todos están encendidos. Adicionalmente, <i>LFY</i> que es un activador de <i>PI</i> , esta encendido.	Honma y Goto, 2001  Weigel y Meyerowitz, 1993
5	Mismo caso que el anterior, solo que en esta combinación <i>AP3</i> es el que está apagado, dando como resultado que <i>PI</i> no alcance sus valores máximos.	Honma y Goto, 2001  Weigel y Meyerowitz, 1993
6	La misma situación que en 4. En este caso también se elimina la posibilidad de autoactivación de <i>PI</i> .	Honma y Goto, 2001  Weigel y Meyerowitz, 1993
7	Esta combinación se asemeja a las anteriores, aunque aquí no está presente <i>AG AP1</i> y <i>LFY</i> está encendido	Honma y Goto, 2001

		Weigel y Meyerowitz, 1993
8	El tetrámero no se forma y adicionalmente <i>LFY</i> , no activa a <i>PI</i> , provocando que <i>PI</i> esté apagado.	Honma y Goto, 2001 Weigel y Meyerowitz, 1993
9	La ausencia de <i>LFY</i> es crucial para que <i>PI</i> esté apagado, como ocurre en las filas 9-11. El argumento es muy parecido al anterior.	Honma y Goto, 2001 Weigel y Meyerowitz, 1993
10	Es necesario <i>LFY</i> para activar <i>PI</i> , y además en esta combinación se descarta la autoactivación de <i>PI</i> , si los tetrámeros no están completos.	Weigel y Meyerowitz, 1993 Honma y Goto, 2001
11	Para la formación de estos tetrámeros se necesita <i>AG</i> o <i>AP1</i> y como no está presente ninguno, <i>PI</i> permanece apagado. Además, <i>LFY</i> está apagado.	Honma y Goto, 2001 Weigel y Meyerowitz, 1993

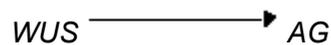
### **AGAMOUS (AG)**

En plantas homocigotas para *ap2-2* o *ap2-9*, los órganos del primer verticilo en posición media se diferencian como carpelos o carpelos estaminoides, los órganos del primer verticilo en posición lateral están ausentes o se diferencian como hojas y los órganos del segundo verticilo están ausentes (Deyholos and Sieburth, 2000).

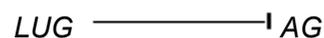
Estos defectos se deben a la expresión ectópica del mRNA de *AG* en estos mutantes (Drews et al., 1991) y sugieren que *AP2* reprime a *AG*.

*AP2* —————| *AG*

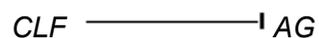
Por otro lado, en mutantes fuertes *wus* (*wushe1*) no se desarrollan los carpelos y generalmente tienen un solo estambre central (Laux et al., 1996). Adicionalmente, en plantas *AP3:WUS* el segundo verticilo está formado por estambres carpeloides, pero en plantas *AP3:WUS ag*, el segundo y tercer verticilo no se diferencian en estambres carpeloides (Lenhard et al., 2001), sugiriendo que *AG* se expresa ectópicamente en el primer caso. Estas observaciones apoyan que *WUS* activa a *AG*.



Los mutantes *lug-1* (*LEUNING*), tienen flores en las que en el primer verticilo (correspondiente a sépalos) está constituido por órganos con tejidos estaminoides o carpeloides o petaloides y en el segundo verticilo, pétalos estaminoides o ausentes. En este mutante la cantidad de mensajero de *AG* es mayor que en la planta silvestre (Liu and Meyerowitz, 1995). Y la hibridización *in situ* mostró la expresión ectópica de *AG* en este mutante (Deyholos and Sieburth, 2000). Adicionalmente, en dobles mutantes *lug ag*, la mutación *ag* es epistática con respecto a la identidad de órganos florales, pues en este doble mutante, los dos primeros verticilos son silvestres (Liu and Meyerowitz, 1995). Recientemente, estudios de interacción de proteínas han mostrado que *LUG* forma un complejo correpresor con *SEU*, para regular la expresión de *AG* (Gregis et al, 2006; Sridhar et al., 2004). Estos datos experimentales sugieren que *LUG* reprime a *AG*.



En el mutante *clf* (*curly leaf*) existe una transformación parcial de sépalos y pétalos a carpelos y estambres, respectivamente (Goodrich et al., 1997). Además, en este mutante se detecta *AG* en el primer verticilo, confirmando que el fenotipo se debe a la expresión ectópica de *AG*. Por otra parte, en el doble mutante *ag clf*, *ag* es epistático (Goodrich et al., 1997). Esto apoya que *CLF* es un represor de *AG*.



Como *LUG* y *CLF* se expresan constitutivamente (Conner and Liun, 2000; Goodrich et al., 1997), se consideró que estos genes están siempre activos en la simulación del fenotipo silvestre en Chaos et al., 2006 y Álvarez-Buylla et al., 2009.

Por otro lado, la expresión ectópica de *AG* se incrementa en dobles mutantes *ap1 lug* o *ap2 lug*, y *AG* se expresa ocasionalmente en los verticilos externos de mutantes *ap1-1*, en donde el primer verticilo es carpeloide y el segundo verticilo es estaminoide (Liu and Meyerowitz, 1995), apoyando que *AP1* también reprime a *AG*.



Estos datos apoyan que la expresión de *WUS* es suficiente en flores silvestres de *Arabidopsis thaliana* para suprimir la represión de *AG* por *LUG*, *CLF*, *AP1* y *AP2*, pues en plantas *AP3:WUS* (Lenhard et al., 2001) hay actividad de *AG* en el segundo verticilo donde normalmente estos represores son activos y previenen la expresión de *AG*.

Adicionalmente, el triple mutante *Ify ap1 tfl1* recupera carpelos normales (Shannon and Meeks-Wagner, 1993), sugiriendo que *TFL1* también reprime a *AG*.



Asimismo, la proteína *LFY* se une a una secuencia enhancer en el primer intrón de *AG* (Busch et al., 1999) y coopera con el homeodominio de *WUS* para activar *AG* en el centro de las flores (Lonhman, 2001). Además, en mutantes *Ify-6*, el dominio de expresión de *AG* en etapas tardías está reducido (Weigel and Meyerowitz, 1993).

Adicionalmente, la expresión de un dominio de activación en *LFY*, provoca el incremento de la expresión ectópica de *AG* (Parcy et al. 1998). Todas estas observaciones experimentales, apoyan que *LFY* es un regulador positivo para *AG*.



En líneas *35S::SEP3*, *AG* se expresa ectopicamente. Y en plantas doble transgénicas *35S::AG 35S::SEP3*, el fenotipo de la sobreexpresión de *AG* es más pronunciado, presentándose características carpeloides ectópicas en un mayor grado (Castillejo et al., 2005). Además resultados de Gómez-Mena, (2005) demuestran que para la autorregulación de *AG*, se necesita un complejo *AG/SEP3*. Esto apoya que *SEP* es un regulador positivo de *AG*.



En Espinosa-Soto et al, (2004) se predijo que *AG* tenía autorregulación, hecho que fue comprobado por Gómez-Mena et al, (2005).



Por otro lado, por experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se sabe que *EMF1* se une a sitios específicos del promotor y del segundo intrón de *AG*. De manera adicional, *EMF1* interfiere con la transcripción por *RNA* polimerasa II y T7 *RNA* polimerasa in Vitro de *AG* (Calonje et al., 2008). Estos datos apoyan que *AG* es reprimido por *EMF1*.

En las reglas lógicas para *AG*, se supone que cuando *EMF1* esta prendido, *AG* esta siempre apagado. Por otro lado, por el tiempo la expresión de *EMF1* se considera que la regulación de *AG* por *EMF1* es anterior a cualquiera de los demás genes. Fortaleciendo este argumento, se ha propuesto que complejos tipo Polycomb estan asociados con la represión de genes del meristemo floral y *EMF1* podría formar parte de dichos complejos (Calonje et al., 2008). También, se supone que la inhibición por *TFL1* y *AP2* es mayor, excepto en dos casos: a) cuando *LFY* y *WUS* están encendidos (como ocurre en una etapa temprana), o b) cuando *AG* y *SEP1-3* están encendidos. (Véase reglas lógicas modificadas en el apéndice).



**Tabla 21. Tabla de verdad para *AG*. Las X representan cualquier valor**

	t							t+1
Fila	AP1	AG	WUS	AP2	SEP	LUG	CLF	AG
1	X	X	X	0	X	X	X	2
2	X	X	X	X	X	X	X	0
3	X	X	1	1	X	X	X	2
4	X	X	1	1	X	X	X	2
5	X	X	X	1	X	X	X	0
6	X	0,1	0	1	X	X	0	1
7	X	2	0	1	0	X	0	1

8	X	0,1	0	1	X	0	X	1
9	X	2	0	1	0	0	X	1
10	0	0,1	0	1	X	X	X	1
11	0	2	0	1	0	X	X	1
12	X	0,1	0	1	X	X	0	1
13	X	2	0	1	0	X	0	1
14	X	0,1	0	1	X	0	X	1
15	X	2	0	1	0	0	X	1
16	0	0,1	0	1	X	X	X	1
17	0	2	0	1	0	X	X	1
18	1,2	0,1	0	1	X	1	1	0
19	1,2	2	0	1	0	1	1	0
20	1,2	0,1	0	1	X	1	1	0
21	1,2	2	0	1	0	1	1	0
22	X	2	0	1	1	X	X	2
23	X	2	0	1	1	X	X	2

**Tabla 22. Argumentos de apoyo para la tabla de verdad de AG.**

<b>Fila</b>	<b>Argumento de apoyo</b>	<b>Referencia</b>
1	Esta combinación se asemeja a la condición del meristemo floral, donde la cantidad de <i>TFL1</i> es menor o igual a la de <i>LFY</i> , y este último enciende a <i>AG</i> . Además, otro de sus represores <i>AP2</i> , esta apagado.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
2	Si la cantidad de <i>TFL1</i> es mayor que la de <i>LFY</i> , esta situación se parece al meristemo de inflorescencia, donde normalmente no se expresa <i>AG</i> . Otro argumento adicional, es que <i>TFL1</i> actúa como represor de <i>AG</i> .	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
3	<i>TFL1</i> es menor que <i>LFY</i> , en semejanza con el meristemo floral.  Como <i>WUS</i> esta encendido, <i>AG</i> se mantiene también encendido, sin importar el estado de sus represores <i>LUG</i> ,	Shannon y Meeks-Wagner, 1993  Lenhard et al., 2001

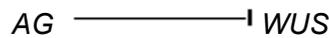
	<p><i>CLF</i>, <i>AP1</i> y <i>AP2</i>, pues en plantas <i>AP3:WUS</i> hay actividad <i>AG</i> en el segundo verticilo donde normalmente estos represores están activos también.</p> <p>Además, <i>LFY</i> coopera con el homeodominio de <i>WUS</i> para activar <i>AG</i> en el centro de las flores.</p>	Lonhman et al., 2001
4	Mismo argumento que el anterior. La condición contraria fue probada.	Lenhard et al., 2001
5	<p><i>AP2</i>, que es un represor de <i>AG</i> esta encendido, y entonces apaga a <i>AG</i>. La condición contraria fue probada.</p> <p>Se consideró que el nivel de <i>LFY</i> y <i>TFL1</i> es importante para decidir si <i>AG</i> se activa o no.</p>	Supuesto del modelo
6	<p>El que <math>TFL1 &lt; LFY</math>, garantiza que se trate de un meristemo de flor, que no haya una represión significativa por el primero. Entonces, <i>AG</i> es encendido por <i>LFY</i>.</p> <p><i>AG</i> está prendido, pero por autoactivación no alcanza el valor máximo pues su represor <i>AP2</i> está encendido.</p>	Parcy et al. 1998
7	<p>Como <math>TFL1 &lt; LFY</math>, éste último puede activar a <i>AG</i>.</p> <p>Además, como <i>AP2</i>, un represor está encendido, la autoactivación de <i>AG</i>, no es suficiente para alcanzar el nivel máximo.</p>	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
8	Mismo argumento que en 7	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
9	<p>Como <math>TFL1 &lt; LFY</math>, y como más de uno de sus represores esta siempre apagado, <i>AG</i> está encendido.</p> <p>Mismo argumento que en 7.</p>	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
10	<p>Cuando <math>TFL1 &lt; LFY</math>, y con que al menos uno de sus represores esté siempre apagado, <i>AG</i> está encendido.</p> <p>Mismo argumento que en 7.</p>	Supuesto del modelo

11	Lo mismo que el anterior.	Supuesto del modelo
12	En las filas 12-17 se supuso altos niveles de <i>LFY</i> y <i>TFL1</i> , que pueden semejar la sobreexpresión de los dos. Se supone que el balance de estos dos genes es importante. En estas filas, aunque <i>AG</i> está completamente o parcialmente encendido, la autoactivación no es suficiente pues el represor <i>AP1</i> siempre está activo, evitando que <i>AG</i> alcance su valor máximo.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
13	Mismo argumento que en 12.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
14	Mismo argumento que en 12.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
15	Mismo argumento que en 12.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
16	Mismo argumento que en 12.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
17	Mismo argumento que en 12.	Shannon y Meeks-Wagner, 1993
18	Los represores <i>AP1</i> y <i>LUG</i> (que interactúan para reprimir <i>AG</i> ) están encendidos. También los represores <i>CLF</i> y <i>AP2</i> , están encendidos, por lo tanto <i>AG</i> está apagado.	Gregis et al, 2006 Goodrich et al., 1997 Deyholos and Sieburth, 2000
19	Los represores <i>AP1</i> , <i>LUG</i> , <i>CLF</i> y <i>AP2</i> están encendidos, y entonces, <i>AG</i> está apagado.	Gregis et al, 2006 Goodrich et al., 1997 Deyholos and Sieburth, 2000
20	Todos los represores están encendidos, y entonces <i>AG</i> está apagado.	Supuesto del modelo
21	Mismo argumento que el anterior.	Supuesto del modelo

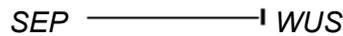
22	Además del balance <i>LFY/TFL1</i> y <i>WUS</i> , en este caso, la autoactivación provoca que <i>AG</i> se exprese al máximo.	Supuesto del modelo
23	Mismo argumento que en el anterior. Como <i>AG</i> está expresado a su máximo nivel, la autoactivación es importante.	Supuesto del modelo

**WUSCHEL (WUS)**

Se ha comprobado experimentalmente que *AG* reprime a *WUS* (Lenhard et al., 2001, Lohmann et al., 2001).



En mutantes *sep1 sep2 sep3*, las flores tienen meristemas indeterminados (Pelaz et al., 2000), sugiriendo que *WUS* se expresa ectópicamente, y que *SEP* es requerido para reprimir *WUS*.



En Espinosa-Soto y colaboradores (2004) se asumió que la actividad de *WUS* depende de su estado de expresión anterior, para evitar la expresión de *WUS* donde *AG* no es activo, como en pétalos. Esta interacción es una predicción del modelo, aún no reportado experimentalmente.



En la Tabla 23 se muestra la tabla de verdad para *WUS* y en la tabla 24, los argumentos que le apoyan.

**Tabla 23. Tabla de verdad para *WUS*. Las X representan cualquier valor.**

	t			t+1
Fila	WUS	AG	SEP	WUS
1	0	X	X	0
2	1	2	1	0
3	1	2	0	1
4	1	0,1	X	1

**Tabla 24. Argumentos que apoyan la tabla de verdad de *WUS*.**

Fila	Argumento de apoyo	Referencia
1	<i>WUS</i> está apagado porque depende del estado de actividad anterior de <i>WUS</i> , que en este caso es también 0.	Supuesto del modelo
2	Todos los represores de <i>WUS</i> considerados están encendidos, y entonces <i>WUS</i> está apagado.	Lenhard et al., 2001, Lohmann et al., 2001 Pelaz et al., 2000
3	<p>La sobreexpresión de <i>AG</i> no es suficiente para reprimir completamente la expresión de <i>WUS</i>, pues las plantas <i>35S::AG</i> muestran una transformación del meristemo de inflorescencia a una flor determinada, pero no una terminación directa del <i>SAM</i> como ocurre en la expresión ectópica de otro represor de <i>WUS</i> (<i>CLAVATA</i>). Esto apoya que se necesitan factores adicionales para reprimir <i>WUS</i>.</p> <p>Como en el fenotipo del triple mutante <i>sep1 sep2 sep3</i>, el meristemo se indetermina, se supone que <i>SEP</i> podría uno de dichos factores, es necesario para reprimir <i>WUS</i>.</p>	<p>Lenhard et al., 2001</p> <p>Pelaz et al., 2000</p> <p>Supuesto del modelo</p>
4	Mismo argumento que en el anterior.	

### 2.3 Versión booleana del modelo de RRG revisado

En Chaos et al., 2006, se publicó la RRG que especifica la determinación temprana de los órganos florales en su versión booleana, es decir, cada gen puede tener solo dos estados, prendido o apagado a diferencia de la versión original donde algunos genes podían tener tres estados. Aunque la dinámica global es la misma, en esta sección se presentan algunas aparentes discrepancias con el modelo reportado en Espinosa-Soto y colaboradores (2004).

## **LEAFY (LFY)**

La regla lógica de *LFY*, en la versión booleana de la red puede resumirse como:

$$LFY = (\text{not } EMF1) \text{ or } (\text{not } TFL1)$$

Es decir, la actividad de *LFY* depende de que no este *EMF1* o que no este *TFL1*.

Entonces, la tabla de verdad de *LFY* se puede reducir y considerar que *LFY* depende solo de sus reguladores negativos, *TFL1* y *EMF1*. De esta manera, en la tabla de verdad booleana, *LFY* esta apagado siempre que sus dos represores están encendidos.

Sin embargo, la evidencia experimental sustenta que *LFY* es influido por *AP1*, *FUL*, *TFL1* y *EMF1* (Espinosa-Soto et al., 2004, sección 2.1).

Esto causaría discrepancia con la fila 10 y 16 del modelo de RRG reportado anteriormente, donde *TFL1* y *EMF1* están encendidos y *LFY* también lo esta. Sin embargo, en el sistema booleano, la fila 10 sería equivalente a la fila 11; y la fila 16 sería equivalente a la fila 13. Entonces aunque se pierde información del mutante de sobreexpresión de *AP1* (donde si  $AP1=2$ , entonces  $LFY= 1$  o  $2$ ), y del doble mutante *ap1 ful* (en el que *LFY* reduce su expresión), los resultados son equivalentes, y los argumentos experimentales discutidos anteriormente se siguen respetando.

## **TERMINAL FLOWER LOCUS 1 (TFL1)**

En el caso de *TFL1*, la regla lógica puede expresarse como:

$$TFL1 = \text{not } AP1 \text{ and not } LFY \text{ and } EMF1$$

Es decir, que la actividad de *TFL1* depende de que no este *AP1* ni *LFY*, pero sí *EMF1*.

Aunque en Espinosa-Soto y colaboradores (2004), se propone que *TFL1* es regulado por *AP1*, *AP2*, *LFY* y *EMF1* y existe evidencia experimental para sustentarlo (ver sección 2.1), en la versión booleana del modelo, *AP2* no participa activamente en la dinámica de *TFL1*. Esto no contradice los datos experimentales de mutantes sencillos y el mutante doble *ap1 ap2*, donde se sugiere que *AP1* y *AP2* tienen funciones parcialmente redundantes (Fig.2 Shannon y Meeks and Wagner, 1993).

La única discrepancia entre las tablas de verdad de ambos enfoques, es en la fila 5 en Espinosa-Soto y colaboradores (2004). Más aún, las opciones alternativas se probaron y los resultados no son significativamente diferentes. Nuevamente, la versión booleana no contradice la evidencia experimental usada en el modelo anterior.

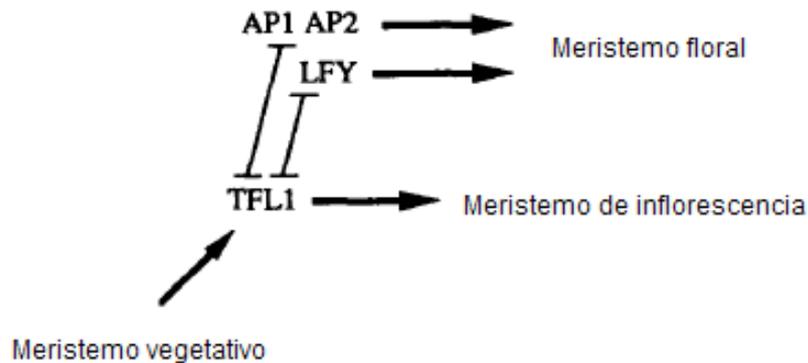


Fig. 2. Esquema de las interacciones genéticas que regulan el desarrollo de la inflorescencia. Las vías de LFY y AP1/AP2 se representan como paralelas para enfatizar que una sola vía no es suficiente para conferir la identidad de meristemo. (Modificado de Shannon y Meeks-Wagner, 1993).

#### 2.4. Relevancia de las nuevas interacciones propuestas

El desarrollo floral ha sido un tema muy estudiado desde hace algunos años por su relevancia en biología del desarrollo y evolutiva y también por su importancia económica.

Desde que el modelo de RRG revisado en este trabajo fue publicado se han reportado nuevas evidencias experimentales relacionadas con este módulo (Ver Apéndice A2 para interacciones consideradas). Sin embargo, no todas se han incluido en el modelo (Tabla 25).

El motivo de su exclusión puede ser porque no son relevantes para el módulo considerado en este trabajo. Así, estas nuevas interacciones podrían formar parte de módulos anteriores o posteriores a la determinación de la identidad de los sumideros de los sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Por ejemplo, no se consideraron genes que podrían formar parte de módulos importantes en el crecimiento y desarrollo de características propias de los diferentes órganos florales (asimetría en pétalos, por ejemplo). A pesar de que el modelo también rescata estados estables que corresponden al meristemo de inflorescencia, éste aspecto no se considera con detalle en este modelo. Por lo tanto, genes que participan en la transición a la floración no fueron incluidos. También puede ser el caso de que existan interacciones que no fueron incorporadas en el modelo porque no exista evidencia experimental suficiente o porque ya se han incluido de manera indirecta. En la tabla 25 se incluyen algunas interacciones reportadas recientemente y relacionadas con el módulo revisado en este trabajo que no fueron incluidos en el modelo.

Por otro lado, las tres nuevas interacciones incluidas en la RRG que determina la diferenciación temprana de los órganos florales se consideran relevantes para dicho módulo.

En el caso de la represión de *AP1* por *AP3/PI*, la interacción es directa pues la proteína PI se une a secuencias blanco en el promotor de *AP1*. Además, *AP1* se expresa más en mutantes *ap3* y *pi* (Sundström et al., 2006). Además, la interacción de los genes tipo A sobre los genes tipo B se había reportado anteriormente, pero no lo contrario. Por lo tanto, probar esta asa de retroalimentación entre los genes A y B con un enfoque dinámico se consideró relevante.

Por otro lado, estudios recientes han mostrado el mecanismo molecular que explica el fenotipo pleiotrópico en mutantes de pérdida de función de *EMF1* (Chen et al., 1999). Se ha sugerido que *EMF1* se asocia con otras proteínas y forma parte de un complejo tipo Polycomb que participa en la inhibición epigenética de genes relevantes para el desarrollo floral (Calonje et al., 2008). En el caso de la represión de *AG* por *EMF1*, *EMF1* se asocia a sitios localizados en el promotor y segundo intrón de *AG* (Calonje et al., 2008) por lo que se considera que esta interacción es relevante.

Además, *AG* es un gen particularmente importante e interesante por su alta conectividad y su relevancia funcional.

Las reglas modificadas se pueden encontrar en el apéndice A1.

Así, el modelo actualizado de esta RRG incorpora interacciones relevantes reportadas recientemente y por lo tanto incorpora más información experimental que podría ser relevante para los trabajos posteriores a éste (por ejemplo, unir este módulo con otros anteriores o posteriores).

**Tabla25.** Interacciones relacionadas con la RRG que determina la diferenciación temprana de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana* que no fueron incluidos en el modelo.

INTERACCIONES NO INCLUIDAS EN EL MODELO		
<i>AGL24+SVP- AG</i>	En el doble mutante <i>agl24 svp</i> , <i>AG mRNAs</i> se detectó en la inflorescencia y meristemos florales desde la etapa 1, indicando expresión temprana de <i>AG</i> . En etapas tardías, <i>AG</i> permanece expresado en todos los organos florales. Probablemente, esta interacción es parte de una RRG diferente y anterior a la determinación del tipo celular de los órganos florales.	Gregis et al., 2006

AGL24+SVP-- AP3	Análisis in situ muestran que en el doble mutante <i>agl24 svp</i> , <i>AP3</i> se expresa en todas las partes del meristemo floral y posteriormente en todos los órganos florales. Probablemente, esta interacción es parte de otra RRG, que es anterior a la determinación temprana de los órganos florales.	Gregis et al., 2006
PNY→LFY PNF→LFY	La expresión de LFY se reduce en el doble mutante <i>pnf</i> después de la inducción floral. Además, los doble mutantes <i>pnf pny</i> no producen flores. Probablemente esta interacción sea parte de un módulo anterior al revisitado en este trabajo.	Anrar et al, 2008.
<i>BEL</i> -- AG	<i>AG</i> se expresa ectopicamente en mutantes <i>blr</i> . Además, <i>BLR</i> se une directamente a secuencias regulatorias cis de <i>AG</i> . Probablemente esta interacción es relevante en organogénesis.	Bao et al., 2004
RBE-- AG	En mutantes <i>rbe</i> , hay expresión ectópica de <i>AG</i> en el segundo verticilo. Por el momento y lugar de expresión, esta interacción podría tener relevancia en la organogénesis.	Krizek et al., 2006.
SUP--  AP3/PI	SUPERMAN (SUP) es considerado un gen cadastral (que determina los límites de un verticilo a otro). Los genes cadastrales, no se incluyen en el modelo porque se considera que estos participan en la disposición espacial de los órganos florales y no en la identidad de los mismos.	Bowman et al.,1992
AP2→PI	En mutantes <i>ap2-2</i> , la expresión de <i>PI</i> es menor y ocupa una menor área comparado con el fenotipo silvestre. Sin embargo, la evidencia experimental no es suficiente y probablemente sea indirecta.	Zhao et al., 2007
AP3--  FUL	El dominio de expresión de <i>FUL</i> se expande al verticilo tres en la etapa tres en mutantes <i>ap3</i> , pero no se ha reportado una interacción directa.	Mandel and Yanofsky, 1995 Sundström et al., 2006
FT--  FUL	<i>FUL</i> se expresa a mayor nivel en plantas 35S:FT-VP16. Esta interacción no se considera, porque podría ser mediada por <i>TFL1</i> y <i>LFY</i> .	Teper-Bamnlker P and Samach A, 2005
FT→SEP3	Sobreexpresión de <i>FT</i> causa expresión ectópica de <i>SEP3</i> en hojas. Sin embargo, se considera que la evidencia experimental no es suficiente.	Teper-Bamnlker P and Samach A, 2005

LFY→CAL	Estudios de activación postraduccional de una forma inducible LFY-GR, demostraron que CAL es un blanco directo de LFY, quien se une al promotor de CAL. Además, AP1 forma heterodimeros con CAL, y la interacción LFY→AP1, ya se incluyó.	William et al.,2004
SEU-- AG	Estudios de inmunoprecipitación de cromatina han mostrado que la proteína SEUSS (SEU) interactúa directamente con elementos reguladores cis de AG. SEU interactúa con LUG y éste ya se incluyó en el modelo. Entonces su inclusión, podría ser en el mismo nodo que LUG.	Sridhar et al, 2006

## 2.4 Resultados

La dinámica de la RRG actualizada se probó con el programa Atalia Versión 1 Beta.

Se encontraron diez sumideros puntuales que corresponden a los reportados previamente (Tabla 14). Al respecto, estos estados de activación genética o sumideros de la red se han interpretado como tipos celulares (Kauffman, 1993), y en este caso corresponden a tipos celulares del meristemo de inflorescencia y a los tipos celulares de los primordios de los órganos florales.

**Tabla 14. Los 10 estados estables o sumideros a partir de todas las posibles condiciones iniciales ( $N = 2^{13}$ ).**

Configuración del sumidero	Tipo celular al que corresponde	Tamaño de la cuenca del sumidero
0001000010000	Inflorescencia 1	136
0001000010001	Inflorescencia 2	136
0001001010000	Inflorescencia 3	72
0001001010001	Inflorescencia 4	72
0110110000100	Sépalos	812
0110110001111	Pétalos 1	12
0110110001110	Pétalos 2	824
1100110101100	Carpelos	2970
1100110101110	Estambres 1	94
1100110101111	Estambres 2	3064

### 2.4.1 Simulación de mutantes

También se simularon algunos mutantes de pérdida de función y ganancia de función de los genes ABC, fijando la salida en 0 o en 1, respectivamente.

Los mutantes *ap1* y *ap2* pierden sépalos y pétalos; y en su lugar poseen carpelos y estambres en mayor número (Riechmann y Meyerowitz.1997).

Ambos mutantes simulados pierden los sumideros que corresponden a sépalos y pétalos (Tabla 26 y 27). Y el tamaño de las cuencas de carpelos y estambres aumentan de tamaño. Así, el modelo es capaz de rescatar los datos experimentales previamente reportados.

Los mutantes de la función B, no presentan pétalos y estambres (Riechmann JL, Meyerowitz EM.1997). En la tabla 28 y 29 se muestran los resultados de la simulación de los mutantes *ap3* y *pi*, respectivamente. En el caso del mutante *ap3*, se observa que se pierden todos los sumideros que corresponden a pétalos y estambres, lo que es consistente con lo reportado experimentalmente.

**Tabla 26**

Mutante <i>ap1</i>	Tamaño
Sumidero	
Inflorescencia 1	160
Inflorescencia 2	160
Inflorescencia 3	96
Inflorescencia 4	96
Sépalos	0
Pétalos 1	0
Pétalos 2	0
Carpelos	3756
Estambres 1	84
Estambres 2	3840

**Tabla 27**

Mutante <i>ap2</i>	Tamaño
Sumidero	
Inflorescencia 1	136
Inflorescencia 2	136
Inflorescencia 3	72
Inflorescencia 4	72
Sépalos	0
Pétalos 1	0
Pétalos 2	0
Carpelos	3782
Estambres 1	106
Estambres 2	3888

**Tabla 28**

Mutante <i>ap3</i>	Tamaño
Sumidero	
Inflorescencia 1	136
Inflorescencia 2	136
Inflorescencia 3	72
Inflorescencia 4	72
Sépalos	824
Pétalos 1	0
Pétalos 2	0
Carpelos	3064
Estambres 1	0
Estambres 2	0
sepaloides	824
carpeloides	3064

Para el mutante *pi*, se pierde un sumidero de pétalos y uno de estambres. Este puede ser el caso de variantes de la mutación *pi*, dónde los efectos homeóticos no son tan pronunciados. Se considera que el mutante también es consistente con lo reportado experimentalmente.

De manera similar, la simulación de la mutación *ag* pierde los sumideros que corresponden a carpelos y estambres, su meristemo se indetermina y muestra sépalos y pétalos en mayor número (Riechmann y Meyerowitz.,1997). Los resultados de la simulación aparecen en la tabla 30. En este caso, también se recuperan sumideros

parecidos pero no idénticos a sépalos y pétalos, mismos que se designan como sepaloides y petaloides, respectivamente.

**Tabla 29**

<b>Mutante <i>pi</i>,</b>	
Sumidero	Tamaño
Inflorescencia 1	136
Inflorescencia 2	136
Inflorescencia 3	72
Inflorescencia 4	72
Sépalos	824
Pétalos 1	824
Pétalos 2	0
Carpelos	3064
Estambres 1	3064
Estambres 2	0

**Tabla 30**

<b>Mutante <i>ag</i></b>	
Sumidero	Tamaño
Inflorescencia 1	136
Inflorescencia 2	136
Inflorescencia 3	72
Inflorescencia 4	72
Sepalos	2404
Petalos 1	20
Petalos 2	2424
Carpelos	0
Estambres 1	0
Estambres 2	0
Sepaloides	1444
Petaloides 1	20
Petaloides 2	1464

**Tabla 31**

<b>Mutante <i>35S::AG</i></b>	
Sumidero	Tamaño
Inflorescencia 1	136
Inflorescencia 2	136
Inflorescencia 3	72
Inflorescencia 4	72
Carpelos	3744
Estambres1	144
Estambres2	3888

El fenotipo de la sobreexpresión de AG bajo el promotor 35S es la pérdida de sépalos y pétalos, y la aparición de estructuras con características de carpelos y estambres (Riechmann y Meyerowitz.1997). En el mutante simulado, se pierden los sumideros de los primeros verticilos y los sumideros de estambres y carpelos se hacen mayores. Esto es consistente con los datos experimentales y el modelo nuevamente es capaz de reproducir el comportamiento del sistema real (Tabla 31).

## **2.5 Contraste de los resultados obtenidos con un enfoque booleano y con un enfoque continuo.**

En Mendoza y Xenarios, 2006 se propone un método alternativo al usado por Espinosa Soto y colaboradores, 2004 para analizar la dinámica de redes de regulación genética.

Este método involucra el uso de un sistema de ecuaciones diferenciales que permite traducir la información estática de conectividad de cierta red de regulación genética en un sistema dinámico mediante la construcción paralela de dos sistemas dinámicos uno discreto y otro continuo (Fig 3).

Este método convierte la topología de una RRG dada en un sistema dinámico discreto, y usa un algoritmo de decisión binaria para identificar todos los estados estables del sistema analíticamente. Posteriormente, el algoritmo usado crea un sistema dinámico continuo y localiza sus estados estables numéricamente, los cuales se localizan cerca de los estados estables del sistema discreto (Fig. 3).

Después, el algoritmo resuelve numéricamente el sistema dinámico continuo comenzando con un estado inicial y una serie de valores para todos los parámetros. Los estados iniciales del sistema continuo son los estados estables encontrados en la aproximación discreta de la red. Este sistema permite hacer simulaciones en el sistema continuo, permitiendo la modificación de varios parámetros (Mendoza y Xenarios, 2006).

Este algoritmo ha rescatado correctamente el comportamiento cualitativo de la red de regulación genética que subyace la diferenciación de células T de ayuda del sistema inmune en humanos (Mendoza y Xenarios, 2006).

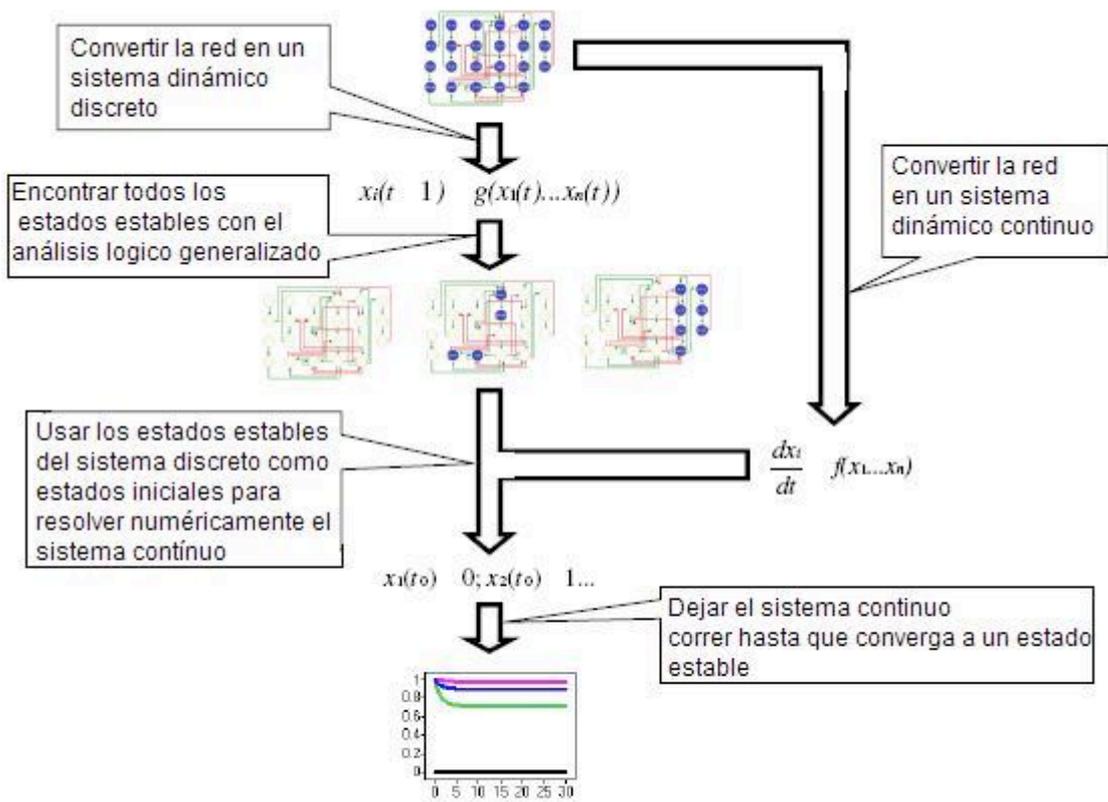


Fig. 3. Representación esquemática para construir un modelo dinámico de una red de regulación genérica y encontrar sus estados estables (Tomado de Mendoza-Xenarios, 2006).

Entonces, a manera de contrastar los resultados entre un enfoque discreto y continuo, la RRG que determina los órganos florales revisitada en esta sección se analizó usando una modificación del método antes mencionado que permite incorporar tablas de verdad.

En el sistema continuo se probaron 5000 condiciones iniciales y como resultado se obtuvieron los mismos sumideros; el tamaño de las cuencas también es similar (Tabla 21). Por lo tanto, los resultados obtenidos con este método alternativo son comparables con los obtenidos con el método discreto

Tabla 32

Sumidero	Modelo discreto	Modelo continuo
Inflorescencia 1	1.660156	4.74
Inflorescencia 2	1.660156	4.77

Inflorescencia 3	0.878906	4.01
Inflorescencia 4	0.878906	4.06
Carpelos	36.254883	21.79
Sépalos	9.912109	11.01
Estambres 1	37.402344	28.46
Estambres 2	1.147461	06.54
Pétalos 1	10.058594	12.74
Pétalos 2	0.146484	1.89

## 2.6 Discusión y perspectivas

El modelo de RRG que subyace tras la diferenciación temprana de los órganos florales revisitada en este capítulo, ofrece una explicación mecanicista y dinámica para el modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991), pues además de reproducir el patrón de expresión genética observada en el fenotipo silvestre y en mutantes reportados experimentalmente, el modelo predice que la determinación del destino celular en una etapa temprana del desarrollo depende de la arquitectura de la red y de las reglas lógicas que determinan las relaciones entre los genes. De esta manera este modelo recupera el módulo básico que determina cuatro regiones en el meristemo de inflorescencia y la diferenciación temprana de los órganos florales.

El modelo además, ha demostrado ser predictivo pues varias de las interacciones propuestas han sido corroboradas experimentalmente. Como son: 1), la autoactivación de *AG* en Gómez-Mena y colaboradores., (2005), y 2) que un gene de identidad de meristemo floral podría actuar positivamente sobre el nodo *SEP* (*SEP1-3*) (Schimid et al., 2003).

El modelo actualizado es capaz de recuperar los diez sumideros que corresponden a configuraciones multigénicas de expresión observadas en el meristemo de inflorescencia, y en las células de sépalos, pétalos, estambres y carpelos durante las etapas tempranas del desarrollo floral. Asimismo, los mutantes simulados muestran una clara correspondencia con lo reportado experimentalmente, validando el modelo y extendiendo su poder explicativo y predictivo a posibles dobles y triples mutantes que no hayan sido reportados experimentalmente.

Además, es plausible agregar otras interacciones en el modelo a medida que los datos experimentales se hacen disponibles, como fue el caso de las tres modificaciones planteadas en este capítulo (Fig. 1). De esta manera, la RRG actualizada incorpora

detalles experimentales relevantes que podrían ser importantes en trabajos posteriores (por ejemplo, unir módulos diferentes).

El tamaño de las cuencas del modelo de RRG actualizado varía muy poco con respecto a otras versiones (Espinosa-Soto et al., 2004 y Chaos et al., 2006). Así, las cuencas de los sumideros correspondientes a estambres y carpelos son notablemente más grandes que las otras. Esto puede deberse a que desde el punto de vista funcional es conveniente que estos destinos celulares que determinarán el desarrollo de los órganos reproductivos sean los más robustos a alteraciones ambientales o genéticas (Espinosa-Soto et al., 2004).

Por otro lado, el hecho de que con dos métodos diferentes (uno discreto y otro continuo), se obtengan los mismos sumideros y su tamaño sea similar, hacer notar que la RRG modelada es muy probablemente certera y que el modelo ha capturado correctamente el modulo que determina cuatro regiones en la inflorescencia y la diferenciación temprana de los órganos florales.

También, este modelo de RRG ha probado poseer algunas propiedades que se han postulado ser compartidas por los sistemas biológicos: ser robusta y al mismo tiempo flexible, con una dinámica en la frontera entre el orden y el caos (Balleza et al., 2008).

De la misma manera, este modelo ha sido útil para estudiar las diferencias en la topología de la red entre *Arabidopsis thaliana* y *Petunia hybrida* (Espinosa-Soto et al., 2004), sugiriendo que este modelo se puede extender a estudios comparativos y evolutivos (ver capítulo 3), y mostrando que los sumideros o tipos celulares primordiales son robustos a duplicaciones como se dieron en el segundo taxa que, sin embargo, tiene la morfología floral estereotípica de todas las angiospermas.

Así, aunque algunas características de las flores, tales como la asimetría floral (Cubas et al., 2001) han aparecido varias veces de manera independiente en respuesta a algunas fuerzas de selección (como abundancia de polinizadores, ver un ejemplo en Kim et al., 2008), o están determinadas por QTL (Anastasiou y Lenhard, 2007), el plan corporal básico de las flores, parece estar muy conservado, al menos entre las eudicotiledoneas (Endress, 2006). Esta conservación del plan corporal sugiere que este módulo es robusto y ha sido conservado durante la evolución de las angiospermas.

Una desventaja de este modelo es que en algunos casos donde la regulación es dada por la combinación de reguladores positivos y negativos, y la dominancia entre ellos no es clara, se pueden hacer conclusiones arbitrarias. Una posible solución a este problema es asignar cierta probabilidad a una salida (estado de un gen), de tal manera que el peso relativo de las entradas puedan variar y además posibilita la inclusión de estocasticidad en la actualización de la red (Savage et al., 2008).

Dentro de las perspectivas, se podría construir la versión asincrónica de este modelo, inicializando los genes en el orden en el que se presentan en el desarrollo. Para esto será necesario generar experimentalmente datos más precisos sobre la expresión de genes y proteínas importantes durante el desarrollo; las técnicas de microscopia confocal hacen plausible esta posibilidad (ver capítulo 3).

Aunque la mayoría de los nodos incluidos en este modelo representan factores de transcripción, recientemente se han descrito otros niveles de regulación que son fundamentales durante el desarrollo, por ejemplo, cambios epigenéticos como cambios en las propiedades de histonas y cambios en la condensación de cromatina (Shaw P. y Dolan, 2008). Entonces, incluir este tipo de regulación podría ser importante en algunos casos.

Además, este modelo podría usarse como antecedente para la construcción de otros módulos funciones relevantes en el desarrollo (ver capítulo 3). Por ejemplo, se ha sugerido que la transición a la floración podría estar determinada por una RRG compleja que antecede a la revisitada en esta sección (Parcy, 2005), actuando como swich entre el estado de flor y no flor. En ella los llamados genes integradores de las vías de floración (*SOC*, *FT*, etc) seguramente juegan un papel central. Este módulo debe estar conectado con el que ha sido descubierto en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas y revisitado en esta tesis.

De la misma manera, otros módulos importantes en estadíos más tardíos del desarrollo floral podrían regular el desarrollo de los órganos, incluyendo el crecimiento y forma final de cada uno de ellos.



### **3. Reflexiones finales**

*En este capítulo se discute la importancia y utilidad de los modelos de redes de regulación genética. Además, se presentan perspectivas de este enfoque, elucubrando sobre su aplicación a preguntas evolutivas y de morfogénesis.*

"Mathematics is biology's next microscope, only better; biology is mathematics' next physics, only better." Joel Cohen, Rockefeller and Columbia Universities, New York.

### 3.1 La importancia y la utilidad de los modelos matemáticos

La acumulación de datos cualitativos de diversos enfoques como genética, bioquímica y de genómica funcional enfocados al estudio de biología del desarrollo han dejado en evidencia que dada la complejidad de las interacciones y la no linealidad características del desarrollo, es necesario el uso de herramientas matemáticas y computacionales que permitan integrar y analizar toda esta información.

De esta manera, los modelos de RRG enfocados al estudio de biología del desarrollo han permitido abordar preguntas relevantes a la dinámica del sistema que van desde el comportamiento de las interacciones y el estudio de propiedades emergentes hasta la conservación evolutiva de la estructura de las redes. En particular, los modelos de redes booleanas han sido usados para capturar la “mecánica estadística” de los sistemas genéticos (Kauffman, 1993). Tales idealizaciones han permitido la exploración de sistemas altamente complejos y de propiedades genéricas que gobiernan la estructura y función de ensamblajes de redes (Alon, 2007).

De entre las posibles aplicaciones, estos enfoques han permitido la predicción de nuevas interacciones (ejemplos en Espinosa-Soto et al., 2004 y Basso et al., 2005) y la identificación de componentes y vías cruciales para el comportamiento global.

Asimismo, se puede obtener predicciones de los efectos de perturbaciones específicas a las redes genéticas de regulación (Li et al., 2007), y predecir múltiples pequeñas perturbaciones que produzcan largos efectos cuando se combinan.

También, los modelos matemáticos han sido útiles para la determinación de parámetros esenciales (como en Díaz y Álvarez-Buylla, 2006) y la elucidación de características compartidas por estos módulos (como robustez, flexibilidad, criticalidad, etc., ejemplo en Balleza et al., 2008).

Adicionalmente, estos enfoques pueden servir para probar hipótesis *in silico*, y para el diseño de nuevos experimentos, proporcionando un marco teórico que complementa los diseños experimentales. Por ejemplo, la modelación matemática puede permitir abordar preguntas que no sean accesibles con experimentación. De esta manera, los modelos complementarían los experimentos y éstos a su vez, ayudarían a hacer más realista el modelo, estableciendo un tipo de retroalimentación entre los dos enfoques.

Por último, aunque los modelos descritos en este trabajo se han enfocado a resolver problemas del desarrollo, este tipo de aproximación también puede aplicarse a identificar los componentes esenciales e interacciones de regulación, cuya alteración lleve a cambios funcionales significativos en otros contextos (como cambios en el malfuncionamiento de células humanas como en el cáncer, etc.).

### **3.2 Sobre los diferentes enfoques**

Los modelos discretos han probado ser útiles en el estudio de la dinámica de procesos relacionados a diferenciación celular (ver capítulo 2, Li et al., 2004; Li et al., 2006; Huang y Ingber, 2007; Benitez et al., 2008); sin embargo, otros procesos cuyos cambios son más cuantitativos, como las modificaciones epigenéticas en el locus FLC (Shindo et al., 2006) considero que podrían ser mejor descritas con un modelo continuo.

Otros ejemplos apuntan ventajas de modelar de manera continua la transducción de señales. Tal como lo muestra el modelo continuo con ecuaciones diferenciales de la vía de señalización del etileno y su respuesta genética en *Arabidopsis thaliana* donde se combina la cinética química para proteínas señalizadoras con una descripción probabilística de los estados de los genes implicados (Díaz y Álvarez-Buylla, 2006). Este modelo reproduce las diferencias observadas experimentalmente en diferentes concentraciones de etileno.

También, a medida que la información experimental cuantitativa sea disponible, será necesario integrarla, haciendo posible la construcción de modelos continuos más realistas. Otra ventaja de los modelos continuos es que podrían hacer predicciones más cuantitativas.

No obstante, una desventaja de las ecuaciones diferenciales ordinarias es que asumen que los cambios de estado son continuos y deterministas, y esto no es necesariamente cierto. Entonces, se ha apuntado que el mayor potencial para describir con exactitud los sistemas biológicos es el enfoque continuo y estocástico, pues cierta variabilidad ocurre intrínsecamente en los procesos celulares. Sin embargo, este enfoque también es el que requiere una mayor cantidad de información, una limitante que no puede pasar desapercibida (Albert, 2007).

Quizá, como sugiere Reka Albert (2007), un enfoque híbrido podría ser ideal para considerar dinámicas discretas y continuas.

Entonces el mejor enfoque para elaborar modelos que ofrezcan una explicación mecanicista, depende de las características del sistema a modelar, de la pregunta a responder y de la disponibilidad de información.

Particularmente interesante es que a medida de qué estas técnicas se hagan extensivas en biología molecular, podemos presenciar la transición de una biología molecular descriptiva a otra más predictiva (Goodwin, 1996).

Por otro lado, aunque los enfoques top-down se han utilizado principalmente para inferir la topología de redes de regulación genética, algunos esfuerzos se han hecho para además estudiar la dinámica de las mismas. Por ejemplo, en Chechik et al., 2008 se localizan motivos estructurales que se relacionan con su expresión en el tiempo y la afinidad en los promotores de las enzimas involucradas en el metabolismo de *Sacharomices cerevisiae*, dando información sobre cómo y cuándo se activan cada nodo en una determinada red. Otro ejemplo lo constituyen las redes bayesianas dinámicas (Kim et al., 2003).

Así, aunque la inferencia de la topología de las RRG es sumamente importante, integrar esta información con la proporcionada con los enfoques bottom up, podría permitir estudios dinámicos, predictivos y explicativos.

### **3.3 Redes para contestar preguntas evolutivas.**

El uso de los modelos de RRG también puede extenderse a estudios de evolución fenotípica, pues permiten conectar las bases genéticas del desarrollo con una parte de la variación en los fenotipos. Así, el estudio de las redes genéticas de regulación que determinan puntos claves en el desarrollo de los organismos es un enfoque nuevo a un problema antiguo: cómo cambios en el programa genético determinan cambios en el plan corporal.

Se ha sugerido que el plan corporal es controlado por redes de regulación genética y por lo tanto parte de la evolución de los planes corporales debe depender de los cambios en la arquitectura de las mismas (Davidson y Edwin, 2006). Además, los

planes corporales están altamente conservados, sugiriendo que existen redes genéticas que deben ser parecidas (en interactores y/o en topología).

De la misma manera, se ha propuesto que la organización de los conjuntos de genes de regulación (factores de transcripción, secuencias en cis que son blanco de éstos, etc.) es modular, por lo tanto, la elucidación de las redes de regulación genética que forman parte de los módulos que determinan puntos claves en el desarrollo es fundamental para proporcionar una explicación mecanicista al problema de cómo se han creado la enorme variedad de formas que observamos en la naturaleza. Ejemplos de la existencia de estos módulos conservados serían para plantas, la red revisitada en este trabajo, y en animales la especificación del endomesodermo en equinodermos y del sistema nervioso en los bilateria, entre otros (Davidson y Edwin, 2006).

Una primera aproximación podría consistir en hacer estudios comparativos de los elementos y asociaciones presentes en las redes de regulación genética, pues esto podría permitir el estudio del origen y evolución de módulos relevantes para la determinación del plan corporal (por ejemplo, en Espinosa-Soto et al., 2004 se compara la red que determina la identidad de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana* y *Petunia hybrida*, sería importante extender este estudio con otras especies).

Entonces, sería interesante encontrar módulos cuyos componentes sean homólogos, como la cascada de proteínas quinasas durante la mitosis, que definan una clase funcional de un módulo conservado, en este caso, de señales de transducción (Hartwell et al., 1999). También identificar si existen módulos que puedan estar relacionados (en función, por ejemplo) aunque no haya una relación de ancestría-descendencia, y en este caso representarían convergencias. Además, comparar módulos con una función común en diferentes organismos podría ser una herramienta útil para elucidar las restricciones evolutivas que los han moldeado. Elucidar ambos casos puede ser de gran importancia para entender el comportamiento celular y cómo estos módulos se han formado durante la evolución.

Asimismo, en aquellas características que se han adquirido varias veces (por ejemplo, la segmentación en animales y la asimetría floral en plantas), y que comparten ciertos componentes genéticos clave, sería interesante analizar si estos genes se han cooptado de manera independiente varias veces, y si forman parte de módulos parecidos o muy diferentes y cómo esto ha ayudado a la formación de nuevas estructuras. Es decir, elucidar si estos genes clave están involucrados en redes con topología similar

para dar lugar a un determinado carácter y si existe una conservación a nivel de otros interactores.

Sería interesante simular, cómo a partir de una red basal, se puede llegar a diferentes tipos de redes. Por ejemplo, si la flor surgió por un fenómeno de co-opción de genes implicados en el desarrollo de la hoja (Parcy et al., 1998), sería interesante encontrar el modulo del cuál formaban parte y simular cómo a partir del ensamble con otros componentes, éste dio lugar a estructuras diferentes.

De esta manera, el estudio de las RRG puede utilizarse para investigar cómo la topología de las redes y en consecuencia, de los caracteres que están determinados por éstas, se ha restringido durante la evolución (Salazar-Ciudad y Jernvall, 2002).

Sin embargo, aunque modelos de RRG han sido exitosos para recuperar la lógica que determina patrones de expresión genética durante el desarrollo en plantas y animales (por ejemplo, Von Dassow et al., 2000; Albert and Othmer, 2003; Espinosa-Soto et al., 2004; Jonsson et al., 2005; Li et al., 2006; Benítez et al., 2008), éstos aún no han sido explícitamente incorporados en los modelos evolutivos de morfogénesis.

Para incluir morfogénesis en estos modelos, quizá sea necesario acoplar estos modelos de RRG con modelos de crecimiento.

Al respecto, para modelar crecimiento se han distinguido varios enfoques. Por ejemplo el uso de resortes que involucran un componente mecánico para modelar el crecimiento. Aunque tales modelos no representan exactamente a la planta, éstos presentan una primera aproximación para acoplar la mecánica de la pared celular con señalización y un modelo de red de regulación genética (Heisler y Jönsson, 2007; Dupuy et al, 2008). Incluir la dinámica del citoesqueleto en estos modelos podría ser crucial para incluir las bases mecánicas de la morfogénesis (importancia de restricciones mecánicas en la forma puede encontrarse en un reciente trabajo en Hamant et al., 2008).

Otro enfoque es el usado en Rollan-Lagan y colaboradores (2003), donde estudian la dinámica del crecimiento durante el desarrollo del pétalo de *Antirrhinum majus* usando una combinación de técnicas de análisis clonal y técnicas computacionales.

Por otra parte, al considerar crecimiento durante la morfogénesis, el conocimiento preciso de los patrones espaciales y temporales de la división celular, incluido el número y orientación de las divisiones, y el conocimiento de la expansión celular es central (Meyerowitz, 1997, Reddy et al., 2004; Reddy et al., 2007). Actualmente, existen técnicas de microscopía confocal que permiten cuantificar el patrón de división celular, e integrar el comportamiento celular en el tiempo para visualizar el crecimiento celular (Reddy et al., 2004). Este tipo de estudios permiten una descripción dinámica de algunos aspectos del crecimiento: la tasa de división celular, la orientación de la división celular y los patrones asociados con morfogénesis de un determinado órgano.

De la misma manera, el uso de imágenes confocales permite extraer un templado celular e incluir patrones de expresión genéticos y datos de localización de proteínas con la dinámica del cambio de forma celular, que pueden ser incorporados en un modelo (ejemplo en Jönsson et al., 2005).

Asimismo, como las células ajustan su plano de división en respuesta a señales temporales relacionadas con el desarrollo del primordio (Reddy et al., 2004), seguramente un modelo encaminado a morfogénesis establecerá un tipo de retroalimentación desde este punto de vista (por ejemplo, retroalimentación con la concentración de hormonas vegetales).

Además del conocimiento de la dinámica de división celular otra herramienta experimental que podría retroalimentar un modelo encaminado al estudio de la morfogénesis sería examinar los efectos de perturbaciones en la división celular y dominios de expresión celular en tiempo real (Reddy et al., 2007).

De esta manera, el uso de técnicas de microscopía confocal y de perturbación, pueden proporcionar detalles para parametrizar los datos en los modelos. A su vez, estas técnicas experimentales pueden proporcionar datos de la dinámica celular que se requieren para construir modelos mecanicistas y para probar los modelos adecuadamente.

Así, modelos de redes de regulación o de señalización pueden ser acopladas con modelos de crecimiento celular y relaciones mecánicas para explicar la formación de patrones espacio-temporales en tejidos. Por ejemplo, en un modelo de la posición de primordios foliares influenciados por el patrón de expresión y concentración de auxinas predice que el mecanismo implicado en el surgimiento de primordios foliares es una

retroalimentación entre la concentración relativa de auxinas en células adyacentes y la dirección de la salida de auxinas (Jonson et al., 2006).

Otro ejemplo, es un modelo que es capaz de reproducir la morfología de los dientes en mamíferos, al acoplar la formación de patrones de expresión de genes importantes y la morfología tridimensional de los mismos (Salazar-Ciudad y Jernvall, 2002). Por lo tanto, modelos que incorporen la morfología tridimensional y el patrón de expresión genética serían cruciales para establecer la liga entre genotipo y fenotipo.

En el caso revisado en el segundo capítulo, podría ser útil entender cómo la RRG que determina los órganos florales, se interconecta con las vías de señalización responsables del crecimiento (Anastasiou y Lenhard, 2007).

Estos enfoques pueden acercarnos a cómo es que los mecanismos que determinan las formas y los tamaños de los órganos en los seres vivos y que contribuyen a la diversidad que observamos actualmente, han sido moldeados a lo largo de la historia evolutiva.

Por lo tanto, el reto es integrar los modelos de redes de regulación genéticas en modelos de crecimiento e integrar estos modelos con interacciones célula-célula implicadas en la morfogénesis (Shapiro et al., 2003).

Por otro lado, las células son capaces de integrar información de múltiples fuentes, y responder acertadamente a diferentes estímulos externos e internos. Se ha propuesto que las respuestas celulares podrían ser descritas por el patrón de conexiones entre los diferentes módulos funcionales (Hartwell et al., 1999). El reto es elucidar cómo éstos se conectan entre sí asegurando la respuesta indicada a señales internas y externas. Por lo tanto, la caracterización y estudio dinámico de estos módulos es crucial para entender el comportamiento a nivel celular.

Una manera de encontrar estos módulos, podría ser mediante su construcción y ensamble en un tipo celular diferente. Actualmente, con técnicas de biología sintética esto se hace plausible (Novák y Tyson, 2008).

Otra manera, es crear modelos teóricos del sistema y verificar que las predicciones coinciden con la realidad, como en el caso revisado de la RRG del desarrollo floral (Espinosa-Soto et al, 2004; ver sección 2.6).

De igual importancia sería encontrar principios generales que gobiernan la estructura y el comportamiento de los módulos, y cómo han sido moldeados por restricciones evolutivas. Por ejemplo, en un reciente trabajo se analiza el comportamiento dinámico de redes genéticas de regulación de diferentes organismos, y se encuentra que todas estas redes muestran un comportamiento crítico, es decir, en la frontera entre el caos y el orden (Balleza et al., 2008). Se muestra que tal dinámica puede favorecer la robustez de los circuitos genéticos frente a perturbaciones externas e internas y al mismo tiempo permitir que sean lo suficientemente flexibles para cambiar.

Finalmente, los modelos de RRG ofrecen un campo amplio e interesante para abordar preguntas de biología de desarrollo. Además, bajo la perspectiva de los sistemas complejos, constituyen una alternativa al enfoque reduccionista y son un excelente principio para pensar en la acción concertada, primero entre los componentes de los módulos funcionales y después entre biología celular, bioquímica, ecología, desarrollo y evolución, es decir, en una biología más integrativa.



## FUENTES DE CONSULTA

- Albert I, Thakar J, Li S, Zhang R, Albert R(2008) Boolean network simulations for life scientists. Source Code Biol Med. 14;3:16.
- Albert, R, and Othmer, HG (2003). "The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*." *J. Theor. Biol.* 223, 1–18.
- Albert R. (2007). Network inference, analysis, and modeling in systems biology. *Plant Cell.* 19(11):3327-38.
- Albert R. y Asshamann S (2009) *Discrete dynamic modeling with asynchronous update or, how to model complex systems in the absence of quantitative information.* Methods in Molecular Biology: Plant Systems Biology, ed. D. Belostotsky. Totowa NJ: Humana Press, in press.
- Alon Uri (2007). An Introduction to Systems Biology. Design principles of biological circuits. Amazon.
- Alvarez-Buylla ER, Benítez M, Dávila EB, Chaos A, Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P. (2007). Gene regulatory network model for plant development. *Curr Opin Plant Biol.*10(1):83-91.
- Álvarez-Buylla, E.R., Benítez, M., Bowman, J., Corvera, A., Chaos, A., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Piñeyro, A. and Sánchez-Corrales, Y.E. (2009) "FLOWER DEVELOPMENT" en el libro: The Arabidopsis Book. Recopilación de Ottoline Leyser. (en prensa).
- Alvarez-Buylla ER, Chaos A, Aldana M, Benítez M, Cortes-Poza Y, Espinosa-Soto C, Harta sánchez DA, Lotto RB, Malkin D, Escalera Santos GJ, Padilla-Longoria P. (2008).b. Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLoS ONE.* 3(11):e3626.
- Assmann S.M. y Albert, R. (2009). [Discrete dynamic modeling with asynchronous update or, how to model complex systems in the absence of quantitative information.](#) Methods in Molecular Biology: Plant Systems Biology, ed. D. Belostotsky. Totowa NJ: Humana Press, in press.
- Anastasiou E, Lenhard M. (2007). Growing up to one's standard. *Curr Opin Plant Biol.*10(1):63-9. Epub 2006 Nov 28.
- Balleza E, Alvarez-Buylla ER, Chaos A, Kauffman S, Shmulevich I, Aldana M. (2008) Critical dynamics in genetic regulatory networks: examples from four kingdoms. *PLoS ONE.* 18;3(6):e245
- Bansal M, Belcastro V, Ambesi-Impiombato A, di Bernardo D.(2007) How to infer gene networks from expression profiles. *Mol Syst Biol.* 2007;3:78.
- Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A. (2005). Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet.* 37(4):382-90.
- Barabasi A.L., Oltvai Z.N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet,* 5(2):101-113.
- Benítez M, Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla ER. (2008) Interlinked nonlinear subnetworks underlie the formation of robust cellular patterns in Arabidopsis epidermis: a dynamic spatial model. *BMC Syst Biol.*
- Calonje M, Sanchez R, Chen L, Sung ZR. (2008). EMBRYONIC FLOWER1 participates in polycomb group-mediated AG gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell.* 20(2):277-91.
- Castillejo C, Romera-Branchat M, Pelaz S. (2005). A new role of the Arabidopsis SEPALLATA3 gene revealed by its constitutive expression. *Plant J.* 43(4):586-96.
- Chaos, Á. 2008. Atalia versión 1. Publicado por el autor, México.

- Chaos Á., Aldana M., Espinosa-Soto C., García-Ponce B., Garay A., Álvarez-Buylla E. (2006) From genes to flower patterns and evolution: Dynamic models of gene regulatory networks. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25:278–289
- Chechik G, Oh E, Rando O, Weissman J, Regev A, Koller D. (2008) Activity motifs reveal principles of timing in transcriptional control of the yeast metabolic network. *Nat Biotechnol.* 2008 Nov;26(11):1251-9.
- Chen, L. Cheng, J., Castle, L., y Sung, Z.R. (1997) EMF genes regulate Arabidopsis inflorescence development. *Plant Cell*. 9, 20011-2024.
- Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D. (2002). HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Development* 129:1085–1094.
- Chen X. (2004.) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303:2022–2025.
- Chae E, Tan QK, Hill TA, Irish VF. (2008) An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development*. 135(7):1235-45.
- Coen ES, Meyerowitz E. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31– 37.
- Conner, J., and Liu, Z. (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12902–12907.
- Cubas P., Coen E., Martínez Zapater J.M. (2001). Ancient asymmetries in the evolution of flowers. *Current Biology*, 11:1050-1052.
- Davidson EH y Edwing DH, (2006) Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science*. 10;311(5762):796-800.
- Deyholos, M.K., and Sieburth, L.E. (2000). Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the AGAMOUS second intron. *Plant Cell* 12, 1799–1810.
- Diaz J, Alvarez-Buylla ER. (2006). A model of the ethylene signaling pathway and its gene response in Arabidopsis thaliana: pathway cross-talk and noise-filtering properties. *Chaos* 16:023112.
- Di Ventura B, Lemerle C, Michalodimitrakis K, Serrano L. (2006). From in vivo to in silico biology and back. *Nature*. 5;443(7111):527-33.
- Dobzhansky, Theodosius. (1973). "Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution." *The American Biology Teacher*. Vol. 35: 125-129.
- Drews, G.N., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1991). Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell* 65, 991–1002.
- Dupuy L, Mackenzie J, Rudge T, Haseloff J. (2008) A system for modelling cell-cell interactions during plant morphogenesis. *Ann Bot (Lond)*.101(8):1255-65.
- Endress, P.K. (2006). "Angiosperms floral evolution: Morphological Developmental Framework". In: *Advances in Botanical Research, incorporating advances in plant pathology. Developmental genetics of the flower*, Soltis, D.E. Leebens-Mack; J.H., and Soltis P.S. Ed. California, Academic Press.
- Espinosa-Soto, C., Padilla Longoria, P., Alvarez-Buylla, E. (2004). A gene regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell*. 6(11), 2923-39
- Ferrándiz C., Gu, Q., Martienssen, R., Yanofsky, M.F. (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* 127, 725-734.
- Garg A, Di Cara A, Xenarios I, Mendoza L, De Micheli G. (2008) Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics*. 1;24(17):1917-25.
- Gregis V., Sessa A., Colombo L., Kater M. (2006). AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in Arabidopsis.

The Plant Cell, Vol.18, 1373-1382.

- Goldbeter, A. (2002). Computational approaches to cellular rhythms. *Nature* 420: 238–245.
- Gómez-Mena C, de Folter S, Costa MMR, Angenent GC, Sablowski R. (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* 132:429–438.
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., and Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386, 44–51.
- Goodwin Brian.(1996) How the Leopard changed its spots. The evolution of complexity. Edit. Simon & Schuster New York.
- Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J. (2008) Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science*; 322(5908):1650-5.
- Hartwell, L., Hopfield, J.J., Leibler, S., and Murray, A.W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature* 402, C47–C52.
- Haung MD, Yang CH., (1998) EMF genes interact with late-flowering genes to regulate *Arabidopsis* shoot development. [Plant Cell Physiol](#). 39(4):382-93.
- Heisler MG, Jönsson H. (2007). Modelling meristem development in plants. *Curr Opin Plant Biol*.10(1):92-7.
- Hill, T.A., Day, C.D., Zondlo, S.C., Thackeray, A.G., and Irish, V.F. (1998). Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. *Development* 125, 1711–1721.
- Honma, T., and Goto, K. (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* 127, 2021–2030.
- Honma, T., and Goto, K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409, 525–529.
- Jack, T., Brockman, L. L. & Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68, 683-697
- Jacob, F. (1974). *The Logic of Living Systems*. London: Allen Lane.
- Jiang D, Wang Y, Wang Y, He Y. (2008). Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* Polycomb repressive complex 2 components. *PLoS ONE*.3(10).
- Jönsson H, Heisler M, Reddy GV, Agrawal V, Gor V, Shapiro BE, Mjolsness E, Meyerowitz EM. (2005) Modeling the organization of the *WUSCHEL* expression domain in the shoot apical meristem. *Bioinformatics*.21 Suppl 1:i232-40.
- Jönsson H, Heisler MG, Shapiro BE, Meyerowitz EM, Mjolsness E.(2006) An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31;103(5):1633-8
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286, 1962–1965.
- Kauffman, S.A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J. Theor. Biol.* 22, 437–467.
- Kauffman, S.A. (1993). *The Origins of Order: Self-Organization and Selection in Evolution*. (Oxford: Oxford University Press).
- Kim M, Cui ML, Cubas P, Gillies A, Lee K, Chapman MA, Abbott RJ, Coen E. (2008) Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. *Science*. Nov 14;322(5904):1116-9.

- Kim S., Imoto S, and Miyano S. (2003). Inferring gene networks from time series microarray data using dynamic bayesian networks. *Brief Bioinform*, 4(3):228–235.
- Laux, T., Mayer, K.F.X., Berger, J., and Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity Arabidopsis. *Development* 122, 87–96.
- Lenhard, M., Bonhert, A., Jurgens, G., and Laux, T. (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* 105, 805–808.
- Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S., and Yanofsky, M.F. (1999). Interactions among AP1, LFY, and TFL1 specify meristem fate. *Plant Cell* 11, 1007–1018.
- Li F, Long T, Lu Y, Ouyang Q, Tang C. (2004) The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6;101(14):4781-6.
- Li S, Assmann SM, Albert R (2006). Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biol*
- Liu, Z., and Meyerowitz, E.M. (1995). LEUNIG regulates AGAMOUS expression in Arabidopsis flowers. *Development* 121, 975–991.
- Locke JCW, Millar AJ, Turner MS.(2005) Modeling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in Arabidopsis thaliana. *J Theor Biol*, 234:383-393.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* 105, 793–803.
- Mandel, A., y Yanofski, M. (1995). The Arabidopsis AGL8 MADS-box gene is expressed in inflorescence meristem and negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell* 7, 1763-1771.
- Mandel, A., y Yanofski, M. (1998). The *Arabidopsis* AGL9 MADS box gene is expressed in young flower primordia. *Sex. Plant Reprod.* 11, 22-28.
- Margolin AA, Nemenman I, Basso K, Wiggins C, Stolovitzky G, Dalla Favera R, Califano A.(2006). ARACNE: an algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context. *BMC Bioinformatics*. 20;7 Suppl 1:S7.
- Mendoza L, Xenarios I. (2006). A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theor Biol Med Model.* 16;3:13.
- Mendoza L, Alvarez-Buylla ER. (1998). Dynamics of the genetic regulatory network of Arabidopsis thaliana flower morphogenesis. *J Theor Biol* 193:307–319.
- Mendoza L, Thieffry D, Alvarez-Buylla ER. (1999) Genetic control of flower morphogenesis in Arabidopsis thaliana: a logical analysis. *Bioinformatics* 15:593–606.
- Meyerowitz, E. M. (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88, 299-308
- Monod, J., and Jacob, F. (1961). General conclusions: Telenomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 26, 389–401.
- Moon Y., Chen L., Long Pan R., Chang H., Zhu T., Maffeo M., Sung Z. Renee. (2003). EMF Genes Maintain Vegetative Development by Repressing the Flower Program in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 15, 681–693.
- Novák B, Tyson JJ. (2008). Design principles of biochemical oscillators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (12):981-91.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I., Weigel, D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395, 561-566.
- Parcy F, (2005). Flowering: time for integration. *Int J Dev Biol.*49(5-6):585-93. Review.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405, 200-203.

- Pelaz, S., Tapia-Lo´pez, R., Alvarez-Buylla, E.R., and Yanofsky, M.F. (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 11, 182–184.
- Piñeiro, M., Coupland, G. (1998). The control of flowering time and floral identity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117, 1–8
- Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S. and Bradley, D. J. (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* 125, 1609-1615.
- Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J., and Coen, E.S. (1999). Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis. *Development* 126, 1109–1120.
- [Reddy G.V., Heisler M.G., Ehrhardt D.W., Meyerowitz E.M.](#) (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Development*; 131(17):4225-37
- Reddy GV, Gordon SP, Meyerowitz EM.(2007). Unravelling developmental dynamics: transient intervention and live imaging in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(6):491-501.
- Riechmann JL, Meyerowitz EM.(1997). Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Mol Biol Cell.* 8(7):1243-59.
- [Rolland-Lagan A.G., Bangham J.A., Coen E.](#) (2003). Growth dynamics underlying petal shape and asymmetry. *Nature.*13;422(6928):161-3.
- Ruíz-García, L., Madueño, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J., y Martínez-Zapater, J.M. (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 9, 1921-1934.
- Salazar-Ciudad, I., and Jernvall, J. (2002). A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8116–8120.
- Savidge, B., Rounsley, S.D., y Yanofsky, M.F. (1995). Temporal relationships between the transcription of two Arabidopsis MADS-box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* 7, 721-733.
- [Savage NS, Walker T, Wieckowski Y, Schiefelbein J, Dolan L, Monk NA.](#) (2008). A mutual support mechanism through intercellular movement of CAPRICE and GLABRA3 can pattern the Arabidopsis root epidermis. *PLoS Biol.* 23;6(9):e235.
- Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, Denmar M, Bressan R, y otros. (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130:6001–6012.
- Schultz, E.A, Haughn, G.W. (1993) Genetic analyses of the floral initiation process (FLIP) in Arabidopsis. *Development* 199, 721-733.
- Segal E, Shapira M, Regev A, Peter D, Botstein D, Koller D, Friedman N., (2003). [Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data.](#) *Nat Genet.* 34(2):166-76.
- Shannon, S., Meeks-Wagner, D.R. (1993) Genetic interactions that regulate inflorescence development in Arabidopsis. *Plant Cell* 5, 639-655.
- Shapiro, B. E., Levchenko, A., Meyerowitz, E. M., Wold, B. J. and Mjolsness, E. D. (2003). Cellerator: extending a computer algebra system to include biochemical arrows for signal transduction simulations. *Bioinformatics* 19, 677-678
- [Shaw P., Dolan L.](#) (2008). Chromatin and Arabidopsis root development. *Semin Cell Dev Biol.* 19(6):580-5.
- Shindo C, Lister C, Crevillen P, Nordborg M, Dean C. (2006) Variation in the epigenetic silencing of FLC contributes to natural variation in Arabidopsis vernalization response. *Genes Dev.* 15;20(22):3079-83.

- Sundström JF, Nakayama N, Glimelius K, Irish VF. (2006) Direct regulation of the floral homeotic APETALA1 gene by APETALA3 and PISTILLATA in Arabidopsis. *Plant J.* 46(4):593-600.
- Steuer R, Kurths J, Daub CO, Weise J, Selbig J. (2002). The mutual information: detecting and evaluating dependencies between variables. *Bioinformatics.* 2002;18.
- Tavazoie, S., Hughes, J.D., Campbell, M.J., Cho, R.J., and Church, G.M. (1999). Systematic determination of genetic network architecture. [Nat Genet.](#) 1999 Jul;22(3):281-5.
- Teper-Bamnolker P, Samach A. (2005). The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell* 17:2661–2675.
- Trewavas Anthony, (2006). A brief history of systems biology. *The Plant Cell*, Vol. 18, 2420–2430.
- Tyson, J.J., Chen, K.C., and Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: Dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 221–231.
- Turatsinze JV, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J. 2008 Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc.* 3(10):1578-88.
- Urbanus SL, de Folter S, Shchennikova AV, Kaufmann K, Immink RG, Angenent GC. (2009) In planta localisation patterns of MADS domain proteins during floral development in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol.* 12;9:5.
- Von Dassow, G., Meir, E., Munro, E.M., and Odell, G.M. (2000). The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 406, 188–193.
- Wagner, D., Sablowski, R.W.M., y Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* 285, 582-584.
- Weigel, D., and Meyerowitz, E.M. (1993). Activation of floral homeotic genes in Arabidopsis. *Science* 261, 1723–1726.
- Wen, X., Fuhrman, S., Michaels, G.S., Carr, D.B., Smith, S., Barker, J.L., and Somogyi, R. (1998). Large-scale temporal gene expression mapping of central nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 334–339.
- Yang, C., Chen, L. Sung, Z.R. (1995). Genetic regulation of shoot development in Arabidopsis: Role of the EMF genes. *Dev. Biol.* 169,421-435.
- Yeung MK, Tegnér J, Collins JJ. (2002). Reverse engineering gene networks using singular value decomposition and robust regression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30;99 (9):6163-8.
- Zhao L, Kim Y, Dinh TT, Chen X. (2007) miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems. *Plant J.* 51(5):840-9.

## Apéndices

### A1. Reglas lógicas para la RRG actualizada

1: FUL\* =not AP1 and not TFL1

1: FT\* =not EMF1

1: AP1\* = (not AG and not TFL1) or (FT and LFY and not AG) or (FT and not AG and not PI) or (LFY and not AG and not PI) or (FT and not AG and not AP3) or (LFY and not AG and not AP3)

1: EMF1\* =not LFY

1: LFY\* =not EMF1 or not TFL1

1: AP2\* =not TFL1

1: WUS\* =WUS and (not AG or not SEP)

1: AG\* = (not EMF1 and not AP2 and not TFL1) or (not EMF1 and not AP1 and LFY) or (not EMF1 and not AP2 and LFY) or (not EMF1 and not TFL1 and LFY and (AG and SEP)) or (not EMF1 and (LFY and WUS))

1: TFL1\* =not AP1 and (EMF1 and not LFY)

1: PI\* = (LFY and (AG o AP3)) or ((PI and SEP and AP3 and (AG or AP1))

1: SEP\* =LFY

1: AP3\* = (LFY and UFO) or ((PI and SEP and AP3 and (AG or AP1))

1: WUS\* = WUS and not (AG or SEP)

## A2. Tabla de interacciones relevantes en la RRG revisitada

INTERACTIONS	EXPERIMENTAL EVIDENCE	REFERENCE
<i>AG</i> → <i>AG</i>	ChIP experiments show that <i>AG</i> interacts <i>in vivo</i> with predicted regulatory sequences of <i>AG</i> .	Gomez-Mena, et al., 2004
<i>AP1</i> --  <i>AG</i>	Sepals are replaced by carpels, and petals by stamens in <i>ap1</i> mutants. <i>AG mRNA</i> found in all the flower primordium of <i>ap1-1</i> plants. Moreover, whorl 1 organs are sometimes carpelloid, and whorl 2 organs are staminoid in <i>ap1</i> mutants.	Bowman et al., 1993 Weigel and Meyerowitz, 1993 Liu and Meyerowitz, 1995
<i>CLF</i> --  <i>AG</i>	In <i>clf</i> mutants, first whorl sepals are frequently carpelloid, second whorl organs are staminoid petals and <i>AG mRNA</i> is detected in sepals. It is likely that <i>CLF</i> is part of a complex with <i>EMF2</i> , <i>MSI1</i> , and <i>FIE</i> that epigenetically regulate <i>AG</i> .	Goodrich et al., 1997. Calonje et al., 2008
<i>LFY</i> → <i>AG</i>	Expression of <i>AG</i> is reduced in <i>lfy-6</i> flowers. The expression of a fusion of <i>LFY</i> to a strong activation domain produces increased and ectopic <i>AG</i> expression. <i>LFY</i> protein binds to <i>AG</i> first intron, and cooperates with <i>WUS</i> homeodomain to activate <i>AG</i> .	Weigel and Meyerowitz, 1993 Parcy et al., 1998 Busch et al., 1999 Lohman et al., 2001
<i>LUG</i> --  <i>AG</i>	There is ectopic expression of <i>AG</i> in <i>lug-1</i> mutants. Furthermore, <i>LUG</i> functions as the repressor of <i>AG</i> via the second regulatory intron.	Liu and Meyerowitz, 1995 Sieburth and Meyerowitz, 1997 Deyholos and Sieburth, 2000 Gregis et al., 2006
<i>SEP3</i> → <i>AG</i>	There is <i>AG</i> expression in rosette leaves of <i>35S::SEP3</i> plants. In addition, <i>35S::AG 35S::SEP3</i> plants displayed carpelloid features at a higher degree.	Castillejo et al., 2005
<i>TFL1</i> --  <i>AG</i>	There are normal stigmas and styles in terminal flowers in a <i>lfy ap1</i> double mutants if the <i>tfl1</i> mutation is added.	Shannon and Meeks-Wagner, 1993.
<i>WUS</i> → <i>AG</i>	<i>wus</i> mutants lack carpels and most stamens. Therefore, in <i>AP3:WUS</i> transgenic plants, 2nd whorl organs are carpelloid stamens instead of petals, whereas in <i>AP3:WUS ag</i> plants, 2nd and 3rd whorl organs do not differentiate into carpelloid stamens.	Laux et al., 1996 Lenhard et al., 2001 Lohman et al., 2001
<i>AG</i> --  <i>AP1</i>	<i>AP1</i> mRNA accumulates uniformly in <i>ag-1</i> mutant flowers.	Gustafson-Brown et al., 1994.
<i>FT</i> → <i>AP1</i>	In <i>ft lfy</i> double mutants, <i>AP1 mRNA</i> is absent, whereas in the respective single mutants there is <i>AP1</i> expression, suggesting that at least one of these two genes needs to be present for <i>AP1</i> activation	Ruiz-García et al., 1997
<i>LFY</i> → <i>AP1</i>	<i>AP1</i> expression is delayed in <i>lfy-6</i> null mutants, ectopic in <i>35S:LFY</i> plants and increased in the inducible form <i>LFY::VP16</i> . It has been shown that <i>LFY</i> directly binds the <i>AP1</i> promoter and activates this gene.	Weigel and Nilsson, 1995. Parcy et al., 1998 Liljegren et al., 1999. Wagner et al., 1999.
<i>TFL1</i> --  <i>AP1</i>	In <i>tfl1</i> mutants, <i>AP1</i> is ectopically expressed in the basal lateral meristems and in N-terminal flowers. Also, the <i>AP1</i> expression is retarded in <i>35S::TFL1</i> .	Gustafson-Brown et al., 1994. Ratcliffe et al., 1998
<i>TFL1</i> --  <i>AP2</i>	The absence of petals in <i>tfl1 ap2</i> double mutant flowers and the presence of these in <i>tfl1</i> single mutants suggest that there is ectopic <i>AP2</i> activity in the terminal flowers of <i>tfl1</i> single mutants.	Shannon and Meeks-Wagner, 1993
<i>AG</i> → <i>AP3</i>	There is a weaker <i>GUS</i> expression in the third whorl of <i>ag-1 AP3:GUS</i> flowers than in wild-type plants. In addition, <i>AG</i> may maintain <i>AP3</i> expression because cauline leaves of <i>35S:PI 35S:AP3 35S:SEP3 35S:AG</i> are converted into stamen-like organs. ChIP experiments show that <i>AG</i> interacts <i>in vivo</i> with predicted regulatory sequences of <i>AP3</i> .	Hill et al., 1998 Honma and Goto, 2001 Gomez-Mena et al., 2005. Zhao et al., 2007

	Also, <i>AP3</i> RNA was absent from the center of the meristem in <i>ag-1</i> .	
<i>AP1</i> → <i>AP3</i>	<i>AP3</i> expression is quite normal in <i>ap1</i> mutants but is almost undetectable in <i>lfy ap1</i> double mutants, indicating that <i>AP1</i> can act with <i>LFY</i> to regulate <i>AP3</i> expression. Furthermore, <i>AP1</i> protein seems to bind <i>AP3</i> cis-regulatory elements.	Weigel and Meyerowitz, 1993 Hill et al., 1998 Lamb et al., 2002 Ng and Yanofsky, 2001
<i>AP3</i> → <i>AP3</i>	In <i>35S:AP3:GR</i> plants, <i>AP3</i> is upregulated when induced with dexamethasone, supporting the notion that <i>AP3</i> self-activates.	Hill et al. 1998 Honma and Goto, 2000
<i>LFY+UFO</i> → <i>AP3</i>	The amount and domain of <i>AP3</i> expression is reduced in <i>lfy-6</i> mutants. <i>AP3</i> protein and messenger levels are reduced in <i>ufo-2</i> plants. Both <i>LFY</i> and <i>UFO</i> have to be overexpressed to induce ectopic expression of <i>AP3</i> . Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) have shown that <i>LFY</i> binds directly to sequences in the <i>AP3</i> promoter. ChIP analyses showed that <i>UFO</i> associates with the <i>AP3</i> promoter. Furthermore, this association was abolished when ChIP was performed using extracts from <i>lfy-26</i> mutant plants harboring the <i>35S::UFO-Myc</i> transgene.	Weigel and Meyerowitz, 1993. Levin and Meyerowitz, 1995. Parcy et al., 1998 Lamb et al., 2002 Chae, 2008
<i>SEP</i> → <i>AP3</i>	In <i>AP3::GUS 35S::PI 35S::AP3 35S::AP1</i> mutants, <i>AP3::GUS</i> is expressed throughout the plant supporting that the full activation of the B-function genes requires a tetramer with <i>SEP</i> proteins. The ectopic expression of <i>SEP3</i> resulted in the induction of ectopic <i>AP3</i> expression. Also, stronger <i>35S::SEP3</i> lines were capable of activating <i>AP3::GUS</i> ectopically.	Honma and Goto, 2001  Castillejo et al., 2005
<i>LFY</i> -  <i>EMF1</i>	Ectopic <i>LFY</i> expression in <i>emf1-1</i> mutants increases the severity of the <i>emf</i> phenotype.	Chen et al. 1999
<i>EMF1</i> -  <i>FT</i>	<i>FT</i> RNA levels are higher in the <i>emf1-1</i> mutant and are observed earlier than in the wild type.	Moon Y. et al., 2003
<i>AP1</i> -  <i>FUL</i>	<i>FRUITFULL</i> is ectopically expressed in <i>ap1</i> mutants.	Ferrández et al., 2000 Mandel y Yanofski, 1995
<i>TFL1</i> -  <i>FUL</i>	It was postulated that <i>TFL1</i> could be an inhibitor, although it also is possible that other factors play this posttranscriptional inhibitory role. This interaction is necessary because when the negative posttranscriptional regulation of <i>FUL</i> by <i>TFL1</i> is not considered, the nonfloral steady gene states disappear. No experimental evidence.	Espinosa-Soto et al. 2004
<i>AP1</i> → <i>LFY</i>	In <i>ap1</i> and <i>ap1 cal</i> double mutants, <i>LFY</i> expression is reduced. Additionally, <i>LFY</i> is activated earlier in <i>35S:AP1</i> plants than in the wild type.	Bowman et al. 1993 Weigel and Nilson, 1995 Kempin et al., 1995 Pfiñero and Coupland, 1998. Liljegren et al., 1999.
<i>EMF1</i> -  <i>LFY</i>	Double mutants of the weak <i>emf1-1</i> allele and <i>lfy-1</i> bear <i>lfy</i> -like flowers suggesting that, for this trait, <i>lfy</i> is epistatic. Also, these genes have antagonistic activities.	Yang et al., 1995
<i>FUL</i> → <i>LFY</i>	Eventhough <i>LFY</i> expression is the same in wild type and <i>LFY::GUS ful-2</i> plants, it is reduced in <i>ful ap1 cal</i> triple mutants relative to <i>ap1 cal</i> double mutant plants, suggesting that the role of <i>FUL</i> in <i>LFY</i> upregulation is important only when <i>AP1</i> is inactive.	Ferrández et al., 2000
<i>TFL1</i> -  <i>LFY</i>	In <i>tfl1</i> mutant plants <i>LFY</i> is ectopically expressed in the shoot apex.	Weigel et al. 1992 Ratcliffe et al., 1999
<i>LFY</i> → <i>PI</i>	Amount and domain of <i>PI</i> expression is reduced in <i>lfy-6</i> mutants. There is no <i>GUS</i> expression in <i>lfy PI::GUS</i> early	Weigel and Meyerowitz, 1993 Honma and Goto, 2000

	flowers.	
<i>PI</i> → <i>PI</i>	Co-immunoprecipitation of AP3 and PI proteins. <i>AP3</i> and <i>PI</i> mRNA levels are not maintained in <i>ap3-3</i> , <i>pi-1</i> double mutants. In <i>AP3::GUS 35S::PI 35S::AP3 35S::AP1</i> mutants, <i>AP3::GUS</i> is expressed throughout the plant supporting that the full activation of the B-function genes requires PI protein.	Jack et al., 1992 Goto and Meyerowitz, 1994 Honma and Goto, 2001
<i>LFY</i> → <i>SEP</i>	Microarray experiments show that the group of <i>LFY</i> dependent genes includes the homeotic cofactors <i>SEP1-3</i> .	Schimid et al. 2003
<i>AP1</i> --  <i>TFL</i>	In <i>35S:AP1</i> , <i>TFL1</i> is severely diminished. Also, in <i>ap1 cal</i> double mutants, <i>TFL1</i> is ectopically expressed.	Liljegren et al., 1999
<i>AP2</i> --  <i>TFL</i>	The <i>tfl1-1</i> mutation partially suppresses the <i>ap2-1 ap1-1</i> mutant inflorescence phenotype.	Schultz and Haughn, 1993 Shannon and Meeks-Wagner, 1993.
<i>EMF1</i> → <i>TFL</i>	In <i>emf1-2 tfl1</i> double mutants, the <i>emf1-2</i> mutation is epistatic with respect to flower initiation. These genes do not have antagonistic activities. This suggests that <i>EMF1</i> upregulates <i>TFL1</i> .	Chen et al., 1997
<i>LFY</i> --  <i>TFL</i>	The <i>35S:LFY</i> plants resemble the <i>tfl1</i> mutant, and no <i>TFL1</i> expression is observed in these plants. Also, it has been shown that <i>LFY</i> can inhibit <i>TFL1</i> at transcriptional level. In addition, <i>TFL1</i> is ectopically expressed in <i>lfy</i> mutants.	Weigel and Nilsson, 1995. Ratcliffe et al., 1999 Liljegren et al., 1999
<i>AG</i> --  <i>WUS</i>	There is strong <i>WUS</i> expression in the center of the floral meristem of <i>ag</i> mutant.	Lenhard et al., 2001 Lohmann et al., 2001
<i>SEP</i> --  <i>WUS</i>	<i>SEP</i> activity is required for <i>WUS</i> downregulation by <i>AG</i> because <i>sep1 sep2 sep3</i> triple mutant plants bear indeterminate flowers.	Pelaz et al., 2000
<i>WUS</i> --  <i>WUS</i>	No experimental evidence. Model assumption.	Espinosa-Soto et al., 2004
<b>ACTUALIZATIONS (Chaos et al., 2006; TAB)</b>		
<i>EMF1</i> --  <i>AG</i>	In ChIP experiments, <i>EMF1</i> was associated with sites located in the promoter and 2nd intron of <i>AG</i> . Therefore, <i>EMF1</i> interfered with transcription by RNA polymerase II and T7 RNA polymerase in vitro.	Calonje et al., 2008
<i>AP3</i> --  <i>AP1</i>	<i>AP1</i> transcript levels are significantly elevated in <i>ap3-3</i> mutant plants compared with both <i>WT</i> and <i>35S::AP3</i> plants.	Sundström et al., 2006
<i>PI</i> --  <i>AP1</i>	ChIP experiments showed that the PI protein binds to target sequences in the <i>AP1</i> promoter	Sundström et al., 2006
<i>miRNA172+HEN1</i> --   <i>AP2</i>	Elevated <i>miRNA172</i> accumulation results in floral organ identity defects similar to those in loss-of-function <i>ap2</i> mutants. On the other hand, the <i>miRNA</i> abundance depends on the activity of DICER-like protein HUA ENHANCER 1 (HEN1), which is expressed through the plant. This observation suggests that a cofactor expressed in the inner floral whorls is required to give specificity to HEN1-dependent repression of <i>AP2</i> . In the <i>AP2</i> logical rules is added that the inactivity of <i>AG</i> is needed for <i>AP2</i> function	Chen et al. 2002. Park et al, 2002 Chen X., 2004 Zhao et al., 2007
<i>LFY</i> → <i>SEP 1-3</i>	Microarray experiments show that the group of <i>LFY</i> dependent genes includes the homeotic cofactors <i>SEP1-3</i>	Schimid et al. 2003
<b>INTERACTIONS NOT INCLUDED IN THE MODEL</b>		

AGL24+SVP- AG	In the <i>agl24 svp</i> double mutant, <i>AG</i> mRNAs were already detected in the inflorescence and floral meristems starting from stage 1, indicating early <i>AG</i> expression. In later stages, <i>AG</i> remains expressed in all floral organs. Probably, this interaction is part of a different GRN that is before the cell fate determination.	Gregis et al., 2006
BEL-- AG	<i>AG</i> is expressed ectopically in <i>blr</i> mutants. Also, <i>BLR</i> directly binds to the <i>AG</i> cis elements (identified by EMSA analyses). Probably, this interaction is important in organogenesis.	Bao et al., 2004
RBE-- AG	In <i>rbe</i> mutants, there is ectopic expression of <i>AG</i> in second-whorl cells. Most likely, this interaction could be important in organogenesis.	Krizek et al., 2006.
SEU-- AG	A direct <i>in vivo</i> association of SEUSS (SEU) proteins with the <i>AG</i> cis-regulatory element was shown by chromatin immunoprecipitation. SEU interacts with LUG in a repressor complex to regulate <i>AG</i> , and LUG already was considered in the GRN model.	Sridhar et al, 2006
AGL24+SVP-- AP3	An <i>in situ</i> analysis shows that in the <i>agl24 svp</i> double mutant, <i>AP3</i> is expressed in all parts of the floral meristem and later in all floral organs. Probably, this interaction is part of a different GRN that is before the cell fate determination.	Gregis et al., 2006
LFY→CAL	Using posttranslational activation of LFY-GR, is demonstrated that <i>CAL</i> is a direct LFY target. cis-regulatory elements in the putative <i>CAL</i> promoter are bound by LFY. Furthermore, AP1 form heterodimers with <i>CAL</i> , and AP1 already was included.	William et al.,2004
AP3--  FUL	The domain of <i>FUL</i> expression is expanded to whorl three in stage 3 of <i>ap3</i> mutants, but no direct interaction is detected by ChIP analysis.	Mandel and Yanofsky, 1995 Sundström et al., 2006
FT--  FUL	<i>FUL</i> are expressed a higher levels in 35S:FT-VP16. It is no considered because this interaction could be mediated by TFL1 and LFY.	Teper-Bamnlker P and Samach A, 2005
PNY→LFY PNF→LFY	The transcripts of <i>LFY</i> are substantially reduced in shoot apices of <i>pny pnf</i> double mutants after floral induction. In addition, <i>pny pnf</i> double mutants, do not produce flowers. Therefore, 35S:LFY <i>pny pnf</i> plants produce flowers. This interaction is part of a different GRN.	Anrar et al, 2008.
AP2→PI	<i>In situ</i> hybridization showed that <i>PI</i> RNA was at a much lower level and occupied a smaller area in <i>ap2-2</i> flowers compared with wild type. Probably it is indirect.	Zhao et al., 2007
AG---SEP3	Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments show that <i>AG</i> interacts <i>in vivo</i> with predicted regulatory sequences of <i>SEP3</i> . Experimental data not enough.	Gomez-Mena et al., 2005.
FT→SEP3	Overexpression of <i>FT</i> causes ectopic expression of <i>SEP3</i> in leaves. There is no more experimental evidence.	Teper-Bamnlker P and Samach A, 2005