



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Modelo espacio-temporal del transporte de auxina en el nicho de células troncales
de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Mónica Lisette García Gómez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces
Instituto de Ecología (UNAM)

Dr. Joseph Dubrovsky
Instituto de Biotecnología (UNAM)
Dr. Luis Mendoza Sierra
Instituto de Investigación Biomédica Básica (UNAM)

MÉXICO, D. F. Enero, 2014



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.

Agradecimientos

Quiero agradecer sobre todo a mi mamá y a mi hermana Carolina. Por su eterno apoyo y solidaridad. Sin ustedes yo no hubiera podido conseguir este logro. Este logro es de las tres, las quiero mucho. A mi papá que aunque ya no está físicamente, constantemente lo está en mi pensamiento.

Gracias a mi tutora, la Dra. Elena por su guía, apoyo, consejos y por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio. Gracias al comité tutor por todas sus observaciones a lo largo de la maestría. Quiero agradecer especialmente al Dr. Joseph por las preguntas inesperadas y por ayudarme a hacer de este un mejor trabajo de tesis. Gracias a todos los sinodales, por las correcciones y sugerencias que sirvieron para mejorar el escrito.

Gracias a toda la gente del C3, del seminario de biología teórica y a la gente del labo en Ecología. Gracias a mis amigas Eli, Esthercita, Liber y Vale. Ojalá que se nos haga una costumbre seguir viajando juntas. Gracias a Euges, que fue un gran guía y compañero de viaje. También quiero agradecer a todos mis amigos, los de Logos (CTC), de la universidad (Betty y Willy) y de la maestría (Regis). La compañía de todos ustedes es muy valiosa para mi.

Gracias al posgrado en ciencias bioquímicas y a Lety por toda la ayuda. Gracias al equipo de CompuCell3D por invitarnos a sus talleres y por haber apoyado en la realización de esta tesis. A CONACyT y a el PAEP, porque gracias a los apoyos pude asistir a cursos que ayudaron mucho a mi formación académica. A la UNAM, gracias por todas las enseñanzas y las oportunidades.

Índice general

Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
1.1. El NCT de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	11
1.1.1. Gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz	13
1.1.2. La vía de señalización de auxina	18
1.1.3. Regulación de la expresión genética en el NCTR de <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	20
1.1.4. Expansión celular en plantas	22
2. Métodos	26
2.1. Modelos celulares de Potts	26
3. Resultados	33
3.1. La función H para modelar comportamientos celulares de plantas en términos de expansión y proliferación celular	33
3.2. Implementación de la función H en CompuCell3D	37
3.3. Modelo del transporte de auxinas en el ápice de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	39
3.4. Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz	42
3.4.1. Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas en distintas condiciones iniciales	43
3.4.2. Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas con variación en la permeabilidad por proteínas de la familia PIN	47
3.4.3. Análisis de los efectos de tratamientos en el gradiente de concentración de auxina.....	51
3.4.4. Modelo del transporte de auxinas y la red de señalización de auxinas en el NCTR	56
4. Discusión	63

Índice de figuras

- 1.1 El NCTR en el ápice de la raíz *Arabidopsis*.
- 1.2 Organización en el eje longitudinal del ápice de la raíz de *Arabidopsis*.
- 1.3 Gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz de *Arabidopsis*.
- 1.4 Transporte de auxinas.
- 1.5 Modelo estructural del transporte de auxinas en la raíz de *Arabidopsis*.
- 1.6 Modelo estructural y morfológico del transporte de auxinas en la raíz de *Arabidopsis*.
- 1.7 Vía de señalización canónica de auxinas.
- 1.8 Modelo de la señalización de auxinas.
- 1.9 *WOX5* es un regulador del mantenimiento de las células iniciales distales.
- 1.10 Modelo booleano de la regulación genética en el NCTR.
- 2.1 Propiedades celulares de las células en CPM.
- 2.2 Vecindario de una celda i,j .
- 2.3 Simulación Monte Carlo en CPM.
- 2.4 Diagrama de flujo de una simulación de CPM.
- 3.1 Restricciones modeladas en la función H.
- 3.2 Esquema de la restricción en la distancia entre COM.
- 3.3 Resultados de la simulación con la función H.
- 3.4 Configuración celular del modelo del ápice de la raíz en CPM.
- 3.5 Concentración de auxinas en el modelo del ápice de la raíz.
- 3.6 Concentración de auxinas en el eje longitudinal del modelo celular del ápice de la raíz.
- 3.7 Concentración de auxinas en las células de la simulación A.
- 3.8 Concentración de auxinas en las células de la simulación B.
- 3.9 Concentración de auxinas en las células de la simulación C.
- 3.10 Concentración de auxinas en las células de la simulación D.
- 3.11 Concentración de auxinas en las células de la simulación E.
- 3.12 Concentración de auxinas en las células de la simulación F.
- 3.13 Respuesta a auxinas tras tratamiento con auxinas.
- 3.14 Concentración de auxinas en las células de la simulación G.
- 3.15 Concentración de auxinas en las células de la simulación H.
- 3.16 Concentración de auxinas en las células de la simulación I.
- 3.17 Respuesta a auxinas tras tratamiento con NPA.
- 3.18 Respuesta a auxinas tras la ablación del CQ.
- 3.19 Modelo de la red de señalización de auxinas.
- 3.20 Comportamiento biestable de W5 en el modelo de la señalización de auxinas.
- 3.21 Análisis de la expresión de *WOX5* con una fusión transcripcional del gen con GFP.
- 3.22 Concentración de auxinas en las células de la simulación J.
- 3.23 Concentración de auxinas en las células de la simulación K.
- 3.24 Concentración de auxinas en las células de la simulación H.

Índice de tablas

- Tabla II.1 Posibles extensiones de la función H.
- Tabla III.1 Análisis de la función H para hacer simulaciones de la expansión y la división celular en plantas.
- Tabla III.2 Resultados del análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas.
- Tabla III.3 Resultados del análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas con variación en la permeabilidad por proteínas de la familia PIN.
- Tabla III.4 Resultados del análisis del efecto de la permeabilidad de proteínas PIN en el transporte de auxinas.
- Tabla III.5 Resultados del análisis de tratamientos en el gradiente de concentración de auxinas.
- Tabla III.6 Resultados del análisis del transporte de auxinas y la red de señalización de auxinas.

Lista de abreviaturas y símbolos

A_σ - Área celular actual (CPM)
 A_T - Área celular target (CPM)
 A_D - Área umbral del agente para dejar de crecer (CPM)
 ARF - Factores de respuesta a auxinas
 ARF^+ - ARF activador
 ARF^- - ARF inhibidor
 AuxREs - Auxin Response Elements
 Aux/IAA - Correceptor de las auxinas, AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
 AUX1 - Permeasa de influjo de auxinas
 β - Temperatura de la simulación (CPM)
 COM - Centro de masa de los agentes (CPM)
 CPM - Modelos celulares de Potts
 CQ - Centro quiescente
 CT - Células troncales
 C - Concentración de auxinas en una célula
 C_{out} - Concentración de auxinas en las células vecinas
 DR5 - Promotor sintético de respuesta a auxinas que tiene secuencias AuxREs
 $e^{-\Delta H/\beta}$ - Probabilidad de aceptar un cambio no favorable (CPM)
 I, J - dimensión de la rejilla de dos dimensiones (CPM)
 i, j - posición de una celda (CPM)
 i', j' - posición vecina de una celda i, j en CPM
 IAAH - Auxinas en forma protonada
 IAA^- - Auxinas en forma aniónica
 J_σ - Flujo de auxinas en cada célula (CPM)
 λ - Intensidad de una restricción de la función H (CPM)
 λ_p - Intensidad de la restricción del perímetro de los agentes (CPM)
 λ_A - Intensidad de la restricción del área de los agentes (CPM)
 λ_r - Intensidad de la restricción de la distancia entre los COM de los agentes (CPM)
 L_{σ_1, σ_2} - Distancia actual entre los COM de células vecinas (CPM)
 L_T - Distancia target entre los COM de células vecinas (CPM)
 m - Parámetro de extensibilidad (Ecuación Lockhart)
 MCS - Paso Monte Carlo (CPM)
 MP - Factor de transcripción ARF^+ *MONOPTEROS*
 n - Vector que indica la polaridad de las proteínas PIN
 NCT - Nicho de células troncales
 NCTR - Nicho de células troncales de la raíz
 NPA - Inhibidor del transporte de auxinas mediado por proteínas PIN
 ODE - Ecuación diferencial ordinaria
 π - Umbral de extensibilidad (Ecuación Lockhart)
 P - Fuerza de presión de turgencia (Ecuación Lockhart)
 PI - Umbral de la desviación del perímetro, tras el cual el P_T aumenta
 P_σ - Perímetro celular actual (CPM)
 P_T - Perímetro celular target (CPM)
 P_m - Permeabilidad de salida de auxinas mediada por proteínas PIN
 $P_{m,1}$ - Permeabilidad de salida pasiva de auxinas
 $P_{m,1}$ - Permeabilidad de salida de auxinas con polaridad lateral en las células BorderLateral
 P_i - Permeabilidad de proteínas PIN de células vecinas
 PIN - Proteínas de eflujo de auxinas de la familia PINFORMED
 PLT - Genes *PLETHORA*
 σ - identificador o spin de cada celda de la rejilla I, J (CPM)
 $\sigma_{i,j}$ - Identificador de una celda i, j (CPM)
 $\sigma_{i,j'}$ - Identificador de una celda vecina a la celda i, j (CPM)
 τ - Tipo celular (CPM)
 TIR1 - Correceptor de las auxinas TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
 u. a. - Unidades arbitrarias
 V - Volumen (Ecuación Lockhart)
 WOX5 - WUSCHEL-RELATED HOMEBOX
 W5 - Parámetro que representa al gen WOX5 en el modelo de ODE
 X - Magnitud que aumenta el P_T en el steppable que implementa la expansión celular (CPM)

Resumen

La organización del nicho de células troncales de la raíz (NCTR) de *Arabidopsis* depende de procesos que actúan a distintas escalas espaciales y temporales, que en conjunto regulan la diferenciación y la proliferación celular. Se han realizado modelos dinámicos para estudiar algunos de estos procesos y su papel individual en la regulación del NCTR. Sin embargo, a la fecha no se sabe cómo es que los distintos procesos se integran para dar lugar a los patrones de comportamiento celular que se observan en la raíz de *Arabidopsis*. Para estudiar en conjunto a estos procesos se requiere de una plataforma de simulación espacio-temporal donde sea posible proponer modelos multiescala del desarrollo del NCTR. En este trabajo se presenta una extensión de los Modelos Celulares de Potts para modelar dinámicas de expansión y proliferación celular de células de plantas. La extensión permite la interpretación de la presión celular y la deformación de la pared celular, las cuales son fuerzas que se han descrito como importantes fuentes de información posicional. Utilizando esta plataforma, se simuló el transporte activo de auxinas en el ápice de la raíz silvestre y en distintas condiciones. Además se propuso un modelo multiescala del transporte de auxinas y la vía de señalización de auxinas controlando la expresión de *WOX5*, un factor de transcripción clave del NCTR. El análisis de los modelos del transporte y la señalización de auxinas mostraron la importancia de ambos procesos en el establecimiento del NCTR. Por lo tanto, utilizando una plataforma de simulación espacio-temporal fue posible estudiar dinámicamente el establecimiento del NCTR de *Arabidopsis*.

Abstract

The organization of the root stem cell niche (SCN) of *Arabidopsis* relies on processes acting at different spatial and temporal scales, that altogether regulate cell differentiation and proliferation in the root. Models have been made to study each of these processes and their individual role in the regulation of the root SCN. Nevertheless, to date it is not known how these different processes are integrated to give rise to the cell behaviors observed in *Arabidopsis* root. To study altogether these processes, it is needed a spatio-temporal simulation framework where it can be possible to propose multiscale models of the development of the root SCN. In this thesis we presented an extension of the Cellular Potts model to model dynamics of cell expansion and proliferation in plant cells. The extension allows the interpretation of the cellular pressure and the deformation of the cell wall, which have been described as important sources of positional information. Using this framework, we simulated the active transport of auxin in the apex of the root in a wild type root and other conditions. Moreover, it was proposed a multiscale model of auxin transport and signaling pathway controlling the expression of *WOX5*, a key transcription factor in the root SCN. The analysis of the models of the auxin transport and signaling pathway showed the importance of both processes in the establishment of the root SCN. Therefore, using a spatio-temporal simulation framework it was possible to study dynamically the establishment of the root SCN of *Arabidopsis*.

Capítulo 1

Introducción

Los organismos multicelulares como las plantas y los animales son complejos estructural y funcionalmente, ya que están conformados por muchos tipos celulares que están organizados en tejidos y órganos. La morfogénesis contempla a un conjunto de procesos que durante el desarrollo embrionario regula la organización espacio-temporal de los distintos tipos de células que se originan a partir de las células troncales. La producción de células a partir de las células troncales también es importante durante la etapa adulta de los organismos para la regeneración de tejidos y órganos, sobre todo en las plantas. La biología del desarrollo estudia los procesos de diferenciación y morfogénesis a través de los cuales los organismos adquieren su organización. En estos procesos participan complejas redes de regulación entre componentes genético-moleculares y no genéticos a distintos niveles de organización espaciales y temporales [1, 2, 3]. Entre los componentes genético-moleculares están los genes mismos, los factores de transcripción, las hormonas, las vías de señalización, entre otros. Y los componentes no genéticos contemplan por ejemplo a los campos físicos (mecánicos, electromagnéticos, etc.) y las condiciones ambientales.

Los componentes genético-moleculares forman redes de regulación que actúan generalmente a nivel del núcleo celular para controlar la expresión genética. Actualmente existe mucha información sobre los componentes que regulan a nivel transcripcional la diferenciación celular y la morfogénesis. Sin embargo, también hay reguladores como las hormonas y los péptidos señalizadores, entre otros, que pueden ser sintetizados en una célula y ejercer su actividad de regulación en otras células [4, 5, 6]. Esta movilidad celular de componentes moleculares, establece circuitos de comunicación celular que son fundamentales para la coordinación celular y la organización de un tejido durante la morfogénesis.

Por otro lado, las condiciones ambientales son un componente no genético que influye en el desarrollo, como ha sido demostrado en varios estudios de epigenética molecular [7, 8]. Particularmente, las plantas forman nuevas estructuras vegetales post-germinación como ramas, hojas, flores o raíces laterales, de manera plástica en respuesta a las condiciones ambientales [9]. También se ha demostrado la importancia de factores mecánicos en las decisiones celulares [10, 11, 12, 13, 14, 15]. Por ejemplo, la tensión en la membrana celular es percibida por el citoesqueleto o por mecanorreceptores, y activa respuestas celulares como apoptosis, proliferación o división celular [10, 16]. Frecuentemente se separa el estudio de los componentes genético-moleculares de los no genéticos, pero es la acción concertada y retroalimentada de ambos tipos de procesos la que da lugar a la organización macroscópica que caracteriza a los órganos complejos que caracterizan a los organismos multicelulares.

La multicelularidad depende en gran medida de la actividad de las células troncales o

madre (CT), que son células que mantienen la capacidad de autorreplicarse a la vez que dan lugar a células de distintos tipos durante la etapa adulta. Estas células mantienen su capacidad totipotencial en regiones definidas o microambientes, llamados los nichos de células troncales (NCT) [17, 18, 19, 20]. Los NCT constan de las células del organizador y las CT [21, 22]. El organizador es importante para regular la actividad de las CT y mantenerlas en un estado indiferenciado. La tasa de división de las CT es baja, y cuando dividen, una célula aumenta su tasa de división celular en la zona de amplificación celular. Tras un número de rondas de división celular, las células dejan de dividirse y se diferencian. Esta organización celular de células troncales, células en proliferación y células en diferenciación, se observa tanto en los NCT de los animales (e.g. asas del intestino, líneas germinales, epitelial y folicular, entre otros [18]) como en los NCT de las plantas (e.g. en los meristemos apicales del vástago aéreo y de la raíz; [23, 19]), lo cual sugiere que es un patrón de organización genérico en todos los organismos multicelulares. A partir de la actividad de los NCT en la etapa adulta, se producen las células que regenerarán a los tejidos. En el caso de las plantas, es a partir de estos NCT que se forman las estructuras y órganos durante todo su ciclo de vida [19].

El estudio experimental de los NCT en sistemas animales es complicado dadas las complejas estructuras anatómicas en las que se encuentran. Siendo que son NCT de difícil acceso, resulta muy difícil estudiar la dinámica celular del órgano *in vivo*. En las plantas, los NCT se encuentran expuestos en los meristemos que están activos durante todo el ciclo de vida. El NCT de la raíz (NCTR) de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* en adelante) es un órgano transparente, con una organización celular relativamente simple, con pocos tipos celulares que están claramente definidos, y un número pequeño de células troncales que dan lugar a cada uno de los tejidos de la raíz [24]. Dadas estas características, el NCTR de *Arabidopsis* permite hacer análisis cuantitativos a nivel celular e *in vivo*, para explorar el papel relativo de alteraciones genéticas y no genéticas en la homeostasis tisular. Por la relativa simplicidad celular y facilidad de estudio, la raíz de *Arabidopsis* se ha convertido en un sistema modelo para el estudio de procesos del desarrollo.

El NCTR de *Arabidopsis* consta de las células del organizador del nicho (Centro quiescente, CQ) y las llamadas células iniciales (que son las células troncales funcionales) [24]. En el NCTR se regula la renovación, mantenimiento y tamaño de la reserva de células iniciales de la raíz [25]. La raíz primaria de *Arabidopsis* está organizada longitudinalmente en cinco regiones adyacentes llamadas respectivamente, de más distal a proximal, (i) el NCTR, (ii) el dominio de proliferación del meristemo, (iii) el dominio de transición del meristemo, (iv) la zona de elongación y (v) la zona de diferenciación o maduración [26]. Los límites entre estas zonas de comportamiento celular a lo largo de la raíz, se establecen por medio de la regulación del balance entre la proliferación y la diferenciación celular [27]. Dicho balance es el resultado de redes de regulación complejas entre fitohormonas, vías de señalización, factores de transcripción y campos físicos [28, 29, 30, 31].

Los modelos computacionales han sido ampliamente utilizados para estudiar la dinámica de regulación que subyace tras los procesos del desarrollo, ya que en estos procesos participan muchos componentes. Los modelos permiten la integración de distintas fuentes de información y el estudio dinámico de como los distintos componentes se regulan entre sí. Estos componentes pueden interactuar de forma no lineal, lo cual quiere decir que se

regulan formando asas de retroalimentación. Dado este comportamiento no lineal, el estado del sistema muchas veces no puede ser predicho con facilidad sin la ayuda de un modelo computacional. Con un modelo se puede estudiar, por ejemplo, cómo es que un conjunto de genes se regulan entre sí formando redes de regulación que determinan distintos tipos celulares, cómo es que el transporte celular de una molécula forma gradientes de concentración en un campo celular, o cómo la dinámica de proliferación celular forma un campo de tensiones que puede ser información posicional. Estos modelos se han realizado para el estudio del NCTR de *Arabidopsis* y se describen brevemente a continuación.

El formalismo de las redes booleanas se ha utilizado para estudiar la lógica compleja y la dinámica de la regulación genética [32]. Una red es un conjunto de elementos y sus interacciones y en el caso de las redes booleanas, los componentes de la red pueden tener dos valores: 0 si está inactivo y 1 si está activo. Para definir el estado de cada nodo (0 ó 1), se escriben las reglas lógicas con base en la evidencia experimental, las cuales contemplan a los reguladores de cada nodo y sirven para describir cualitativamente las interacciones entre los componentes de la red. Azpeitia y colaboradores utilizaron este formalismo para describir la dinámica de regulación genética que subyace tras la determinación de los perfiles de expresión genética de los tipos celulares del NCTR [29, 30]. Su modelo obtuvo como estados estables, configuraciones de estado de los nodos que corresponden a las que caracterizan a cada uno de los tipos celulares del NCTR. En el modelo hay reguladores que se mueven entre células o cuya actividad afecta a células vecinas. Estos componentes móviles, forman circuitos de regulación tipo activador-inhibidor [33], que en un modelo de redes acopladas es suficiente para dar lugar a la emergencia de la disposición espacial del NCTR [29]. El modelo booleano de la regulación genética en el NCTR [29, 30], permitió identificar a los elementos e interacciones que son necesarios y suficientes para entender como se establecen los distintos tipos celulares y el patrón celular en el NCTR. Sin embargo, en la raíz de *Arabidopsis* esta red de regulación genética no actuó de manera autónoma, sino que regula el desarrollo y la organización de la raíz de manera compleja con las vías de señalización hormonal, con campos físicos, entre otros.

Los morfógenos como las hormonas son importantes para la organización celular de órganos como la raíz de *Arabidopsis*. Un morfógeno es una molécula que en las células produce respuestas celulares específicas dependiendo de su concentración local. La auxina es una hormona que participa de manera crucial en la regulación del desarrollo de la raíz [34]. Las auxinas son transportadas activamente entre células por proteínas de eflujo (familia de proteínas PIN, entre otras) [35], formando un gradiente de concentración con un máximo en el organizador del NCTR [36, 37]. El gradiente es fundamental para la formación y la regulación del NCTR [38], es importante para regular el tamaño del meristemo [39] y correlaciona con comportamientos celulares de proliferación, elongación y diferenciación celular en la raíz. Se han propuesto varios modelos de la dinámica del transporte de auxinas en la raíz de *Arabidopsis* [40, 41, 42, 43, 31]. Estos modelos consideran dominios espaciales de una o dos dimensiones y han permitido entender cómo emerge el gradiente de concentración de auxinas a lo largo del eje longitudinal de la raíz de *Arabidopsis*.

Los campos físicos constituyen un componente no genético que podría ser importante en la regulación del patrón celular del NCTR, ya que se ha reportado que pueden afectar la

dirección del transporte activo de auxinas en el NCT del vástago aéreo de *Arabidopsis* [12, 13]. Barrio y colaboradores [31] exploraron con un modelo espacio-temporal la cooperación dinámica entre el transporte activo de auxina, la proliferación celular y un campo de tensiones genérico que emerge por la presión causada por la ocupación del espacio por las células en proliferación. Dicho modelo recupera un patrón de tamaños celulares a lo largo del eje longitudinal de la raíz muy similar al encontrado en las raíces reales de *Arabidopsis*. El modelo permitió comenzar a entender cómo se acopla la división celular, el transporte de auxinas, y un campo físico, para dar lugar al patrón macroscópico que caracteriza a la raíz. Este modelo no incorpora la dinámica de regulación de las redes genéticas intracelulares. El estudio de las redes de regulación podría ser importante para entender, por ejemplo, cómo es que las redes de regulación subyacen a la organización de la raíz a través de la regulación del campo de tensiones, y como es que este campo retroalimenta a la diferenciación celular a través de la regulación de la actividad de componentes de las redes de regulación.

Cada uno de estos modelos han ayudado a entender el papel individual de cada proceso en el mantenimiento del NCTR. Sin embargo, aún no existe un modelo que incorpore la dinámica de la proliferación celular, las redes de regulación, el transporte hormonal y los campos físicos en el NCTR. Por lo tanto, a la fecha no se comprende cómo es que estos distintos procesos se integran para dar lugar a los patrones de comportamiento celular que se observan en la raíz de *Arabidopsis*. Para ello es útil contar con un formalismo de simulación multiescala que permita estudiar procesos del desarrollo que ocurren a diferentes niveles de organización. El formalismo debe permitir modelar una población de células, con redes de regulación intracelulares, comunicación entre células, expansión y proliferación celular [1, 2, 3].

Actualmente existen varios formalismos de simulación multiescala para proponer modelos del desarrollo [44, 1, 45, 3, 46]. El formalismo de Modelos Celulares de Potts (CPM) [47, 48, 49, 46], permite modelar a las células como agentes que se pueden expandir, dividir, diferenciar, tener propiedades biofísicas como adhesividad celular diferencial, etc. Las propiedades de las células pueden estar sujetas al estado de redes de regulación intracelulares o al estado del medio que las rodea. Por lo tanto, CPM permite estudiar los procesos que ocurren en cada célula y entre células, y como emerge la organización macroscópica. CPM ha sido utilizado para proponer modelos en su mayoría de células animales o de vida libre (como por ejemplo de bacterias) y existe un solo trabajo sobre desarrollo de plantas [40]. En dicho trabajo no se contemplan fuerzas como la presión de turgencia y la elasticidad de la pared celular, las cuales están detrás de la forma y el tamaño celular. Una extensión de CPM que permita la interpretación de estas fuerzas físicas, permitirá tener una plataforma de simulación donde sea posible proponer un modelo multiescala del NCTR que incorpore los componentes genéticos y no genéticos mencionados previamente. Así, se podrán identificar cuáles son los componentes y las relaciones entre ellos, que son clave para la regulación de la actividad y del tamaño del NCTR. La comprensión de estos procesos en el NCTR, nos permitirá sugerir como es la regulación en otros NCT, dado el patrón celular genérico que los caracteriza.

1.1 El NCT de la raíz de *Arabidopsis*

El modelo multiescala del nicho de células troncales de la raíz (NCTR) que se presenta en este trabajo considera a los siguientes procesos: el transporte polar de las auxinas por la actividad de proteínas de la familia PINFORMED (PIN), la red de señalización de auxinas y el control de la expresión genética de *WOX5*. La evidencia experimental sobre su importancia en el mantenimiento del NCTR se describe a continuación y se revisan modelos computacionales que se han realizado anteriormente para el NCTR.

En el ápice de la raíz primaria de *Arabidopsis* se encuentra el NCTR, el cual consta de las células del organizador del nicho (Centro quiescente, CQ) y las células iniciales a su alrededor [50, 25]. Las células iniciales darán origen a células de distintos tipos celulares dependiendo de su posición respecto al CQ. Las células iniciales proximales dan lugar a los tejidos pro-vasculares, las iniciales distales a células de la columela y epidermis/cofia lateral y las iniciales laterales a células de endodermis/córtex [24] (Figura 1.1). Las células del CQ mantienen en un estado indiferenciado a las células iniciales por medio de un mecanismo molecular de comunicación intercelular de corto alcance [50].

Las células del CQ tienen una actividad mitótica muy baja y tienen la capacidad de regenerar a las células iniciales [51]. Las células iniciales tienen tasas de división bajas y cuando proliferan, una de las células hijas aumenta su tasa de división celular en el dominio de amplificación del meristemo. Después de un número de rondas de división celular, las células disminuyen su probabilidad de dividirse en la zona de transición, hasta ser totalmente nula en la zona de elongación donde las células crecen anisotrópicamente [26] (Figura 1.2). La organización de la raíz de *Arabidopsis* en zonas de comportamiento celular distintivo es producto de la interacción entre vías hormonales y la regulación genética, entre otros procesos [27, 28, 29, 30, 31, 52]. Las auxinas forman un gradiente de concentración y de respuesta en el ápice de la raíz con un máximo de concentración en el CQ. La alteración del gradiente, por ejemplo por perturbaciones del transporte activo de auxinas, produce defectos en la organización del ápice de la raíz [36], lo cual sugiere que el gradiente provee información posicional para su organización.

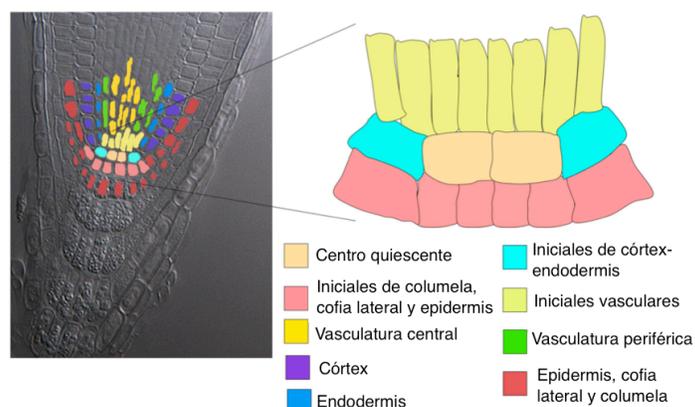


Figura 1.1: **El NCTR en el ápice de la raíz de *Arabidopsis***. Se muestra una fotografía del ápice de la raíz. Con colores se muestran los distintos tipos celulares. Imagen modificada de [30].

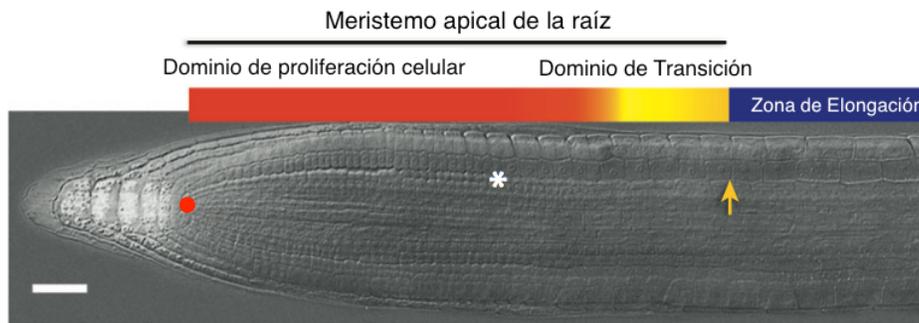


Figura 1.2: **Organización en el eje longitudinal del ápice de la raíz de *Arabidopsis*.** Con un círculo rojo en la punta se marca la posición del NCTR. Con un asterisco blanco se marca arbitrariamente la frontera entre el dominio de proliferación y de transición del meristemo. Con una flecha amarilla se marca el inicio de la zona de elongación. La barra indica la escala, 50 μm. Imagen modificada de [26].

1.1.1 Gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz

Las moléculas que se pueden mover entre células, permiten la coordinación de células vecinas para formar patrones de organización tisular. Por lo tanto, las hormonas y otras moléculas de comunicación intercelular son cruciales para la organización de tejidos y órganos en el desarrollo de plantas y animales. Entre los circuitos de comunicación celular que se pueden formar, están los circuitos de regulación tipo activador-inhibidor [33]. En el caso de *Arabidopsis* estas moléculas son representadas por fitohormonas, microRNAs, péptidos señaladores, entre otras. Varias fitohormonas han sido relacionadas con la organización del NCTR, regulando mutuamente sus vías de señalización y la expresión genética de reguladores importantes del NCTR. Las auxinas son un grupo de fitohormonas que han sido estudiadas ampliamente, pues regulan muchos procesos del desarrollo en *Arabidopsis*, incluyendo a la raíz. Actualmente se conocen los detalles moleculares respecto a su transporte celular y los componentes de la vía de señalización [53]. En el ápice de la raíz el transporte activo de auxinas por las proteínas de la familia PIN forma una red de transporte que da lugar a un gradiente de concentración con un máximo en las células del CQ [37] (Figura 1.3). El gradiente de concentración de auxinas se establece en el desarrollo embrionario [38] y persiste post-embriónicamente siendo requerido para el mantenimiento del meristemo [36]. El gradiente de auxinas es importante para la organización del NCTR pues los inhibidores del transporte polar de auxinas o incubación de raíces en medio con auxinas muestran fenotipos afectados en la organización de la raíz [36]. El gradiente de concentración de auxinas es traducido por la vía de señalización en un gradiente de respuesta (Figura 1.3). DR5 es un promotor sintético de respuesta a auxinas que tiene secuencias AuxREs (Auxin Response Elements) en tándem y suele estar fusionado a genes reporteros como *GUS* o *GFP* [54, 36]. La actividad de DR5 es una medida indirecta de la concentración de auxinas que ha sido utilizada para monitorear la respuesta a auxinas con resolución celular en distintos tratamientos.

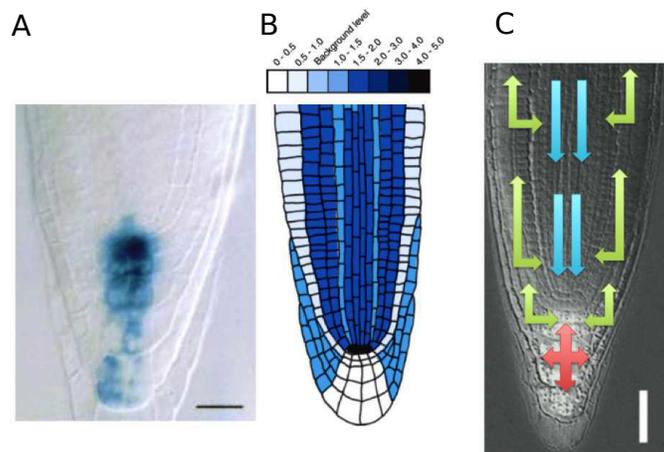


Figura 1.3: **Gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz de *Arabidopsis***. La expresión de *DR5::GUS* en la punta de la raíz (A, barra 25 μ m). Mapa de concentración de auxinas en distintos tipos celulares con datos de espectrometría de masas (B). Los flujos de transporte en el ápice de la raíz (C). Con flechas verdes se marca el flujo basipétalo y lateral, con flechas azules el flujo acropétalo y con flechas rojas el flujo sin polaridad. Imágenes modificadas de [36, 37].

La hipótesis quimiosmótica explica cómo es que la diferencia de pH del apoplasto y el citoplasma celular, influye en el transporte de las auxinas entre las células [55, 56]. En el apoplasto el pH es ácido y las auxinas se encuentran mayoritariamente en forma de especie protonada (*IAAH*). *IAAH* es permeable a la membrana plasmática, y las auxinas pueden entrar pasivamente a las células a través de toda la membrana celular. Adicionalmente el influjo de auxinas se puede llevar a cabo por la actividad de proteínas permeasas de influjo de auxinas de la familia *AUX1/LAX* [57]. En el citoplasma donde el pH es neutro, las especies protonadas de auxinas (*IAAH*) se disocian a su forma aniónica (*IAA⁻*). *IAA⁻* es impermeable a la membrana plasmática y las auxinas salen pasivamente de la célula a una tasa muy baja. Proteínas de eflujo de auxina aumentan la tasa de salida de auxinas. Dichas proteínas de eflujo de auxinas se encuentran distribuidas polarmente en la membrana celular formando flujos dirigidos de transporte de auxinas (Figura 1.4) [58].

El eflujo de auxinas es mediado por dos familias de transportadores de eflujo, las proteínas de la familia *PINFORMED* (familia *PIN* en adelante) y los transportadores *P-GLYCOPROTEIN/MULTIDRUG-RESISTANCE/ABCB* (*PGP/MDR/ABCB*) [61, 35]. En la punta de la raíz se expresan cinco genes de la familia *PIN*: *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4* y *PIN7* cuyas proteínas están localizadas polarmente en las membranas de las células de la raíz [38, 4]. La disposición de las proteínas *PIN* forman un flujo acropétalo que dirige a las auxinas hacia la punta de la raíz por el cilindro vascular, un flujo basipétalo que dirige a las auxinas hacia la base de la planta por la epidermis, un reflujos que dirige a las auxinas del flujo basipétalo al acropétalo en las células de córtex y un flujo hacia todas direcciones en las células de columela. Estos flujos colectivamente generan un mecanismo de transporte que forma un gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz (Figura 1.3). La polaridad de los proteínas *PIN* es un proceso complejo que aún no se comprende en su totalidad. Hay señales en la secuencia y el estado de fosforilación de los transportadores, que influyen en la polaridad de las proteínas *PIN*. La actividad antagonista de la quinasa *PINOID* (*PID*) y la fosfatasa 2A (proteín phosphatase 2A, *PP2A*) [53] definen la

polaridad apical o basal de los transportadores PIN. Además, evidencia reciente sugiere que la tensión en la membrana celular también sirve de señal para definir la polaridad de las proteínas PIN [13].

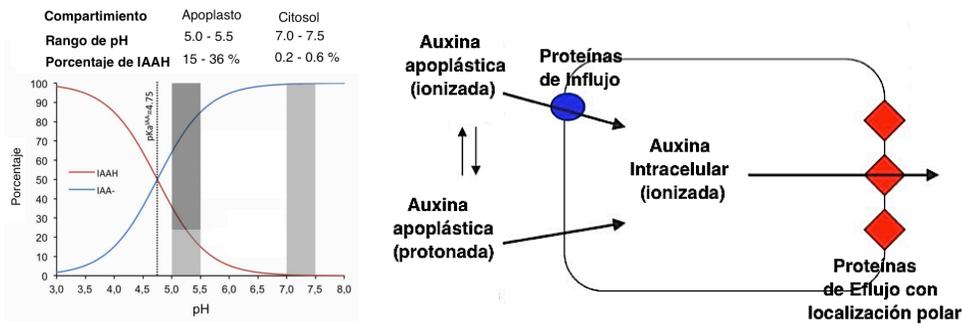


Figura 1.4: **Transporte de auxinas.** Gráfica de los porcentajes de la forma aniónica (IAA^-) y protonada ($IAAH$) de auxinas en distintos valores de pH (A). Se marcan los valores de pH del apoplasto y el citosol. Diagrama de una célula con proteínas de eflujo de auxinas en rojo, y en azul proteínas de influjó de auxinas (B). Con flechas se indican los flujos de transporte celular. Imágenes modificadas de [59, 60].

Las proteínas PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7 de eflujo de auxinas se localizan en la membrana basal de células pro-vasculares. PIN4, PIN3 y PIN7 se localizan en las células de columela sin polaridad redistribuyendo las auxinas del flujo acropétalo al basipétalo. PIN2 se localiza en las células de epidermis y cofia lateral en la membrana apical y en menor densidad en la membrana lateral. PIN2 también se localiza en la membrana basal de las células de córtex. PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7 se han observado localizadas con polaridad lateral en las células de córtex formando el reflujó que redirige a las auxinas de la epidermis a la pro-vasculatura central [62, 63, 64, 4, 65]. El máximo de concentración se forma donde termina el flujo acropétalo y comienza la redistribución de auxinas, que es justo donde están las células del CQ.

Modelos del transporte de auxinas en el ápice de la raíz

La dinámica del transporte de auxinas en el ápice de la raíz ha sido estudiada a través de modelos computacionales que han demostrado que la polaridad y la regulación de las proteínas PIN es suficiente para recuperar el patrón de concentración de auxinas que se observa en la raíz [40, 42, 43]. El modelo estructural [40] mantiene la polaridad y densidad de proteínas PIN constante durante la simulación, mientras que el modelo morfogenético [42, 43] incluye la regulación de las proteínas PIN por las auxinas.

El modelo estructural (Figura 1.5) estudia la red de transporte de auxinas en la punta de la raíz en un dominio de dos dimensiones. El modelo considera el transporte activo de auxinas mediado por proteínas PIN y la difusión de la fitohormona en el apoplasto y el citoplasma. En el modelo se consideran cuatro tipos celulares diferentes, cada uno con una polaridad distinta de transportadores PIN con base en datos experimentales (Figura 1.5). Este modelo reproduce el gradiente y máximo de concentración en la punta de la raíz en un rango amplio de parámetros de permeabilidad (tasas de actividad de proteínas PIN), sin entrada de auxinas desde el tallo, en sobreexpresión de enzimas biosintéticas de auxinas, y en inmersión de la raíz en solución con auxinas tras cortarla. Además el modelo reproduce

la formación del nuevo máximo tras la ablación de las células el CQ y el modelo es consistente con datos experimentales [36]. El modelo estructural describe el mecanismo de transporte que subyace a la distribución de auxinas en el ápice de la raíz [40] y en regiones curvadas en la zona de diferenciación donde se forman las raíces laterales [65].

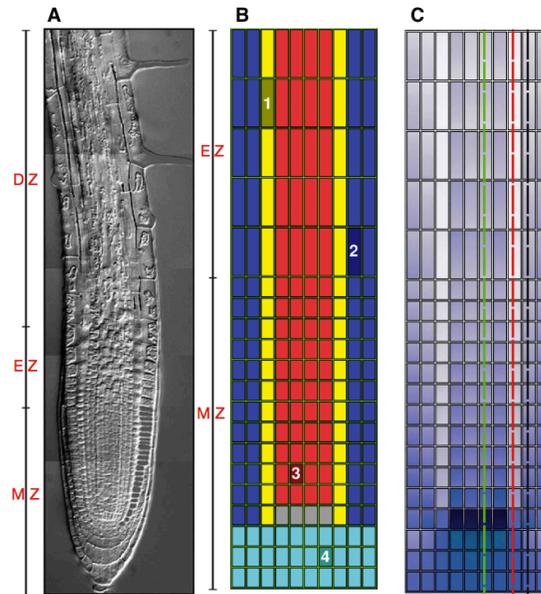


Figura 1.5: **Modelo estructural del transporte de auxinas en la raíz de *Arabidopsis***. A la izquierda se muestra la zona meristemática (MZ), de elongación (EZ) y de diferenciación (DZ) en una fotografía de una raíz de *Arabidopsis* (A). Al centro se muestra la representación de la raíz en dos dimensiones con cuatro tipos celulares con colores distintos (B). Cada tipo celular tiene una polaridad de proteínas PIN distintiva y forman tres flujos: acropétalo, basipétalo y el lateral (reflujo). A la derecha se muestra el campo de concentración de auxinas donde se aprecia un gradiente que se forma dada la posición polar en la membrana celular de las proteínas PIN (C). Imágenes modificadas de [40].

La actividad de los transportadores PIN es regulada por las auxinas de un modo dependiente de la concentración [66], y esta regulación es importante para la formación del patrón de concentración de auxinas en la punta de la raíz en etapas tempranas de desarrollo o tras un daño en el ápice de la raíz (por ejemplo, por un corte o ablación del CQ). Existen dos modelos propuestos por Mironova y colaboradores [42, 43] que consideran el rol de las auxinas en la regulación de sus propios transportadores PIN. En el 2010 Mironova y colaboradores [42] propusieron un modelo morfogenético en un dominio de una y dos dimensiones. En el modelo unidimensional considera una fila de células funcionalmente idénticas. El nivel de concentración de proteínas PIN1 en cada célula se define por la concentración local de auxinas. Las auxinas son transportadas entre células desde un extremo, representando las auxinas que provienen del tallo [42]. Los modelos describen el proceso dinámico por el que las proteínas PIN se polarizan en las membranas celulares en la raíz de *Arabidopsis*. En un segundo modelo, Mironova y colaboradores exploraron la cooperación del modelo estructural con el morfogenético. Este modelo considera la regulación diferencial de proteínas PIN1, PIN2 y PIN3 por las auxinas en un dominio de dos dimensiones. Se consideran dos tipos de células, cada uno expresa algunas de las proteínas PIN con polaridad definida en la membrana (Figura 1.6). En dicho modelo los mecanismos morfogenético y estructural, actúan cooperativamente para la formación del

gradiente y máximo de concentración de auxinas en raíces intactas, y recupera los patrones de concentración tras simular que se corta la punta de la raíz.

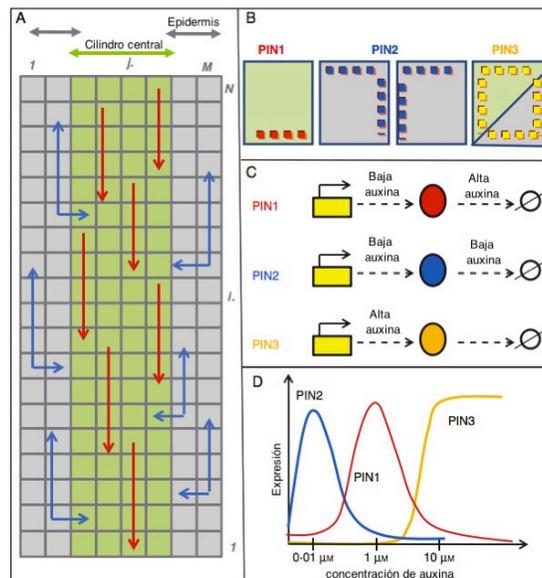


Figura 1.6: **Modelo estructural y morfogénico del transporte de auxinas en la raíz de *Arabidopsis***. Se muestra una representación de la raíz, los flujos de transporte de auxinas que se forman (A), y la polaridad en los dos tipos celulares (B). Se muestra como las auxinas regulan transcripcionalmente a las proteínas PIN1, PIN2 y PIN3 (C, D). Imágenes modificadas de [43].

El modelo estructural y el morfogénico fijan la polaridad de las proteínas PIN en la membranas celulares. En 2008, Stoma y colaboradores [41] exploraron la hipótesis de la canalización (también conocida como flux-based) para la determinación de polaridad de las proteínas PIN [41]. Esta hipótesis supone que existe una retroalimentación positiva entre el flujo y las proteínas que median el transporte de auxinas (polaridad de proteínas PIN), amplificando así pequeños flujos. Estos flujos pueden crear canales de transporte de auxinas que subsecuentemente pueden diferenciar en tejidos de venas en hojas. La hipótesis de la canalización supone que la permeabilidad de la membrana plasmática (por proteínas PIN) aumenta en los lados celulares donde el flujo neto de auxinas es positivo. Stoma y colaboradores [41] fueron capaces de recuperar la distribución de proteínas PIN y de auxinas en un modelo en dos dimensiones del meristemo apical del vástago aéreo y de la raíz de *Arabidopsis*.

Existe evidencia que indica que el crecimiento celular produce tensión entre células vecinas que es transmitida a la membrana celular a través de la pared celular [13]. En el NCTR algunas células están quiescentes, otras dividiendo o elongándose. Por lo tanto, la tensión en la membrana celular será diferente en las distintas zonas de la raíz formando campos físicos mesoscópicos que podrían proveer información posicional. Existe evidencia experimental que sugiere que la tensión en la membrana celular es un regulador del transporte de auxinas al regular la polaridad de las proteínas PIN [13]. En el meristemo del vástago aéreo se sabe que la tensión correlaciona con la disposición polar en la membrana celular de la proteína de eflujo PIN1. Recientemente, Barrio y colaboradores [31] exploraron mediante un modelo espacio-temporal la cooperación dinámica entre el

transporte activo de auxinas, la proliferación celular y un campo de tensiones genérico que emerge por la presión causada por las células en proliferación en la raíz de *Arabidopsis*. Dicho modelo recupera el patrón de tamaños celulares a lo largo del eje ápico-basal de la raíz, lo cual sugiere que estos procesos dinámicos son todos necesarios para explicar la organización en el eje longitudinal de la raíz.

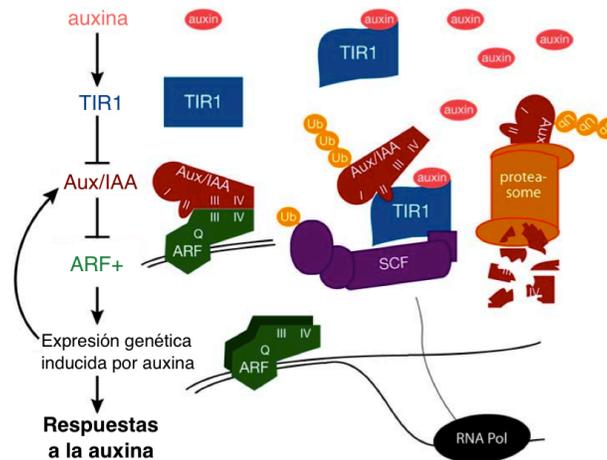


Figura 1.7: **Vía de señalización canónica de auxinas.** A la izquierda se muestra la vía a alta concentración de auxinas donde el represor Aux/IAA se degrada y libera a los ARF+ que regulan la expresión de genes de respuesta. A la derecha se muestra la vía a bajas concentraciones de auxinas, el dímero Aux/IAA-ARF+ no permite la activación del promotor de genes de respuesta. Imagen modificada de [73].

1.1.2 La vía de señalización de auxina

Las fitohormonas dentro de las células se unen a receptores y desencadenan vías de señalización que regulan el metabolismo, la expresión genética o la toma de decisiones celulares como expansión o división celular. La vía de señalización de auxinas regula la expresión genética de componentes de la red de regulación del NCTR [29, 30]. Por ejemplo, *WOX5* [67] y los genes de la familia *PLETHORA* [68] responden a las concentraciones de auxina. La concentración de auxinas dentro de las células es percibida por una vía de señalización canónica que se describe a continuación. La auxina une a dos proteínas que constituyen sus co-receptores: TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) y Aux/IAA (AUXIN/INDOLE-3-3-ACETIC ACID). TIR1 es una proteína F-box parte del complejo de ubiquitinación SCF-TIR1 (SKP1, Cullin, TIR1) que da especificidad al proceso de ubiquitinación, y su unión a la auxina favorece la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA [69, 70] (Figura 1.7). Los factores de respuesta a auxinas (ARF) pueden ser activadores (ARF^+) o inhibidores (ARF^-) de la transcripción. Ambos se unen a secuencias AuxREs (Auxin Response Elements) en los promotores de genes de respuesta a auxinas [71] para regular su expresión y compiten por los sitios de unión [72]. Los ARF^+ pueden homodimerizar con otras proteínas ARF^+ y heterodimerizar con proteínas Aux/IAA. El dímero Aux/IAA- ARF^+ no permite que ARF^+ se una a los promotores y por lo tanto inhibe su capacidad como regulador transcripcional [71, 54]. Las proteínas Aux/IAA también pueden homodimerizar. Cuando la concentración de auxinas en la célula es alta, la auxina se une al dímero TIR-Aux/IAA y aumenta la proteólisis de los represores Aux/IAA promoviendo la actividad de los ARF^+ [73, 74, 53]. Es interesante que entre 18

los genes cuya expresión es promovida por las auxinas, se encuentran *WOX5* regulador importante del NCTR [67, 75] y las proteínas Aux/IAA que son los represores de la vía de señalización.

Se han identificado 23 genes de tipo ARF y 29 de Aux/IAA en el genoma de *Arabidopsis* [53] y cada uno tiene propiedades bioquímicas distintas [76]. Esto implica que el control de la expresión genética por auxinas involucra a una red de señalización compleja con muchos elementos específicos para distintos procesos y por lo tanto no es trivial predecir su comportamiento.

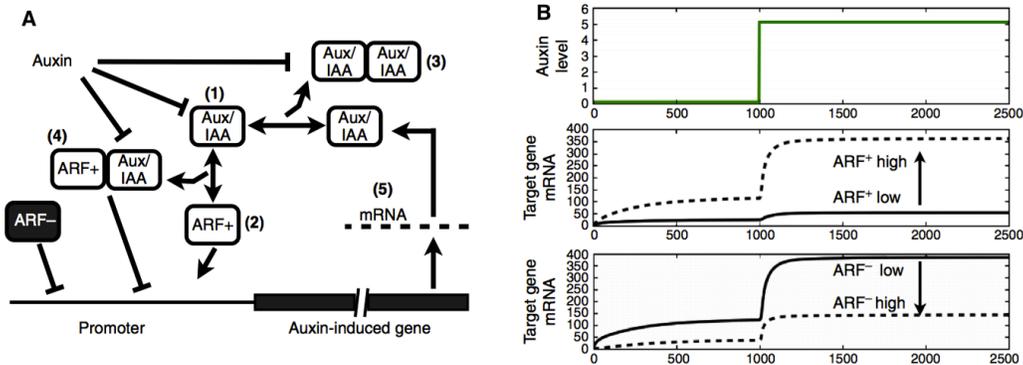


Figura 1.8: **Modelo de la señalización de auxinas.** A la izquierda se ve la red genérica de señalización de auxinas (A). Los elementos de la red son: auxinas, ARF^+ , ARF^- , Aux/IAA y un gen de respuesta. A la derecha se muestran tres gráficas del comportamiento del modelo (B). Arriba se ve la concentración de auxinas, debajo la expresión del gen blanco en concentraciones altas y bajas de ARF^+ , y debajo la expresión en concentraciones altas y bajas de ARF^- . Imágenes modificadas de [78].

Modelos de la red de señalización de auxina

Actualmente se conocen los componentes principales de la vía de señalización de auxinas y se han hecho modelos matemáticos describiendo la dinámica de la red de regulación [77, 78, 79]. Vernoux y colaboradores [78] modelaron la vía de señalización de auxinas contemplando cinco elementos genéricos: Auxinas, ARF^+ , ARF^- , Aux/IAA y un gen blanco. Primero hicieron un mapa de expresión y el interactoma de todas las proteínas de las familias Aux/IAA y ARF de *Arabidopsis* en el meristemo apical del vástago aéreo. Hicieron un análisis de clustering de los datos del interactoma en el que agruparon las proteínas con interacciones similares. Es decir se agrupó en un clúster a aquellas proteínas conectadas entre sí que tienen el mismo grado de conectividad, es decir con un número parecido de interacciones. Se recuperaron tres clústers: (i) un clúster conformado principalmente por las proteínas Aux/IAA que interactúan activamente con otras proteínas Aux/IAA, (ii) un segundo clúster conformado por proteínas Aux/IAA y las proteínas ARF^+ y (iii) un tercer clúster conformado por las proteínas ARF^- las cuales interactúan limitadamente con otras proteínas de la red. A partir de estas interacciones infirieron una topología de la red de señalización de auxina para proponer un modelo dinámico de la regulación transcripcional de respuesta a auxinas (Figura 1.8). Utilizaron un sistema de ecuaciones diferenciales para modelar que proteínas ARF^+ dimerizan con proteínas Aux/IAA, las proteínas ARF^- limitan la actividad de proteínas ARF^+ en la inducción de

la expresión genética en su modelo, y la presencia de auxinas remueve la acción represora de los Aux/IAA pero no la acción inhibitoria de los *ARF*⁻ sobre las proteínas *ARF*⁺.

El transporte activo de auxinas en el ápice de la raíz origina variaciones locales en la concentración de la hormona. Estas concentraciones son interpretadas por las células donde el estado de la vía de señalización (concentración de cada elemento de la vía) tiene un rol importante en la sensibilidad a la hormona y la magnitud de la respuesta. El trabajo de Vernoux [78] es un indicativo que para entender el efecto de las auxinas en las células es importante tanto estudiar el transporte polar de auxinas originando variaciones locales de la fitohormona, al igual que cómo las células responden a dichas concentraciones con sensibilidades diferentes.

1.1.3 Regulación de la expresión genérica en el NCTR de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Las auxinas son un componente de la red de regulación que controla la expresión genética en las células del NCTR [29, 30] y regula la expresión de dos de sus componentes, los genes de la familia *PLETHORA* (*PLT*) y *WOX5*. Los genes de la familia de *PLT* son reguladores importantes para la especificación y la actividad de las células iniciales en NCTR. Se ha sugerido que los genes de la familia *PLT* son los principales efectores de la respuesta a auxinas ya que se expresan formando un gradiente (de mRNA y proteína) que coincide con el de las auxinas [80, 68]. También las auxinas regulan la expresión de *WOX5* a través del *ARF*⁺, *MONOPTEROS* (*MP*) [75, 67]. *WOX5* se expresa exclusivamente en las células del CQ y es indispensable para mantener a las células iniciales en estado indiferenciado. En mutantes *wox5*, de pérdida de función, la fila de células iniciales distales se diferencian, mientras que en mutantes de sobre-expresión, aumenta el número de filas con células iniciales distales [67, 81] (Figura 1.9).

WOX5 es un factor de transcripción de la familia WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN que tienen funciones importantes en todos los estados de desarrollo de las plantas [82]. *WOX5* se expresa en la célula hipófisis desde el estado corazón en el desarrollo embrionario de *Arabidopsis* [82]. Esta célula dará lugar al CQ y a las células iniciales distales [67]. Entonces *WOX5* se expresa en el NCTR desde su formación en el desarrollo embrionario y una vez formado el CQ, *WOX5* se expresa exclusivamente en dichas células. La expresión de *WOX5* es dependiente de la vía de señalización de auxinas ya que en mutantes de pérdida de función de *MP* (un factor de transcripción *ARF*⁺), la expresión de *WOX5* no se observa en la hipófisis [67] y no se desarrolla una raíz en plantas adultas. Lo cual sugiere que la actividad de *WOX5* es crucial para el desarrollo del NCTR. En experimentos donde la raíz se incubaba con auxinas (NAA), la expresión de *WOX5* desaparece en el CQ. Aumentando la sensibilidad del microscopio se puede observar que se expresa en las células del CQ e iniciales de endodermis. Siendo que la expresión de *WOX5* es dependiente del *ARF*⁺ y la auxina disminuye su expresión en el CQ, las auxinas tienen un efecto de campana en la expresión de *WOX5* en la raíz de *Arabidopsis*. Además se ha demostrado que *WOX5* promueve el aumento en la concentración de auxinas. Por un lado, *WOX5* podría estar disminuyendo la expresión de *SUR2*, la cual es una enzima que redirige los precursores de auxina a la síntesis de glucosinatos de indol [75]. También se ha demostrado que *WOX5* en el CQ modula la expresión de genes involucrados en la 20

biosíntesis de auxina como *YUC1* [83]. Por lo tanto, existe un asa de retroalimentación positiva entre las auxinas y *WOX5*.

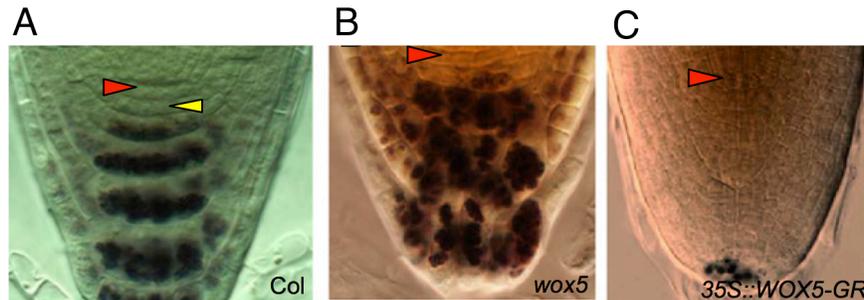


Figura 1.9: **WOX5 es un regulador del mantenimiento de las células iniciales distales.** En las imágenes se marca con una flecha roja la posición del CQ. Se pueden identificar a las células distales diferenciadas por la tinción con lugol del almidón de los amiloplastos. Se muestra la organización del NCTR en una raíz intacta (A) donde se marca con una flecha amarilla la primera fila de células iniciales distales, en una mutante de pérdida de función de *WOX5* donde la diferenciación celular aumenta y no hay células iniciales distales (B), y en una raíz con sobreexpresión de *WOX5*, donde la diferenciación celular es mucho menor y se tienen múltiples filas de células iniciales distales (C). Imágenes modificadas de [81].

Modelo de la red de regulación genética en el NCTR

Las células que componen el NCTR son las del CQ, las iniciales proximales, distales y laterales, que muestran distintos perfiles de expresión genética. A la fecha se han identificado los componentes moleculares principales que subyacen a la regulación genética en el NCTR. Azpeitia y colaboradores [29, 30] integraron la evidencia experimental disponible en la literatura sobre la regulación genética en el NCTR en un modelo booleano que describe la dinámica de regulación que subyace la determinación de tipos celulares del NCTR (Figura 10). Elementos del modelo, como *SHORTROOT (SHR)*, *CLE-X*, *Auxina* y *WOX5* se pueden mover entre células o regulan la red de regulación de células vecinas. Este movimiento de componentes de la red, forma circuitos de comunicación celular. Con el formalismo de las redes booleanas fue posible estudiar las implicaciones de estos circuitos. En un modelo de redes acopladas, cada célula tiene una red y la comunicación entre células se modela como interacciones entre redes. Un modelo de redes acopladas de las células del NCTR recuperó, como único estado estable, la disposición celular con el CQ al centro y las células iniciales a su alrededor.

En este modelo se incluye la vía de señalización de auxinas que regula la expresión de *WOX5* [29, 30]. *WOX5* además es regulado por los factores transcripcionales *SHR* y *SCR*, entre otros. Una predicción del análisis del modelo es que *WOX5* reprime a los represores *Aux/IAA* (IAA en Figura 1.10). Esta predicción es necesaria para recuperar la organización espacial del NCTR por comunicación molecular célula-célula. Al ser un modelo discreto no captura totalmente características continuas de la regulación del NCTR, como por ejemplo el gradiente de concentración de auxinas que es representado por solo dos valores: 0 y 1.

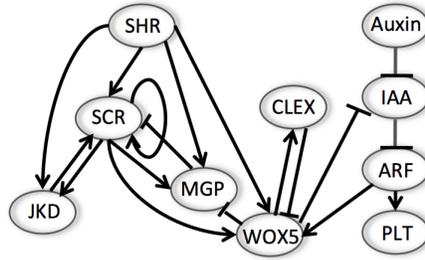


Figura 1.10: **Modelo booleano de la regulación genética en el NCTR.** Las flechas indican activación y las líneas chatas indican represión. Imagen cortesía de Eugenio Azpeitia.

1.1.4 Expansión celular en plantas

Las células vegetales están revestidas por una pared compleja de polisacáridos que ellas mismas sintetizan [84]. La pared celular impide la migración celular y por lo tanto la organización celular de un tejido en plantas es en gran medida el resultado de patrones de expansión y división celular [85]. La pared celular primaria se forma alrededor de la membrana plasmática durante el crecimiento. La pared celular provee soporte estructural y sus componentes principales son las microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos complejos como la pectinas y hemicelulosas [84]. Las microfibrillas de celulosa se sintetizan por largos complejos membranales que las excretan por la superficie celular, mientras que los polisacáridos de la matriz se sintetizan en el aparato de Golgi y se transportan en vesículas que se fusionan con la membrana plasmática [84]. Una vez fuera de la célula, los polisacáridos de la matriz se asocian con las microfibrillas de celulosa y polisacáridos preexistentes por interacciones físicas no covalentes, ligaciones enzimáticas y reacciones de entrecruzamiento (crosslinking).

Para entender cómo se lleva a cabo el crecimiento celular en plantas en el contexto de la pared celular es importante definir dos conceptos: presión de turgencia y propiedades elástico-plásticas de la pared celular.

La concentración de solutos en las células vegetales es mayor que en el espacio extracelular. Por lo tanto, por ósmosis, existe una tendencia a que agua del espacio extracelular entre al interior de las células. Sin embargo, la pared celular impide que el tamaño celular pueda aumentar. Por lo tanto existe un potencial osmótico. La presión de turgencia es la fuerza que mantiene a la membrana celular contra la pared celular como consecuencia de la diferencia en el potencial osmótico entre el interior y el exterior de la célula [84, 86]. Las propiedades elástico-plásticas de la pared celular definen si la pared puede ser extendida y de ser así, a qué velocidad. Así entonces, la presión de turgencia es una fuerza que busca expandir el volumen celular, mientras que la pared celular se opone a dicha expansión, con la consecuente generación de tensión en la pared celular¹.

La tensión en la pared celular es consecuencia de la presión de turgencia que busca aumentar el tamaño celular. Dicha tensión causa una deformación en la pared celular. Cuando la tensión es suficientemente alta, provee la energía mecánica necesaria para extender (plásticamente) la pared celular de manera irreversible [84]. La extensión plástica de la pared celular es necesaria para la expansión celular y se lleva a cabo por un proceso

controlado llamado reptar o *creeping*. Durante el reptar, la matriz de polisacáridos cede a la tensión y permite que las microfibrillas de celulosa se reacomoden. El primer paso para reptar es la disrupción bioquímica de enlaces en los polímeros de la pared celular con un consecuente rearrreglo. Así se reduce la tensión en la pared y el turgor de la célula, permitiendo la entrada adicional de agua y por ende la extensión plástica [85]. La pared celular se extiende una magnitud limitada dados los enlaces restantes de entrecruzamiento entre los polímeros y su estructura misma. Durante el reptar, la extensión elástica es convertida en extensión irreversible, y posteriormente el paso de extensión elástica se repite [85].

La velocidad con la que este proceso ocurre depende de las propiedades de la pared celular que son conferidas por la composición y estructura de polisacáridos que la forman [84, 87, 85]. El xiloglucano es un tipo de hemicelulosa que se piensa que sirve para entrecruzar microfibrillas de celulosa. Entre más entrecruzamientos, más resistente será la pared celular pues se alteran sus propiedades elástico-plásticas [84]. Las propiedades de la pared celular pueden ser descritas por el umbral de extensibilidad π y la extensibilidad m . π establece un umbral de la tensión necesaria para realizar cambios plásticos en la pared celular y m es una medida de la magnitud de la extensión irreversible de la pared celular en cada episodio de reptar [85, 86]. Ambos parámetros dependen de la composición, organización y los enlaces entre componentes que forman a la pared celular. Los radicales hidroxilo y ciertas enzimas pueden eliminar enlaces entre los constituyentes de la pared celular, lo cual afecta a el umbral π y extensibilidad m sin alterar significativamente la composición y estructura de la pared. Entre las enzimas se encuentran la expansina, la xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa y la endo-(1,4)- β -D-gluconasa, las cuales regulan respuestas rápidas de expansión celular en cuestión de segundos [84, 85]. Al contrario, los cambios lentos en la expansión celular resultan de cambios substanciales en la composición y los enlaces de entrecruzamiento en la pared celular [84].

La expansión celular en plantas consiste de dos procesos interrelacionados; la regulación del potencial osmótico promoviendo la entrada de agua a la célula y el aumento de su volumen, y la extensión irreversible de la pared celular (reptar) cuando la tensión en la pared rebasa el umbral π . Un proceso importante que ocurre simultáneamente si la expansión es continua, es la deposición de nuevos polímeros en la pared celular para así mantener su integridad y evitar que se debilite [84, 87, 85, 86]. El tamaño celular es la optimización parcial de ambas restricciones y emerge de estas dos procesos que actúan en direcciones contrarias [86]. La expansión celular es expresada matemáticamente por la ecuación de Lockhart como, $\frac{dV}{dt} = m(P - \pi)$. Dicha ecuación dice que la tasa volumétrica de la expansión celular es proporcional a la diferencia entre la presión de turgencia P y el umbral de extensibilidad π [88, 87, 85, 86]. Mientras la fuerza de la presión de turgencia sea menor a el umbral π , $P < \pi$, la pared se comportara como un material elástico. Sin embargo, cuando $P > \pi$, entonces la pared se comportará como un material plástico y se extenderá irreversiblemente de forma proporcional a m .

¹ Cuando se aplica una fuerza a un material elástico-plástico se puede extender reversiblemente. Cuando la fuerza rebasa un umbral, las deformaciones serán irreversibles [86].

Hipótesis

Si el transporte y la vía de señalización de auxinas son reguladores clave del nicho de células troncales de la raíz de *Arabidopsis*, entonces un modelo multiescala que incorpore ambos procesos permitirá recuperar el preestablecimiento del patrón del nicho de células troncales de la raíz de *Arabidopsis*.

Objetivo General

Proponer una plataforma de simulación multiescala e implementar con ella un modelo del transporte y la vía de señalización de auxinas en el nicho de células troncales de la raíz de *Arabidopsis*.

Objetivos particulares

1. Estudiar el formalismo de Modelos Celulares de Potts y sus distintas aplicaciones. Plantear una extensión para implementar modelos de comportamientos celulares de plantas en términos de expansión y proliferación celular.
2. Implementar en el programa CompuCell3D la extensión de Modelos Celulares de Potts para modelar comportamientos celulares de plantas.
3. Implementar un modelo del transporte de auxinas en el nicho de células troncales de la raíz en dos dimensiones. Explorar la posibilidad de incluir un modelo de la vía de señalización de auxinas en cada célula de la simulación.
4. Validar el modelo mediante la simulación de perturbaciones y analizar su efecto en el patrón de concentración de auxinas.

Capítulo 2

Métodos

2.1 Modelos celulares de Potts

Los Modelos Celulares de Potts (CPM) constituyen un esquema de modelación para representar a las células como agentes con dinámicas intra- e intercelulares (redes bioquímicas y gradientes de moléculas) [46, 47, 48, 49]. Los agentes pueden expandirse y proliferar según el estado de redes intracelulares o de su microambiente. Este formalismo fue propuesto por los físicos James Glazier y François Granier para estudiar el papel de la adhesión celular diferencial en la clasificación celular de células embrionarias [47, 48, 89]. Desde entonces, CPM ha sido utilizado para estudiar una gran variedad de sistemas y para ello se han desarrollado diversas extensiones que consideran a las restricciones e interacciones celulares importantes para un sistema de estudio particular. Por ejemplo restricciones en el área celular, superficie celular, e interacciones como adhesividad celular, quimiotaxis, haptotaxis, entre otras. Estas restricciones e interacciones celulares se modelan en CPM siguiendo un principio de minimización de la energía. Con distintas extensiones se han propuesto modelos para estudiar la dinámica de células embrionarias [47, 48], la dinámica de macrófagos y bacterias, la gastrulación, la invasión de tumores [90], la culminación del cuerpo fructífero de la ameba *Dyctiostelium discoideum* [91], la organización del ojo de *Drosophila* [92], la vasculogénesis [93], la somitogénesis de vertebrados [94], el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* [40], entre muchos otros.

En los CPM se representa explícitamente a una célula como un agente que es capaz de interactuar con otros agentes (células) en su vecindario. El espacio de la simulación se define como una rejilla I, J de dos dimensiones. I indica la magnitud de la rejilla en el eje radial y J en el eje longitudinal. Cada celda i, j de la rejilla tiene un identificador o spin (σ) asociado. Se tienen tantos identificadores σ como número de células se quieran modelar. Una célula se define como el espacio de celdas con el mismo identificador σ . Por lo tanto, las células en CPM son regiones de celdas con el mismo identificador. Modelar la expansión celular de una célula $\sigma = 1$ es igual a aumentar el número de celdas en la rejilla con un identificador $\sigma = 1$. El medio no celular siempre tendrá $\sigma = 0$ (Figura 2.1).

Propiedades de las células en CPM

Las regiones de celdas con el mismo σ (célula en adelante) tienen asociadas propiedades como: tipo celular τ , área A_σ (que es igual al número de celdas con el mismo identificador), perímetro P_σ (que es igual al número de celdas en frontera con otra célula o el medio), y el centro de masa (COM). Los parámetros A_T y P_T (valores target en adelante) indican el valor nominales de área y perímetro de una célula y pueden estar definidos específicamente para cada célula o como parte de los parámetros que caracterizan a un tipo celular τ . Las propiedades de área A_σ y perímetro celular P_σ , tenderán a adquirir los valores

de A_T y P_T (Figura 2.1). Cada célula en un CPM tiene un centro de masa (COM) que es la posición en la rejilla de CPM que mejor representa la posición de la célula. En dos dimensiones es una coordenada i y j que representa el punto medio entre el máximo y el mínimo valor en i , y el máximo y mínimo valor en j de cada célula.

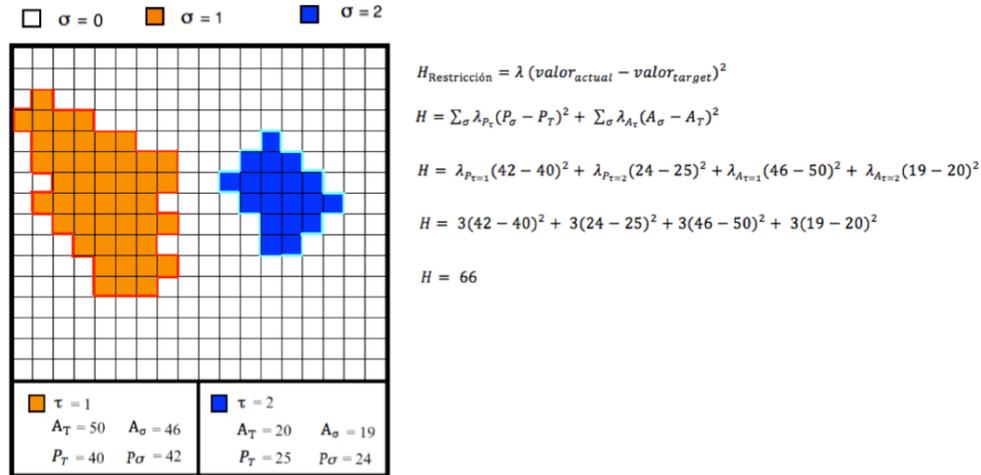


Figura 2.1: **Propiedades celulares de los agentes en CPM.** El espacio de la simulación tiene dimensiones I, J en las coordenadas x, y . En la imagen se muestran dos regiones de posiciones adyacentes con el mismo σ , $\sigma = 1$ y $\sigma = 2$, que representan a dos células. El medio externo que es el espacio donde no hay agentes y siempre tiene $\sigma = 0$. Las células tienen tipos celulares asociados. Las células de $\tau = 1$ y $\tau = 2$ tienen valores diferentes de A_T y P_T . La función H cuantifica las desviaciones de las propiedades de las células respecto a los valores target.

El hamiltoniano energético (la función H) es la energía potencial del sistema que cuantifica las desviaciones de las propiedades celulares (e.g. área A_{σ} , perímetro P_{σ} , etc.) respecto de los valores target (Figura 2.1). La función H puede tener tantos términos como restricciones e interacciones se modelen, por ejemplo, adhesión celular (afinidad de contacto), área, perímetro, quimiotaxis, distancia entre centros de masa, etc. (Tabla II.1). Para el caso de las restricciones, la función H es la suma del cuadrado de la desviación para cada restricción en cada célula, y así cualquier desviación (i.e. $A_{\sigma} < A_T < A_{\sigma}$) aumenta la energía potencial del sistema. Por ejemplo, si una célula σ tiene área actual $A_{\sigma} = 15$ y su área target es $A_T = 13$, la desviación para la restricción del área se cuantificará como $H = (15 - 13)^2 = 22$.

La intensidad de la restricción se define con el parámetro λ . Cada restricción de la función H se multiplica por una λ que es un parámetro denominado el multiplicador de Lagrange. Este parámetro permite asociar intensidad a las restricciones de la función H . Entonces, si λ es muy grande la restricción es fuerte y tiene mayor tendencia a cumplirse la restricción, y si λ es menor la restricción es más laxa. Cuando distintas restricciones (área, perímetro, u otras) no pueden ser optimizadas simultáneamente, la célula adquiere valores que optimizan parcialmente todas las restricciones.

Término	Proceso Biológico
$H_{adhesión} = \sum_{\sigma} J_{\tau\sigma, \tau\sigma'} (1 - \delta_{\sigma_{i,j}, \sigma_{i',j'}})$	Adhesión celular mediada por caderina, integrina u otras moléculas
$H_{perímetro} = \sum_{\sigma} \lambda_{\sigma} (P_{\sigma} - P_T)^2$	Restricción del perímetro celular
$H_{área} = \sum_{\sigma} \lambda_{\sigma} (A_{\sigma} - A_T)^2$	Restricción del área celular
$H_{quimiotaxis} = \mu(\sigma)C(x)$	Quimiotaxis en un campo químico

Tabla II.1 Posibles extensiones de la función H. Restricciones e interacciones que se pueden incorporar a la función H del sistema.

Simulación Monte Carlo

Disminuir la función H significa optimizar mejor a las restricciones e interacciones del sistema. Para conseguir minimizar la función H se lleva a cabo una simulación Monte Carlo. De la rejilla de dimensión I, J se elige al azar una celda i, j . Después se elige al azar a una celda vecina del primer punto, es decir a i', j' (el grado del vecindario es modificable, en el ejemplo se consideran los vecinos en primer grado, Figura 2.2). Si $\sigma_{i,j}$ es igual a $\sigma_{i',j'}$ significa que son celdas de la misma célula y entonces se repite este paso. Cuando se tienen dos puntos vecinos con identificadores σ diferentes, se propone que el punto i, j cambie su identificador al del vecino, $\sigma_{i,j} \rightarrow \sigma_{i',j'}$, es decir, que una célula aumenta una celda a costa de que su vecina lo pierda. Para evaluar si este cambio es favorable para el sistema, se calcula la función H en las dos condiciones. Si el cambio disminuye la energía potencial del sistema, se acepta con probabilidad de 1. Entonces las restricciones e interacciones del sistema se optimizan tras efectuar el cambio. Si el cambio no disminuye la energía del sistema, se acepta con una probabilidad $e^{-\Delta H/\beta}$ y así se aceptan cambios no favorables que permiten explorar el vecindario y hallar un mínimo energético global (Figura 2.3). La probabilidad con la que se aceptan cambios no favorables se puede modificar con el parámetro β y se le denomina la temperatura de la simulación. Las propiedades de las células pueden ir cambiando a lo largo de la simulación y el mínimo global no es constante. Este esquema se repite hasta que se hayan intentado tantos cambios como el número de celdas en la rejilla que definen un paso Monte Carlo (MCS). Una medida como MCS, permite establecer una escala temporal donde en cada paso o de un número discreto de pasos se ejecuten otras dinámicas como la actualización del estado de redes intracelulares, el transporte activo de moléculas, entre otras.

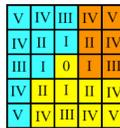


Figura 2.2: **Vecindario de una celda i, j .** El vecindario del punto i, j (señalado como 0) se define en primer grado como todas las celdas vecinas con I es el vecindario en primer grado, II es el de segundo grado, III en tercer grado, y así consecutivamente.

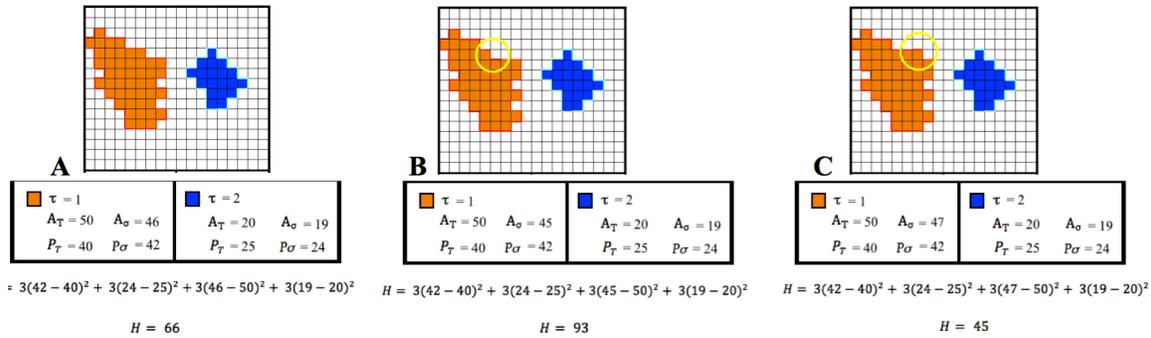


Figura 2.3: **Simulación Monte Carlo de CPM.** Se muestra al condición inicial (A) y el valor de la función H en esa condición. Se muestran dos posibles cambios de celdas, el primero no es favorable para el sistema (B), y el segundo si optimiza mejor las restricciones de las células (C).

Steppables

Los steppables permiten implementar distintos procesos dinámicos que son importantes para un sistema de estudio. En una simulación de CompuCell3D se puede incluir el transporte de moléculas entre células, la secreción de moléculas, la expansión celular, la división celular, la dinámica de redes de regulación intracelulares, entre otros, cada uno con un steppable. Además estos steppables pueden estar acoplados, por ejemplo si el estado de una red de regulación intracelular define la tasa de expansión celular, de secreción de moléculas, entre otras posibilidades. Los steppables pueden modelar procesos que ocurren a distintas escalas temporales. Por lo tanto los tiempos de actualización deben variar entre ellas (Figura 2.4), siendo que un proceso se puede actualizar cada $MCS = 1$, $MCS = 5$, $MCS = 100$, etc.

CompuCell3D

CompuCell3D es un programa que implementa los CPM con una interfaz gráfica [49, 46]. Fue desarrollado por el grupo de investigación del James Glazier del Biocomplexity Institute en la Universidad de Indiana, y permite hacer simulaciones sencillas con códigos XML y Python. El archivo XML define aspectos básicos de la simulación como la dimensión de la rejilla, el tiempo MCS que durará la simulación, los tipos celulares, etc. Los archivos Python permiten generar los códigos de los steppables, es decir de procesos dinámicos que pueden cambiar parámetros del sistema a lo largo de la simulación (como A_T o P_T , expansión y división celular). En los archivos Python se define la escala temporal de cada steppable.

El estudio de procesos intracelulares como son las redes de regulación bioquímica o genética, se realiza en CompuCell3D a través de los steppables. Se pueden considerar modelos de tipo booleano, bioquímicos, termodinámicos, u otros, para lo cual se precisa un código Python [95]. CompuCell3D tiene las funciones necesarias para incorporar modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) cuando están en formato SBML (Systems Biology Markup Language). SBML es un formato estándar de redes de regulación con el propósito de promover el intercambio de modelos. Existe una gran cantidad de

plataformas de modelación como Jarnac y JDesigner (<http://sys-bio.org/>) que cuentan con traductor SBML para importar y exportar modelos. Actualmente existen bases de datos con 462 modelos SBML (modelos curados, actualización Agosto 2013, <http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/>).

El uso de herramientas computacionales como Jarnac y JDesigner permite generar un modelo de ODE para representar una red de regulación, exportarlo a un archivo SBML y posteriormente incorporarlo a CompuCell3D por medio de un steppable. El steppable actualiza el estado de los componentes de modelo de ODE cada n pasos MCS [95]. Se pueden incluir modelos de redes de regulación en células de distintos tipos celulares.

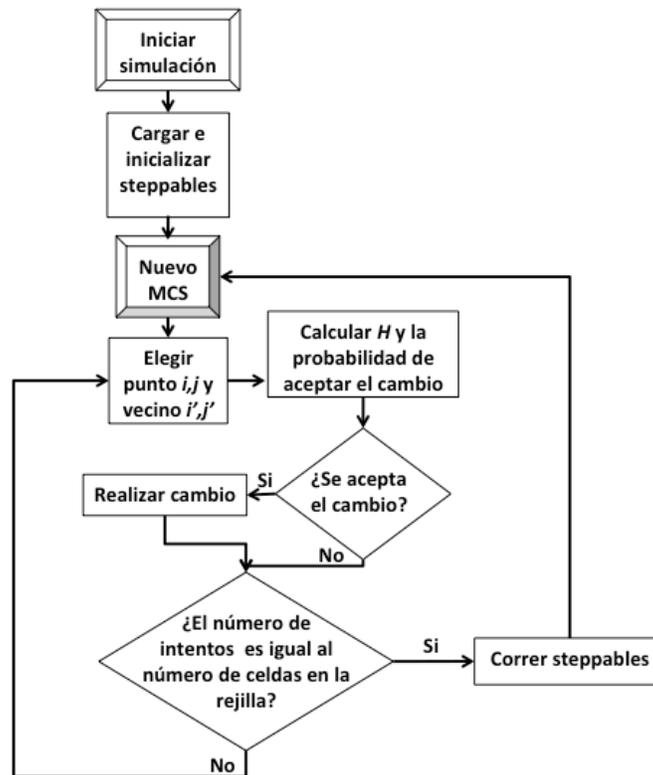


Figura 2.4: **Diagrama de flujo de una simulación de CPM.** Se inicializa el modelo, se inicia un MCS con el ciclo donde se elige un cambio que disminuya la función H, y cada fin del MCS se ejecutan los steppables correspondientes. Figura modificada del manual de CompuCell3D.

Implementación de la función H en CompuCell3D

Para la implementación de la función H (Sección 3.1) en una simulación de CompuCell3D se escribieron tres códigos, dos en el lenguaje de programación Python y uno en XML (*PlantSteppables.py*, *Plant.py* y *Plant.xml*) que se incluyen en el Anexo 1¹ de este trabajo. Estos códigos se utilizaron para las simulaciones de la sección 3.2. Los archivos se describen a continuación:

- *Plant.xml*: define las dimensiones de la rejilla ($x=100$, $y=100$), el tiempo de las simulación (MCS = 500), la temperatura de la simulación ($\beta=10$), se listan los

tipos celulares (*medium* y *cell*), la distancia restrictiva entre los COM de las células (la tercera restricción de la función H y $L_T = 4$) y la configuración celular inicial de la simulación con dos células (*plant.piff*) donde se definen dos agentes de tipo *cell* en el centro de la rejilla.

- *PlantSteppables.py*: se definen cuatro steppables: Growth, Mitosis, Cells_Plot y HistEP. En Growth se modela el crecimiento gradual de las células y en Mitosis la división celular al alcanzar un área celular mínima. En Growth se define $\lambda_p = 5$, $\lambda_A = 5$, $A_T = 20$, $P_T = 5$, y desde el tiempo MCS = 100 se incrementa el A_T una unidad cada 2 MCS. Si la diferencia absoluta entre el P_σ y P_T es mayor a $X=20$, entonces se incrementa P_T una unidad (para modelar un episodio de reptar). En Mitosis se dividen las células cuya A_σ sea mayor a 50. El eje de división se define con el vector (0, 1, 0), es decir el eje de división es horizontal. Se actualizan las propiedades de las células hijas a las iniciales. En Cells_Plot se grafica el número de células cada MCS. En HistEP se grafica un histograma de los valores poblacionales de presión celular y la deformación de la pared celular.
- *Plant.py*: Declara en la simulación una instancia de cada uno de los steppables.

Implementación del transporte de auxinas en CompuCell3D

La función H propuesta para modelar expansión y división celular en plantas permite modelar el transporte de auxinas en las células del ápice de la raíz de *Arabidopsis*. Las células tienen un área y perímetro constante (no hay expansión ni división celular) y hay una distancia restrictiva entre sus COM para evitar desplazamientos. Los parámetros de área y perímetro de los agentes, son los mismos que en la simulación anterior por lo que las fuerzas de presión celular y deformación de la pared celular son similares. El modelo incorpora el transporte activo y pasivo de auxinas en el ápice de la raíz. [40]. Se escribieron tres códigos para implementar el modelo en CompuCell3D, dos en el lenguaje de programación Python y uno en XML que se incluyen en el *Anexo 2* de este trabajo y se describen a continuación:

- *Root.xml*: Se define el tamaño de la rejilla ($x=300$, $y=300$), el tiempo de la simulación (MCS = 20,000), la temperatura de la simulación ($\beta=3$), se listan los tipos celulares: *Medium*, *CQ*, *Pro-vascular*, *Columela*, *EndodermisRight* (endodermis y córtex derechas), *EndodermisLeft* (endodermis y córtex izquierdas), *BorderLateralLeft* (epidermis izquierda), *BorderLateralRight* (epidermis derecha), *Border* y *Source*, la distancia restrictiva entre los COM de células vecinas (la tercera restricción de la función H, $L_T = 3$) y la configuración celular inicial de la simulación (*Condicion inicial root.piff*) que es un corte longitudinal de la raíz. Cada tipo celular tiene definida como una de sus propiedades, la dirección de transporte de auxina dada la polaridad de proteínas PIN.
- *RootSteppables.py*: se definen tres steppables: AuxinTransport, AuxinField y VolumeParamSteppable. En AuxinTransport se implementa el transporte activo y pasivo de auxinas. Se recorren todas las células de la simulación y dependiendo de su tipo celular, translocará auxina a la vecina en determinada dirección. AuxinField sirve para visualizar con resolución celular la concentración de auxinas en la simulación. VolumeParamSteppable define $\lambda_p = 5$, $\lambda_A = 5$, $A_T = 20$, $P_T = 5$

- *Root.py*: Declara en la simulación una instancia de cada uno de los steppables.

Estos steppables se utilizaron como base de las simulaciones de la sección 3.3 y 3.4. Se utilizaron en las nueve simulaciones del transporte de auxina sin dinámica Potts (estática) (distintas condiciones iniciales en una raíz intacta, perturbaciones de la densidad y polaridad lateral de las proteínas PIN, inmersión de la raíz en solución con auxinas, tratamiento con NPA y ablación del CQ) y de las tres simulaciones del transporte de auxinas y la vía de señalización de auxinas (Raíz intacta, Inmersión de la raíz en solución con auxinas y tratamiento con NPA). Los códigos se incluyen en el *Anexo 2*, *Anexo 3* y *Anexo 4*¹ de este trabajo.

¹ Los anexos 1, 2, 3, y 4 de este trabajo se incluyen en un disco adjunto debido a su extensión.

Capítulo 3

Resultados

3.1 La función H para modelar comportamientos celulares de plantas en términos de expansión y proliferación celular

Energía potencial del sistema

En este trabajo se propuso una extensión de los modelos celulares de Potts en la forma de la función H para describir procesos morfogénicos de las células de plantas. La función H consta de tres términos elásticos, dos de los cuales son una representación matemática de la presión de turgencia y de la deformación de la pared celular. El tercer término sirve para desfavorecer los desplazamientos de los agentes (células).

$$H = \sum_{\sigma} \lambda_P (P_{\sigma} - P_T)^2 + \lambda_A (A_{\sigma} - A_T)^2 + \lambda_T (L_{\sigma_1, \sigma_2} - L_T)^2 \quad (3.1)$$

La función H calcula la desviación de los valores actuales $(A_{\sigma}, P_{\sigma}, L_{\sigma_1, \sigma_2})$ respecto a los target (A_T, P_T, L_T) para cada término de cada agente (célula en adelante) de la simulación. El parámetro λ es una medida de la intensidad de cada restricción. Generalmente en la simulación no se puede optimizar una restricción sin causar desviaciones en otra, por lo tanto la forma que adquieren las células es la que optimiza parcialmente todas las restricciones.

El primer término, $\lambda_P (P_{\sigma} - P_T)^2$ es una restricción en el perímetro de cada célula que representa las propiedades elástico-plásticas de la pared celular (P_T). Este tiene un valor de cada célula, y entonces supone que todos los lados de la pared celular tienen las mismas propiedades elástico-plásticas y no hay anisotropías¹ (Figura 3.1). Además es una representación de la membrana y la pared celular, suponiendo que están siempre en cercano contacto. P_T y λ_P son parámetros que representan la composición de la pared celular.

El segundo término, $\lambda_A (A_{\sigma} - A_T)^2$ es una restricción del área de cada célula que representa la presión de turgencia la cual tiende a expandir el volumen celular, para así disminuir el potencial osmótico (diferencia de concentración entre el citoplasma y el apoplasto) (Figura 3.1).

¹En CPM se puede usar un vector para definir la forma de cada célula en la simulación y así modelar células elongadas, sin embargo la medida de perímetro sigue siendo de toda la célula

El tercer término $\lambda_T(L_{\sigma_1, \sigma_2} - L_T)^2$ es una restricción en la distancia que existe entre los centros de masa (COM) de células vecinas. Para representar la limitación de movimiento que impone la pared celular, esta restricción permite que las células vecinas tiendan a mantener esa condición durante toda la simulación (Figura 3.1 y 3.2). Siendo que la simulación es Monte Carlo y por lo tanto permite algunos cambios que no minimizan la energía del sistema, algunos cambios pueden involucrar desplazamientos entre células vecinas. Por lo tanto, dichos desplazamientos se desfavorecen pero no se prohíben los en la simulación. Para evitarlos aún mas se puede disminuir la temperatura de la simulación, β , ya que desfavorece los cambios que no minimizan a la función H. También se puede aumentar el valor del parámetro λ_T para aumentar la intensidad de la restricción.

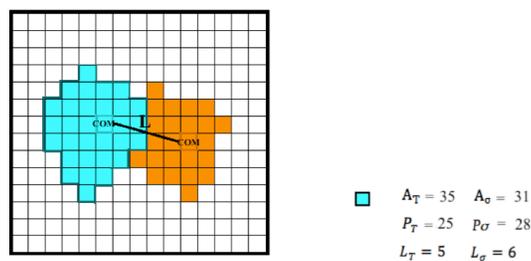


Figura 3.1: **Restricciones modeladas en la función H.** Las desviaciones en área y perímetro celular pueden ser interpretadas como fuerzas interpretadas como presión y tensión de la pared celular. En el ejemplo se optimizan parcialmente ambas restricciones; el área actual (A_σ) es menor a la target (A_T) y el perímetro actual (P_σ) es mayor al target (P_T), tal como en las células de plantas donde el volumen celular es menor al ideal (donde el potencial osmótico sería nulo) y la pared celular se estira elásticamente.

La forma de células anisotrópicas de plantas emerge de las propiedades de la pared celular que la rodea. Por ejemplo, la composición de la pared celular puede ser diferente en las paredes laterales, apicales y basales. Por lo tanto la extensibilidad de la pared y la expansión celular será diferente en distintas direcciones. Siendo que CPM es un formalismo que sigue un principio de minimización de energía, las células tienden a tener formas isotrópicas. Se puede implementar la anisotropía en CPM si se modela una célula con varios agentes alineados denominados compartimentos (Figura 3.2). Cada compartimento tiene las variables asociadas a un agente en CPM. Para el modelo del transporte de auxinas que se propuso en este trabajo, no fue necesario tal nivel de detalle. Pero será importante para modelar las células en la zona de elongación de la raíz de *Arabidopsis* en futuras aplicaciones de la herramienta.

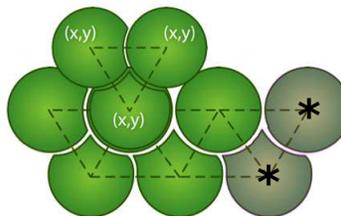


Figura 3.2: **Esquema de la restricción en la distancia entre COM.** El tercer término de la función H establece una restricción en la distancia entre COM de células vecinas. Se marcan con un asterisco dos agentes que conforman a una célula elongada. Las células sin asterisco son agentes que representan células

individuales. La red de distancias entre COM tiende a mantener a todas las células en cercano contacto.

Modelado de la expansión y la división celular de plantas

La expansión celular en las plantas consiste de dos procesos acoplados: la regulación de la entrada de agua a la célula, para reducir el potencial osmótico, y la extensión irreversible de la pared celular (Capítulo 1). Para modelar la expansión celular de plantas en CPM, los parámetros de la función H se pueden relacionar con aquellos de la ecuación de Lockhart que describe la expansión celular en células de plantas (Ecuación 3.2). Siendo que son aproximaciones diferentes, no es una equivalencia de parámetros. La ecuación de Lockhart dice que la tasa volumétrica de expansión celular es proporcional a la diferencia entre la presión de turgencia P y el umbral de extensibilidad π [88, 87, 85, 86]. Mientras la fuerza de la presión de turgencia sea menor a el umbral π , $P < \pi$, la pared celular se comportara como un material elástico. Sin embargo, cuando $P > \pi$, entonces la pared celular se comportará como un material plástico y se extenderá irreversiblemente. La presión de turgencia en la ecuación de Lockhart, P , se puede relacionar con la desviación en el área celular, $\lambda_A(A_\sigma - A_T)^2$ de la función H. Cuando la presión celular es positiva, el perímetro celular es mayor al target. Cuando la desviación de P_σ y P_T es mayor a un umbral, el perímetro se extenderá irreversiblemente. A esto se le llama la extensión plástica de la pared celular y se puede modelar con un steppable (Código 1). En dicho steppable el área target A_T aumenta gradualmente (cada n MCS) y cuando la diferencia entre el perímetro actual, P_σ , y el target, P_T , sea mayor que PI, entonces aumentará el valor del perímetro target, P_T , constituyendo un episodio de reptar y la adición de nuevos componentes a la pared celular. La magnitud del aumento del perímetro target, P_T , también se define con el parámetro X , el cual indica cuántas unidades arbitrarias aumenta el P_T . El valor de X se puede relacionar con el parámetro de extensibilidad m de la ecuación de Lockhart, que es la magnitud de la extensión irreversible.

Tras un episodio de reptar, disminuye la presión celular. Si la expansión celular es continua, entonces la presión celular (de turgencia) volverá a aumentar, provocando reptar nuevamente [85]. Este proceso es representado en CPM aumentando gradualmente (cada n MCS) el A_T de la célula en expansión.

$$\frac{dV}{dt} = m(P - \pi) \quad (3.2)$$

A_D es un parámetro que se define en el steppable que modela el crecimiento celular (Código 2). Cuando A_σ es igual o mayor al umbral A_D , las células pueden dejar de crecer y dividir. En el segundo caso, las celdas en la rejilla que conforman a la célula se dividen en dos regiones que conforman a dos células hijas y se actualizan las propiedades de cada una (σ , τ , A_T , P_T). CPM permite especificar el eje de división respecto al eje mayor o menor de la célula, al azar o respecto a un vector (x, y, z) . La mayoría de las divisiones celulares en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis* son anticlinales (perpendicular al eje de crecimiento en un corte longitudinal) y se pueden especificar con el vector $(0, 1, 0)$.

Para implementar el expansión y la división celular en CompuCell3D se aplican dos steppables. En el código de cada steppable se puede incluir la regulación del proceso por

la concentración de una molécula, por el estado de una red de regulación subcelular, entre otras posibilidades. Como ejemplo se muestran los steppables Growth y Mitosis (Código 1 y 2) escritos en el lenguaje de programación Python. El steppable Growth es una clase que recorre todas las células en la simulación, aumenta el A_T de cada célula, y después evalúa si el valor absoluto de la diferencia entre el perímetro actual y el target es mayor que el umbral PI. De ser mayor entonces P_T aumenta su valor X unidades. El steppable Mitosis es una clase que recorre todas las células en la simulación y evalúa si el A_σ es igual o mayor a A_D . De ser así, la célula se divide y las células hijas actualizan sus propiedades.

```
# Steppable Growth
```

```
class Growth:
    for cell in cellList:
        if (AT<AD):
            AT+=1
            if abs(cell.Psigma - cell.PT)>PI:
                cell.PT+=X
```

Código 1. **La clase Growth implementa la expansión celular de plantas en CompuCell3D.** La clase recorre todas las células de la simulación almacenadas en la lista cellList y aumenta el área target A_T una unidad mientras que no se rebase el umbral A_D . Posteriormente se evalúa si la desviación de P_T y P_σ es mayor al umbral PI (π). Si es mayor se aumenta el valor del perímetro target P_T , X unidades.

```
# Steppable Mitosis
```

```
class Mitosis:
    for cell in cellList:
        if cell.Asigma=>AD:
            self.divideCellRandomOrientation(cell)
            child1Cell.AT=a
            child1Cell.PT=p
            child2Cell.AT=a
            child2Cell.PT=p
```

Código 2. **La clase Mitosis implementa la división celular en CompuCell3D.** La clase recorre todas las células de la simulación y evalúa si el área target, A_T , de cada célula es igual o mayor que el área límite, A_D . De ser así la célula se divide con orientación al azar y se actualizan las propiedades A_T y P_T de cada célula hija con los mismos valores target.

Campos físicos mesoscópicos

Las restricciones del área y el perímetro celular de la función H se puede derivar para interpretar fuerzas celulares que se pueden relacionar con la presión de turgencia y la deformación de la pared celular de cada agente. Derivando el término del área celular de la función H, $\lambda_A(A_\sigma - A_T)^2$, se obtiene la fórmula de la presión celular, $\frac{dH}{dP} = -2\lambda_A(A_\sigma - A_T)$. Cuando una célula tenga un A_σ menor a la A_T entonces existirá una presión positiva pues tiende a expandir el área celular. La presión será negativa en el caso contrario. El término del perímetro celular, $\lambda_P(P_\sigma - P_T)^2$, también se puede derivar para obtener la fórmula de la deformación de la pared celular, $\frac{dH}{dP} = -2\lambda_P(P_\sigma - P_T)$. Cuando una célula tenga un P_σ mayor a la P_T entonces existirá una fuerza negativa pues tiende a disminuir el perímetro celular. La fuerza será positiva en el caso contrario.

Los campos físicos mesoscópicos se forman a partir de los valores de la presión y la deformación del perímetro cada célula σ . La diferencia entre los valores de cada fuerza entre células vecinas es una medida que permite definir niveles relativos de tensión. La tensión celular local constituye una fuente importante de información posicional que puede tener impactos importantes a nivel de las redes de regulación, así como en el transporte y la respuesta de vías hormonales [13, 31, 15]. Estudios recientes en el meristemo apical del va stago aéreo han sugerido que señales mecánicas en la forma de tensión en la pared celular sirven como información posicional para localizar polarmente en la membrana a la proteína de eflujo de auxinas, PIN1 [12, 13]. En el desarrollo de la raíz señales mecánicas también podrían estar regulando el transporte de auxinas [31]. Por lo tanto, la interpretación de fuerzas físicas como la presión de turgencia y la deformación del perímetro celular (deformación de la pared celular en adelante), es de gran importancia para la plataforma de simulación multiescala que proponemos.

3.2 Implementación de la función H en CompuCell3D

La función H propuesta en este estudio se utilizó para desarrollar un modelo de las células de las plantas y analizar propiedades tales como: presión celular, la deformación de la pared celular y el reptar. Los detalles de la simulación se pueden consultar en los Métodos (Capítulo 2). En el modelo inicialmente se consideran dos células que aumentan gradualmente su área target, A_T . Cuando la deformación del perímetro de cada agente rebasa el umbral PI, entonces aumenta el perímetro target, P_T (extensión plástica). Este aumento gradual del perímetro busca representar el reptar que caracteriza al crecimiento celular vegetal. Las células pueden dividirse si tienen un área celular, A_σ , igual o mayor al área límite, A_D . En la Figura 3.3 se muestran los resultados gráficos de la simulación en distintos pasos MCS. Como se puede observar, las células se mantienen en cercano contacto y sin desplazamientos celulares debido a la restricción en la distancia entre COM (centros de masa) de células vecinas.

Para analizar a la función H y evaluar si representa adecuadamente los procesos inherentes a las células de plantas (presión de turgencia y deformación de la pared), se hicieron dos simulaciones más para comparar sus resultados. Una de ellas con la función H sin la restricción del área celular y otra sin la restricción del perímetro celular. En la Tabla III.1 se muestran las gráficas del número de células en el tiempo y un histograma de la presión celular y de la deformación de la pared celular en la población de células. En la simulación de la función H normal, se puede ver en la gráfica del número de células que tras cada evento de división celular hay un tiempo de aproximadamente MCS = 100 entre cada episodio de reptar (extensión plástica del perímetro). En el histograma se puede apreciar que la presión celular es positiva y que por ende tiende a incrementar el área celular. También se observa que la deformación de la pared celular es negativa y entonces el perímetro celular es mayor al P_T , y tiende a disminuir.

En la simulación de la función H sin el término del área celular las células no crecen ni se dividen como se puede apreciar en la gráfica de número de células. Este resultado es debido a que el incremento en el área celular es necesario para que haya expansión y división celular. Durante la simulación, la deformación de la pared celular fluctúa entre los valores 10 y -10 *u.a.*, es decir que en promedio es cero y por lo tanto el perímetro actual de la

célula es muy cercano al perímetro target.

En la simulación de la función H sin la restricción en el perímetro celular se puede apreciar en la gráfica de número de células que el tiempo de cada episodio de reftar es de aproximadamente $MCS = 60$. Por lo tanto, el tiempo en que ocurre cada episodio de reftar disminuye en esta simulación en comparación con la función H normal. En el histograma se puede ver que la presión celular es positiva ya que las células están creciendo, pero la magnitud de la presión celular es mucho menor a la de la simulación con la función H normal (>50 contra ~ 400 , respectivamente).

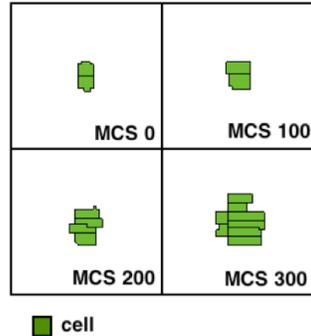


Figura 3.3: **Resultados de la simulación con la función H.** Se muestra la simulación a los tiempos $MCS = 0, 100, 200$ y 300 . En el tiempo $MCS = 100$ las dos células aumentan su A_T para simular la expansión celular. Para el tiempo $MCS = 200$ dos células se dividieron y las cuatro células crecen.

Simulación	Número de células	Presión celular y Deformación de la pared celular
Función H normal		
Función H sin A		
Función H sin P		

Tabla III.1 **Análisis de la función H para hacer simulaciones de la expansión y la división celular de plantas.** En la primera columna se listan tres simulaciones: la función H normal, la función H sin la restricción en área celular y la función H sin la restricción del perímetro celular. En la segunda columna se muestran gráficas del número de células en la simulación (eje y) a lo largo del tiempo (eje x). En la tercera

columna se muestran histogramas de frecuencia de presión celular (verde) y deformación de la pared celular (rojo) en la población de células para el tiempo MCS = 500. Este histograma se genera calculando la presión celular y la deformación del perímetro celular (según las fórmulas presentadas anteriormente) para cada agente, y graficando la frecuencia de la magnitud de estas fuerzas.

3.3 Modelo del transporte de auxinas en el ápice de la raíz de *Arabidopsis*

Implementación del transporte de auxinas en CompuCell3D

Los detalles de la simulación se pueden consultar en los Métodos (Capítulo 2). El archivo *CondicionInicialRoot.piff* define la condición celular inicial de la simulación y representa un corte longitudinal del ápice de una raíz de *Arabidopsis* (Figura 3.4). Se tienen nueve tipos celulares de los cuales dos son las condiciones de frontera, y tres son equivalentes. Estos tipos celulares son, *Border* y *Source*, *BorderLateralLeft* y *BorderLateralRight*, *EndodermisLeft* y *EndodermisRight*, *Pro-vascular*, *CQ* y *Columela* [40]. Las células de tipo *Source* y *Border* establecen las condiciones de frontera para representar la conexión del modelo del ápice de la raíz al resto de la planta. Las células de tipo *Source*² son una entrada constante de auxinas al modelo y las de tipo *Border* son una salida de auxinas del sistema de transporte. *BorderLateral* representa a las células de epidermis y cofia lateral. Cada célula tiene una disposición polar de transportadores PIN según su tipo celular (Figura 3.4) con base en evidencia experimental [62, 63, 64, 4]. El transporte activo de auxinas se implementa en el steppable AuxinTransport (Código 3, Métodos) que es una clase que cada MCS recorre todas las células de la simulación, evalúa el tipo celular y transloca auxinas a células vecinas según la polaridad de proteínas PIN. El flujo de auxinas dada la permeabilidad de PIN en cada célula es:

$$\vec{J}_\sigma = -(P_m \pi_\sigma) C_{in} - (P_{m,l}) C_{in} + (P_i \pi_{\sigma i}) C_{out} \quad (3.3)$$

donde \vec{J}_σ es el flujo de auxinas en cada célula, P_m es la permeabilidad de salida mediada por proteínas PIN en la membrana celular, $P_{m,l}$ es la permeabilidad de salida pasiva de auxinas, P_i es la permeabilidad de proteínas PIN de células vecinas, el vector \vec{n} es la polaridad de las proteínas PIN en cada célula, C es la concentración de auxinas en esa célula, y C_{out} es la concentración de auxinas de células vecinas. El flujo es igual a la salida de auxinas mediada por las proteínas PIN, la salida de auxinas por transporte pasivo y la entrada de auxinas de células vecinas.

En AuxinTransport la dirección del transporte de auxinas entre células vecinas se implementó con un conjunto de reglas lógicas. Todas las células de la simulación tienen una variable que almacena la concentración de auxinas, C . El tipo celular *Source* transloca una cantidad constante de auxinas a sus vecinas distales, las células *Pro-vascular* y *CQ*

² La síntesis de auxina es muy activa en las hojas de la planta, desde las cuales se transporta al ápice de la raíz. En el ápice de la raíz también se sintetizan auxinas, pero en menor proporción.

translocan auxinas intracelular a sus vecinas distales, las células de *Endodermis* translocan auxinas a sus vecinas distales y laterales (izquierda o derecha, dependiendo si es *EndodermisLeft* o *EndodermisRight* respectivamente), las células de *BorderLateral* translocan auxinas a sus vecinas proximales y laterales (izquierda o derecha, dependiendo si es *BorderLateralLeft* o *BorderLateralRight* respectivamente), las células de *Columela* translocan auxinas a todas sus vecinas, y las células de *Border* solo reciben las auxinas de sus vecinas *BorderLateral* (Figura 3.4). Además de este transporte activo dirigido, todas las células translocan auxinas de manera pasiva a una tasa menor.

Las tasas de permeabilidad con las que se translocan auxinas representan la densidad de proteína de eflujo PIN en la membrana celular y son constantes en la simulación. Los valores de permeabilidad P_m fueron definidos con base en la exploración de parámetros reportada en el trabajo de Grieneisen y colaboradores [40]. Para el transporte apical, basal y lateral (en el caso del tipo celular *Endodermis*) la permeabilidad es P_m , para el transporte lateral de las células *BorderLateral* es $P_{m,bl} = P_m/5$ y para el transporte pasivo en todas las células es de $P_{m,l} = P_m/20$. Los parámetros utilizados para las simulaciones del transporte en raíces intactas y el código de la simulación se muestra en el Código 3. Para implementar el transporte polar se necesita saber la posición de una célula respecto a otras. Para hacer esto en CPM se comparan COM (centro de masa) que en dos dimensiones consta de una coordenada en el eje x, y (Figura 3.4).

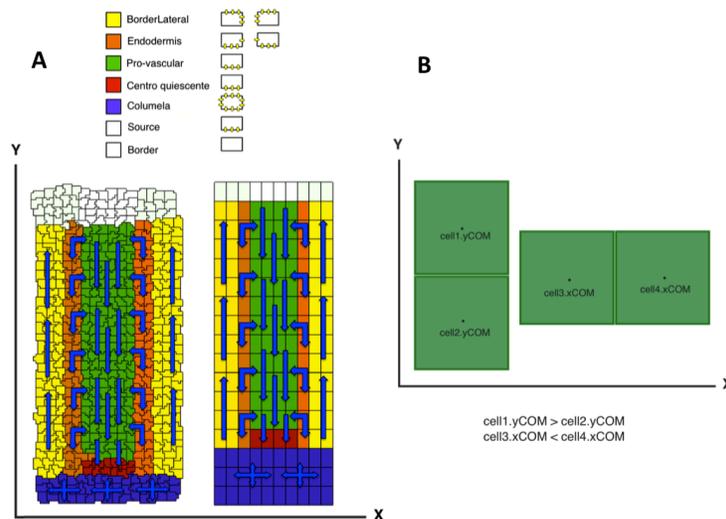


Figura 3.4: **Configuración celular del modelo del ápice de la raíz en CPM.** Se muestran la configuraciones celulares de los nueve tipos celulares en el modelo del ápice de la raíz (A). Se listan los tipos celulares y se muestra la polaridad de las proteínas PIN con bordes amarillos. Con flechas azules se indica la dirección del transporte activo de auxinas. Comparación entre los COM de células vecinas para evaluar posiciones relativas (B). A la derecha se muestran cuatro células distribuidas en un espacio de dos dimensiones, x, y y se comparan los COM. La célula *cell1* tiene la posición y del COM mayor que la célula *cell2*, por lo que la *cell1* está arriba de otra *cell2*. *cell3* está a la izquierda de *cell4*, pues la primera tiene una posición menor en x del COM.

#Parametros del transporte

```

permeabilidad_apical = 0.001
permeabilidad_basal = 0.001
permeabilidad_lateralED = 0.001

```

```

permeabilidad_lateralBL = 0.0002
pasivo = 0.00005
class AuxinTransport:
    for cell in cellList :
        for neighbor in neighborList :
            if cell.type==Columela :
                transport=permeabilidad*Cauxin_cell
            elif cell.type==CQ :
                if neighbor.yCOM<cell.yCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
            elif cell.type==Pro-vascular :
                if neighbor.yCOM<cell.yCOM:
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
            elif cell.type==EndodermisRight :
                if neighbor.xCOM<cell.xCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
                elif neighbor.yCOM<cell.yCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
            elif cell.type==EndodermisLeft :
                if neighbor.xCOM>cell.xCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
                elif neighbor.yCOM<cell.yCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
            elif cell.type==BorderLateralRight :
                if neighbor.xCOM<cell.xCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
                if neighbor.yCOM>cell.yCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
            elif cell.type==BorderLateralLeft :
                if neighbor.xCOM>cell.xCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell
                elif neighbor.yCOM>cell.yCOM :
                    transport=permeabilidad*Cauxin_cell

```

Código 3. AuxinTransport es el steppable que implementa el transporte de auxinas. La clase AuxinTransport recorre todas las células de la simulación (*cell*), después recorre todos los vecinos de esa célula (*neighbor*), y dependiendo de que tipo celular sea *cell* translocarán auxinas a las vecinas a las que tenga dirigidas proteínas PIN. La dirección del transporte será diferente si es célula de tipo *Columela*, *CQ*, *Pro-Vascular*, *EndodermisRight*, *EndodermisLeft*, *BorderLateralRight* o *BorderLateralLeft*.

Resultados del modelo de transporte de auxinas en la raíz

En la condición inicial de la simulación las células tienen la misma concentración de auxinas, $C = 10.0$ u.a. (unidades arbitrarias). El transporte polar y pasivo de auxinas (steppable AuxinTransport) redistribuye a las auxinas y forma rápidamente un gradiente de concentración a lo largo del eje longitudinal. Después el gradiente se estabiliza (los cambios en la concentración celular son cada vez menores). Auxinas entran por las células *Source* (cada una de estas células tienen $C = 10.0$ u.a.) y salen por las células *BorderLateral*. En la Figura 3.5 se muestra la concentración de auxinas en el modelo celular en distintos tiempos de la simulación. Estos resultados concuerdan con los que han

sido reportados [40].

Con la función H que proponemos, fue posible hacer un modelo del transporte de auxinas en el ápice de la raíz que forma el gradiente de concentración auxinas con un máximo de concentración en el *CQ*. Es importante resaltar que el gradiente de concentración de auxinas en la raíz de *Arabidopsis* es el resultado del transporte polar y el metabolismo de auxinas. El metabolismo de auxinas no se consideró en este modelo.

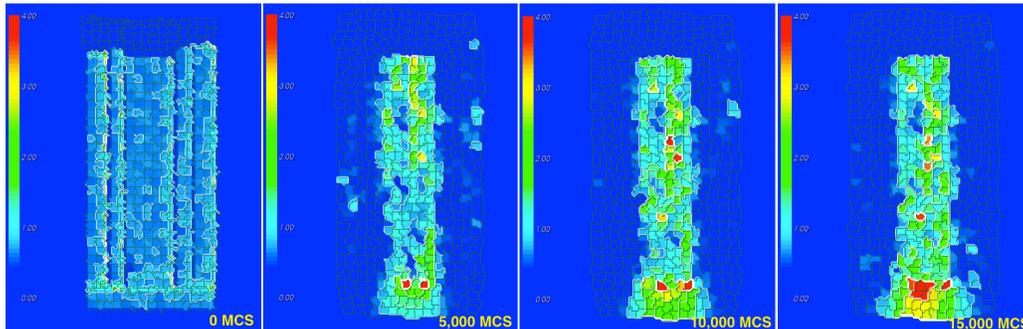


Figura 3.5: **Concentración de auxinas en el modelo del ápice de la raíz.** Se muestran distintos tiempos de la simulación. En la condición inicial todas las células tienen la misma concentración de auxinas, en MCS = 5,000 se aprecia el gradiente de concentración con un máximo en las células de tipo *CQ*, y de ahí en adelante el gradiente se estabiliza (MCS = 10,000 y MCS = 15,000). El rango de la escala de color va de 0 - 4 *u.a.*

3.4 Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas en el ápice de la raíz

Se procedió a analizar con el modelo, la formación del gradiente de concentración de auxinas en distintas condiciones iniciales, bajo perturbaciones y bajo tratamientos. Para ello se hicieron nueve simulaciones en CompuCell3D cada una de las cuales tienen los códigos de la simulación anterior (*Root.py*, *RootSteppables.py* y *Root.xml*; Capítulo 2 - Métodos). Las nueve simulaciones se hicieron en CompuCell3D en un sistema celular estático (sin dinámica Potts) contemplando los mismos tipos celulares anteriores, los mismos parámetros y las mismas relaciones de transporte entre las células (Figura 3.4). Ya que no hay división ni proliferación celular en este modelo, no es necesario incluir la dinámica de Potts, que incrementa el tiempo de simulación. Sin embargo, la extensión del formalismo en la forma de la función H, será de gran utilidad para futuros modelos de la actividad del meristemo en la raíz que consideren proliferación y expansión celular.

Las nueve simulaciones se listan a continuación:

- Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas en distintas condiciones iniciales (CI):

- A. Raíz intacta- CI con células con concentración de auxinas $C = 10.0 \text{ u.a.}$
- B. Raíz intacta - CI con células con concentración de auxinas $C = 0.0 \text{ u.a.}$
- C. Raíz intacta - CI con concentración de auxinas diferente en cada célula

- Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas con variación en la₄₁

permeabilidad por proteínas de la familia PIN:

- D. Perturbación 1 - Simulación sin proteínas PIN con polaridad lateral
- E. Perturbación 2 - Simulación con mayor densidad de proteínas PIN en la membrana
- F. Perturbación 3 - Simulación con menor densidad de proteínas PIN en la membrana

- Análisis de los efectos de tratamientos en el gradiente de concentración de auxina:

- G. Perturbación 4 - Inmersión de la raíz en solución con auxinas
- H. Perturbación 5 - Tratamiento con NPA
- I. Perturbación 6 - Ablación de las células del centro quiescente

Se utilizaron dos gráficas para analizar las propiedades dinámicas de las simulaciones:

- Concentración promedio de auxinas por tipo celular: Es una gráfica de la concentración promedio de auxinas por tipo celular a lo largo del tiempo de la simulación. El eje x es el tiempo de la simulación (MCS) y el eje y es la concentración promedio de auxinas por tipo celular.
- Histograma de concentración de auxinas: Muestra la distribución de la concentración de auxinas para cada tipo celular. El eje x es la concentración de auxinas y el eje y es la frecuencia.

En ambas gráficas los tipos celulares en código de colores son: *CQ* en rojo, *Pro-vascular* en verde, *Columela* en morado, *Endodermis* en amarillo y *BorderLateral* en naranja.

3.4.1 Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas en distintas condiciones iniciales

Para analizar la formación del gradiente de concentración de auxinas se hicieron tres simulaciones, cada una con una condición inicial diferente. La primera es donde todas las células tienen la misma concentración de auxinas (**A**), la segunda es donde las células no tienen auxinas (**B**) y la tercera es donde todas las células tienen concentraciones diferentes de auxinas (**C**). En la Tabla III.2 se muestran gráficas con los resultados de estas tres simulaciones, y se discutirán a continuación.

A. Raíz intacta- condición inicial con células con concentración de auxinas $C = 10.0 \text{ u.a.}$

En la simulación **A**, en el tiempo $\text{MCS} = 0$ todas las células tienen la misma concentración de auxinas, $C=10 \text{ u.a.}$ Desde que inicia la simulación, la red de transporte de auxinas redistribuye las auxinas hasta formar el gradiente de concentración. La formación del gradiente ocurre rápidamente y es apreciable desde el tiempo $\text{MCS} = 100,000$ (Figura 3.7).

A partir de entonces el gradiente se va estabilizando mientras auxinas entran a la simulación mediante las células *Source* (cada célula *Source* tiene $C = 10 \text{ u.a.}$) y sale por₄₂

las células *Border* (Figura 3.7 y Tabla III.2 Concentración de auxinas A). El sistema se acerca a la estabilización en el tiempo MCS = 300,000, ya que los cambios en la concentración de auxinas son cada vez menores. La estabilización del gradiente hace que este se vuelva más abrupto, es decir que la diferencia en la concentración de auxinas de células vecinas a lo largo del eje longitudinal de auxinas sea mayor (Figura 3.6). El gradiente se estabiliza totalmente hasta el tiempo MCS = 1 millón (Tabla III.2 Concentración de auxinas A). Desde este tiempo hasta el final de la simulación en MCS = 5 millones, no se observan cambios en la concentración de auxinas de las células y se ha alcanzado un estado estacionario dinámico.

En el estado estacionario la concentración de auxinas en las células del *CQ* es la más alta, seguida de la concentración de auxinas en las células de *Columela*. La gráfica de frecuencia de concentración de auxinas muestra que las células de *Endodermis* tienen valores más altos de auxinas que las *Pro-Vasculares* seguidas de las células *BorderLateral* (Tabla III.2, Histograma A). Estas proporciones concuerdan con modelos previos de auxinas del transporte activo de auxinas [40]. La simulación A con el sistema celular estático es equivalente a la simulación con dinámica Potts ya que ambas recuperan el gradiente de concentración de auxinas. Sin embargo las gráficas en esta simulación nos permiten identificar el tiempo en que el gradiente se estabiliza y las distribuciones de concentración de auxinas por tipo celular con detalle.

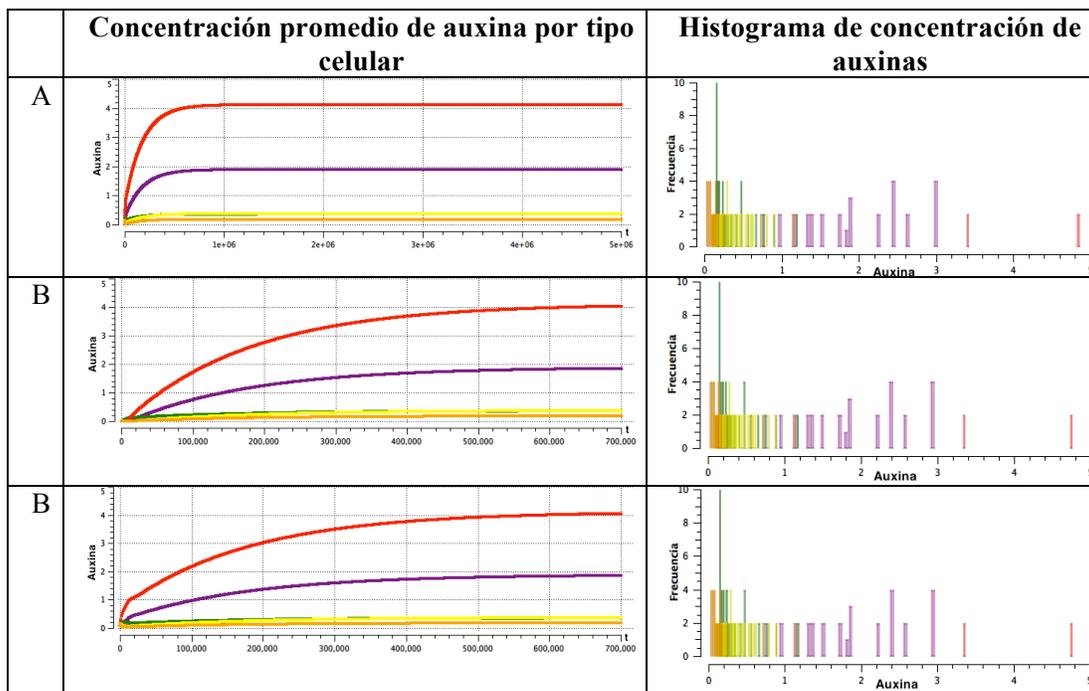


Tabla III.2 **Resultados del análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas.** Las gráficas Concentración promedio de auxinas por tipo celular- tiene como eje x el tiempo (MCS) y como eje y la concentración de auxinas. Histograma de concentración de auxinas- tiene como eje x la concentración de auxinas y como eje y la frecuencia. Los tipos celulares están en código de colores: *CQ* en rojo, *Pro-vascular* en verde, *Columela* en morado, *BorderLateral* en naranja y *Endodermis* en amarillo. Las simulaciones B y C son de MCS = 700,000 mientras que la simulación A es de MCS = 5 millones.

B. Raíz intacta- condición inicial con células con concentración de auxinas $C = 0.0$ u.a.

En la simulación **B**, en el tiempo $MCS = 0$ las células no tienen auxinas $C=0.0$ u.a. Las auxinas entran al modelo celular por las células *Source* y se transporta acropetalamente hasta formar un gradiente y máximo de concentración en las células del *CQ* (Figura 3.8). El gradiente se comienza a formar desde el tiempo $MCS = 25,000$ y se acerca a la estabilización en el tiempo $MCS = 300,000$ siguiendo el patrón de formación del gradiente de la simulación **A** (Tabla III.2 Concentración de auxinas **B**). El histograma de concentración de auxinas de la simulación **B** al tiempo $MCS = 700,000$ tiene un patrón similar al de la simulación **A** al tiempo $MCS = 5$ millones (Tabla III.2, Histograma **B** y **A**), soportando que los posteriores cambios de concentración de auxinas serán mínimos o nulos. La concentración celular final de auxinas es igual que la simulación **A**. Entonces el valor del estado estacionario de la red del transporte de auxina depende de los parámetros del sistema y no de la condición inicial.

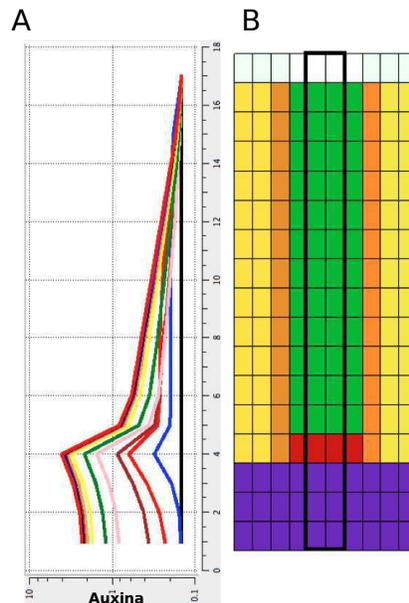


Figura 3.6: Concentración de auxinas en el eje longitudinal del modelo celular del ápice de la raíz. Gráfica el promedio de la concentración de auxinas de las células centrales en un corte longitudinal (A) (enmarcadas en un rectángulo negro (B)). El eje x de la gráfica muestra la concentración de auxinas en escala logarítmica y unidades arbitrarias, y el eje y la distancia de la punta de la raíz del modelo. Se grafican distintos tiempos, $MCS = 0$ en negro, $MCS = 1,000$ en azul, $MCS = 5,000$ en rojo, $MCS = 10,000$ en vino, $MCS = 50,000$ en rosa, $MCS = 100,000$ en verde, $MCS = 200,000$ en amarillo, $MCS = 300,000$ en naranja, $MCS = 400,000$ en morado, $MCS = 500,000$ en negro, $MCS = 600,000$ en azul y $MCS = 700,000$ en rojo. A partir del tiempo $MCS = 300,000$ las líneas se superponen lo que quiere decir que no ocurren cambios substanciales en la concentración de auxinas.

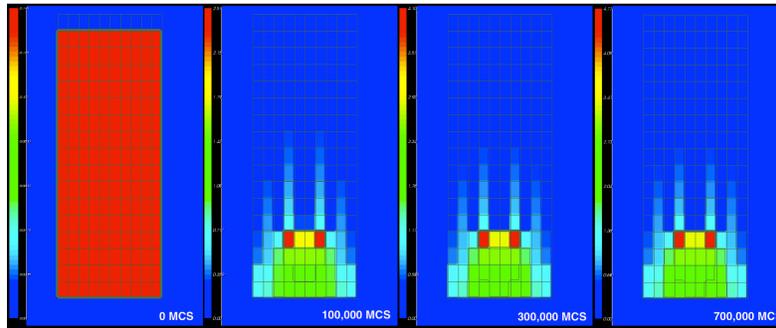


Figura 3.7: **Concentración de auxinas en las células de la simulación A.** Se muestra la concentración de auxinas en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 0, MCS = 100,000, MCS = 300,000 y MCS = 700,000. A partir del tiempo MCS = 300,000 la concentración de auxinas en las células se estabiliza y cambia poco. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 0 es de 0.0 - 0.145, MCS = 100,000 es de 0.0 - 2.51, MCS = 300,000 es de 0.0 - 4.10 y en el tiempo MCS = 700,000 es de 0.0 - 4.77.

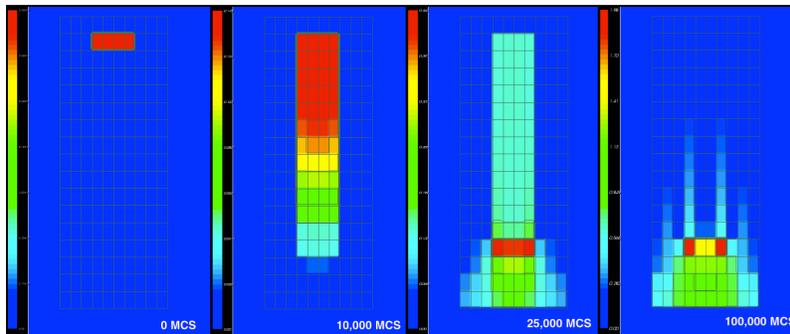


Figura 3.8: **Concentración de auxinas en las células de la simulación B.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 0, MCS = 10,000, MCS = 25,000 y MCS = 100,000. A partir del tiempo MCS = 300,000 la concentración de auxinas en las células cambia poco en el tiempo y se estabiliza. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 0 es de 0.0 - 0.00012, MCS = 10,000 es de 0.0 - 0.145, MCS = 25,000 es de 0.0 - 0.403 y en el tiempo MCS = 100,000 es de 0.0 - 1.98.

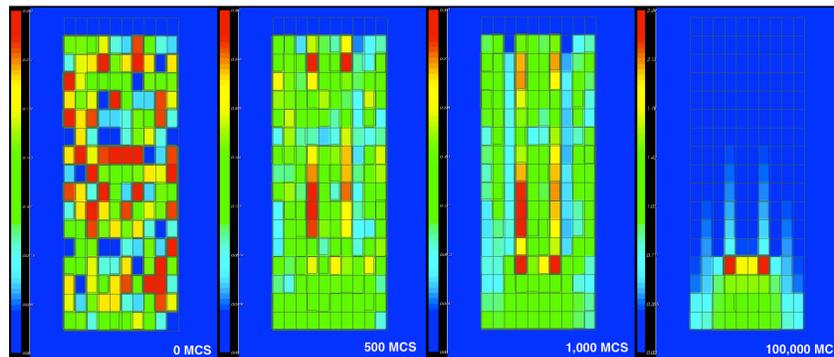


Figura 3.9: **Concentración de auxinas en las células de la simulación C.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 0, MCS = 500, MCS = 1,000 y MCS = 100,000. A partir del tiempo MCS = 300,000 la concentración de auxinas en las células cambia poco en el tiempo y se estabiliza. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 0 es de 0.0 - 0.250, MCS = 500 es de 0.0 - 2.67, MCS = 1,000 es de 0.0 - 0.360 y en el tiempo MCS = 100,000 es de 0.0 - 2.49.

C. Raíz intacta- condición inicial con células con concentración de auxinas diferente en cada célula

En la simulación C, en el tiempo MCS = 0 las células tienen una concentración de auxinas diferente, la cual está en el rango $C= 1-10 u.a$. Se hicieron 50 simulaciones con condiciones diferentes, y todas recuperaron la formación del gradiente de concentración de auxinas con un máximo de concentración en las células del *CQ* en el tiempo MCS = 700,000. Durante la simulación, las auxinas se redistribuyen formando el gradiente de concentración con una dinámica parecida a la de las simulaciones A y B (Figura 3.9 y Tabla III.2 A, B y C).

En las tres simulaciones con condiciones iniciales diferentes, se recupera el gradiente de concentración de auxinas dada la red de transporte por proteínas PIN. Es importante mencionar que nuestro modelo no contempla la regulación de la densidad o de la polaridad de las proteínas PIN, por lo que dicha red de transporte es constante.

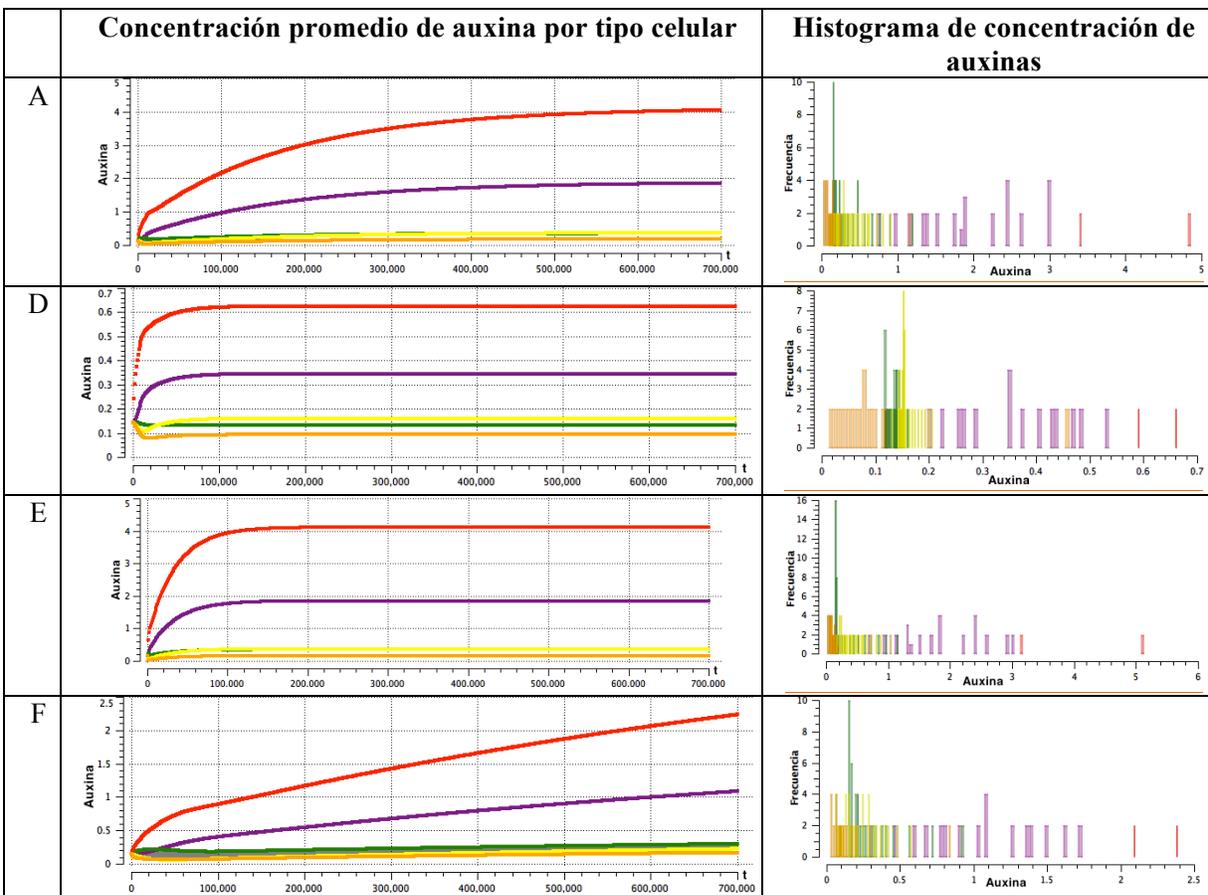


Tabla III.3 Resultados del análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas con variación en la permeabilidad por proteínas de la familia PIN. Las gráficas Concentración promedio de auxinas por tipo celular- tiene en el eje x grafica el tiempo (MCS) y el eje y la concentración de auxinas. El Histograma de concentración de auxinas- tiene como eje x la concentración de auxinas y en el eje y la frecuencia. Los tipos celulares están en código de colores: *CQ* en rojo, *Pro-vascular* en verde, *Columela* en morado, *BorderLateral* en naranja y *Endodermis* en amarillo. Los resultados mostrados son de simulaciones de tiempo MCS = 700,000.

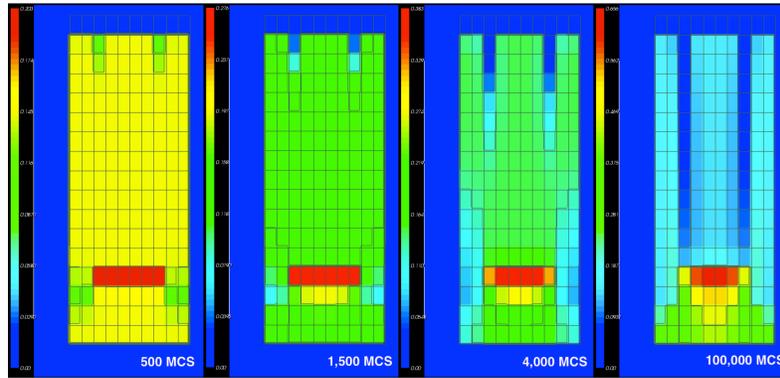


Figura 3.10: **Concentración de auxinas en las células de la simulación D.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo $MCS = 500$, $MCS = 1,500$, $MCS = 4,000$ y $MCS = 100,000$. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo $MCS = 500$ es de $0.0 - 0.203$, $MCS = 1,500$ es de $0.0 - 0.276$, $MCS = 4,000$ es de $0.0 - 0.383$ y en el tiempo $MCS = 100,000$ es de $0.0 - 0.656$.

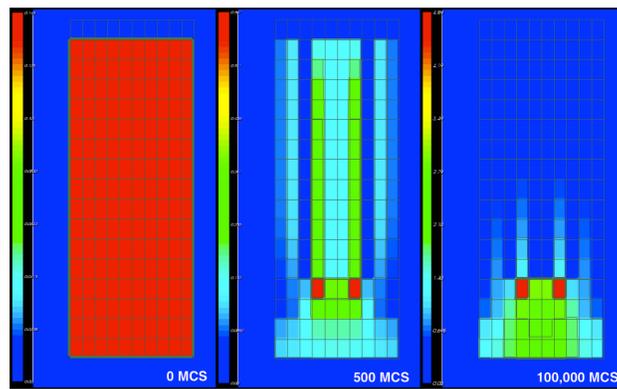


Figura 3.11: **Concentración de auxinas en las células de la simulación E.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo $MCS = 0$, $MCS = 500$ y $MCS = 100,000$. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo $MCS = 0$ es de $0.0 - 0.145$, $MCS = 500$ es de $0.0 - 0.597$ y en el tiempo $MCS = 100,000$ es de $0.0 - 4.89$.

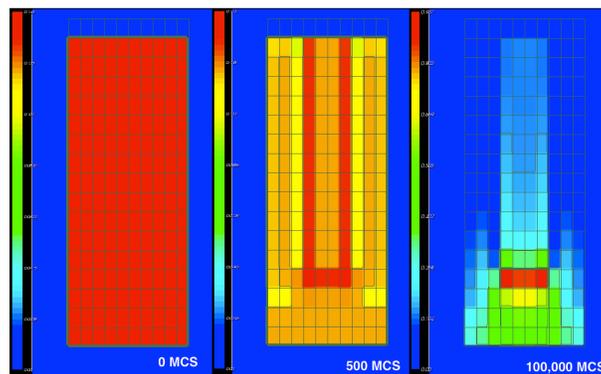


Figura 3.12: **Concentración de auxinas en las células de la simulación F.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo $MCS = 0$, $MCS = 500$ y $MCS = 100,000$. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo $MCS = 0$ es de $0.0 - 0.145$, $MCS = 500$ es de $0.0 - 0.173$ y en el tiempo $MCS = 100,000$ es de $0.0 - 0.937$.

3.4.2 Análisis de la formación del gradiente de concentración de auxinas con variación en la permeabilidad por proteínas de la familia PIN

Se ha reportado que el balance entre las auxinas y la citoquinina establece el fin de la zona meristemática y el inicio de la zona de elongación [52]. Aunque nuestro modelo no incorpora la biosíntesis ni la dinámica de transporte de la citoquinina, los cambios en la agudeza del gradiente de concentración de auxinas en distintas condiciones (en simulaciones **D-I**), nos dan pistas del posible tamaño del meristemo tomando en cuenta la importancia del balance auxinas/citoquinina. Para analizar el efecto en el gradiente de diferentes concentraciones de proteínas PIN se hicieron tres simulaciones con variaciones en su polaridad o la densidad de las proteínas PIN. La primera es donde no hay transporte lateral en las células de *Endodermis* ni de *BorderLateral* (**D**), la segunda es donde hay más concentración de proteínas PIN en todas las células (**E**) y la tercera es donde hay menos concentración de proteínas PIN en todas las células (**F**). La salida pasiva de auxinas es la misma que en las simulaciones pasadas $P_{m,i} = P_m/20$, por lo que las simulaciones **D** y **E** representan sobre- y subexpresión de proteínas PIN. En la Tabla III.3 se muestran las gráficas de los resultados de estas simulaciones y se discuten a continuación.

D. Perturbación 1- Simulación sin proteínas PIN con polaridad lateral

Las mutantes sencillas de proteínas PIN suelen tener fenotipos moderados debido a la redundancia funcional. Por ello, es difícil estudiar en plantas vivas el rol individual de cada flujo de auxinas en la raíz y las mutantes múltiples muestran defectos severos de crecimiento y diferenciación [4]. La densidad de proteínas PIN con polaridad lateral en la epidermis (*BorderLateral*) forma el reflujo que conecta el flujo basipétalo con el acropétalo y se ha sugerido que regula el tamaño del meristemo [4, 40]. En la simulación **D** exploramos qué le pasa al gradiente de concentración de auxinas cuando no hay proteínas PIN con polaridad lateral, ni en las células de epidermis (*BorderLateral*) ni en las de endodermis y córtex (*Endodermis*).

En la simulación de la raíz intacta (simulación **A**) las células de tipo *BorderLateral*, *EndodermisRight* y *EndodermisLeft*, tienen proteínas PIN localizadas en la cara lateral de las células con dirección al cilindro vascular. En la simulación **D** dicha polaridad se eliminó. Los resultados del modelo celular se pueden apreciar en la Figura 3.10. En la simulación **D** el gradiente se estabiliza totalmente alrededor del tiempo $MCS = 100,000$, mientras que en la simulación **A** tardaba $MCS = 1$ millón. Sin embargo la concentración promedio de las células es mucho menor en esta simulación que en la simulación **A** (i.e. en el *CQ* es de 0.6 u.a. contra 4.0 u.a. respectivamente; Tabla III.3 Concentración de auxinas **D**). Además de que la diferencia de los valores de concentración de auxinas en el *CQ* y sus vecinas no es tan amplia, haciendo al gradiente menos abrupto (Tabla III.3, Histograma **D**).

E. Perturbación 2- Simulación con mayor densidad de proteínas PIN en la membrana

Los parámetros de permeabilidad de PIN representan la densidad de la proteína de eflujo en la membrana celular. Las variaciones en dichos valores pueden interpretarse como

diferencias en la regulación transcripcional, traduccional o post-traduccional de las proteínas PIN. En la simulación **E** se analizó el gradiente aumentando cinco veces (respecto a la simulación **A**) los valores de los parámetros de permeabilidad apical, basal y lateral $5 * P_m$ y lateral de *BorderLateral* $5 * P_{m,bl}$. No se cambió el valor del parámetro de la permeabilidad pasiva de auxinas, $P_{m,l}$. Entonces, los parámetros de permeabilidad para la simulación **E** son:

```
permeabilidad_apical = 0.005
permeabilidad_basal = 0.005
permeabilidad_lateralED = 0.005
permeabilidad_lateralBL = 0.001
pasivo = 0.00005
```

Los resultados del modelo celular se pueden apreciar en la Figura 3.11. En esta simulación se observa que el sistema alcanza un estado estable dinámico antes del tiempo MCS = 200,000 (Tabla III.3, Concentración de auxinas **E**). Los valores de concentración a los que se estabiliza son muy similares a los valores de la simulación **A** (Tabla III.3, Histograma **A** y **E**), por lo tanto estos resultados muestran que la mayor permeabilidad de PIN disminuye el tiempo en que el sistema llega a un mismo estado estacionario, pero no afecta el valor en que se estabiliza.

F. Perturbación 3- Simulación con menor densidad de proteínas PIN en la membrana

En la simulación **F** se disminuyeron cinco veces (respecto a la simulación **A**) los parámetros de permeabilidad apical, basal y lateral $P_m/5$, de la permeabilidad lateral de las células *BorderLateral* $P_{m,bl}/5$. La permeabilidad pasiva de auxinas no se cambió $P_{m,l}$. Los parámetros de permeabilidad de la simulación **F** son:

```
permeabilidad_apical = 0.0002
permeabilidad_basal = 0.0002
permeabilidad_lateralED = 0.0002
permeabilidad_lateralBL = 0.00004
pasivo = 0.00005
```

Los resultados del modelo celular se muestran en la Figura 3.12. El gradiente se comienza a formar y hasta el tiempo MCS = 700,000 no logra estabilizarse (Tabla III.3, Concentración de auxinas **F**). Los resultados de la simulación **F** también sugieren que la permeabilidad de proteínas PIN correlaciona positivamente con la velocidad en que se estabiliza el gradiente. Para explorar esta hipótesis se hicieron 10 simulaciones con parámetros de permeabilidad en el rango de aquellos de la simulación **F** y la simulación **E**. Los resultados muestran que a medida que los parámetros de permeabilidad aumentan, disminuye el tiempo en que el sistema se estabiliza (en la Tabla III.4 se muestran los resultados de tres simulaciones). Por lo tanto la densidad global de proteínas PIN con polaridad definida, correlaciona con la velocidad a la que se estabiliza el gradiente dentro del rango de parámetros explorados en nuestro modelo.

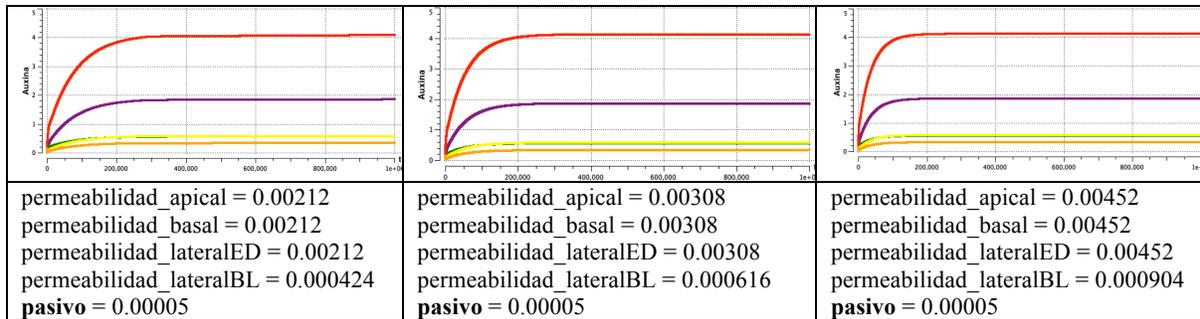


Tabla III.4. **Resultados del análisis del efecto de la permeabilidad de proteínas PIN en el transporte de auxinas.** Las gráficas Concentración promedio de auxinas por tipo celular- tiene en el eje x grafica el tiempo (MCS) y el eje y la concentración de auxinas. El Histograma de concentración de auxinas- tiene como eje x la concentración de auxinas y en el eje y la frecuencia. Los tipos celulares están en código de colores: *CQ* en rojo, *Pro-vascular* en verde, *Columela* en morado, *BorderLateral* en naranja y *Endodermis* en amarillo. Los resultados mostrados son de simulaciones de tiempo MCS = 700,000.

3.4.3. Análisis de los efectos de tratamientos en el gradiente de concentración de auxina

Se hicieron tres simulaciones para analizar el efecto de tratamientos en el gradiente. En cada una, el tratamiento empieza una vez que el gradiente se comienza a estabilizar en el tiempo MCS = 300,000 (Tabla III.2). En la simulación **G** se modela la inmersión de la raíz en solución con auxinas, en la simulación **H** se modela el tratamiento de NPA, y en la simulación **I** se modela la ablación de las células del *CQ*. Para interpretar los resultados del modelo con información experimental, utilizamos datos de la actividad del promotor sintético DR5 el cual es sensible a auxinas. Hay varios supuestos al comparar distribución con respuesta a auxinas. Por ejemplo se supone que la concentración de auxinas en las células es interpretada por la vía de señalización de auxina sin considerar la expresión no homogénea de sus reguladores en la raíz (e.g. ARF^+ y ARF^-) [96], que confiere distintas sensibilidades de respuesta a auxinas. Además se ignora la saturación de la vía y de la actividad del promotor DR5. Pese a estos supuestos, la expresión de genes reporteros fusionados a DR5 son los datos experimentales más informativos que existen actualmente para relacionar con la concentración de auxinas. En la Tabla III.5 se muestran gráficas con los resultados de estas simulaciones.

G. Perturbación 4- Inmersión de la raíz en solución con auxinas

En la simulación **G** se modificó el steppable AuxinTransport. La versión AuxinTransportImmersion ejecuta el transporte de auxinas como en la simulación de la raíz intacta **A** por MCS = 300,000. Cuando ya se formó el gradiente de concentración de auxinas, entonces empieza el tratamiento con medio adicionado con auxinas. Las células que están en contacto con el medio aumentan su concentración de auxinas cada MCS, como si la estuvieran absorbiendo del medio en el que crecen. El aumento es constante durante toda la simulación pues se asume que las auxinas en el medio se encuentran a una concentración alta y su entrada a las células esta limitada por la permeabilidad de las membranas.

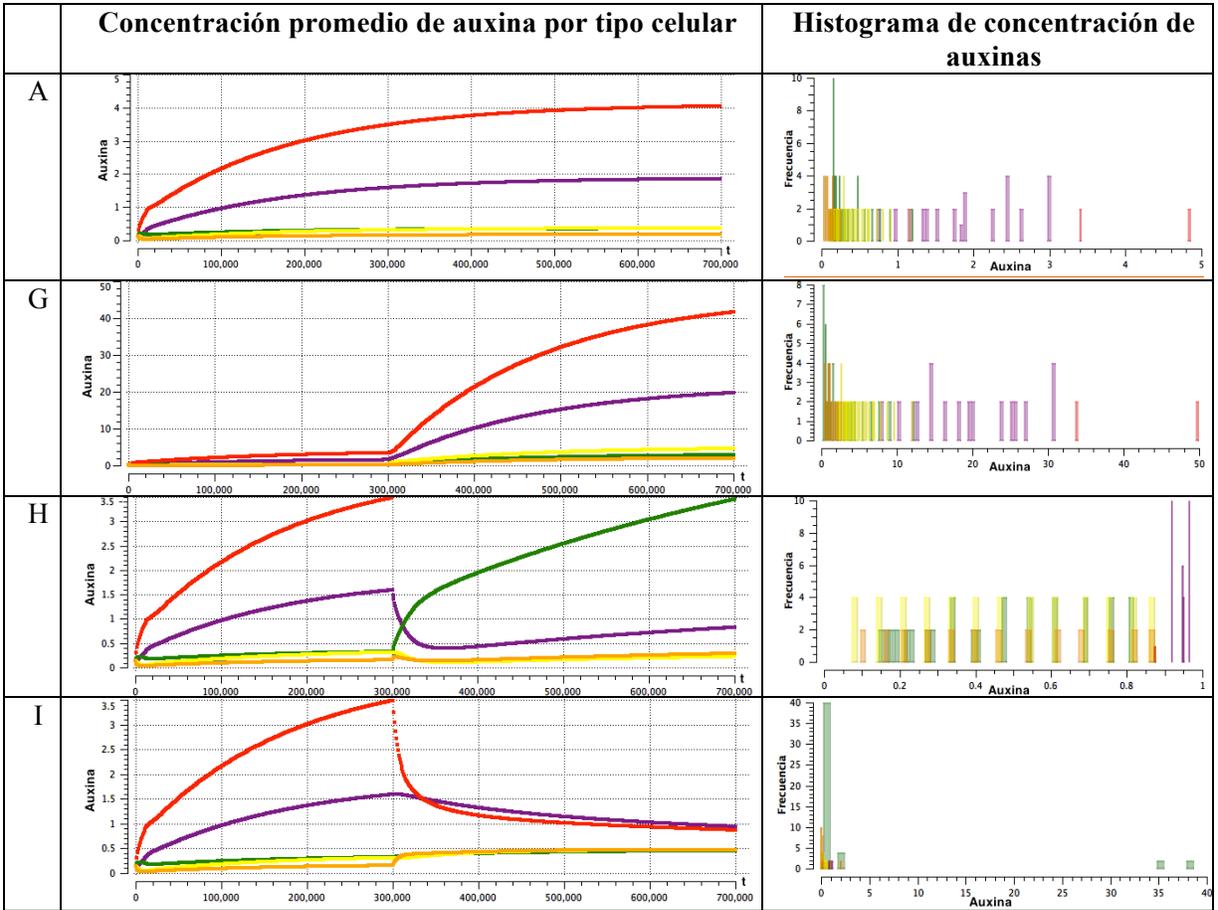


Tabla III.5 **Resultados del análisis de tratamientos en el gradiente de concentración de auxinas.** Las gráficas Concentración promedio de auxinas por tipo celular- tiene en el eje x grafica el tiempo (MCS) y el eje y la concentración de auxinas. El Histograma de concentración de auxinas- tiene como eje x la concentración de auxinas y en el eje y la frecuencia. Los tipos celulares están en código de colores: *CQ* en rojo, *Provascular* en verde, *Columela* en morado, *BorderLateral* en naranja y *Endodermis* en amarillo. Los resultados mostrados son de simulaciones de tiempo MCS = 700,000.

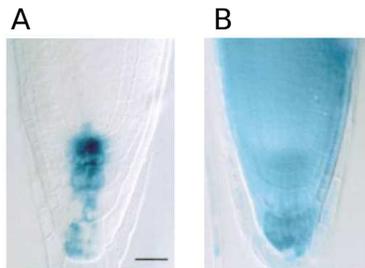


Figura 3.13: **Respuesta a auxinas tras tratamiento con auxinas.** Expresión del gen reportero GUS fusionado al promotor sintético DR5 (*DR5::GUS*) en raíces de plántulas de 4 dpv (tinción de 30 minutos) (A). Expresión de *DR5::GUS* en raíces de plántulas tras la aplicación de 2,4-D en el medio de crecimiento (B). La barra indica 25 μ m. Imágenes modificadas de [36]

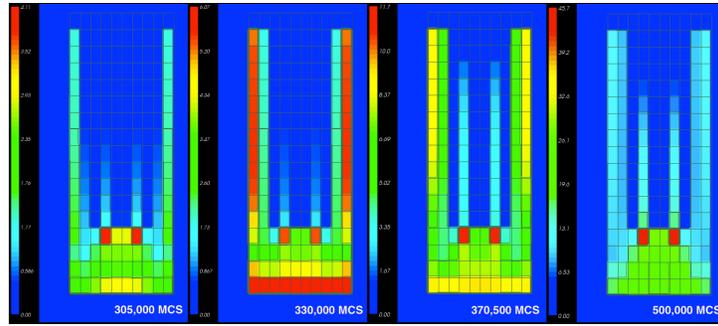


Figura 3.14: **Concentración de auxinas en las células de la simulación G.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 305,000, MCS = 330,000, MCS = 370,500 y MCS = 500,000. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 305,000 es de 0.0 - 4.11, MCS = 330,000 es de 0.0 - 6.07, MCS = 37,500 es de 0.0 - 11.7 y en el tiempo MCS = 500,000 es de 0.0 - 45.7.

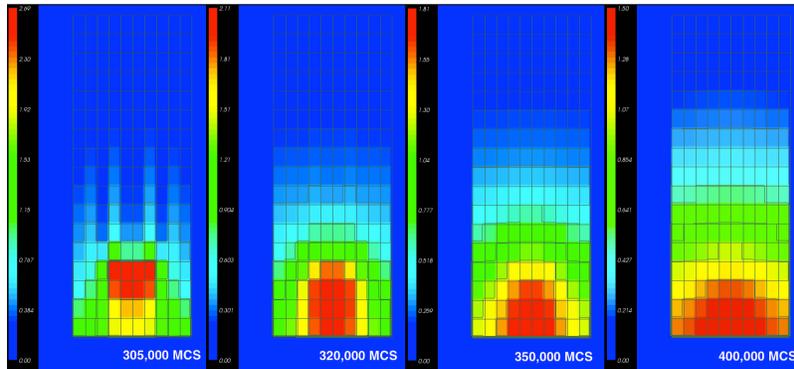


Figura 3.15: **Concentración de auxinas en las células de la simulación H.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 305,000, MCS = 320,000, MCS = 350,000 y MCS = 400,000. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 305,000 es de 0.0 - 2.69, MCS = 320,000 es de 0.0 - 2.11, MCS = 350,000 es de 0.0 - 1.81 y en el tiempo MCS = 400,000 es de 0.0 - 1.50.

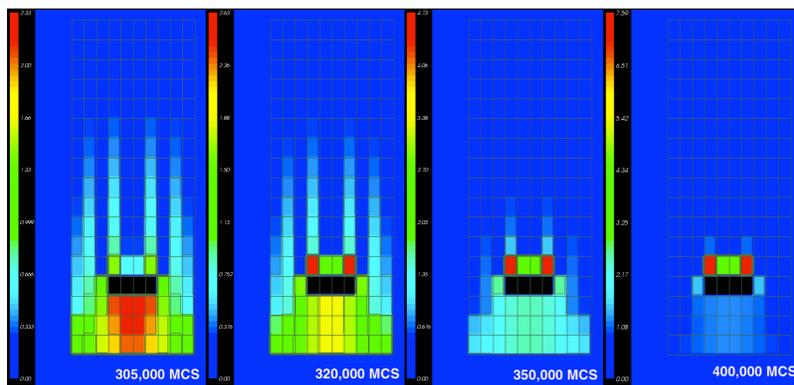


Figura 3.16: **Concentración de auxinas en las células de la simulación I.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 305,000, MCS = 320,000, MCS = 350,000 y MCS = 400,000. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 305,000 es de 0.0 - 2.33, MCS = 320,000 es de 0.0 - 2.63, MCS = 350,000 es de 0.0 - 4.73 y en el tiempo MCS = 400,000 es de 0.0 - 7.59.

Los resultados del modelo celular se pueden apreciar en la Figura 3.14. La concentración de auxinas incrementa sostenidamente en todos los tipos celulares. En el tiempo MCS = 700,000 las células de tipo celular *CQ* han alcanzado en promedio una concentración casi doce veces mayor a la simulación de la raíz intacta (**A**). El gradiente de concentración de auxinas se conserva aunque la concentración de auxinas no deja de aumentar en todas las células (Tabla III.5 Concentración de auxinas e Histograma **G**). A pesar del aumento drástico en las concentración de auxinas promedio por tipo celular, las células del *CQ* siguen teniendo la mayor concentración promedio, seguidas de las células de *Columela*, *BorderLateral*. Existen datos de experimentos donde raíces de *Arabidopsis* crecen en un medio adicionado con auxinas sintéticas 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid), y los cambios en la distribución de auxinas son monitoreados indirectamente con la actividad de *DR5::GUS* [36]. En estos experimentos el dominio de expresión del gen reportero se expande a todas las células del ápice de la raíz (Figura 3.13). Estos datos experimentales se pueden interpretar en nuestro modelo si el tratamiento con auxinas promueve altos niveles de concentración de auxinas en todas las células, rebasando el valor umbral que activa al promotor sintético DR5. Sin embargo, nuestro modelo no considera la saturación de las proteínas PIN ni la regulación de su polaridad, la cual podría tener implicaciones en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis* ante el tratamiento con auxinas.

H. Perturbación 5- Tratamiento con NPA

La simulación **H** modeló el tratamiento con NPA, que es un inhibidor de la actividad de las proteínas PIN. Para ello se modificó el steppable AuxinTransport. En la versión AuxinTransportNPA se ejecuta el transporte activo de auxinas como en la raíz intacta hasta el tiempo MCS = 300,000. A partir del tiempo MCS = 300,001 se modifican los parámetros de permeabilidad a los siguientes:

```
permeabilidad_apical = 0.0
permeabilidad_basal = 0.0
permeabilidad_lateralED = 0.0
permeabilidad_lateralBL = 0.0
pasivo = 0.00005
```

Los resultados del modelo celular se pueden apreciar en la Figura 3.15. A partir del tiempo MCS = 300,000 las auxinas dejan de ser transportadas polarmente y por ende los flujos de transporte en la raíz (acropétalo, basipétalo y el reflujo) desaparecen. Las auxinas ahora son transportadas muy lentamente en todas direcciones por el transporte pasivo de auxinas. Las células del *CQ* y *Columela* disminuyen sus valores de concentración promedio de auxinas tras haber tenido los valores más altos de concentración. Así mismo, las células de *Endodermis*, *BorderLateral* y *Pro-vascular* aumentan sus valores de concentración promedio de auxinas (Tabla III.5 Concentración de auxinas e Histograma **H**). A partir del tiempo 600,000 MCS se empieza a observar la tendencia donde todas las células tienen los mismos valores de auxinas (alrededor de 0.8 *u.a.*). Por lo tanto el gradiente de concentración de auxinas desaparece en el tratamiento con NPA.

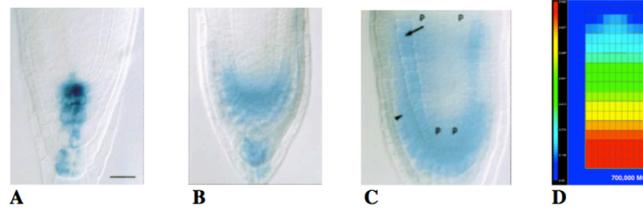


Figura 3.17: **Respuesta a auxinas tras tratamiento con NPA.** Expresión del gen reportero GUS fusionado al promotor sintético DR5 (*DR5::GUS*) en raíces de plántulas de 4 dpj (tinción de 30 minutos) (A). Expresión de *DR5::GUS* en raíces de plántulas de 4 dpj germinadas en NPA (tinción de 30 minutos) (B). Expresión de *DR5::GUS* en raíces de 7dpj germinadas en NPA (C). La expresión de *DR5::GUS* no es homogénea en todas las células de la raíz, sino que se concentra en las células de epidermis, cofia lateral y columela. Distribución de auxinas en la simulación H (D). El gradiente con el máximo de concentración en las células del CQ se ha afectado y la concentración de auxinas se homogeniza en todas las células. Imágenes A, B y C modificadas de [36]. La barra indica 25 μm .

Se han hecho experimentos de raíces tratadas con NPA donde los cambios en la distribución de auxinas son monitoreados con la actividad del promotor sintético DR5 [36]. En dichos experimentos, en raíces de 4dpj desaparece el máximo de expresión de *DR5::GUS* en las células del CQ e iniciales de columela y su patrón de expresión se expande [36] (Figura 3.17). Días después, en raíces de 7 dpj se observa un máximo de expresión de *DR5::GUS* en las células de epidermis, cofia lateral y columela (Figura 3.17). Entonces los resultados de la simulación **H** concuerdan parcialmente con los experimentos [36], pues logran reproducir alteraciones tempranas del gradiente de concentración de auxinas, pero no las alteraciones observadas a largo plazo. Dichas alteraciones en el patrón de expresión de *DR5::GUS* podrían ser el producto del metabolismo de auxinas o de transporte activo mediado por una proteína que no sea sensible a NPA. AUX1 es una proteína permeasa de influjo de auxinas que en raíces intactas se localiza en las membranas celulares de células de epidermis, cofia lateral, columela y células pro-vasculares distales [36, 57]. Su localización correlaciona con los patrones de expresión de *DR5::GUS* en tratamiento con NPA de 7dpj, además de que su actividad no es sensible a NPA. La mayoría de los modelos de transporte de auxinas en la raíz no ha considerado la actividad de las proteínas AUX1, y su actividad podría ser importante para agudizar el gradiente de concentración de auxinas (marcar más las diferencias en la concentración) y explicar la distribución de auxinas en tratamiento con NPA.

I. Perturbación 6- Ablación de las células del centro quiescente

Para la simulación **I**, se modificó el steppable AuxinTransport y se creó una nueva versión AuxinTransportAblate. En este Steppable se ejecuta el transporte activo de auxinas como en la raíz intacta hasta el tiempo MCS = 300,000 MCS. Entonces las células del CQ se vuelven no funcionales, y dejan de recibir o mandar auxinas a sus células vecinas como resultado de su ablación. Los resultados del modelo celular se pueden apreciar en la Figura 3.16. A partir del tiempo de la ablación de las células del CQ, el resto de las células alteran su concentración promedio de auxinas. Las células de tipo *Pro-vascular* (proximales inmediatas al CQ) aumentan su concentración rápidamente (Tabla III.5 Concentración de auxinas **I**). Hasta el tiempo MCS = 700,000 la concentración en las células *Pro-vascular* aumenta indefinidamente. Los resultados de la simulación **I** son consistentes con aquellos

publicados por Grieneisen y colaboradores [40].

Experimentos de ablación con láser de las células del centro quiescente muestran una completa reespecificación de la cofia y del centro quiescente por tejido pro-vascular distal [50, 36]. Previa a esta reespecificación se observa un nuevo máximo de actividad de *DR5::GUS* en la parte distal de la región pro-vascular (Figura 3.18). Tanto la presencia de un nuevo máximo de concentración como la reespecificación del tejido son dependientes del transporte polar de auxinas [36]. En el sistema vivo una vez establecido el nuevo máximo de concentración de auxinas se llevan a cabo otros cambios en distribución de proteínas PIN y regulación genética para el restablecimiento del NCTR. Nuestro modelo logra reproducir las etapas tempranas de la ablación del CQ.

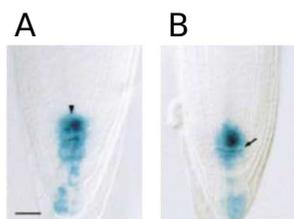


Figura 3.18: **Respuesta a auxinas tras la ablación del CQ.** Expresión de *DR5::GUS* en raíces de plántulas de 5 dpq (tinción de 30 minutos) (A). Con una flecha se marca el sitio del CQ. Expresión de *DR5::GUS* en raíces de plántulas de 3 dpq, dos días tras la ablación del CQ (B). Imágenes modificadas de [36]. La barra indica 25 μ m.

3.4.4 Modelo del transporte de auxinas y la red de señalización de auxinas en el NCTR

A continuación se presentan los resultados de un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias que describe la dinámica de la red de señalización de auxinas controlando la expresión genética de *WOX5*. Este modelo fue propuesto por el candidato a doctor en ciencias biomédicas Eugenio Azpeitia. El modelo considera a los componentes genéricos de la vía de señalización a auxinas: los represores *Aux/IAA*, los factores transcripcionales *ARF⁺* y *ARF⁻* y a *WOX5* como gen de respuesta. En la raíz de *Arabidopsis* la expresión de *WOX5* es sensible a la concentración de auxinas y además se observa exclusivamente en las células del organizador del NCTR [75, 67, 81], y constituye un marcador de la posición del NCTR.

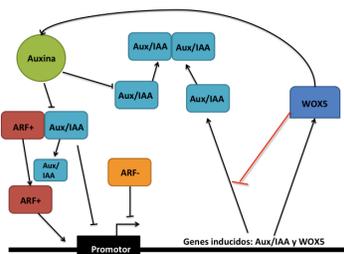


Figura 3.19: **Modelo de la red de señalización de auxinas.** Se muestra un diagrama de los componentes que se tomaron en cuenta y las relaciones de regulación entre ellas. En rojo se destaca la interacción no

reportadas en la literatura.

El sistema de ecuaciones diferenciales se muestra (Ecuación 3.4) junto con un esquema de los componentes y sus interacciones (Figura 3.19). Las variables del modelo son aux (auxinas), A (ARF^+), I (Aux/IAA), D_IA (dímero $ARF^+ - Aux/IAA$), D_II (dímero $Aux/IAA - Aux/IAA$), y W5 ($WOX5$). Los ARF^- (parámetro K_{AM}) se consideran constantes en el modelo. Las variables D_IA y D_II aumentan su concentración por la formación de los dímeros (con tasas K_{IA} y K_{II}), disminuyen su concentración por la disociación de los dímeros (con tasas K'_{IA} y K'_{II}) y son degradados a una tasa dependiente de aux ($\frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1}$). La variable A aumenta su concentración dada su liberación del dímero D_IA por la degradación de I que es dependiente de la concentración de aux ($\frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1}$), también por la disociación del dímero D_IA (K'_{IA}) y disminuye su concentración dada la formación del dímero D_IA (K_{IA}). La variable I tiene una función de síntesis promovida por aux e inhibida por W5 ($\frac{p_{iI} A^{n2}}{K_{AM}^{n2} + W5^8 + 1}$) y su degradación es dependiente de aux ($\frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1}$). La variable W5 tiene una función de síntesis promovida por A e inhibida por I ($\frac{p_{iW5} A^n}{K_{AM}^{n+1}}$) y una tasa de degradación de basal (deg_{W5}). Por último la variable aux tiene una tasa de síntesis basal (p_{iaux}), una tasa de síntesis dependiente de W5 (p_{aux}) y una tasa de degradación basal (deg_{aux}).

$$\frac{dD_{II}}{dt} = K_{IA}IA - K'_{IA}D_{IA} - \frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1} D_{IA} \quad (3.4)$$

$$\frac{dD_{II}}{dt} = K_{II}II - K'_{II}D_{II} - \frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1} D_{II}$$

$$\frac{dA}{dt} = \frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1} D_{IA} + K'_{IA}D_{IA} - K_{IA}IA$$

$$\frac{dI}{dt} = \frac{p_{iI} A^{n2}}{K_{AM}^{n2} + W5^8 + 1} - \frac{\gamma_1 deg_1 K_{aux} aux}{K_{aux} aux + 1} I$$

$$\frac{dW5}{dt} = \frac{p_{iW5} A^n}{K_{AM}^n + 1} - deg_{W5}W5$$

$$\frac{daux}{dt} = p_{iaux} + p_{aux}W5 - deg_{aux}aux$$

El modelo considera que A puede dimerizar con I para dar lugar a D_IA, y que I puede dimerizar con I para dar lugar a D_II. Ambos dímeros pueden ser disociados por aux con la subsecuente degradación de I. A regula positivamente la expresión de I y W5, y compete con K_{AM} por los sitios de unión a promotores de respuesta a aux. W5 promueve a aux formando una asa de retroalimentación positiva, y reprime la expresión de I formando un

asa de retroalimentación negativa (esta interacción no está reportada en la literatura y representa una predicción del modelo de Azpeitia [29]). El modelo tiene un comportamiento biestable en los niveles de concentración de W5 con respecto a la concentración de auxinas. Si aux es mayor al umbral u , entonces W5 aumenta drásticamente su concentración (Figura 3.20). Este modelo se acopló al modelo del transporte de auxinas de la sección anterior. De este modo, en este modelo se considera la escala intracelular de las redes de regulación y la intercelular del transporte de auxinas, constituyendo un modelo multiescala del preestablecimiento del patrón del NCTR de *Arabidopsis*. En nuestro modelo multiescala, W5 es un marcador de la posición del organizador del RNCT.

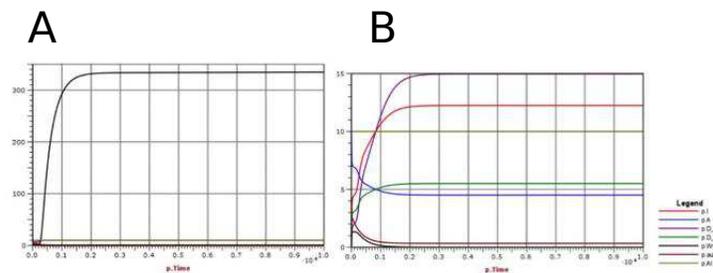


Figura 3.20: **Comportamiento biestable de W5 en el modelo de la señalización de auxinas.** En las dos gráficas, el eje x es el tiempo, y el eje y es la expresión. Se muestra la dinámica del sistema cuando la concentración de auxinas es mayor al umbral u (A). Se puede apreciar que en dicha condición, W5 tiene su máxima concentración ($W5= 300$ u.a.). Se muestra la dinámica del sistema cuando las auxinas son menores al valor u ($W5= 0$ u.a.) (B). $I=Aux/IAA$, $A=ARF+$, $DII= Aux/IAA-Aux/IAA$, $DIA= Aux/IAA-ARF+$, $W5=WOX5$, $aux= auxinas$, $AI= ARF-$.

Implementación del modelo multiescala en CompuCell3D

El sistema de ecuaciones diferenciales se exportó a formato SBML (con Jarnac [97]) para incorporarlo a la simulación de CompuCell3D. Se utilizaron los steppables de la simulación A (Capítulo 2 - Métodos), y se añadió el steppable AuxinIntracellularNetwork (Código 4). En AuxinIntracellularNetwork se define un sistema de ecuaciones diferenciales para cada célula de la simulación. El steppable recorre todas las células de la simulación y resuelve la red un tiempo. Cada célula de la simulación tiene dos variables en relación con las auxinas, C es la variable de auxinas del transporte y aux del modelo SBML. Para acoplar las auxinas del transporte activo con las de la red de señalización, se coordinan los valores antes y después de resolver el sistema de ecuaciones diferenciales. En el steppable primero se copia el valor del parámetro del transporte al parámetro de la red ($aux = C$). Y tras resolver el sistema de ecuaciones diferenciales, se copia el valor del parámetro de la red al parámetro del transporte ($C = aux$). Así la red de señalización de auxinas interpreta la concentración celular de auxinas y posteriormente la red afecta a las auxinas que serán transportada.

```
class Auxin_Intracellular_Network :
    for cell in cell_List:
        aux.cell=C.cell
        timestepBionetworks()
        C.cell= aux.cell
```

Código 4. El steppable acopla el modelo intracelular de señalización de auxinas al modelo del

transporte de auxinas. El steppable recorre todas las células de la simulación y guarda en la variable aux de la red SBML, el valor de auxinas dado el transporte, C . Después se resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales (timestepBionetworks). Se finaliza copiando el valor aux a la variable SBML al la variable del transporte activo, C .

Para estudiar la cooperación del transporte de auxinas y la red de señalización de auxinas en el control de la expresión de *WOX5*, se simuló el sistema de la raíz intacta y con dos perturbaciones:

- J. Raíz intacta
- K. Perturbación 1- Inmersión de la raíz en solución con auxinas
- L. Perturbación 2- Tratamiento con NPA

Para el análisis de las propiedades dinámicas de las tres simulaciones se incluyen tres gráficas:

- Concentración promedio de auxinas por tipo celular: Es una gráfica de la concentración promedio de auxinas por tipo celular a lo largo del tiempo de la simulación. El eje x es el tiempo de la simulación (MCS) y el eje y es la concentración promedio de auxinas por tipo celular.
- Histograma de concentración de auxinas: Muestra la distribución de la concentración de auxinas para cada tipo celular. El eje x es la concentración de auxinas y el eje y es la frecuencia.
- Concentración promedio de $W5$ por tipo celular: Gráfica de la concentración promedio de $W5$ por tipo celular. El eje x es el tiempo de la simulación en MCS, y el eje y el valor de $W5$.

En las tres gráficas los tipos celulares están en código de colores: *CQ* en rojo, *Pro-vascular* en verde, *Columela* en morado, *Endodermis* en amarillo y *BorderLateral* en naranja. En la Tabla III.6 se muestran las gráficas de las tres simulaciones. Las tres simulaciones se comportan idénticas a la simulación **A** hasta el tiempo 300,000 MCS. A partir de este tiempo y hasta el final de la simulación se incluye la dinámica de la red intracelular en el steppable AuxinIntracellularNetwork.

J. Raíz intacta

En la simulación **J** desde el tiempo $MCS = 0$ hasta el $MCS = 300,000$ se comporta exactamente como la simulación **A**. A partir del tiempo $MCS = 300,001$ cuando el gradiente de concentración de auxinas ya se formó y se estabiliza (Tabla III.6, Concentración auxinas **A**), se incorpora la dinámica de la red intracelular de señalización de auxinas (Figura 3.22). La concentración de $W5$ es alta tan solo en las células del *CQ* pues son las que dado el transporte de auxinas tienen mayor concentración de auxinas y rebasan el umbral u (Tabla III.6, Concentración $W5$ **J**). Siendo que $W5$ promueve a las auxinas [75, 83], los niveles de concentración de auxinas en las células del *CQ* incrementan y amplían la diferencia en la concentración de estas células con el resto (Tabla III.6, Histograma **J**).

K- Perturbación 1- Inmersión de la raíz en solución con auxinas

En la simulación **K** desde el tiempo MCS = 0 hasta el MCS = 300,000 se comporta exactamente igual que la simulación **A**. A partir del tiempo MCS = 300,001 hasta el tiempo MCS = 400,000 la simulación **K** se comporta como la simulación **G** donde se simula la inmersión de la raíz en medio adicionado con auxinas. A partir del tiempo MCS = 400,000 donde el gradiente de concentración de auxinas ha sido alterado por el tratamiento, se incorpora la dinámica de la red intracelular de señalización de auxinas a la simulación **K**. El gradiente de concentración de auxinas no se altera substancialmente a partir de la inclusión de la red intracelular pero aumenta el valor en la concentración de todas las células (Figura 3.23). La concentración de W5 es alta en todos los tipos celulares dado que la concentración de auxinas es alta en todas las células (Tabla III.6 Valor de W5 **K**). Existen datos experimentales del patrón de expresión de *WOX5* de raíces de *Arabidopsis* en solución con auxinas [81]. La expresión de *WOX5* es monitoreada con una fusión transcripcional del gen de *WOX5* y *GFP*. En la raíz intacta la expresión de *WOX5::GFP* se observa exclusivamente en las células del CQ. Bajo tratamiento de inmersión, la expresión de *WOX5* disminuye. Además, aunque a niveles bajos, la expresión de *WOX5* se observa tanto en el CQ y las células iniciales de córtex y endodermis (Figura 3.21). En nuestro modelo W5 no disminuye su concentración y además aumenta su dominio de expresión a todas las células. Esto sugiere que nuestro modelo no contempla restricciones en las células para que no expresen a *WOX5*. Dichas restricciones deberían ser contempladas para poder reproducir correctamente el comportamiento de *WOX5* en inmersión de auxinas. Es posible que las restricciones involucren a los factores de transcripción *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORTROOT* (*SHR*) los cuales se expresan en las células del CQ y la endodermis, y se ha demostrado que son necesarios para la expresión *WOX5* [67].

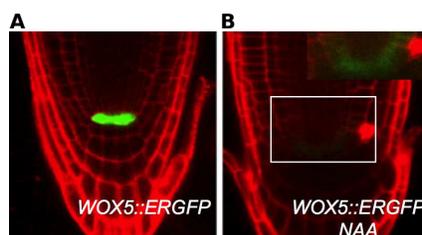


Figura 3.21: **Análisis de la expresión de *WOX5* con una fusión transcripcional del gen con *GFP*.** En la raíz intacta, la expresión de *WOX5* se observa en las células del CQ (A). Tras el tratamiento con auxinas (NAA) la expresión de *WOX5* disminuye (B). La expresión de *WOX5* se expande a las células iniciales de endodermis/córtex como se puede observar en el cuadro de la esquina superior derecha en la figura (B). Imágenes modificadas de [81]

L. Perturbación 2- Tratamiento con NPA

En la simulación **L** desde el tiempo MCS = 0 hasta el MCS = 300,000 se comporta exactamente igual que la simulación **A**. A partir del tiempo MCS = 300,001 hasta el tiempo MCS = 400,000 se comporta como la simulación **H** donde se simula el tratamiento de la raíz con NPA que inhibe el transporte polar por proteínas de la familia PIN. A partir del tiempo MCS = 400,000 donde el gradiente de concentración de auxinas ha sido alterado por el tratamiento, se incorpora la dinámica de la red intracelular de señalización de auxinas. El

gradiente de concentración auxinas desaparece más rápidamente tras la inclusión de la red intracelular que sin ella (Tabla III.5, Concentración auxinas **H** y Tabla III.6, Concentración de auxinas **L**) homogenizando la concentración de auxinas en las células de la simulación (Figura 3.24). Entonces no existe un máximo de concentración de auxina y ninguna célula en la simulación llega a tener la concentración mínima de auxinas necesaria para tener una alta concentración de W5 (Tabla III.6, Concentración W5 **L**). Siendo que W5 tiene una baja concentración, no promueve a las auxinas y sus niveles se mantienen bajos en todas las células. Actualmente no existen datos experimentales sobre la expresión de *WOX5* en tratamiento con NPA, pero el patrón de respuesta a auxinas formando máximos de respuesta en la epidermis y la expresión de marcadores del NCTR alrededor sugieren que *WOX5* podría estar expresándose próximo a los máximos [36] (Figura 3.17).

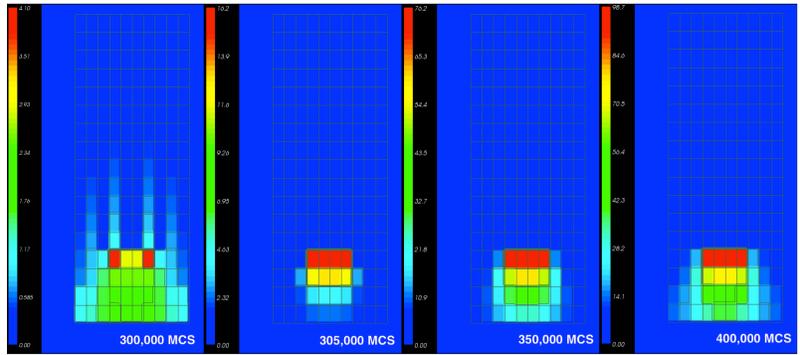


Figura 3.22: **Concentración de auxinas en las células de la simulación J.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 300,000, MCS = 305,000, MCS = 350,000 y MCS = 400,000. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 400,000 es de 0.0 - 4.1, MCS = 405,000 es de 0.0 - 16.2, MCS = 450,000 es de 0.0 - 76.2 y en el tiempo MCS = 500,000 es de 0.0 - 98.7.

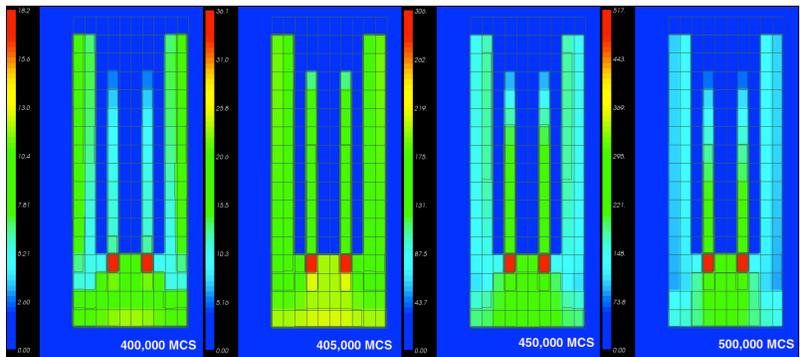


Figura 3.23: **Concentración de auxinas en las células de la simulación K.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 400,000, MCS = 405,000, MCS = 450,000 y MCS = 500,000. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 400,000 es de 0.0 - 18.2, MCS = 405,000 es de 0.0 - 36.1, MCS = 450,000 es de 0.0 - 306 y en el tiempo MCS = 500,000 es de 0.0 - 517.

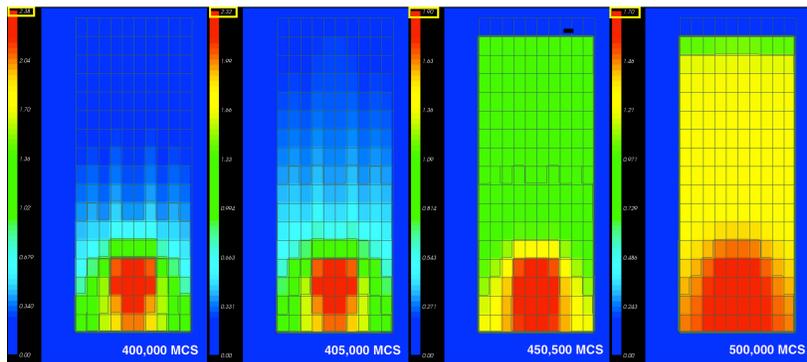


Figura 3.24: **Concentración de auxinas en las células de la simulación L.** Se muestra la concentración de auxinas en unidades arbitrarias en cada célula de la simulación en el tiempo MCS = 400,000, MCS = 405,000, MCS = 450,000 y MCS = 500,000. La escala de color en cada tiempo MCS es distinta. En el tiempo MCS = 400,000 es de 0.0 - 2.38, MCS = 405,000 es de 0.0 - 2.32, MCS = 450,000 es de 0.0 - 1.9 y en el tiempo MCS = 500,000 es de 0.0 - 1.7.

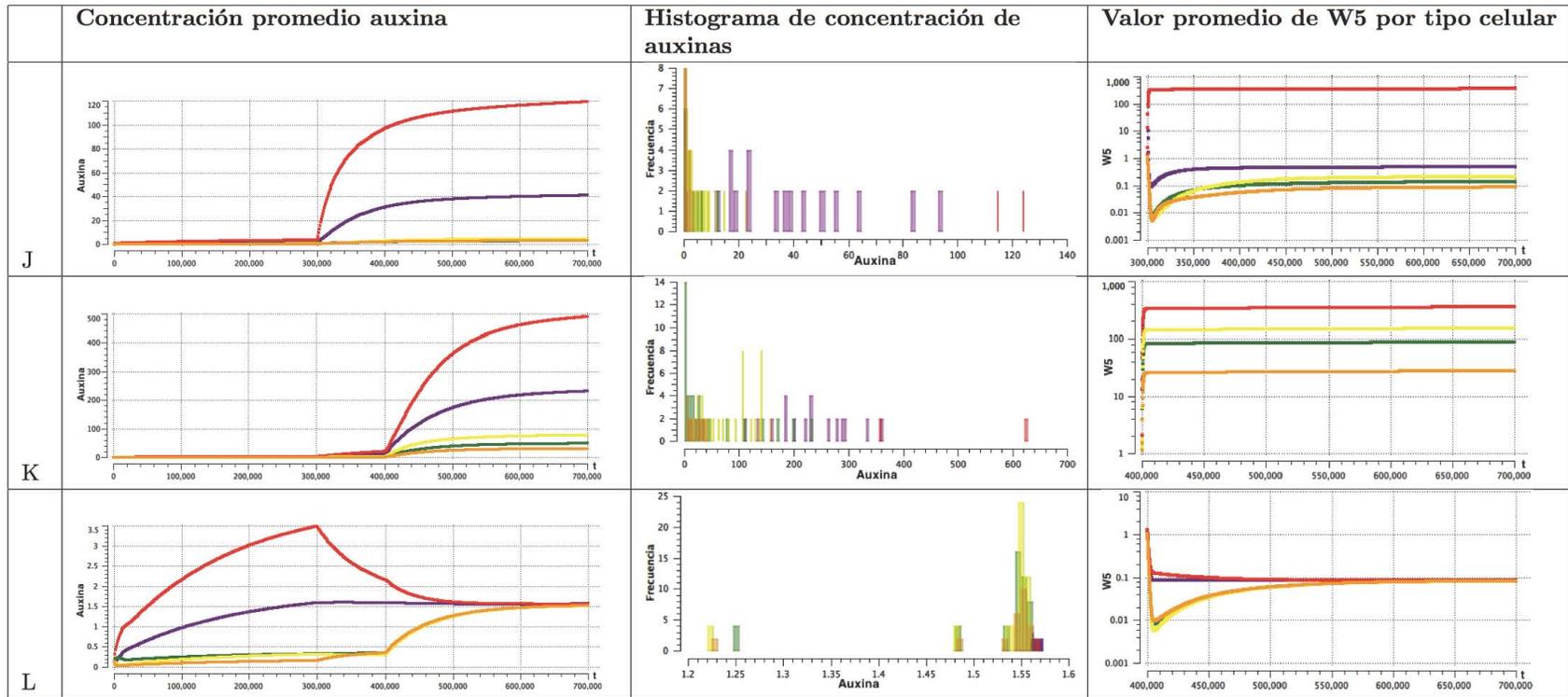


Tabla III.6 Resultados del análisis de transporte de auxinas y la red de señalización de auxinas. Las gráficas Concentración promedio de auxinas y Valor de W5 tienen en el eje x grafica el tiempo (MCS) y el eje y la concentración de auxinas. El Histograma de concentración de auxinas- tiene como eje x la concentración de auxinas y en el eje y la frecuencia. Los tipos celulares están en código de colores: *CQ* en rojo, *Pro-vascular* en verde, *Columela* en morado, *BorderLateral* en naranja y *Endodermis* en amarillo. Los resultados mostrados son de simulaciones de tiempo MCS = 700,000.

Capítulo 4

Discusión

La raíz de *Arabidopsis* se ha convertido en un sistema teórico-experimental fundamental para entender procesos del desarrollo de organismos multicelulares [40, 65, 42, 29, 98, 30, 31]. Estos procesos van desde el nivel molecular, al de las redes de regulación, las interacciones celulares, hasta los procesos tisulares u organogénicos que subyacen a la diferenciación celular. El estudio del desarrollo de la raíz en los últimos años ha generado un acervo importante de información del cual se han identificado componentes genéticos, hormonales y vías de señalización como reguladores del crecimiento de la raíz [36, 75, 5, 67, 6, 81, 83, 52, 99]. Las mutaciones en alguno de estos componentes muchas veces dan fenotipos difíciles de explicar si no se contempla la acción coordinada entre componentes genéticos y no genéticos, los cuales forman redes de regulación complejas que actúan a diversas escalas temporales y espaciales [1, 2, 3]. Siendo que en general los estudios se han enfocado a estudiar los procesos que participan en la regulación del NCTR de *Arabidopsis* de manera independientemente, a la fecha no se sabe cómo es que estos procesos actúan colectivamente para dar lugar a la emergencia del patrón morfogenético de la raíz. Su estudio es importante para comenzar a comprender que alteraciones en los procesos interfieren con la organización del NCTR, y alteran su actividad y por ende la producción celular. Identificar dichas alteraciones, es importante para sugerir cómo es la regulación del patrón morfogenético de NCT en otros organismos multicelulares.

Para estudiar la acción concertada de estos elementos y cómo a partir de ellos emerge la organización de la raíz se necesita una herramienta computacional de simulación multiescala. La plataforma de simulación multiescala que proponemos en este trabajo modela explícitamente el espacio y permite estudiar simultáneamente las dinámicas del transporte de moléculas entre células y las dinámicas sub-celulares como las redes de regulación. Aunque el modelo presentado en este trabajo no incorporó el papel de los campos físicos mesoscópicos, esto también será posible en futuros desarrollos de este enfoque de simulación. Esta herramienta de simulación de procesos espacio-temporales del desarrollo de plantas nos permitirá generar modelos para poder postular predicciones verificables experimentalmente respecto de la emergencia de los patrones de concentración de hormonas, comportamientos celulares y de expresión genética a lo largo del ápice de la raíz de *Arabidopsis*.

Plataforma multiescala del desarrollo

Actualmente existen varias plataformas de simulación multiescala para describir distintos niveles de organización [46, 44, 45]. En este trabajo se propuso una extensión novedosa del formalismo de Modelos Celulares de Potts (CPM) que permite simular comportamientos celulares de plantas en términos de expansión y proliferación celular. De la función H que proponemos, se pueden interpretar fuerzas físicas como la presión celular y la deformación de la pared celular, los cuales son dos componentes con direcciones

opuestas que subyacen a la forma celular. En un modelo de la expansión y proliferación celular utilizando la función H recuperamos la dirección de las fuerzas físicas como se observa en las células de plantas. La presión celular es positiva (hacia el exterior) como lo es la presión de turgencia, y la deformación de la pared celular es negativa (hacia el interior). Además, en el modelo recuperamos cualitativamente la extensión plástica o reptar de la pared celular. La importancia de incluir las fuerzas físicas en un modelo del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, recae en la reciente evidencia de que puede regular la dirección del transporte de auxinas [12, 13], y la expresión genética [100]. A medida que se vaya describiendo con mayor detalle el papel de los campos físicos en el desarrollo de la raíz, será posible estudiarlos con un modelo dinámico utilizando la función H que proponemos. Además con la función H se pueden incorporar dinámicas continuas, discretas o híbridas de procesos a nivel celular y subcelular, como por ejemplo el transporte de moléculas y las redes de regulación. Por lo tanto, esta plataforma constituye una herramienta de modelación de gran alcance para modelar simultáneamente el crecimiento celular, redes de regulación y campos químicos y físicos, en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.

Anteriormente una extensión de CPM se utilizó para estudiar la proliferación celular en el ápice de la raíz [40]. Dicha extensión no incorporaba el papel de los campos físicos en el desarrollo de la raíz ni de las redes de regulación genética. Las ventajas de la función H que proponemos en este trabajo es la eficiencia computacional, la interpretación de fuerzas físicas, la formación de campos químicos y físicos, la incorporación de redes de regulación y la comunicación entre células. Todos los cuales son procesos cruciales para estudiar el desarrollo del NCTR de *Arabidopsis*. Evitar los desplazamientos celulares es importante en una plataforma de simulación del desarrollo en plantas debido a la pared celular y la consecuente ausencia de migraciones celulares. Una limitación de la función H que proponemos es que los desplazamientos celulares se desfavorecen, pero no se impiden. Por lo tanto, los resultados generados con esta plataforma deben ser interpretados teniéndolo en consideración. La función H se implementó en CompuCell3D (CC3D) que es un programa computacional que está disponible para distintos sistemas operativos. CC3D tiene una interfaz gráfica sencilla y constantemente se actualiza. Los desarrolladores de CC3D organizan talleres anuales lo cual permite discutir y obtener guía directamente de ellos.

Modelo del transporte de auxinas en la raíz

Utilizando CC3D implementamos un modelo del transporte de auxinas en el ápice de la raíz utilizando la función H. Para el modelo consideramos la actividad de las proteínas PIN que se encuentran localizadas polarmente en las membranas celulares. El modelo recupera la formación del gradiente de concentración de auxinas en el eje longitudinal de la raíz con un máximo de concentración en las células que corresponden al organizador del NCTR. Una herramienta de modelación que permite el estudio de la formación del gradiente es útil pues actualmente no es sencillo visualizar la concentración de auxinas con una resolución celular. La respuesta transcripcional a auxinas es la manera más utilizada para estudiar indirectamente el gradiente de concentración de auxinas en condiciones normales o frente a perturbaciones [71, 54, 72, 36]. Nuestro modelo multiescala nos permite estudiar de manera sencilla la distribución de auxinas, pudiendo predecir cuales serán los efectos en el patrón de concentración de auxinas bajo distintas perturbaciones. Es importante mencionar que los resultados presentados en este trabajo suponen que la polaridad de las proteínas PIN es

fija aún bajo los distintos tratamientos. Este puede no ser el caso, lo cual deberá revisarse y posiblemente incluirse en futuros modelos.

Si bien en trabajos previos se estudió la formación del gradiente de concentración de auxinas en la raíz de *Arabidopsis* con aproximaciones continuas [40, 41, 42, 43], en este trabajo utilizamos un modelo de reglas lógicas para estudiar la dinámica del transporte de auxinas. Nuestra aproximación recupera resultados cualitativamente similares a los publicados anteriormente [40], por lo tanto dicho nivel de detalle es suficiente para estudiar el transporte de auxinas en la raíz. Con este modelo del transporte de auxinas en la raíz exploramos condiciones iniciales y tratamientos que anteriormente no se habían estudiado en un modelo espacio-temporal. Estas simulaciones sugieren cual podría ser el efecto en el gradiente de concentración de auxinas en la raíz de *Arabidopsis* frente a distintas condiciones y tratamientos. En el modelo se identificó el sitio máximo de concentración de auxinas como un marcador de la posición del organizador del NCTR [37]. En la perturbación del transporte con NPA (**H**) los resultados sugieren que deben considerarse las proteínas de influjo de auxinas como AUX1 [57, 59]. El patrón de expresión y la polaridad de AUX1 en las células de la raíz de *Arabidopsis* podría explicar el patrón de respuesta a auxinas observado experimentalmente en tratamiento con NPA, el cual no logramos reproducir en la simulación **H**. Esta hipótesis se probará en futuros desarrollos del modelo presentado en este trabajo. Para comparar el resultado de nuestras simulaciones con la respuesta de la raíz de *Arabidopsis* ante las perturbaciones, utilizamos datos de la actividad del promotor sintético DR5 [54]. Los resultados de la simulaciones fueron comparados con estos datos teniendo en cuenta que la formación del gradiente de concentración de auxinas depende del transporte activo de auxinas, del metabolismo de auxinas [75, 37, 83, 99] y de la actividad de proteínas de influjo de auxinas [57, 59].

Modelo del transporte y la red de señalización de auxinas

El ápice de la raíz es un sitio activo de síntesis de auxinas [37, 83] y en este trabajo se presentó un modelo que considera el metabolismo de las auxinas. En colaboración con Eugenio Azpeitia se propuso un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias de la vía de señalización de auxinas. El modelo contempla para las auxinas una tasa de degradación basal, de síntesis basal y de síntesis promovida por *WOX5* [75, 83]. En el modelo, *WOX5* es representado por la variable *W5* que es promovida por las auxinas [67], estableciendo un asa de retroalimentación positiva. En el modelo *W5* tiene un comportamiento bistable respecto a la concentración de auxinas como se ha sugerido por distintos experimentos [67, 81]. Cuando la concentración de auxinas es menor a un valor umbral, *W5* no se expresa. Cuando la concentración de auxinas rebasa el valor umbral, entonces *W5* se expresa. Modelos previos habían estudiado la vía de señalización de auxinas [78, 77, 79], y nuestro modelo incorpora la regulación de la expresión de *WOX5*, el cual es un factor de transcripción clave en la organización del NCTR. Este modelo de la vía de señalización de auxinas se acopló con el modelo del transporte de auxinas en la raíz, constituyendo un modelo multiescala que considera la escala subcelular y la celular. El modelo multiescala recuperó la concentración más alta de la variable *W5* en las células de tipo *CQ* del modelo. Este resultado concuerda con lo que se ha reportado experimentalmente donde la expresión de *WOX5* se observa únicamente en el organizador del NCTR. La expresión de *WOX5* en el *CQ* es necesaria para mantener a las células iniciales distales en estado indiferenciado

[67, 81], y en nuestro modelo constituye un marcador de la posición del organizador del NCTR. Por lo tanto, utilizando una herramienta de simulación multiescala pudimos modelar el transporte activo de auxinas y la vía de señalización de auxinas para recuperar la posición del organizador del NCTR.

Utilizando el modelo multiescala simulamos dos perturbaciones, la inmersión de la raíz en solución con auxinas y el tratamiento con NPA. Se tiene evidencia de la respuesta de *WOX5* en la primera perturbación donde su expresión disminuye y se observa ectópicamente en las células iniciales de endodermis/córtex. En la simulación de dicha perturbación (K), *W5* tiene un alto valor en casi todas las células de la simulación y no exclusivamente en las células de tipo *CQ*. Por lo tanto, nuestro modelo no recupera la respuesta de *WOX5* en la inmersión de auxinas. Esto puede explicarse debido a que el modelo subcelular no considera reguladores importantes del NCTR como *SHR* y *SCR* [101, 29]. *SHR* y *SCR* regulan la expresión de *WOX5* y su actividad coincide en las células del *CQ* y de la endodermis. Además, nuestro modelo no considera que algunos componentes de la vía de señalización de auxinas no se expresan homogéneamente en la raíz [96, 76], alterando la sensibilidad de la respuesta a auxinas. Sin embargo, nuestro trabajo establece las bases para proponer un modelo multiescala del transporte hormonal y las redes de regulación subcelulares, para estudiar el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. Incluir aquellos componentes y sus interacciones más determinantes nos permitirá tener un modelo multiescala con mayor capacidad de predicción y que sea validable con datos experimentales. Tal como está establecida la plataforma, será posible incorporar una red de interacciones moleculares más completa.

Perspectivas

Entre los reguladores que sabemos que serán importantes en el modelo subcelular, están aquellos que son parte de la red de regulación genética (RRG) del NCTR [29, 30], las hormonas y sus vías de señalización [28]. Es interesante que entre estos componentes hay crosstalk o regulación cruzada, lo cual establece dinámicamente el límite entre la proliferación y la elongación celular en la raíz de *Arabidopsis* [52, 28, 27]. Además de las auxinas, hay hormonas como las citoquininas que son transportadas en la raíz y forman patrones de concentración [102]. Incluir en el modelo a los mecanismos que están detrás de la formación de los campos químicos hormonales es de gran importancia pues regulan a la proliferación y la diferenciación celular en la raíz de *Arabidopsis*. Un modelo multiescala de la regulación genético- hormonal nos permitirá analizar si las dinámicas acopladas del transporte hormonal, la proliferación celular y la diferenciación celular son suficientes para la formación de un campo físico mesoscópico que pueda ser incorporado subsecuentemente en el modelo como información posicional [13, 31]. Con un modelo multiescala del NCTR podremos estudiar como cambiando el valor de diferentes parámetros, se altera el patrón macroscópico de la raíz. Esta aproximación ayudará a entender el desarrollo de la raíz como la acción coordinada de muchos componentes a distintas escalas espaciales y temporales, y nos permitirá comprender los mecanismos que subyacen a la organización de la raíz y las alteraciones que dan lugar a fenotipos mutantes.

Conclusiones

La función H propuesta en este trabajo modela las fuerzas de presión de turgencia y la deformación de la pared celular para modelar crecimiento de células de plantas. Dicha función se utilizó para modelar a las células en el ápice de la raíz de *Arabidopsis* pero es aplicable a otros sistemas de estudio vegetales. El modelo del transporte de auxinas por la actividad de las proteínas PIN, recupera un gradiente de concentración de auxinas como el que se observa en la raíz de *Arabidopsis*. El modelo sugiere el efecto en el gradiente de concentración de auxinas ante distintas condiciones y tratamientos. La herramienta de simulación multiescala permitió proponer un modelo del transporte y la vía de señalización de auxinas que recupera la actividad de W5 en las células que representan al organizador del NCTR. Para tener un modelo certero del efecto de distintas condiciones y perturbaciones en el NCTR de *Arabidopsis* se requiere de un modelo subcelular mas completo que incluya a los componentes genéticos y hormonales más importantes.

Bibliografia

1. Grieneisen V, Scheres B (2009) Back to the future: evolution of computational models in plant morphogenesis. *Current opinion in plant biology* 12.
2. BandLR, FozardJA, GodinC, JensenOE, PridmoreT, et al. (2012) Multiscale systems analysis of root growth and development: modeling beyond the network and cellular scales. *The Plant Cell* 24.
3. De Vos D, Dzhurakhalov A, Draelants D, Bogaerts I, Kalve S, et al. (2012) Towards mechanistic models of plant growth. *Journal of experimental botany* 63.
4. Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, et al. (2005) The pin auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433.
5. Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai W, Xue HW, et al. (2005) Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17.
6. Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology* 19.
7. Morgan H, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature genetics* 23.
8. Richards EJ (2006) Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7.
9. Sultan SE (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science* 5.
10. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* 276.
11. Nelson CM, Jean RP, Tan JL, Liu WF, Sniadecki NJ, et al. (2005) Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *PNAS* 102.
12. Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uytewaal M, et al. (2008) Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science* 322.
13. Heisler MG, Hamant O, Krupinski P, Uytewaal M, Ohno C, et al. (2010) Alignment between pin1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS biology* 8.
14. Kierzkowski D, Nakayama N, Routier-Kierzkowska AL, Weber A, Bayer E, et al. (2012) Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science Signaling* 335.
15. Mammoto T, Mammoto A, Ingber DE (2013) Mechanobiology and developmental control. *Annual review of cell and developmental biology* 29.
16. Ingber DE (2007) Integrins, tensegrity and mechanotransduction. *Gravitational and Space Biology* 10.
17. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414.
18. Li L, Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and develop-*

mental biology 21.

19. Scheres B (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8.
20. Lander AD, Kimble J, Clevers H, Fuchs E, Montarras D, et al. (2012) What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC biology* 10.
21. Sablowski R (2004) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends in cell biology* 14.
22. Powell K (2005) Stem-cell niches: it's the ecology, stupid! *Nature* 435.
23. Doerner P (2003) Plant meristems: A merry-go-round of signals review. *Current Biology* 13.
24. Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, et al. (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119.
25. Scheres B, Benfey P, Dolan L (2002) Root development: The arabidopsis book. American Society of Plant Biologists .
26. Ivanov VB, Dubrovsky JG (2012) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in plant science* .
27. Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S (2012) Growth and development of the root apical meristem. *Current opinion in plant biology* 15.
28. Garay-Arroyo A, De La Paz Sánchez M, García-Ponce B, Azpeitia E, Álvarez-Buylla ER (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics* 241.
29. Azpeitia E, Benitez M, Vega I, Villarreal C, Álvarez-Buylla ER (2010) Single-cell and coupled GRN models of cell patterning in the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche. *BMC systems biology* 4.
30. Azpeitia E, Weinstein N, Benitez M, Mendoza L, Álvarez-Buylla ER (2013) Finding missing interactions of the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche gene regulatory network. *Frontiers in plant science* 4.
31. Barrio RA, Romero-Arias JR, Noguez MA, Azpeitia E, Ortiz-Gutiérrez E, et al. (2013) Cell patterns emerge from coupled chemical and physical fields with cell proliferation dynamics: the *Arabidopsis thaliana* root as a study system. *PLoS computational biology* 9.
32. Álvarez-Buylla ER, Benitez M, Davila EB, Chaos A, Espinosa-Soto C, et al. (2007) Gene regulatory network models for plant development. *Current opinion in plant biology* 10.
33. Turing AM (1952) The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* .
34. Teale WD, Paponov I, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7.
35. Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, et al. (2006) Pin proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312.
36. Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, et al. (1999) An auxin-dependent distal

organizer or pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99.

37. Petersson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk JY, Wang JY, et al. (2009) An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of iaa distribution and synthesis. *The Plant Cell* 21.
38. Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, et al. (2006) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 439.
39. Perrot-Rechenmann C (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2.
40. Grieneisen V, Xu J, Marée AF, Hogeweg P, Scheres B (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449.
41. Stoma S, Lucas M, Chopard J, Schaedel M, Traas J, et al. (2008) Flux-based transport enhancement as a plausible unifying mechanism for auxin transport in meristem development. *PLoS computational biology* 4.
42. Mironova VV, Omelyanchuk NA, Yashipon G, Fadeev SI, Kolchanov NA, et al. (2010) A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root. *BMC systems biology* 4.
43. Mironova VV, Omelyanchuk NA, Novoselova ES, Doroshkov AV, Kazantsev FV, et al. (2012) Combined in silico/ in vivo analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance. *Annals of botany* 110.
44. Dupuy L, Mackenzie J, Rudge T, Haseloff J (2008) A system for modelling cell-cell interactions during plant morphogenesis. *Annals of botany* 101.
45. Merks RM, Guravage M, Inzé D, Beemster GT (2011) Virtualleaf: an open-source framework for cell-based modeling for plant tissue growth and development. *Plant Physiology* 155.
46. Swat MH, Thomas GL, Belmonte JM, Shirinifard A, Hmeljak D, et al. (2012) Multi-scale modeling of tissues using *compuCell3d*. *Methods in cell biology* 110.
47. Graner F, Glazier JA (1992) Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Physical review letters* 69.
48. Glazier JA, Graner F (1993) Simulation of the differential adhesion driven arrangement of biological cells. *Physical review E* 47.
49. Izaguirre JA, Chaturvedi R, Huang C, Cickovski T, Coffland J, et al. (2004) *CompuCell*, a multi-model framework for simulation of morphogenesis. *Bioinformatics* 20.
50. Van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390.
51. Barlow PW, Grundwag M (1974) The development of amyloplasts in cells of the quiescent centre of Zea roots in response to removal of the root cap. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 73.
52. Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, et al. (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* 17.
53. Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136.

54. Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Aux/iaa proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* 9.
55. Rubery PH, Sheldrake AR (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118.
56. Goldsmith MHM, Goldsmith MH (1981) Mathematical analysis of the chemiosmotic polar diffusion of auxin through plant tissues. *PNAS* 78.
57. Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, et al. (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease aux1. *The Plant Cell* 16.
58. Kramer EM, Bennett MJ (2006) Auxin transport: a field in flux. *Trends in plant science* 11.
59. Swarup R, Péret B (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers- an overview. *Frontiers in plant science* 3.
60. Leyser O (2005) Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of pin? *Cell* 12.
61. Geisler M, Murphy AS (2006) The abc of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS letters* 580.
62. Müller A, Guan C, Galweiler L, Tanizler P, Huijser P, et al. (1998) Atpin2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *The EMBO Journal* 17.
63. Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, et al. (2002) Atpin4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* 108.
64. Friml J (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator pin3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415.
65. Laskowski M, Grieneisen V, Hofhuis H, Colette A, Hogeweg P, et al. (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS biology* 6.
66. Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, et al. (2005) Functional redundancy of pin proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of pin expression. *Development* 132.
67. Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, et al. (2007) Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446.
68. Gallinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, et al. (2007) Plethora proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449.
69. Dharmasiri S, Estelle M (2002) The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Molecular Biology* 49.
70. Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001) Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414.
71. Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Arf1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276.
72. Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T (1999) Activation and repression of transcription by auxin-

- response factor. PNAS 96.
73. Woodward AW, Bartel B (2005) A receptor for auxin. *The Plant Cell* 17.
 74. Benjamins R, Scheres B (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59.
 75. Gonzali S, Novi G, Loreti E, Paolicchi F, Poggi A, et al. (2005) A turanose-insensitive mutant suggests a role for *wox5* in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 44.
 76. Villalobos LIAC, Lee S, Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, et al. (2012) A combinatorial *tir1/afb-aux/iaa* co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature chemical biology* 8.
 77. Middleton AM, King JR, Bennett MJ, Owen MR (2010) Mathematical modelling of the *aux/iaa* negative feedback loop. *Bulletin of mathematical biology* 72.
 78. Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, et al. (2011) The auxin signalling network translates dynamic output into robust patterning at the shoot apex. *Molecular systems biology* 7.
 79. Havens KA, Guseman JM, Jang SS, Pierre-Jerome E, Bolten N, et al. (160) A synthetic approach reveals extensive tunability of auxin signaling. *Plant Physiology* 1.
 80. Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, et al. (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119.
 81. Ding Z, Friml J (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. PNAS 107.
 82. Haecker A, Gros-Hardt R, Geiges B, Sarkar AK, Breuninger H, et al. (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131.
 83. Tian H, Wabnik K, Niu T, Li H, Yu Q, et al. (2013) *Wox5-iaa17* feedback circuit mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Molecular plant* .
 84. Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6.
 85. Cleland RE (2010) Auxin and cell elongation- plant hormones. Springer Netherlands .
 86. Mirabet V, Das P, Bouchard R, Hamant O (2011) The role of mechanical forces in plant morphogenesis. *Annual Review of Plant Biology* 62.
 87. Shopfer P (2006) Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany* 93.
 88. Lockhart JA (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of theoretical biology* 8.
 89. Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, Steinberg MS (1996) Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* 122.
 90. Turner S, Sherratt JA (2002) Intercellular adhesion and cancer invasion: a discrete simulation using the extended Potts model. *Journal of theoretical biology* 216.
 91. Marée AF, Hogeweg P (2001) How amoeboids self-organize into a fruiting body: multicellular

coordination in *Dyctiostelium discoideum*. PNAS 98: 3879-3883.

92. Käfer J, Hayashi T, Marée AF, Carthew RW, Graner F (2007) Cell adhesion and cortex contractility determine cell patterning in the *Drosophila* retina. PNAS 104.
93. Szabo A, Merks RM (2013) Cellular potts modelling of tumor growth, tumor invasion, and tumor evolution. *Frontiers in Oncology* 3.
94. Hester SD, Belmonte JM, Gens JS, Clendenon SG, Glazier JA (2012) A multi-cell, multi-scale model of vertebrate segmentation and somite formation. *PLoS computational Biology* 7.
95. Swat MH, Belmonte JM, Heiland RW, Zaitlen BL, Glazier JA (2012) *CompuCell3d* reference manual version 3.6.2. Biocomplexity Institute and Department of Physics .
96. Rademacher EH, Möller B, Lokerse AS, Llavata-Peris CI, Van den Berg W, et al. (2011) A cellular expression map of the *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *The Plant Journal* 68.
97. Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, et al. (2003) The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics* 19.
98. Cruz-Ramírez A, Díaz-Treviño S, Blilou I, Grieneisen V, Sozzani R, et al. (2012) A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* .
99. Moubayidin L, Di Mambro R, Sozzani R, Pacifici E, Salvi E, et al. (2013) Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Developmental cell* 26.
100. Mammoto A, Mammoto T, Ingber DE (2012) Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *Journal of cell science* 125.
101. Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes and development* 17.
102. Muraro D, Wilson M, Bennett MJ (2011) Root development: Cytokinin transport matters too! *Current Biology* 21.