



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis comparativo de los modelos de red
booleana de la regulación del ciclo celular en
eucariontes

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

PRESENTA:

Aarón Castillo Jiménez

TUTORA

Dra María Elena Álvarez Buylla Roces



México D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno.

Castillo

Jiménez

Aarón

62 37 11 92

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306078114

2. Datos del asesor.

Dra.

María Elena

Álvarez-Buylla

Roces

3. Datos de sinodal 1

Dra.

María de la Paz

Jiménez

Sánchez

4. Datos de sinodal 2

Dr.

León Patricio

Martínez

Castilla

5. Datos Sinodal 3

Dr.

Luis Antonio

Mendoza

Sierra

6. Datos Sinodal 4

Dra.

Mariana

Benítez

Keinrad

7. Datos del trabajo escrito

Análisis comparativo de los modelos de red booleana de la regulación del ciclo celular en eucariontes

177 p

2015

Índice

	Página
Resumen	1
Parte I Antecedentes	2
Capítulo 1: Los modelos de red como herramientas para entender procesos moleculares y celulares	3
1.1 Las redes como herramientas para la descripción de los procesos biológicos a nivel celular.....	4
1.2 Redes: aproximaciones y sus fundamentos.....	10
1.2.1 Modelos de redes continuos y discretos.....	11
1.2.2 Modelos de redes determinísticos y estocásticos.....	13
1.2.3 Complejidad de los modelos contra complejidad de los sistemas de estudio: de lo cualitativo a lo cuantitativo.....	14
1.3 Redes booleanas.....	15
1.4 Construcción de un modelo de red booleana.....	21
Capítulo 2: El ciclo celular en eucariontes	26
2.1 El ciclo celular en eucariontes: mecanismos y componentes generales.....	27
2.1.1 Mecanismos de control del ciclo celular en eucariontes.....	30
2.2 Ciclo celular en eucariontes unicelulares.....	38
2.3 Ciclo celular en animales: el caso particular de los mamíferos.....	44
2.4 La regulación del ciclo celular en plantas: <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo.....	49
2.5 El ciclo celular eucarionte: comparaciones y restricciones.....	53

<i>Parte II Hipótesis, objetivos y métodos</i>	56
Capítulo 3: Modelos de red de la regulación del ciclo celular en eucariontes	58
3.1 Modelos de red de la regulación del ciclo celular en eucariontes.....	59
3.2 El modelo de red del ciclo celular en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	61
3.2.1 Derivación de las tablas de verdad y las reglas lógicas correspondientes al modelo de Davidich y Bornholdt.....	67
3.2.2 Resultados de la construcción de las tablas de verdad y la dinámica descrita por ellas.....	68
3.2.3 El modelo modificado de la regulación del ciclo celular en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	71
3.2.3.1 Resultados.....	74
3.3 El modelo de red del ciclo celular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
3.3.1 Una propuesta de modelo de red booleana de la regulación del ciclo celular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
3.3.1.1 Resultados.....	83
3.4 El modelo de red de regulación del ciclo celular genérico en mamíferos.....	84
3.4.1 Propuesta de red de regulación del ciclo celular genérico en mamíferos.....	89
3.5 Una propuesta de red de regulación del ciclo celular en <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
Capítulo 4: Análisis estructural de los modelos de red estudiados	102
4.1 Principios de organización en las redes de regulación biológica.....	103
4.2 Características locales de la arquitectura de redes de regulación biológica: Motivos de red.....	107

4.3 El paradigma estructura-función de redes.....	109
4.4 Análisis motivo-estructural de los modelos de red de regulación del ciclo celular en eucariontes.....	114
4.4.1 Resultados.....	118
<i>Parte III Análisis de resultados y conclusiones</i>	140
Capítulo 5: Discusión y perspectivas sobre los modelos de red de la regulación del ciclo celular	141
5.1 Discusión y perspectivas sobre los modelos de red booleana como herramientas para entender diferentes procesos biológicos.....	142
5.2 Análisis, discusión y perspectivas sobre el comportamiento dinámico de las redes de regulación del ciclo celular en eucariontes.....	144
5.3 Discusión y perspectivas sobre las propiedades estructurales de las redes de regulación del ciclo celular en eucariontes.....	152
5.4 Conclusiones generales y perspectivas futuras en torno a las redes de control del ciclo celular en eucariontes.....	161
Referencias bibliográficas.....	166
Apéndices.....	176

Resumen

En el presente trabajo se analizan tres modelos booleanos de la regulación del ciclo celular: *Schizosaccharomyces pombe* (Davidich y Bornholdt, 2008) y *Saccharomyces cerevisiae* (Li *et al*, 2004; Irons, 2009; Fauré *et al*, 2009) y mamíferos (Fauré *et al*, 2006); se propone además una red de regulación del ciclo celular en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Para comparar los modelos se derivaron y verificaron las reglas lógicas que determinan el estado de cada uno de los elementos de la red en cada modelo, en particular se discute el caso de *S. pombe* cuya dinámica booleana basa su formalismo en la uso de funciones umbral de tipo booleano, por lo que este trabajo aporta las reglas lógicas para analizar su comportamiento. Por otro lado, se hizo un análisis estructural de motivos de dos y tres nodos al interior de las redes de control en *A. thaliana*, *S. pombe* y mamíferos, y se compararon con motivos analizados previamente en la literatura cuyo comportamiento dinámico ha sido relacionado con el surgimiento de oscilaciones sostenidas, discutiéndose además su pertinencia en el cotexto de toda la red. Finalmente se discuten tanto el comportamiento dinámico como estructural en el contexto de la regulación del ciclo celular y algunas aproximaciones futuras para explorar sus diferentes escalas de regulación.

Parte I

Antecedentes

En los capítulos 1 y 2 se presentan los antecedentes que dan sustento a este trabajo de tesis, en particular, se presentan los fundamentos de las redes booleanas y su uso para la modelación de diferentes procesos biológicos en la escala celular. Se presentan los diferentes formalismos para modelar redes regulatorias y se presentan los pasos para la construcción y análisis de modelos de red booleana.

Por otro lado en el capítulo 2 se presentan las características del ciclo celular como proceso fundamental de las células eucariontes, se presenta la maquinaria molecular que determinan y controlan las diferentes fases del ciclo y se presenta de forma comparativa, las particularidades en los mecanismos y escalas de regulación del ciclo celular en las levaduras *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, generales en mamíferos y en la planta *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo 1

Los modelos de red como herramientas para entender procesos moleculares y celulares.

En esta sección se describen los fundamentos del uso de modelos matemáticos para entender procesos celulares y moleculares. Se contextualizan los modelos de red como una herramienta poderosa pero ciertamente restringida, sus diversas aproximaciones, los fundamentos de los modelos redes y en particular los modelos de redes booleanas en el contexto de una biología integrativa de los procesos en la escala celular. Finalmente se describen los pasos de construcción de un modelo de red booleana haciendo énfasis en las fases críticas de delimitación del proceso de interés biológico.

“Evolution is like a dance – it's not going anywhere, it's simply exploring a space of possibilities”

Brian Goodwin

1.1 Las redes como herramientas para la descripción de los procesos biológicos a nivel celular

Durante la última década, y gracias a los enfoques de la genética molecular, la biología molecular, la genómica funcional y la bioinformática, se han identificado, caracterizado y ordenado componentes moleculares de diversos procesos celulares que interactúan entre sí en forma de redes regulatorias. En principio el enfoque de reducir el estudio de los sistemas biológicos a elementos aislados que forman parte de tales redes ha sido no sólo exitoso sino necesario en la dilucidación de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes, así como de sus consecuencias a nivel organismo; sin embargo queda claro que este enfoque reduccionista y mecanicista ha llegado a su máxima capacidad explicativa (Bornholdt, 2005) puesto que muchas funciones biológicas emergen como resultado de múltiples interacciones a múltiples escalas de forma no aditiva.

En ese sentido, es cada vez más clara la necesidad de utilizar enfoques integrativos en los que la acción concertada de múltiples componentes de algún proceso biológico se analicen para entender su comportamiento colectivo, en particular las propiedades emergentes derivadas de su interacción (Breitling R, 2010). Dentro de estas aproximaciones, la llamada Biología de Sistemas ha sido el enfoque de investigación que más auge ha tenido gracias a las estrategias de experimentación masiva y su complementación con herramientas matemáticas y computacionales para explorar los aspectos dinámicos de los procesos biológicos (Kitano, 2002).

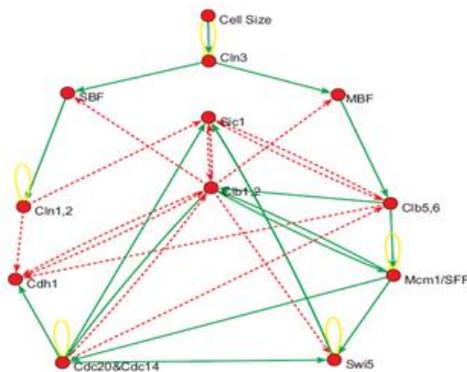


Fig. 1 Ejemplo de una red de regulación.

Diagrama de la red de regulación del ciclo celular en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los nodos representan proteínas y las distintas flechas las diferentes interacciones físicas entre ellas. (Tomado de Li et al, 2004)

Así, son tres los objetivos que el enfoque integrativo de la biología de sistemas pretende abordar (Breitling R, 2010): Explicar por *Simplicidad* mediante la identificación de principios básicos de organización a diferentes escalas de los procesos biológicos, así conceptos como robustez, modularidad

o evolucionabilidad pretenden describir rutas generales de organización biológica; Explicar la *Diversidad funcional de los sistemas biológicos* mediante la descripción detallada de las interacciones en las diversas escalas de organización biológica desde una perspectiva evolutiva, así las representaciones mediante redes adquieren un sentido natural del detalle organizativo de los sistemas biológicos; y finalmente entender la *Complejidad* puesto que los sistemas biológicos son ante todo sistemas donde la interacción de múltiples componentes describen comportamientos emergentes que no pueden ser entendidos mediante el estudio aislado de los mismos (Bruggerman et al, 2002; Powell y Drupe, 2009).

La idea detrás del enfoque de la Biología de Sistemas es pasar de una descripción estática de los sistemas biológicos a una visión dinámica e integrativa. Por tanto, parece cierto que una de las representaciones más adecuadas de los procesos biológicos entendiendo estos como sistemas complejos es el de las redes (Barabasi y Oliva, 2004). El término red es una descripción general para un conjunto de elementos conectados entre sí mediante interacciones específicas. Un ejemplo claro es una red de interacción de proteínas como las que se describen en este trabajo donde los elementos son las proteínas y las interacciones bioquímicas entre ellas las conexiones (Véase Fig. 1).

De manera formal, una red es un objeto matemático denominado grafo $G=(V, E)$, que consiste de un conjunto de vértices, nodos o puntos V y un conjunto de aristas E que une esos nodos. Las gráficas pueden ser no dirigidas si las aristas o conexiones entre los nodos no tienen dirección alguna, dirigidas si existe un nodo de partida o nodo fuente y un nodo de destino o nodo blanco, o mixtas si existen nodos con conexiones dirigidas y no dirigidas (Véase Fig. 2); en términos generales las redes dirigidas indican interacciones específicas entre nodos lo que biológicamente se traduce en procesos específicos entre los elementos de la red (Junker y Schreiber, 2008). Por ahora la idea central es que las redes y en particular las redes dirigidas, son modelos naturales para representar los procesos moleculares del funcionamiento celular, de las redes se profundizará más sus fundamentos y aproximaciones en la siguiente sección.

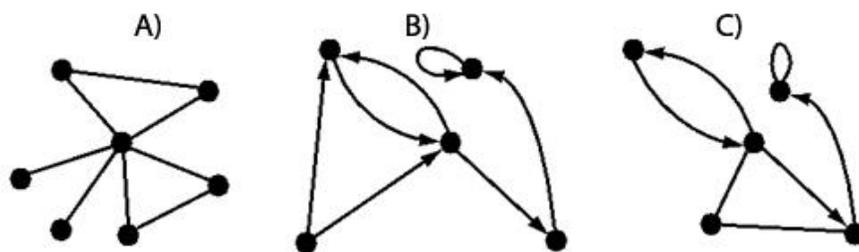


Fig. 2 Diagrama general de un grafo. Se observa la representación general de tres grafos: A) Un grafo $G=(7, 8)$ no dirigido, B) Un grafo $G=(5, 7)$ dirigido donde el nodo de partida es aquel de donde surge la flecha y C) Un grafo $G=(5, 7)$ mixto. (Tomado y modificado de Junker y Schreiber, 2008)

Las primeras aproximaciones de modelos de redes biológicas fueron propuestas en la década de los 60 y 70 con los trabajos pioneros de Stuart Kauffman (Kauffman, 1969) y René Thomas (Thomas R., 1973) para la descripción de la regulación génica. El primero estableciendo aproximaciones teóricas mediante redes de estado binario (Booleanas) aleatorias para entender los procesos de regulación genética derivando posibles rutas dinámicas de comportamiento, el segundo generalizando modelos discretos de redes biológicas basándose en la lógica del circuito regulatorio. Aun cuando ambos enfoques mostraron ser poderosas herramientas para aproximar el comportamiento de la regulación molecular, la limitada disponibilidad de datos no permitió extrapolar tales resultados a sistemas biológicos reales.

Sin embargo, sólo recientemente y gracias a la información derivada de los grandes proyectos de secuenciación de genomas como de las estrategias de experimentación masiva es que este enfoque ha adquirido importancia central. Así en las redes de regulación en la escala celular, los genes, mRNA, proteínas o pasos de rutas metabólicas son representados mediante nodos y las interacciones moleculares entre ellos mediante flechas, permitiendo generar hipótesis sobre la organización de las redes y su posterior comprobación experimental (Bruggeman y Westerhoff, 2007). En ese sentido, se distinguen de forma general dos enfoques para la construcción de modelos de redes regulatorias de los procesos celulares y moleculares: el enfoque “top-down” y el enfoque “bottom-up” (Véase Fig. 3).

El enfoque “top-down” comienza con datos generados por métodos de experimentación masiva, analiza estos datos usando aproximaciones de redes de diferente tipo y grados de detalle para describir mecanismos moleculares y patrones funcionales de comportamiento. Típicamente los datos analizados se obtienen de estrategias tan variadas como genómica, transcriptómica, experimentos de microarreglos, metabolómica o análisis de flujo, que en general son capaces de medir muchas variables en similares condiciones experimentales. Así esta aproximación trata más de inducir redes regulatorias de muchos datos del sistema, por tanto el enfoque “top-down” permite extraer información de los datos más que deducirla de conocimiento preexistente que en general es más detallado y puntual.

En ese sentido el enfoque “top-down” puede ser entendido como aproximación que va desde los datos masivos al análisis computacional de estos para inferir relaciones funcionales y estructurales entre los elementos de los que no existe información previa (Bansal et al, 2007). Así el proceso inicia con la colección de datos experimentales seguido de su análisis e integración para determinar correlaciones entre grupos de moléculas, finalizando con la formulación de hipótesis concernientes a la co- e interregulación de esos grupos de moléculas en condiciones experimentales muy amplias (Bruggeman y Westerhoff, 2007).

Entre los métodos utilizados para establecer patrones de correlación se encuentran los algoritmos de agrupamiento cuyo objetivo es la formación de grupos de moléculas con comportamiento similar; así moléculas altamente relacionadas pueden estar correguladas si responden de forma similar en condiciones experimentales iguales, lo que en principio podría indicar una alta probabilidad de estar funcionalmente relacionadas (Bonneau et al, 2006), sin embargo aun cuando exista relación funcional podría no existir relación causal entre moléculas del mismo grupo (Albert, 2007).

Otro método de inferencia de redes regulatorias lo constituyen los métodos Bayesianos. En general en los métodos Bayesianos se comienza con una distribución de probabilidad para tratar de describir la relación entre grupos de moléculas, determinándose de forma heurística una red de interacción, posteriormente se determina un valor para evaluar la red inferida contra los datos experimentales buscándose la topología de la red cuyo valor es el más alto, indicando así una mayor concordancia entre los datos y las relaciones causales inferidas (Szederkényi et al, 2011; Albert, 2007). Sin embargo la limitante fundamental de este método reside en que en general en los experimentos masivos el número de variables es mucho más grande que el número de observaciones, lo que podría determinar valores de concordancia muy bajos, además las gráficas descritas por este método no permiten identificar asas de retroalimentación lo que delimita la estructura de la red inferida como las relaciones funcionales entre los elementos, aun así esta metodología ha sido aplicada exitosamente por ejemplo, al inferir la red de regulación que describe la determinación de la identidad celular de las células embrionarias durante las primeras etapas de desarrollo en *Drosophila* (Wolf et al, 2005).

Por otro lado, el enfoque “bottom-up” parte de la información detallada derivada de experimentos a pequeña escala del sistema, así el conjunto de datos es bastante homogéneo, pequeño y notablemente cuantitativo, por lo que la construcción de redes regulatorias es más directa en la medida que la información describe con un mayor detalle las relaciones funcionales entre moléculas que pertenecen a la red; por tanto la experimentación es realizada con base en la construcción de estos modelos de red regulatoria tanto para validar y probar el modelo como para investigar hipótesis inspiradas en su análisis (Bruggeman et al, 2007). Así los modelos de red en el enfoque “bottom-up” describen en general pequeños módulos, entendiendo un módulo como un conjunto de elementos (genes, proteínas, metabolitos, etc.) corregulados que responden a diferentes condiciones y organizándose como unidades funcionales (Sauro, 2008), de tal forma que es posible entender las propiedades sistémicas que emergen de tales módulos dentro del sistema completo bajo estudio. Por tanto la inferencia de redes regulatorias basadas en este tipo de enfoque es muy certera, sin embargo en general las redes inferidas (módulos) son

relativamente pequeñas (Albert, 2007).

Por lo anterior, el enfoque “top-down” es una interesante aproximación para la determinación de la estructura de la red regulatoria y la identificación de posibles interacciones entre elementos hasta ahora no caracterizados. Mientras que el enfoque “bottom-up” permite la construcción a partir de datos existentes con un mayor nivel de detalle y prosigue con el análisis de sus consecuencias a nivel sistema (Westerhoff y Palsson, 2004). Además, mientras el enfoque “top-down” puede ser entendido como una aproximación inductiva de las redes regulatorias, el enfoque “bottom-up” es una aproximación que pretende deducir las propiedades funcionales que emergen de la caracterización de módulos a un nivel mecanístico profundo (Bruggeman y Westerhoff, 2007).

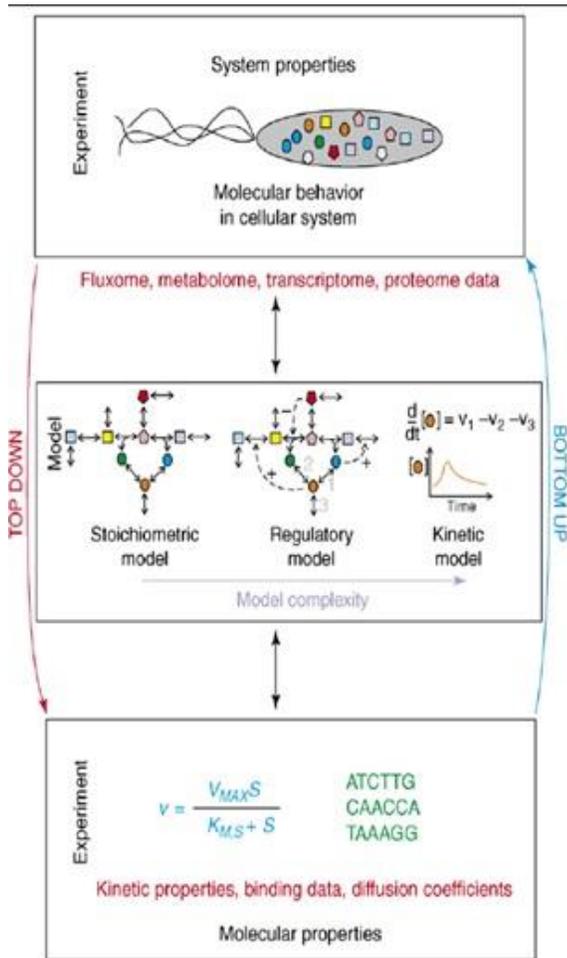


Figura 3 Representación de las aproximaciones “top-down” y “bottom-up” en Biología de Sistemas.

A nivel celular, las propiedades moleculares derivadas de experimentos masivos o a pequeña escala son la base para la construcción de modelos de red, se ejemplifican tres modelos usados para modelar redes en ambos enfoques: modelos estequiométricos, modelos regulatorios (como los analizados en este trabajo) y modelos cinéticos. El enfoque bottom-up comienza con información detallada de las propiedades moleculares del sistema para la construcción de modelos de red regulatoria que describan su comportamiento emergente así como su validación experimental posterior. En contraste el enfoque top-down comienza con datos experimentales de experimentos masivos y trata de describir de ellos redes regulatorias hasta entonces no caracterizadas. En ambos casos los modelos pueden abarcar desde una simple red de regulación que da cuenta de la estequiometría de los componentes hasta modelos cinéticos detallados de su comportamiento (Tomado y modificado de: Bruggeman y Westerhoff, 2007)

Una consecuencia inmediata del enfoque “bottom-up” es que la topología de la red construida queda resuelta directamente y con las relaciones funcionales entre los elementos perfectamente delimitadas, tales relaciones pueden abarcar desde una regulación puramente cualitativa (activación e inhibición entre elementos) hasta descripciones estequiométricas y cinéticas que detallan

los procesos moleculares entre los nodos. Por tanto, una vez establecida la red, es posible evaluar su comportamiento dinámico, por lo que no es fortuito que este enfoque se haya privilegiado en la construcción de modelos redes regulatorias. Algunos ejemplos son la red que describen la determinación temprana de los órganos florales (Mendoza y Álvarez-Buylla, 1998; Mendoza et al, 1999; Espinosa-Soto et al, 2004; Chaos et al, 2006; Sánchez-Corrales et al, 2010) y la organización espacial de los tricomas de la raíz y tallo (Benítez et al, 2008) en *Arabidopsis thaliana*; la red de transducción de señales que controla la apertura de los estomas (Li et al, 2006) o la red que describe la diferenciación de los linfocitos T (Mendoza y Pardo, 2010). De particular interés para esta tesis son las redes de regulación que controlan en ciclo celular en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Davidich y Bornholdt, 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Li et al, 2004; Irons, 2009; Fauré et al, 2009) y mamíferos (Fauré et al, 2006), por lo que en este trabajo se abordara con detalle este enfoque.

Los modelos de red de regulación pueden ser aplicados para entender diferentes procesos en la escala celular bajo diferentes contextos. Sin embargo, uno de los problemas que inicialmente fueron abordados bajo la perspectiva de la biología de sistemas mediante la integración de modelos y datos experimentales fue el ciclo celular. Particularmente tres aspectos parecen ser determinantes en la complejidad del ciclo celular: la existencia de un número grande de proteínas regulatorias, una notable cantidad de interacciones entre proteínas, y finalmente, que tales interacciones se dan en diversas formas: estimulando, inhibiendo o modulando (Fuß et al, 2005). Por tanto, se ha sugerido que una perspectiva integrativa de estudio del ciclo celular debe tener dos objetivos fundamentales: proveer explicaciones cualitativas y cuantitativas de su regulación, y por otro lado, ser predictivo y capaz de extrapolarse a más de un contexto funcional o experimental (Ferrell et al, 2011).

De esta forma, considerando las dos suposiciones anteriores, en el presente trabajo se aborda el análisis del ciclo celular desde la perspectiva de los modelos de red regulatoria en la escala celular y molecular, para ello, sin embargo es necesario delimitar algunas particularidades de las redes. Por un lado las aproximaciones para modelar redes regulatorias y los fundamentos que dan sentido a su establecimiento, y por otro, las particularidades del ciclo celular que hacen imperante entender de forma integrativa su regulación. De la primera cuestión se hablará en las siguientes secciones de este capítulo mientras que del segundo aspecto se hablará de forma detallada a lo largo del Capítulo 2.

1.2 Redes: aproximaciones y sus fundamentos

En la sección anterior se describió como los modelos de red son herramientas adecuadas para entender los procesos biológicos en la escala celular entendiendo estos como sistemas complejos difícilmente abordables mediante el estudio aislado de sus componentes, y particularmente, se estableció como es que diferentes enfoques pueden usarse para abordar su construcción, sin embargo ahora es necesario hacer notar las diferentes aproximaciones para modelar redes.

En primer lugar, la diferencia notable al momento de establecer modelos de red de los procesos celulares es diferenciar entre los modelos dinámicos y los modelos estáticos o esquemáticos. Los modelos estáticos son representaciones en las que las variables, es decir el estado de los nodos, no cambian en el tiempo, de manera que corresponden a esquemas de representación invariantes (Ellner, 2011). Por otro lado los modelos dinámicos evolucionan en el tiempo y las variables tienen respuestas a estímulos internos o externos, determinando conjuntos de respuestas o series temporales del sistema (Wang et al, 2012).

Precisamente, el primer paso en el establecimiento de un modelo de red dinámico implica ensamblar los componentes que forman parte de la red y las interacciones que se definen entre ellos; el siguiente paso es complementar tales interacciones con información o hipótesis acerca de su naturaleza dinámica puesto que mientras más información haya acerca de ellas mejor es la caracterización del sistema. En tal caso los patrones de expresión/represión de genes o la activación/inactivación proteica resultan de la combinatoria del número de nodos como de sus interacciones (Albert R, 2004). Justamente, información como las tasas de reacción, series de tiempo sobre expresión, funciones lógicas o relaciones estequiométricas determinan el estado de cada uno de los nodos en el tiempo. Finalmente se deben considerar algunas condiciones o estados iniciales de las variables (nodos) y evaluar la evolución del sistema en el tiempo o bien considerar todas las condiciones posibles y evaluar el comportamiento futuro del sistema explorando todo el espacio de estados (Albert R, 2005).

Por tanto los modelos dinámicos de redes deben no sólo incorporar el conocimiento existente sobre el proceso biológico de interés, sino ser capaz de simularse con el fin de obtener predicciones cualitativas o cuantitativas del comportamiento dinámico del sistema que describe (Albert *et al*, 2008; Wang et al, 2012).

Así diferentes formalismos han sido implementados para modelar la dinámica de redes regulatorias haciendo hincapié en diferentes niveles de información, complejidad y tratamiento

computacional del problema de estudio (Bornholdt, 2005). Particularmente podemos distinguir dos aproximaciones a los modelos dinámicos de redes: continuos y discretos. A su vez ambos pueden aproximarse mediante un enfoque determinístico o estocástico. En cada caso la disponibilidad de los datos y el grado de detalle de la descripción varía, por lo que se discutirán sus alcances y limitaciones.

1.2.1 Modelos de redes continuos y discretos

Los modelos de red continuos (o modelos cinéticos) como los basados en Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO) o Ecuaciones Diferenciales Parciales (EDP) son una aproximación usada para modelar la evolución continua en el tiempo o el espacio, de las moléculas a nivel celular en una red regulatoria basándose en el conocimiento profundo de la cinética bioquímica que regula el estado de cada nodo (Tyson et al, 2003; Jong H, 2002). Estos modelos usan parámetros tales como tasas de reacción, degradación o unión, constantes de difusión de moléculas, etc., así como un conjunto de condiciones iniciales y en la frontera para simular el comportamiento cinético del sistema.

Usualmente los modelos basados en EDO se componen de sistemas de EDO con funciones de tipo no lineal descritas por las Leyes de Acción de Masas, Michaelis-Menten o Golbeter-Koshland o funciones como la de Hill (Fuß et al, 2005; Fall et al, 2002; Qu et al, 2003), para las que es difícil encontrar una solución analítica por lo que en principio los métodos numéricos y las aproximaciones cualitativas son las herramientas usadas para estudiar modelos basados en EDO no lineales (Jong H, 2002).

Un aspecto interesante de los modelos continuos es que con ellos es posible predecir el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones cambiando el valor de los parámetros necesarios o las condiciones iniciales durante su simulación computacional. Para explorar la dependencia entre el comportamiento del sistema y el valor de los parámetros es necesario aplicar algunas técnicas particulares, entre ellas, el análisis de bifurcación del sistema. En él se determina como la dinámica del sistema cambia en función de los parámetros del modelo, en particular para caracterizar el tipo de soluciones que se pueden esperar para el sistema de EDO (Tyson et al, 2003; Kaplan y Glass, 1995). De ellas las soluciones recurrentes son destacables: por un lado los estados estacionarios donde las concentraciones no cambian en el tiempo, y por otro las soluciones periódicas donde las variables transitan por una secuencia de estados de concentración en un periodo de tiempo definido.



Figura 4 Aproximación al estudio de redes regulatorias. Diferentes técnicas de modelación han sido descritas y categorizadas en función de su complejidad (complejidad del modelo) y la complejidad del sistema que pretenden representar. La complejidad del sistema impide abordar con modelos difíciles de construir por lo que los métodos cualitativos son buenas aproximaciones iniciales, los métodos cuantitativos requieren una mayor cantidad de datos y tienen una mayor complejidad computacional (Modificado de: Kahlem y Birney, 2006)

Teniendo en consideración lo anterior, los modelos de redes continuos son aproximaciones poderosas para el estudio del comportamiento dinámico de diferentes procesos a escala celular. Particularmente los modelos basados en ODE han mostrado ser excelentes herramientas en muchos contextos biológicos: modelación de la red de regulación de los operones Lac (Carrer y Keasling, 1999) y de triptófano en *E. coli* (Koh et al 1998), la salida de mitosis en los huevos de *Xenopus laevis* (Koh et al 1998). Justamente, y de particular relevancia para este trabajo, los modelos de la regulación del ciclo celular en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al, 2000; Chen et al, 2004) y *Schizosaccharomyces pombe* (Novak et al, 2001), así como el modelo genérico del ciclo celular en mamíferos (Novak y Tyson 2004), mismos que se revisan el Capítulo 3 de este trabajo.

Por otro lado, los modelos de red en estado discreto consideran que los nodos evolucionan en pasos discretos de tiempo. En el caso más simple, el estado de un nodo existe solo en un conjunto finito de valores, siendo los modelos de red binaria el caso más sencillo. En un modelo binario o Booleano, el estado de un nodo en una red de regulación sólo puede adquirir un estado activo o inactivo representado por los números 1 y 0 respectivamente (Albert R, 2005). En general, en los modelos discretos la actividad de la red en un momento de tiempo definido es denominada el estado de la red y usualmente es representado como un vector de valores por unidad de tiempo.

Como en el caso de las redes en estado continuo, el comportamiento de las redes en estado discreto puede ser de dos tipos, por un lado el estado de la red puede llegar a un estado único a lo largo del tiempo formando un denominado atractor puntual, o bien el sistema puede permanecer en un ciclo compuesto

por un conjunto de estados formando un atractor dinámico o cíclico (Albert R, 2007).

Los modelos discretos en general necesitan de un menor número de parámetros para describir el comportamiento dinámico de una red regulatoria, y particularmente, los modelos booleanos parten sólo del conocimiento cualitativo de las interacciones entre los elementos de la red (activación/inhibición o presencia/ausencia), lo que facilita su implementación en sistemas donde los datos disponibles son limitados (Karlebach y Shamir, 2008). Algunos de los formalismos más usuales en este tipo de aproximación son las ecuaciones en diferencias, las redes Petri y las redes booleanas (Schlitt y Brazma, 2007; Albert R. 2005), siendo estas últimas el formalismo más sencillo pero no menos poderoso para describir el comportamiento dinámico de redes regulatorias, de ellas se hablara con más detalle en la sección 1.3.

1.2.2 Modelos de redes determinísticos y estocásticos

La segunda aproximación para establecer modelos de redes regulatorias es diferenciar entre modelos deterministas y modelos estocásticos. Los modelos deterministas son aquellos en los que cada variable, parámetro o conjunto de ecuaciones que definen el estado del sistema queda perfectamente determinado por un conjunto limitado de condiciones. Así en una red de regulación determinista, las funciones lógicas, ecuaciones o parámetros están perfectamente definidos y son invariantes en el tiempo por lo que el estado futuro de la red dependen de su estado pasado de forma iterativa (Shmulevich y Aitchison, 2009).

Por otro lado en los modelos estocásticos o probabilísticos se introduce el principio de incertidumbre, así las variables, parámetros, ecuaciones o reglas que describen al sistema varían en el tiempo, lo que da como resultado fluctuaciones aleatorias que las modifican por lo que el estado en un momento dado no puede ser determinado con exactitud a partir de estados previos (Shmulevich y Aitchison, 2009; Karlebach y Shamir, 2008).

La aplicación de ambos formalismos varía en función de la disponibilidad de los datos como de las finalidades del modelo en cuanto a la descripción del sistema. En el caso de modelos continuos basados en EDO la incorporación de elementos aleatorios es una consecuencia del efecto de la concentración de las especies moleculares interactuantes, así a baja concentración la probabilidad de interacción es menor. En tal caso los sistemas son aproximados con metodologías como las Ecuaciones Químicas Maestras y el Algoritmo de Gillespie (Thattai y van Oudenaarden, 2001), constituyendo sistemas con un alto detalle de descripción pero una mayor complejidad de implementación a medida

que el tamaño de la red aumenta (Ribeiro et al, 2006).

En el caso de los modelos discretos, la descripción determinista es la más usual en la formalización de redes de regulación (Schlitt y Brazma, 2007), sin embargo la incorporación de elementos estocásticos ha sido explorada de forma notable en muchos modelos de redes, particularmente los basados en formalismos Booleanos. En el caso más sencillo un nodo puede oscilar entre un estado 0 o 1 dada una probabilidad, bien las reglas lógicas que definen el comportamiento de cada nodo cambian en función de ciertas condiciones o finalmente incorporando ruido al momento de resolver las reglas sin modificar estas. Por ejemplo Álvarez-Buylla y otros evaluaron el papel del ruido sobre la determinación temprana de los órganos florales en *Arabidopsis* (Álvarez-Buylla et al, 2008), demostrando la importancia de este en la determinación temporal de los tipos celulares de la flor. En ese sentido, si bien los modelos deterministas han sido ampliamente aplicados, la incorporación de elementos estocásticos puede dar pista sobre la emergencia de patrones estables de organización dentro de las redes regulatorias de sistemas celulares.

1.2.3 Complejidad de los modelos contra complejidad de los sistemas de estudio: de lo cualitativo a lo cuantitativo

Hasta hora he abordado la discusión en torno a los modelos red de regulación en la escala celular partiendo de las aproximaciones en su construcción, por un lado estrategias para abordar la determinación de la topología de la red y por otro en cuanto a la concepción de estas como sistemas dinámicos que pueden estudiarse bajo enfoques diferentes. Así se ha determinado que descripciones más finas como las dadas por métodos en estado continuo y bajo un enfoque estocástico requieren un conocimiento detallado del sistema. Sin embargo ya se ha descrito como enfoques discretos y en particular enfoques booleanos pueden describir de forma general la dinámica de aquellos modelos continuos para diferentes procesos celulares. Por ejemplo, Fauré y colaboradores (Fauré et al, 2006) logran reproducir de manera general mediante un modelo booleano el comportamiento dinámico del ciclo celular en mamíferos reduciendo el modelo de red basado en EDO descrito por Novak y Tyson (Novak y Tyson, 2004) al incorporar únicamente información cualitativa descrita por la topología de la red. Por otro lado, Albert y Othmer (Albert y Othmer, 2003) logran discretizar el modelo continuo de red regulatoria de la segmentación en *Drosophila melanogaster* propuesto por von Dassow y colaboradores (von Dassow et al, 2000), recuperando el mismo tipo de información relativa a los perfiles de expresión observados durante las

primeras etapas de la segmentación.

Por lo anterior, se necesita un considerable nivel de detalle acerca de los procesos regulatorios para la formulación de redes basadas en descripciones continuas en comparación con los modelos en estado discreto. Esto hace a los modelos continuos más difíciles de construir que los modelos discretos y en particular con respecto a las redes booleanas. La complejidad del modelo junto con la disponibilidad de datos experimentales determina el nivel de detalle con que el problema habrá de ser abordado. En consecuencia, mientras que los sistemas más grandes de redes regulatorias basadas en ODE usualmente no exceden los 20 nodos, los modelos discretos como las redes booleanas pueden extenderse a cientos de ellos con relativo menor costo computacional (Véase la Figura 4)

Por otro lado, la aplicación de modelos continuos o discretos y sus aproximaciones determinísticas o estocásticas, está determinada por el nivel de granularidad o detalle con que se pretenda abordar el fenómeno de interés. Así, los modelos en estado continuo son más adecuados para modelar aspectos cuantitativos como la variación de la concentración de los nodos en una determinada condición y a lo largo del tiempo. Mientras que los modelos discretos, particularmente los Booleanos, son útiles para estudiar aspectos cualitativos de un proceso biológico como por ejemplo qué elementos en la red permanecen activos en los estados estables o cómo cambian los estados estables ante cambios como la sobreexpresión o la delección de alguno de los elementos en la red (Ivanov y Dougherty, 2006). En conclusión, ninguna técnica única de modelación puede capturar todos los aspectos de un proceso biológico representado en una red de regulación, por lo que múltiples métodos son usados en diferentes fases de su análisis (Albert R, 2007).

1.3 Redes booleanas

Las limitaciones mostradas en las aproximaciones anteriores para describir el comportamiento dinámico de redes regulatorias básicamente se debe a la falta de datos para obtener los parámetros, las dificultades técnicas en su solución y la poca practicidad para simular sistemas con un gran número de componentes, esto ha motivado la búsqueda de métodos simplificados para describir redes regulatorias. Las aproximaciones de estado discreto booleano son una de esas alternativas y básicamente parten de la idea de que cada componente en una red regulatoria puede tener dos estados y este depende de funciones lógicas determinadas por la combinatoria de las interacciones descritas por la topología de la red. En esta sección se describirán las redes booleanas con detalle haciendo énfasis en los supuestos más relevantes

y las propiedades más significativas que permiten aproximar el comportamiento de las redes regulatorias celulares.

La idea central de las redes booleanas es que los genes, proteínas o demás procesos celulares son tratados como elementos discretos binarios, es decir, con dos estados de comportamiento: encendido/apagado en el caso de redes genéticas o presencia/ausencia en el caso de redes de interacción proteína-proteína. Así un gen en el estado 1 (encendido) denota su transcripción, mientras que para proteínas esto puede ser interpretado como que está presente y en su conformación activa y funcional (e.g. fosforilada o desfosforilada). Además, todas las interacciones pueden ser entendidas por mecanismos de activación/inhibición mediante funciones lógicas que relacionan combinatoriamente el estado de un nodo en función de sus reguladores (Véase la sección 1.4 para más detalles) (Albert R, 2004, Kauffman et al, 2004).

Antes de describir a las redes booleanas, daré una breve pero importante descripción acerca de los principios del álgebra o lógica Booleana y a partir de ello se describirán los fundamentos de las redes booleanas como modelos cualitativos de los procesos celulares. El álgebra Booleana introducida por George Boole en 1854 define un desarrollo sistemático de lógica basado en argumentos. Se define un conjunto $V = \{0,1\}$, junto con dos operadores binarios (es decir que toman dos argumentos para operarlos): “+” y “.”, que para cada x e y números que pertenece a V ($\forall x, y \in V$), establece un único valor de salida z que también pertenece a V ($z \in V$); es decir, para cualesquiera dos números 1 ó 0, las operaciones entre ellos siempre devuelven un número 1 ó 0.

Sin embargo es E.V. Huntington en 1904 quien desarrolla una definición más formal del álgebra booleana al extenderla axiomáticamente y establecerla como un sistema que mediante dos operaciones binarias ahora definidas como **AND** y **OR** (referidas a los postulados de Boole como $+$ e \cdot), y un operador unario **NOT** (\neg) que asegura la existencia del complemento de cualquier elemento de V , opera números binarios y devuelve números binarios. Tales operadores se definen mediante las siguientes tablas de verdad, que no son más que la representación del operador y su valor de salida en V (Véase la Figura 5) (Johnsonbaugh R, 1999):

Entrada		Salida
x	y	X AND y
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

Entrada		Salida
x	y	X OR y
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

Entrada	Salida
x	NOT x
0	1
1	0

Figura 5. Tablas de verdad de los operadores booleanos binarios AND, OR y el unario NOT.

De esta manera cada operador booleano es una función que toma como argumentos sus entradas, por lo que para cada función con M entradas existen exactamente 2^M filas o estados posibles, asignado una única salida para cada uno de ellos.

Considerando las propiedades del algebra booleana y en particular las tablas de verdad descritas en la figura 5, en los modelos de red booleana cada elemento es representado mediante una variable booleana σ_i , es decir, que puede tener únicamente dos estados $\sigma_i = (0 \text{ ó } 1)$. Una red de n nodos tiene exactamente $\sigma_i (i=1,2,\dots, N)$ variables booleanas cada una con un estado en el tiempo t , $\sigma_i(t)$. En consecuencia, el estado de un nodo en la red a lo largo del tiempo está determinado por la función:

$$\sigma_n(t + \tau) = F_n(\sigma_{n_1}(t), \sigma_{n_2}(t), \dots, \sigma_{n_k}(t)) \quad \dots [1]$$

Donde $(\sigma_{n_1}(t), \sigma_{n_2}(t), \dots, \sigma_{n_k}(t))$ son los reguladores del nodo σ_n , mientras que F_n es una función booleana construida a partir de la combinatoria de los reguladores del nodo σ_n descrita por su tabla de verdad. Por otro lado τ es el tiempo característico de la activación de cada nodo, es decir, expresa el número de pasos de tiempo para los cuales su estado cambia en función de sus reguladores, y en el caso más simple de una red booleana $\tau = 1$ (Kauffman, S, 1993), tal como en este trabajo se asume.

La ecuación anterior define el estado de cada nodo en un tiempo dado. Por tanto, para caracterizar el comportamiento dinámico de la red es necesario explorar el estado de todos los nodos en un tiempo definido, así, el vector

$$S(t) = [\sigma_1(t), \sigma_2(t), \sigma_3(t), \dots, \sigma_n(t)] \quad \dots [2]$$

define el estado de la red en el tiempo t . Debido a la suposición de estado binario para los N nodos que determinan la red de regulación, existen exactamente 2^N estados posibles de la red, mismos que forman un conjunto finito de condiciones posibles que la red puede tener, el llamado **espacio de estados**. De este modo la evolución temporal de la red en el espacio de estados constituye una **trayectoria** de la red.

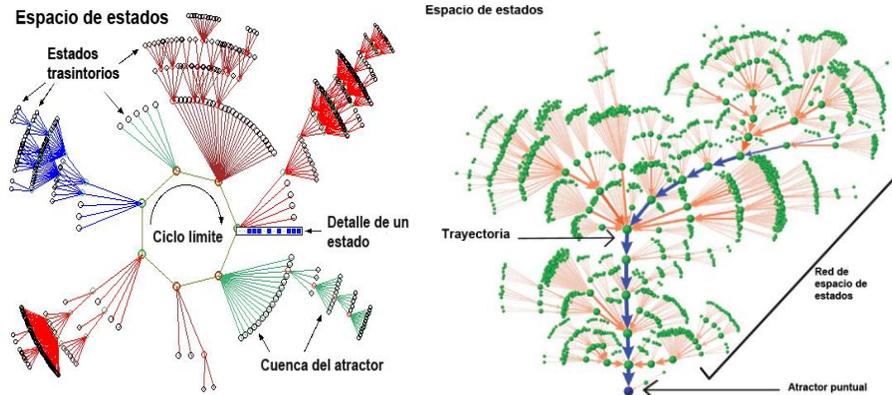


Figura 6. Dinámica de las redes booleanas dentro del espacio de estados. El espacio de estados de dos redes booleanas distintas, ambas convergiendo a un único atractor. Se observa en la figura de la derecha la red de estados con un único atractor dinámico o ciclo limite al centro, los círculos representan a cada uno de los estados de la red mostrándose el detalle de uno de ellos donde los cuadros azules simbolizan estados 1 y los blancos 0 en función del vector [2], además se observan los estados transitorios que forman parte de la cuenca de atracción del ciclo limite. En el lado izquierdo se observa la red de estados de una red que converge a un único atractor puntual, se muestra con flechas azules la trayectoria a lo largo de los estados transitorios hasta el atractor puntual (Imagen derecha: tomada y modificada de Wuensche A, 2002; imagen izquierda: tomada y modificada de Li et al, 2004).

Podemos entender el espacio de estados como otra red, la **red de espacio de estados**, que debe ser estrictamente diferenciada de la topología de red (véase Figura 6). Como el espacio de estados es finito y la dinámica del sistema completamente determinística (véase [1]), la red puede transitar de un estado a otro en ese espacio en el tiempo hasta que se estabiliza en un **atractor puntual o estado estable**. La definición general de los sistemas dinámicos dice que un atractor es un estado o conjunto de estados a los que el sistema llega a lo largo del tiempo y en el cual el sistema permanece una vez que llega a este a lo largo del tiempo. Por otro lado al conjunto de estados que transitan hacia el atractor y en los que la red no permanece al evolucionar el tiempo se denominan **estados transitorios** y al conjunto de estados transitorios que llevan a un atractor se denomina **cuenca de atracción** de un atractor determinado.

Además si el estado estable está formado por un conjunto de estados repetitivos a manera de ciclo, este se denomina **atractor dinámico o ciclo límite**.

En consecuencia, las redes booleanas se constituyen como un modelo de red discreto, finito y determinista. Como se ha descrito, la actividad futura de cada nodo en la red está determinado por el estado de sus reguladores en un tiempo anterior, dada la ecuación [1], sin embargo es necesario hacer una distinción interesante entre esta representación y los mecanismos biológicos subyacentes. Es claro que las funciones biológicas que regulan el estado de cada entidad representada en un nodo tienen tiempos determinados de respuesta desde que la señal es censada hasta que la respuesta es producida generando un cambio en su estado futuro. Por tanto el orden en que un determinado nodo es actualizado dados los estados de sus reguladores puede tener un efecto en la dinámica del sistema; en general existen dos esquemas de actualización de los nodos en una red booleana: actualización sincrónica y asincrónica.

En el esquema sincrónico se asume que los procesos de regulación entre los nodos de la red son temporalmente iguales y por tanto, todos los nodos se actualizan al mismo tiempo (Garg et al, 2008). Si bien es cierto que esta es una simplificación poco válida, el enfoque sincrónico es una buena aproximación en el caso de redes en las que existe poca información concerniente al orden temporal preciso de activación de los nodos involucrados, siendo además una descripción determinista del comportamiento dinámico de la red (Wang et al, 2012).

En contraste, en el esquema de actualización asincrónico, no existen dos nodos que cambien su estado simultáneamente, por lo que las escalas temporales de cada nodo no son comparables y en cada paso de tiempo los nodos pueden o no cambiar su estado. Existen dos aproximaciones de la asincronía de redes booleanas, por un lado si la información sobre los patrones de expresión de los nodos es limitada, estos pueden ser actualizados de forma aleatoria. En otro caso si se conoce el orden relativo de actualización entre los nodos de la red, es posible fijar prioridades de actualización de cada nodo, evaluándose el estado de la red una vez que todos los nodos han sido actualizados (Garg et al, 2008, Fauré et al 2006). En ambos casos, la actualización asincrónica modifica el comportamiento a largo plazo del sistema, por lo que una misma condición inicial de la red puede llevar a diferentes atractores e incluso modificar el tamaño del espacio de estados de la red (Garg et al, 2008), por lo que el enfoque asincrónico es no determinístico.

Ambas aproximaciones han sido exitosamente aplicadas en diferentes contextos celulares, sin embargo algunos autores apuntan que es necesario considerar ambos enfoques al momento de evaluar los estados estables de la red, por ejemplo, Fauré y colaboradores en su trabajo sobre el modelo de red

booleana del ciclo celular genérico en mamíferos (Fauré et al, 2006), demostraron que un enfoque híbrido sincrónico-asincrónico permite recuperar un atractor que describe con mayor detalle la secuencia de eventos característicos del ciclo celular en condiciones normales, sin embargo, el análisis de ambas metodologías requiere un notable conocimiento de los eventos celulares involucrados en la regulación de los nodos.

Por tanto, la elección del esquema de actualización de la red estará en función de la información de los procesos regulatorios, su temporalidad y el tamaño de la red analizada, así el enfoque sincrónico puede ser el punto de partida cuando se analizan redes booleanas con poca información detallada, por lo que en este trabajo se priorizara su uso en el análisis de los modelos descritos en el capítulo 3.

Los primeros modelos de redes booleanas, los modelos de Redes Booleanas Aleatorias (RBN, por sus siglas en inglés), propuestos por Stuart Kauffman en 1969, no fueron aplicados a contexto biológico alguno, sino más bien establecidos como un modelo teórico libre de parámetros cinéticos para aproximar el estudio dinámico de la expresión genética como lo propuesto por Jacob y Monod con su modelo del operón (Monod y Jacob, 1961). En su trabajo, Stuart Kauffman asume varias particularidades para aproximar la regulación genética mediante sistemas booleanos (Kauffman, 1969; Kauffman et al, 2004): en primer lugar las redes se constituyen como sistemas N - K , es decir, redes con N nodos y K conexiones de entrada por nodo; en segundo lugar el número de nodos es fijo pero el número de K entradas es un valor promedio de conectividad de la red; y finalmente el estado de cada nodo está determinado por una función booleana f_i especificada por una tabla de verdad cuyas variables evolucionan de forma sincrónica (Véase la figura 7).

Al analizar la dinámica, Kauffman describió que a lo largo del tiempo las redes son canalizadas a estados estacionarios o atractores y que tales atractores en el contexto biológico podrían representar tipos celulares dependiendo del estado de los genes representados por los nodos. Así dada una configuración inicial en la red y las funciones booleanas que determinan su cambio temporal, el sistema evoluciona hasta alcanzar una configuración que es estable en el tiempo, un atractor, siendo este un comportamiento emergente del sistema y no una propiedad intrínseca de cada elemento en la red.

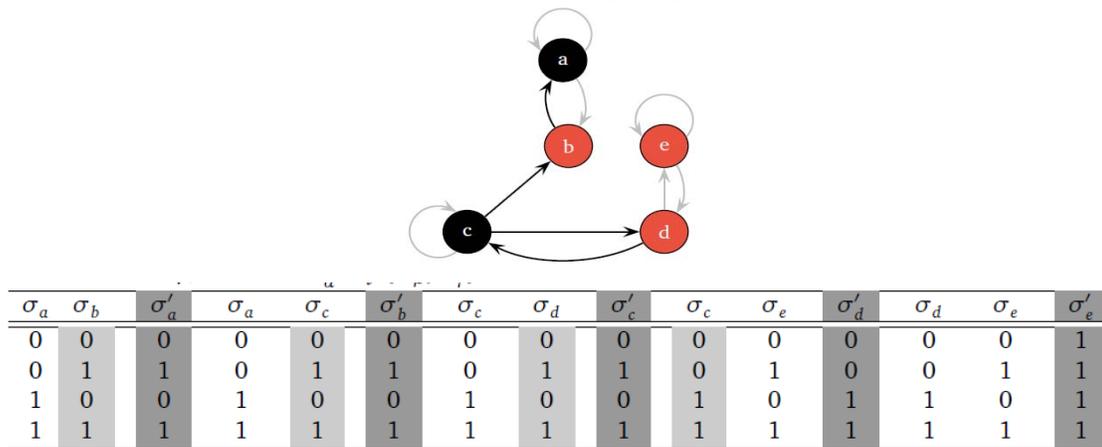


Figura 7. Ejemplo de una red booleana N-K. La red consiste de $N=5$ y $K=2$, cada nodo es tiene un valor booleano rojo=0 o negro=1 determinado por una función f_i dada por la tabla de verdad asociada. En esta tabla el valor σ' expresa el estado futuro de la red en el tiempo $t+1$, se marca en columnas gris tenue los nodos cuyo estado determina mayoritariamente el estado siguiente del nodo regulado.

Si bien solo recientemente la hipótesis de Stuart Kauffman de interpretar los atractores de redes booleanas como tipos o perfiles celulares ha sido explorada gracias a la disponibilidad de datos de expresión genética como los de microarreglos de DNA, las redes booleanas son modelos adecuados para entender los procesos dinámicos de redes de control biológicas, por otro lado pueden ser vistas como una simplificación de los modelos basados en ecuaciones diferenciales (Bornholdt, 2005). Particularmente este tipo de formalismo ha sido aplicado en diferentes contextos biológicos para modelar circuitos regulatorios en los que es posible predecir la secuencia o patrón de expresión con pocos parámetros, algunos de ellos son la red que subyace la diferenciación de los órganos florales de *A. thaliana* (Mendoza et al, 1999; Espinosa-Soto et al, 2004), la red de transducción de señales para la apertura de estomas inducida por ácido abscísico (Li et al, 2006), el ciclo celular de *S. cerevisiae* (Li et al, 2004), el ciclo celular en mamíferos (Fauré et al, 2006) o la red de regulación de la segmentación en *D. melanogaster* (Sanchez y Thieffry, 2001; Albert y Othmer, 2003).

1.4 Construcción de un modelo de red booleana

De forma general, Wang y otros (Wang et al, 2012) sostienen que los pasos fundamentales (véase la Figura 8) en el desarrollo de un modelo dinámico de red booleana como los analizados en el presente trabajo son:

1. *Síntesis de la estructura de la red.* Mediante la extensiva búsqueda en la literatura relevante al problema de interés, se pueden determinar los elementos de la red. Los experimentos a gran escala pueden decir la topología general de la red y mediante la información de los experimentos a pequeña escala establecerse el sentido de las relaciones entre elementos o bien discernir entre aquellos suficientes o necesarios para el problema en cuestión. Algunas paqueterías permiten utilizar algoritmos de agrupamiento para encontrar el grafo más parsimonioso que determinan las interacciones positivas o negativas derivadas de la literatura (por ejemplo NET-SYNTHESYS, véase DasGupta et al, 2008).

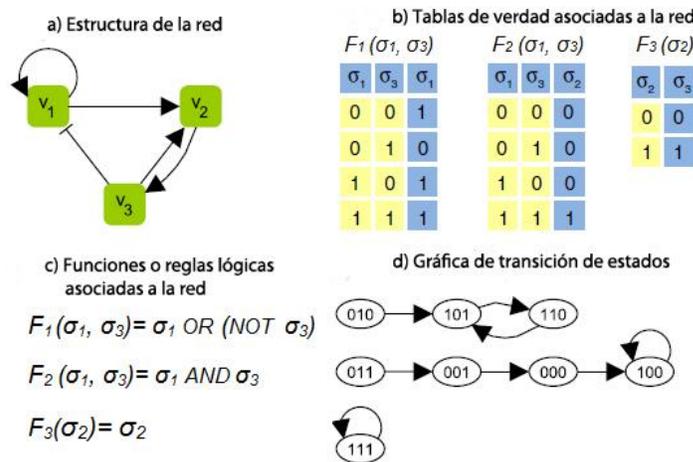


Figura 8. Ejemplo simple de la construcción de un modelo de red Booleana. a) El grafo dirigido que muestra la topología de la red (estructura de la red) asociada al modelo booleano. Las flechas representan efectos positivos sobre el nodo y las flechas truncadas denotan efectos negativos. b) Las tablas de verdad de las funciones asociadas a la topología determinan en última instancia el estado de cada nodo asociado al estado de sus reguladores. c) Las funciones booleanas del modelo; puede verse que dada la topología en a), pueden definirse funciones alternativas, específicamente: $F_1(\sigma_1, \sigma_3) = \sigma_1 \text{ AND } (\text{NOT } \sigma_3)$; $F_2(\sigma_1, \sigma_3) = \sigma_1 \text{ OR } \sigma_3$; d) La gráfica de transición de estados muestra la evolución del sistema a lo largo de los estados característicos de la red usando un esquema de actualización sincrónico. En este caso los estados 100 y 111 son puntos fijos del sistema, esto es, el sistema se canaliza a tales estados, mientras que los estados 101 y 110 forman un ciclo límite, es decir, el sistema oscila entre esos estados. (Tomado y modificado de Wang et al, 2012)

2. *Determinación de las funciones lógicas de la red.* La estructura de la red, es decir, las relaciones dirigidas positivas o negativas de un elemento a otro, no determinan la relación de dependencia entre los elementos de la red, para determinar las funciones lógicas que determinan el estado futuro de cada elemento de la red es necesario utilizar datos de la literatura y observaciones experimentales, simplificando el evento biológico mediante los operadores lógicos AND, OR y NOT descritos anteriormente así como otros derivados de

estos. Por ejemplo una proteína cuya actividad depende de su fosforilación por una cinasa en algún sitio particular puede ser escrita mediante la función lógica $P(t+1)=K_1(t)$, donde respectivamente P y K_1 representa el estado de la proteína y la cinasa. Por otro lado si para esa misma proteína existiesen múltiples sitios de fosforilación y es necesario que dos de ellos lo estén por dos cinasas diferentes cada uno, la función booleana que determina el estado futuro es $P(t+1)=K_1(t) \text{ AND } K_2(t)$, si por otro lado la activación es suficiente por alguna de ellas, la regla lógica derivada puede verse como efectos independientes de tales reguladores, esto es, $P(t+1)=K_1(t) \text{ OR } K_2(t)$, finalmente si el estado de la misma proteína depende de la ausencia de una fosfatasa que la inactiva, el estado futuro definido por la función booleana puede ser $P(t+1)=\text{NOT } F(t)$. Por tanto un paso determinante es la determinación de las funciones reguladoras de cada nodo.

3. *Determinación del esquema de transición de estados del sistema.* Una vez determinadas las funciones booleanas que describen la evolución temporal de cada nodo dentro de la red es necesario determinar el esquema de actualización de cada nodo. Por un lado el enfoque sincrónico, como se explicó en la sección 1.3 de este capítulo, permite explorar todo el espacio de estados puesto que para cada posible estado inicial existe al menos un estado sucesivo en el tiempo, sin embargo la variación temporal de los procesos de regulación celular no puede ser representada bajo este esquema. Por otro, el enfoque asincrónico permite capturar la variación temporal de la regulación a nivel celular, lo que puede aproximarse de forma determinística asumiendo reglas de actualización fijas para cada nodo o bien incorporando enfoques estocásticos al variar el orden de activación de manera aleatoria. La sincronía o asincronía del sistema tiene importantes efectos sobre su dinámica y en muchos casos es preferible comparar ambos esquemas.
4. *Análisis de la salida del sistema.* Una vez establecidas las funciones lógicas que determinan el estado de cada nodo, el sistema debe ser analizado ya sea explorando algunas condiciones iniciales particulares de interés biológico y dejando evolucionar el sistema hasta encontrar los atractores, o bien explorando todo el espacio de estados identificando así el o los atractores del sistema, su tipo y el tamaño de la cuenca asociada en el caso de redes relativamente pequeñas. Es importante determinar que diferentes algoritmos pueden llevar a identificar con diferente eficiencia atractores asociados a la dinámica de la red, aunque muchos de ellos han sido incorporados ya en paqueterías de

análisis. Así, existen diferentes paqueterías que permiten analizar redes booleanas, algunas de ellas incorporan diferentes herramientas de simulación, entre ellos puede citarse BooleanNet (Albert I et al, 2008), SimBoolNet (Zheng et al, 2010) y BoolNet (Mussel et al, 2010), otros como GINsim (Gonzalez et al, 2006) y SQUAD (Di Cara et al, 2007) son de propósito más general al soportar lógicas multivaluadas, pero es fácilmente incorporable un enfoque booleano. Además ATALIA (Chaos Á, 2008), desarrollado en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas de la UNAM (LGMDEP) y donde se llevó a cabo esta tesis, permite hacer exploraciones evolutivas sobre la dinámica de redes binarias. Por otro lado BooleanNet, permite incorporar metodologías para simular sistemas híbridos booleanos y basados en EDOs, lo que permite extender la información cualitativa al incorporar algunas variables cinéticas cuando sea posible obtenerlas.

En este trabajo se prefirió utilizar BoolNet puesto que la fácil implementación de las reglas lógicas, los algoritmos de búsqueda de atractores y la exportación de los datos del espacio de estados a paqueterías de análisis de redes como Pajek, permiten explorar de forma más completa los modelos de red booleana del ciclo celular aquí revisados.

5. *Verificación del modelo.* Existen diversas formas de validar ciertas características del modelo booleano propuesto. En primer lugar el modelo debe ser capaz de reproducir las evidencias experimentales como las respuestas de salida ante determinadas condiciones iniciales conocidas, si el modelo falla en tal caso es necesario bien revisar las interacciones e incluso incorporar nuevas o bien verificar la pertinencia de las funciones booleanas. Por otro lado la posible inconsistencia puede provenir de la elección errónea del esquema de actualización por lo que en tal caso será necesario modificarlo. Otra posibilidad radica en realizar un análisis de robustez del sistema lo que indirectamente permite validar el modelo propuesto, por un lado es posible analizar el efecto que pequeñas perturbaciones como el intercambio de reglas lógica AND y OR genera en la dinámica, el cambio en el signo de las interacciones, la adición o delección de componentes o interacciones en la red o la modificación de pares de interacciones entre nodos, así un buen modelo es capaz de permanecer lo suficientemente invariante en su comportamiento a largo plazo ante pequeñas perturbaciones lo que refleja la adaptabilidad y su coherencia al representar el problema de interés.

6. *Implicaciones y predicciones.* Una vez identificados los atractores es posible determinar bajo qué condiciones el sistema experimenta diferentes respuestas a partir de diferentes estados iniciales de la red. En otro sentido, el sistema puede ser perturbado manteniendo fijo el estado de alguno de los nodos por ejemplo simulando la sobreexpresión al fijar un nodo en estado 1 o simulando la pérdida de función al fijar el estado en 0, permitiendo identificar así componentes esenciales y asociando su modificación con fenotipos reportados como alterados. En ambos casos es posible predecir e incluso proponer validaciones experimentales modificando las condiciones del sistema *in vivo* permitiendo así actualizar la red.

Considerando los fundamentos de la sección 1.3 y la metodología anterior, en el Capítulo 3 de este trabajo se analizan cuatro redes de regulación que describen el control del ciclo celular en cuatro organismos modelo eucariontes. Tres de las redes son analizadas dinámicamente mediante la derivación de las reglas lógicas que dan sustento a su formalismo booleano, en particular para la red de regulación booleana del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe* se dedujeron todas las reglas lógicas, mientras que para los casos de las redes de *Saccharomyces cerevisiae* y mamíferos, se analizaron y actualizaron las reglas previamente disponibles en la literatura. Finalmente, y como parte de un proyecto mucho más amplio desarrollado en el laboratorio donde se realizó esta tesis, junto con varios miembros se propone una red de regulación mínima para el control del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*, sin que se analice dinámicamente su comportamiento, en tal caso, la aportación en este trabajo se limita a la descripción de los reguladores de la red de acuerdo a la metodología de la sección 1.4 de este capítulo, sin embargo su análisis se extienden a aspectos topológicos y de organización descritos en el Capítulo 4.

En la siguiente sección se describirán los detalles acerca de los mecanismos implicados en la regulación del ciclo celular eucarionte y las particularidades que se observan para cuatro organismos modelo, en su conjunto este y el siguiente capítulo son la base del análisis presentado en el Capítulo 3.

Capítulo 2

El ciclo celular en eucariontes

En esta sección se describen el ciclo celular como un proceso fundamental en las células eucariontes y se analizan algunas de las rutas generales de control entre los organismos eucariontes revisados: levaduras, mamíferos y plantas. Se describen algunas generalidades del ciclo como un proceso dinámico compuesto por diferentes fases altamente reguladas y caracterizadas por un conjunto de componentes moleculares particulares, en muchos casos compartidos y en otros no. Por otro lado, se detallan las vías más generales de control conocidas y estudiadas, que son la base para la construcción de los modelos dinámicos revisados en capítulos posteriores. Además se hace una pequeña discusión en torno a las cuestiones evolutivas que han sido resueltas y aquellas que parecen ser importantes en la investigación actual del campo.

“...if ever we are to attain a final theory in biology, we will surely, surely have to understand the commingling of self-organization and selection.”

Stuart A. Kauffman

2.1 El ciclo celular en eucariontes: mecanismos y componentes generales

Se entiende por ciclo celular al proceso que inicia al término de una división celular y que concluye con el final de la siguiente división (Stein et al, 2011). En general si bien los elementos regulatorios que determinan cada evento pueden variar, dos requisitos son invariantes: la replicación del DNA y la segregación de los cromosomas replicados en células derivadas por la división celular (Morgan, 2007)

El ciclo celular está dividido en una serie de etapas o fases cuya secuencia temporal es común a todos los eucariontes. Existen dos fases de carácter funcional, estas son la de síntesis de DNA o fase S, y la de mitosis o fase M donde los cromosomas se separan en células hijas idénticas y la célula se divide; y dos etapas preparatorias G1 y G2; G1 es la fase de crecimiento, mientras G2 es la de aumento de crecimiento en masa y de verificación de la integridad del genoma como de la correcta replicación de este, preparándose para la división celular (Véase Figura 9). Las fases G1, S y G2 comprenden el denominado estado de Interfase mientras que la fase M comprende el estado de Mitosis con los eventos de división nuclear (cariocinesis) y de división citoplasmática (citocinesis) (Morgan, 2007; Stein et al, 2011)

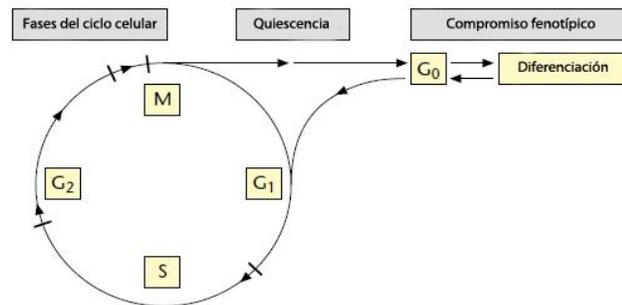


Figura 9. Fases del ciclo celular. Las cuatro fases del ciclo celular (G1, S, G2, M) involucran la duplicación del genoma y la subsecuente segregación de los cromosomas en las dos células derivadas del proceso de división. Sin embargo existen salidas al ciclo clásico: las células puede permanecer sin proliferar en un estado quiescente (G0) con la opción de volver a entrar al ciclo mitótico o diferenciarse comprometiendo su destino celular al expresar genes característicos del linaje celular (Tomado y modificado de: Stein et al, 2011)

La interfase corresponde al periodo entre dos estados mitóticos y se caracteriza por la ausencia de cambios notables en la forma celular. En general, la cromatina se encuentra dispersa en el núcleo por lo que es difícil distinguir los cromosomas individualmente. A lo largo de la interfase la célula crece exhibiendo altas tasas de transcripción y síntesis de nuevos componente celulares; durante G1, que es el primer estadio dentro de la interfase, la célula puede dejar el estado proliferativo y diferenciar, entrar en

estado quiescente, denominada fase G₀, o bien progresar por G₁ hacia la fase S y concluir el ciclo de división (Véase Figura 9). Por tanto es notable que la fase G₁, y en particular los eventos tardíos de fase G₁, son cruciales para la posterior replicación del DNA. Al término de la fase S, de cada cromosoma hay dos replicas idénticas denominadas pares de cromátidas, que serán igualmente distribuidas en los núcleos de las células hijas durante la mitosis. Posteriormente durante fase G₂, corresponde al periodo de preparación de la mitosis por lo que en general se observa un aumento de masa y tamaño celular necesarios para la futura citocinesis (Morgan, 2007).

El siguiente paso es hacia fase M, caracterizado por cambios de la forma celular y de la estructura de la cromatina; la coordinación de los eventos de fase M finalmente están encaminados a la adecuada segregación de los cromosomas y la división celular para la formación de dos células hijas. El primer estadio en fase M es la mitosis que puede ser dividida en varios estados discretos con características distintivas (Krauss G, 2003). El primer estado es la Profase, donde se observa la migración y separación de los centrosomas replicados durante fase S hacia los polos opuestos de la envoltura nuclear, esto permitirá la orientación del huso mitótico durante los estados siguientes de división nuclear. La profase también está caracterizada por una progresiva condensación de los cromosomas hasta una compactación máxima justo antes de la ruptura de la envoltura nuclear que define el final de la profase (Stein et al, 2011). Así al final los cromosomas en estado mitótico muestran un arreglo característico sobre su eje de separación con la forma característica en equis (Pinheiro y Sunkel, 2012) (Véase Figura 10)

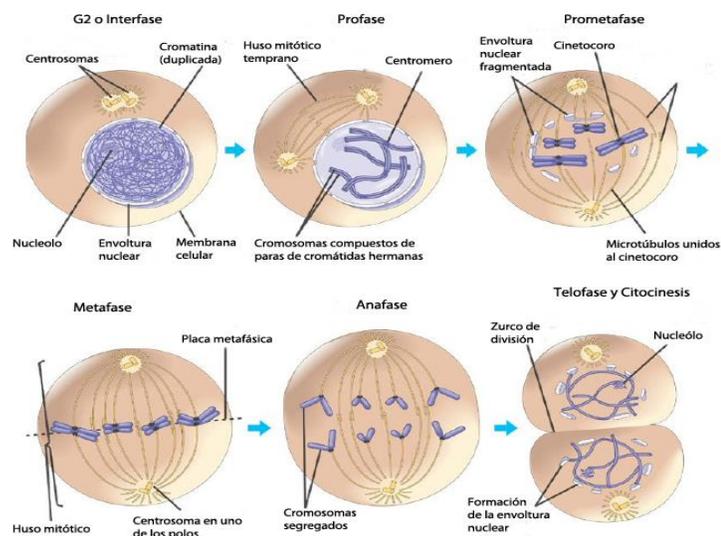


Figura 10. Etapas de fase M. Representación diagramática de los eventos de fase M, particularmente en mamíferos. Las células en G₂ presentan cromosomas duplicados pero no segregados, la cromatina aún se encuentra condensada y se observa la envoltura nuclear; en profase se inicia la condensación de la cromatina y la formación del huso mitótico; en prometafase la envoltura nuclear se fragmenta y los cromosomas ya perfectamente definidos interactúan con los microtúbulos mediante

su cinetocoro; en metafase las cromátidas hermanas se unen a los microtúbulos de cada polo del huso mitótico se alinean en el plano de división al centro de la célula; en anafase las cromátidas hermanas se separan en dirección de polos opuestos (anafase A) y se segregan hacia cada polo (anafase B). El estado final involucra la telofase cuando la envoltura nuclear se reestablece alrededor de cada conjunto de cromosomas segregados, y la citocinesis cuando el citoplasma se divide (Tomado y modificado de: Pinheiro y Sunkel, 2012)

El siguiente estado es la prometafase donde la ruptura de la envoltura nuclear permite la interacción cromosomas-microtúbulos por medio de los cinetocoros, así cuando las cromátidas hermanas son establemente unidas mediante sus cinetocoros a los microtúbulos, estos las desplazan sobre el plano del huso mitótico cada una en polos separados. La etapa subsecuente es la metafase que es definida por el alineamiento de las cromátidas hermanas en el centro del huso formando la placa metafásica. Después la etapa de anafase comprende dos procesos sucesivos: anafase A que se caracteriza por la pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas lo que facilita su separación y anafase B, donde las cromátidas hermanas son separadas y llevadas a polos opuestos completando la segregación de los cromosomas duplicados. Una vez segregados inicia la etapa de Telofase cuando la envoltura nuclear vuelve a ser ensamblada alrededor de cada conjunto de cromosomas segregados formando los dos núcleos de las células derivadas, el huso mitótico se desestabiliza dejando un centrosoma por cada conjunto de cromosomas segregados. (Véase figura 10). Finalmente la etapa terminal de fase M es la citocinesis o la partición del citoplasma que en realidad comienza durante la anafase mediante la formación de los anillos de actina-miosina perpendiculares al plano del huso mitótico, permitiendo así la separación de las células hijas, concluyendo así la fase M y permitiendo que las células hijas entren ahora a fase G1 (Morgan, 2007; Pinheiro y Sunkel, 2012).

Esta descripción es muy generalizada y hace referencia al ciclo celular característico en animales, específicamente en mamíferos; existen variaciones considerables a lo observado en plantas y en organismos eucariontes unicelulares, sin embargo estas particularidades se discuten en las siguientes secciones de este capítulo. Lo interesante hasta este punto es que cada fase está perfectamente caracterizada por procesos a nivel celular como de la expresión diferencial de moléculas que los controlan, esto se unifica con el concepto de punto de control de las fases del ciclo celular.

Los puntos de control pueden entenderse como puntos de todo o nada donde las células verifican el estado correcto de los eventos previos de una fase a otra. Los puntos de control consisten de un sensor que detecta errores, una señal que es generada por el sensor mediante una vía de transducción de señales y finalmente un elemento de respuesta en la maquinaria del ciclo celular (Rieder, 2011).

En general se han descrito tres puntos de control. Un punto de control está en la transición G1/S

y controla la entrada a fase S, en G2 existe otro punto que asegura la replicación del DNA antes de pasar a M, mientras que al final de la transición G2/M otro punto asegura la cariocinesis y la posterior citocinesis. Las respuestas de paro o paso en cada punto de control necesariamente están ligados a la dinámica molecular de la maquinaria de control del ciclo celular por lo que para entender la dinámica asociada a estos es necesario describir la maquinaria del ciclo celular (Novak et al, 2003).

Por otro lado, la secuencia cíclica de las fases G1, S, G2 y M describe un ciclo celular estándar, sin embargo existen variaciones en la duración de cada una de las fases entre los diversos grupos de eucariontes y aún entre poblaciones celulares de un mismo organismo. Por ejemplo en células tempranas embrionarias de mamíferos el periodo entre fase S y M se ve reducido haciendo indistinguibles las fases G1 y G2; mientras que en levaduras de fisión se observa una extensión en la duración de la fase G2 (Oliva et al, 2005), de ello se discutirá más en las siguientes secciones.

2.1.1 Mecanismos de control del ciclo celular en eucariontes

Los elementos regulatorios claves del ciclo celular en eucariontes en gran medida han sido identificados en levaduras, sin embargo mecanismos homólogos han sido reportados en otros eucariontes, no sin tener particularidades. En general dos procesos son centrales en la regulación del ciclo celular eucarionte: i) Cambios oscilatorios en la actividad de la maquinaria molecular del ciclo, con la actividad de proteínas cinasas como los componentes más importantes, ii) Proteólisis específica de los reguladores del ciclo celular. Por otro lado la actividad de la maquinaria del ciclo celular es controlada por tres tipos de proteínas: 1) Cinasas dependientes de ciclina (CDKs), 2) Ciclinas y 3) Inhibidores de CDK (CKIs). De esta manera el sistema oscilatorio del ciclo celular está caracterizado por interacciones entre estas tres clases de proteínas y los dos procesos fundamentales anteriores (Novak et al, 2007).

Las CDKs son proteínas de 34-40 kDa con actividad de cinasa específica de los residuos Serina/Treonina, la actividad de CDK es mediada por la unión de una proteína ciclina (Obaya y Sedivy, 2002). Las ciclinas activas en realidad se constituyen como heterodímeros donde la subunidad CDK efectúa la actividad catalítica y la subunidad ciclina efectúa la activación del complejo y su especificidad (Pinheiro y Sunkel, 2012). Además de la unión a su respectiva ciclina, la mayoría de las CDKs requiere la fosforilación en su llamado segmento de activación o loop T (Morgan, 2007; Pinheiro y Sunkel, 2012).

Las CDK pueden existir en un estado activo o inactivo. La transición entre ambos es controlada por la unión a Ciclinas y los CKIs, bien por procesos de fosforilación/defosforilación en su segmento de

activación. Las CDKs poseen múltiples sitios de fosforilación reconocidos por diferentes proteínas cinasas y estos pueden tener múltiples resultados combinatorios en su estado de activación (Morgan, 2007). Se sabe que en general la fosforilación en los residuos de Treonina 161 (Thr161), 160 (Thr160) o 172 (Thr172) son marcas de activación, mientras que en general la fosforilación de Thr14 y la Tirocina 15 (Tyr15) son inhibidores de la actividad cinasa de la subunidad CDK (Morgan, 2007; Malumbres et al, 2009).

En eucariontes unicelulares la actividad oscilatoria de CDK es efectuada sólo por un tipo de CDK: en *Schizosaccharomyces pombe* existe sólo una CDK, Cdc2 también conocida como p^{34cdc2} , mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* es Cdc28 también conocida como $p^{34cdc28}$; por otro lado en eucariontes multicelulares existen familias completas de CDKs que efectúan papeles diversos en las diferentes fases del ciclo; en mamíferos se conocen 10 diferentes clases de CDKs referidas como CDK1 a CDK10. (Morgan D., 2007; Satyanarayana y Kaldis, 2009), mientras que en plantas se observan 6 diferentes clases de familias de CDKs referidas desde CDKA;1 a CDKF;1, siendo las familias CDKB1 y CDKB2 las más abundantes (Gutiérrez C., 2009). Estas diferencias notables en el número de CDKs hablan por un lado de mecanismos de redundancia funcional de familias de CDKs en el caso de eucariontes multicelulares, como de múltiple funcionalidad para una sola CDK en el caso de eucariontes unicelulares, de ello discutiré en la última sección de este capítulo.

La activación de las CDKs es efectuada por una familia de CDKs activadoras de CDKs o CAKs, compuestas por una subunidad CDK y una ciclina que en el caso de mamíferos es la Ciclina de tipo H. Esta familia está presente eucariontes multicelulares particularmente, y su actividad parece ser constante a lo largo del ciclo. Al fosforilar los residuos Thr160, Thr161 o Thr172 estas proteínas permite un cambio conformacional en el loop T que junto a la unión de la subunidad ciclina permiten fijar una posición específica para los sustratos a fosforilar por el complejo activo (Morgan D., 2007).

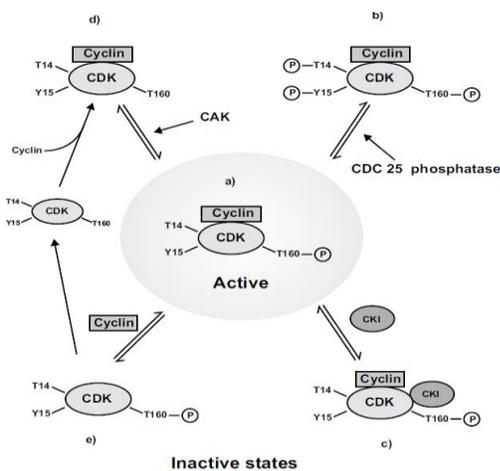


Figura 11. Mecanismos de activación/inactivación de la actividad de CDKs. La forma activa de la CDK en (a) asociada con su correspondiente ciclina; el residuo Thr160 de la CDK (o sus posiciones equivalentes) es fosforilado mientras que los residuos Thr14 y Tyr15 permanecen sin fosforilar. Así la transición a la inactivación sucede por la fosforilación de Thr14 o Tyr15 como en (b) o por la unión a un inhibidor de CDK (CKI) como en (c). Otra forma inactiva de CDK puede tenerse si el complejo CDK-Ciclina se forma pero los residuos Thr160 o sus correspondientes no se encuentran fosforilados como en d) Finalmente podemos tener un estado inactivo de CDK si esta no se une a su subunidad ciclina como en (e). (Tomado de: Morgan, 2007)

Por otro lado la inactivación mediante Thr15 y Tyr15 es un mecanismo antagónico de control característico de las transiciones de las diferentes fases. Se sabe que en *Schizosaccharomyces pombe* la cinasa Wee1 es responsable de estas fosforilaciones inactivadoras, mientras que en otros organismos se han encontrado proteínas homólogas a Wee1 lo que manifiesta su importancia evolutiva; particularmente durante la regulación de la actividad de las CDKs en fase M. Por ejemplo en mamíferos los complejos CDC2-Ciclinas B que inician la mitosis se mantienen inactivos hasta fase G2 debido a estas fosforilaciones sin embargo durante la transición G2/M son activados por acción de la fosfatasa CDC25 que elimina esas marcas y activa el complejo (Morgan D,2007).

Es decir, la activación e inhibición de las CDK está regulada por diferentes vías (Véase Figura 11), por un lado la unión a su subunidad ciclina que la activa y le da su especificidad, sin embargo si los residuos Thr160 o sus correspondientes del dominio de activación (loop T) no están fosforilados el heterodímero no es funcional, por otro lado la unión a CKIs inhibe su actividad; la fosforilación de los residuos Thr14 y Tyr15 mantiene inactiva a la CDK y aún en unión a su ciclina sólo la remoción de tal modificación postraduccional permitirá su activación.

Este parece ser un principio general de control de la actividad de las CDKs, si bien las cinasas/fosfatasas involucradas en cada uno de los grupos de eucariontes varía, lo importante como mecanismo general de control es la existencia de dos estados estables (activo-inactivo) cuyas transiciones son procesos reversibles, esto es, desde una perspectiva dinámica del control del ciclo, un punto a considerar al momento de establecer modelos booleanos como los que se analizan en el siguiente capítulo es la identificación de módulos funcionales de activación-inhibición de CDK en los circuitos regulatorios pues su estado es determinante en cada transición y definirá la dinámica global del sistema (Fauré y Thieffry, 2009).

La segunda clase de moléculas determinantes son las ciclinas. Originalmente definidas como proteínas que presentación una variación oscilatoria en su expresión durante el ciclo celular, las ciclinas son proteínas activadoras de cinasas de Serina/Treonina caracterizadas por un dominio de 100

aminoácidos llamado “caja de ciclina” que media su unión a CDKs, sin embargo, aún cuando su nombre deriva de la fluctuación en sus niveles de expresión a lo largo del ciclo, se ha observado que algunos miembros de la familia de ciclinas, particularmente en mamíferos, no oscilan en su expresión (Morgan D, 2007; Gopinathan *et al*, 2011).

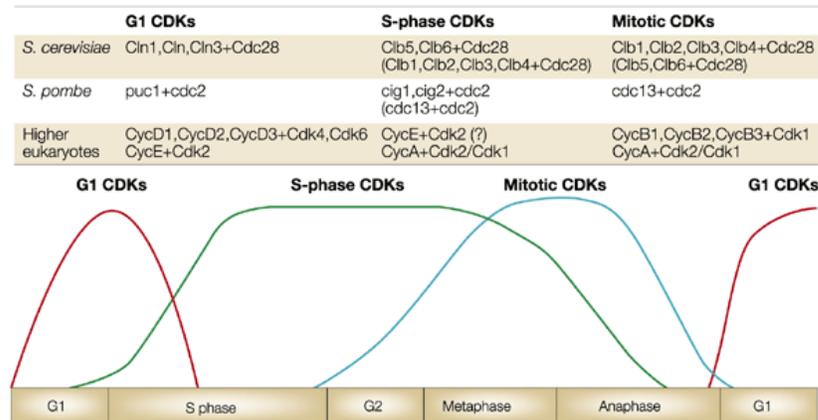


Figura 12. Ciclinas y CDKs características en las diferentes fases del ciclo celular. Se presentan las ciclinas características de cada fase del ciclo en levaduras y eucariontes multicelulares (mamíferos particularmente). (Tomado de Bardin y Amon. 2001)

La actividad de las ciclinas es primariamente modulada por cambios en sus niveles de expresión y por su degradación por proteólisis. Como participantes centrales en la regulación directa del ciclo celular, se ha optado por dividir las ciclinas en cuatro clases que corresponde a las fases características del ciclo celular, basado en el tiempo de su expresión como de su función dentro de ellas (Morgan D, 2007). Tres de las clases: ciclinas de la transición G1/S, de fase S y de fase M, están directamente involucradas en el control de los eventos del ciclo celular; la cuarta clase, las ciclinas de fase G1, por otro lado, contribuyen en el control de entrada al ciclo y en la respuesta a señales extracelulares (Lim y Kaldis *et al*, 2013).

Las ciclinas de clase G1/S tienen su mayor nivel de expresión durante fase G1 tardía y decaen hacia fase S temprana. La función primaria de estas ciclinas en complejo con las CDKs es permitir la progresión a lo largo del punto de control de inicio del ciclo e iniciar los procesos que permitirán la replicación del DNA o participando en otros eventos como la duplicación de los centrosomas en el caso de vertebrados o de los cuerpos polares en levaduras. Paralelamente, las ciclinas de fase S comienzan a expresarse teniendo sus máximos niveles en fase S temprana estimulando la replicación del DNA. Los niveles de ciclinas S permanecen altos durante toda la fase S, G2 y la mitosis temprana. Las ciclinas de fase M aparecen tarde en la secuencia temporal de expresión, su concentración aumenta conforme el ciclo transita hacia la mitosis teniendo su pico máximo de expresión en la metafase, siendo responsables

del ensamble del huso mitótico y el alineamiento de las cromátidas hermanas a este durante la metafase, mientras que su baja expresión durante la anafase lo que permite la salida de mitosis y la citocinesis. Finalmente las ciclinas de G1, ayudan a coordinar el crecimiento celular y son necesarias para la entrada al ciclo celular, siendo algo muy característico que parece no presentar patrones oscilatorios de expresión, pero incrementan gradualmente en respuesta a señales extracelulares como factores de crecimiento u hormonas (Véase Figura 12) (Morgan D, 2007)

La clasificación anterior corresponde a lo clásicamente observado en levaduras y vertebrados, y aun cuando es útil para entender la regulación del ciclo a lo largo de las diferentes clases, no es universalmente aplicable a todos los eucariontes, puesto que se ha observado que una misma ciclina puede tener diferentes funciones o picos de expresión en diferentes tipos celulares en el caso de los eucariontes multicelulares, de ello se discutirá más adelante.

La tercera clase de proteínas determinate en el control del ciclo celular la constituyen los inhibidores de CDK (CKI), que se unen a los complejos CDK-Ciclina, inactivándolos y arretando el ciclo, particularmente durante la fase G1, en repuesta a condiciones ambientales no favorables o señales intracelulares como daño al DNA (Gopinathan *et al*, 2011).

Especie	Nombre	Nombre Alternativo	Proteinas relativas	Función
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sic1	--	Rum1	Inhibe los complejos CDK-ciclina de fases S y M en fase G1
	Far1	--	--	Inhibe los complejos CDK-ciclina de la transición G1/S en respuesta a feromonas
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Rum1	---	Sic1	Inhibe los complejos CDK-ciclina de las fases S y M
<i>Xenopus laevis</i>	Xic1	Kix1	Cip/Kip	Inhibe los complejos CDK-ciclina de G1/S y Fase S
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KRP1	ICK1	Kip	Interactúan con las Ciclinas D en plantas inhibiendo los complejos CYCD-CDKA, bloqueando la entrada a mitosis.
	KRP2	ICK2	Kip	Bloquea la transición G1/S e inhibe específicamente la CDKA1
	SIM	SIAMESE	KRP/ICK	Interactúa con las ciclinas D (CYCD2;1, CYCD3;2 y CYCD4;1)
<i>Homo sapiens</i>	p21	Cip1/Waf1	Cip/Kip	Activa la ciclina D, inhibe ls complejos CDK-ciclina en G1/S y fase S
	p27	Kip1	Cip/Kip	Activa el complejo Cdk4-Ciclina D, inhibe ls complejos CDK-ciclina en G1/S y fase S
	p15	--	INK4	Inhibe a Cdk4 y Cdk6

Figura 13. Tabla de inhibidores de CDK en diferentes eucariontes. Se presentan aquí los datos de los CKIs en diferentes eucariontes y las proteínas a las que se relacionan. (Tabla con datos de Morgan D, 2007 y Gutierrez G, 2009).

La mayoría de los eucariontes poseen CKIs que contribuyen a establecer una fase G1 estable, si bien en términos generales estas proteínas parecen no tener muchas secuencias conservadas, comparten muchas características funcionales (Morgan D, 2007). Primero, son importantes inhibidores de los complejos CDK-Ciclina de las fases S y M, por lo que están expresados en altos niveles durante G1 para inhibir la actividad de tales complejos. Segundo, estas proteínas no inhiben los complejos CDK-Ciclina de fase G1/S, por lo que no actúan como reguladores negativos de tal punto de control. Finalmente, estos inhibidores son fosforilados por CDKs, así en fase G1 tardía, la actividad de los complejos CDK-Ciclina de la transición G1/S permite su degradación mediante fosforilación permitiendo la activación de los complejos de fase S (Carneiro y Koff, 2003; Morgan D, 2007). En la Tabla 1 se presentan los respectivos inhibidores de CDK en *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, mamíferos y *Arabidopsis thaliana*.

La regulación del ciclo celular también está íntimamente relacionada con los procesos de proteólisis específica en las diferentes fases del ciclo, así la transición de una fase a otra debe ser unidireccional e irreversible. En parte, esto se logra mediante procesos todos o nada que permiten la irreversible activación de la actividad de las CDKs, esta irreversibilidad es lograda mediante la degradación proteolítica de las proteínas regulatorias. La proteólisis es particularmente crítica en la transición de metafase-anafase donde las cromátidas hermanas deben separar y la salida del mitosis es lograda mediante la degradación de las ciclinas mitóticas y otras como las cohesinas (Malumbres y Barbacid, 2009).

La vía ubiquitin proteasoma es fundamental en la actividad del ciclo al limitar la disponibilidad de sus proteínas regulatorias. En tal caso, la actividad de las proteínas ubiquitina es determinante en el proceso de oscilación característica, puesto que al tratarse de un proceso irreversible desde el punto de vista termodinámico, canaliza el ciclo en una dirección por lo que en cada nuevo ciclo se requiere la síntesis de nuevos reguladores (Malumbres y Barbacid, 2009; Vodermaier H.C., 2004).

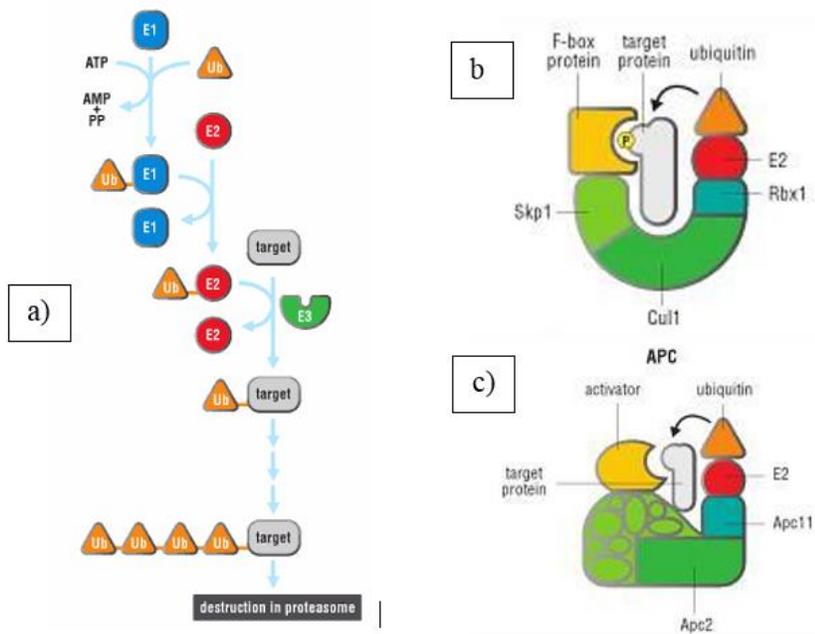


Figura 13. Diagrama de la vía ubiquitina-proteasoma y de los complejos SCF y APC.

La degradación se da mediante la proteína ubiquitina, una de las principales vías de control proteolítico del ciclo celular eucariote; así mediante una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada que se une a proteínas blanco formando cadenas largas reconocidas por el complejo 26S proteosoma, se degradan muchas proteínas incluidas reguladores positivos y negativos del ciclo celular. Para ello es necesaria la actividad de tres clases de enzimas: una enzima activadora de ubiquitina (E1), una ubiquitina conjugante (E2) y una ubiquitina ligasa (E3), quienes en conjunto marcan a un residuo de Lisina de la proteína blanco, particularmente en posiciones K48 o K11 mediante el reconocimiento sitio-específico de la enzima E3 (Kin, 2008) permitiendo su degradación; así E3 es un factor limitante en la vía (Van Leuken, 2008; ver Figura 13).

En función de su motivo estructural, las E3 se clasifican en cuatro familias: tipo HECT, RING-finger, U-Box y PHD-finger. Particularmente la familia RING-finger es la más grande y contiene a su vez a subfamilias, una de ellas es la familia basada en Culinas que incluye a dos complejos determinantes: uno es SKP1/CUL1/F-Box (SCF) y otro es el complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C), mismas que constituyen las principales enzimas E3 que degradan a los reguladores del ciclo celular en eucariontes (Nakayama, 2006).

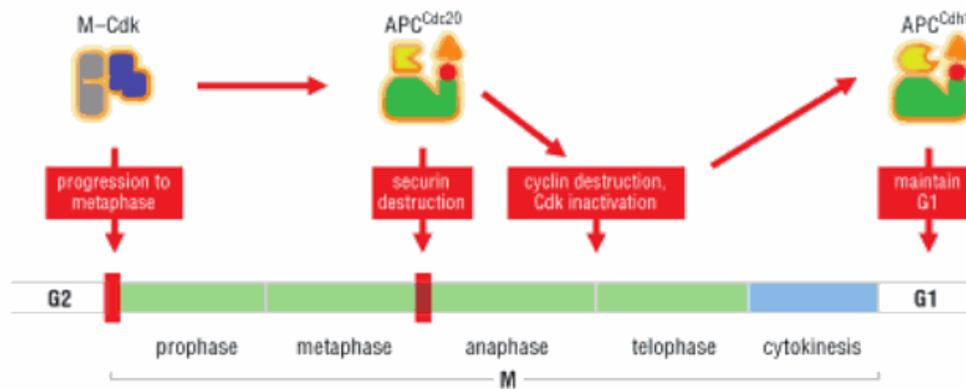


Figura 14. Actividad del complejo APC a lo largo del ciclo celular. Los complejos CDK-Ciclinas de fase M promueven los eventos de mitosis temprana, resultando en el alineamiento de las cromatidas hermanas en huso, al mismo tiempo esto compuesto promueven la activación de Cdc20, que lleva el ciclo hacia la anafase y la salida de mitosis mediante la degradación de la proteína securina y las ciclinas de fase M, en una retroalimentación negativa. La inactivación de las ciclinas M, permite por otro lado hacia el final de la mitosis la activación de Cdh1 lo que permite la inactivación de los complejos de fase S y M, manteniendo la célula en fase G1 hasta la activación de los complejos de la transición G1/S. (Tomado de Morgan D., 2007)

La actividad del complejo SCF está determinada por la subunidad proteica F-box, que le da la especificidad mediante el reconocimiento específico de blancos que han sido marcados previamente por fosforilación, particularmente por la actividad de complejos CDK-Ciclina.

Por otro lado, el complejo promotor de la anafase (APC) se encarga de la regulación de la transición de la metafase a la anafase, si bien el complejo cataliza la ubiquitinación de muchas proteínas, dos sustratos en particular son importantes: por un lado la proteína securina que promueve la liberación de la proteasa separasa que permite la separación de las cromatidas hermanas, por otro lado a las ciclinas de fase S y M, permitiendo la mitosis y la citocinesis. (Vodermaier H.C., 2004). El complejo es regulado por un conjunto de proteínas activadoras que se unen a este en diferentes fases del ciclo. Estas proteínas activadoras son Cdc20 y Cdh1 en *S. cerevisiae*, Slp1 y Ste9 en *S. pombe*, p55/Cdc20 y Cdh1 en mamíferos, CDC20.1 y CCS52A1/CCS52A2/CCS52B en *Arabidopsis* (Morgan D., 2007). En términos generales, Cdc20 (y sus homólogos) activan al complejo APC en transición metafase-anafase iniciando la salida de mitosis. Cdh1 (y sus homólogos) entonces activa al complejo en fase M tardía manteniéndose activa hasta fase G1 temprana manteniendo la proteólisis de las ciclinas hasta que el ciclo celular inicie de nuevo (véase la figura 14)

Los anteriores componentes regulatorios son los más comunes en las redes de control del ciclo celular en eucariontes, sin embargo, aun cuando entre los diversos organismos modelo eucariontes

muchos componentes esta compartidos, existe una interesante variación entre el tipo y número de estos involucrados en el control del ciclo celular, lo que plantea preguntas interesantes en torno a la evolución de las redes de control del ciclo celular, en particular, se ha propuesto que más que los elementos conservados es la topología de la red y sus propiedades dinámicas asociadas las que han sido conservadas en la evolución (Cross *et al*, 2011). Para extender estas ideas y poder analizar las redes de control en diferentes eucariontes, en las siguientes secciones se describirán los mecanismos de control en eucariontes unicelulares, animales y plantas, y al final de este capítulo, se discutirá comparativamente las escalas y procesos dinámicos importantes en el control del ciclo celular.

2.2 Ciclo celular en eucariontes unicelulares

El control del ciclo celular en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son los mejor descritos de todos los eucariontes. Los estudios en tales organismos han permitido determinar mecanismos de control comunes y extender algunas ideas sobre las posibles rutas de control existentes en eucariontes multicelulares. El uso de estas levaduras como sistema modelo para el estudio del ciclo celular provee un número importante de ventajas: se trata de organismos unicelulares, de rápida división y capaces de crecer en estado haploide (Fantes *et al*, 2000; Oliva *et al*, 2005).

Aun cuando ambas especies son evolutivamente divergentes, existen rutas comunes de control entre las fases características del ciclo y un notable grado de conservación entre las moléculas de control, particularmente la existencia de mecanismos antagónicos entre cinasas y fosfatasa que determinan el paso en las transiciones G1/S y G2/M. En ese sentido las aproximaciones de la genética clásica así como los estudios con técnicas de análisis masivo mediante genómica y proteómica, junto un análisis a nivel sistema de las interacciones entre los reguladores es necesario para caracterizar a profundidad las escalas y eventos regulatorios comunes en eucariontes unicelulares (Nurse P, 2003; Novak *et al*, 2010)

Dicho lo anterior, aquí se presentaran brevemente las rutas determinantes en el control del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) y *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), analizando los mecanismos de control de los complejos Ciclina/CDK, de los patrones de expresión de Ciclinas, de la actividad de los inhibidores de CDK así como las rutas de degradación clásicas de complejos proteicos mediante la ruta APC-Proteosoma, finalmente estableciendo ideas básicas sobre la importancia de la regulación multiescala en las transiciones G1/S y G2/M; una revisión más extensa puede verse en el trabajo de Rupes (Rupes, 2002) y Bahler (Bahler, 2005)

En *S. cerevisiae* existe un punto a la mitad de la fase G1 en el que la célula es irreversiblemente comprometida a entrar al ciclo mitótico, tal punto es referido como el *Inicio*. El Inicio está relacionado a mecanismos de control del tamaño celular, así las células cuyo tamaño no sobrepasa un cierto límite no pueden progresar ese punto; antes de este punto, que corresponde a una fase G1 temprana, las células dependen de la presencia de señales ambientales, particularmente nutrientes; en caso de no existir los nutrimentos necesarios la célula entra en un estado estacionario, bien la célula pasa a través de G1 y se ve retrasado en alguna de las fases posteriores o bien en ciclos posteriores (Nasmyth 1993: Mendenhall y Hodge 1998). Una vez cruzado el punto de Inicio las células están irreversiblemente programadas a completar el ciclo independientemente de las condiciones ambientales (Barik et al, 2010).

Desde un punto de vista funcional, son tres los eventos que definen la entrada a mitosis en los eucariontes: la formación del uso mitótico, la ruptura de la envoltura nuclear y la condensación de los cromosomas; sin embargo *S. cerevisiae* y *S. pombe* presentan una mitosis cerrada, es decir, su envoltura nuclear permanece intacta; por otro lado en *S. cerevisiae* la formación del uso mitótico no se da en fase S como en los demás eucariontes lo que supone difícil distinguir entre las fases G2 y M. En *S. pombe* las fases G1 y S son cortas mientras que G2 es larga conteniendo en sí la mayor parte del crecimiento celular, el punto de control de Inicio parece depender de una masa crítica y de la correcta mitosis en un ciclo previo. Sin embargo parece aún más importante la regulación del punto de control en la transición G2/M, (obsérvese la Figura 18) (Lew et al, 1997; De Souza y Osmani, 2007)

A nivel estructural, el ciclo celular en ambas levaduras está determinado por la expresión en las transiciones G1/S y G2/M de una sola CDK altamente conservada codificada por los genes CDC28 y Cdc2⁺, en *S. cerevisiae* y *S. pombe* respectivamente. Funcionalmente estas CDK fosforilan residuos de Serina o Treonina que son seguidos por una Prolina y una secuencia consenso de K/R, S/T, P, X, K/R donde X puede ser cualquier aminoácido (Lew et al, 1997).

Como se mencionó en la sección anterior, la actividad de las CDKs es mediada por la unión a una ciclina para formar el complejo activo en alguna fase particular del ciclo. Se han caracterizado varias ciclinas características de las diferentes del ciclo en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, se resumen estos componentes en la Tabla 2.

En *S. pombe*, la Cdc2 es fosforilada en su residuo Thr167, sitio que corresponde a la Thr169 de *S. cerevisiae* y a la Thr161 de Cdk1 en mamíferos, tal modificación es necesaria para la activación de su dominio cinasa. Tal proceso es efectuado por CAK, particularmente *S. pombe* tiene dos cinasas activadores parcialmente redundantes en función, Mcs4/Mcs2 y Csk1 (Kaldis P, 1999)

Fase	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
	Ciclínas		Inhibidores		CDK	
G1	Cln1, Cln2, Cln3	Cig1, Cig2	Far1	Rum1	Cdc28	Cdc2
S	Clb5 y Clb6 en Fase temprana Clb3 y Clb4 en fase tardía.	Cig1, Puc1	Sic1			
G2	Clb1 y Clb2 en fase temprana	Cdc13	Sic1			
M	Clb2	Cdc13	Cdc6			

Tabla 2. Moléculas de control en las fases del ciclo celular de las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*. (Tabla propia con información de: Matsuoka, 2002; Humprey y Pearce, 2005).

Un proceso determinante en la regulación del ciclo celular en *S. pombe* es la activación del complejo Cdc13/Cdc2 mediante la desfosforilación del residuo Tirosina15 de la subunidad Cdc2, proceso efectuado por la fosfatasa Cdc25. En general para los complejos CiclinasB/Cdc2, la fosforilación del residuo Y15 es efectuada por las tirosina-quinasas Wee1 y Mik1, por lo que antagonizan notablemente con Cdc25 (Moser y Russell, 2000).

Wee1 es regulada por el complejo Nim1/Cdr fosforilandola promoviendo la mitosis, mientras que Cdc25 la inhibe (Moser y Russell, 2000). Adicionalmente Cdc25 tiene una alta regulación traduccional (Daga y Jimenez, 1999). Así los picos máximos de Cdc2 fosforilada en Y15 (Cdc2-Y15) se observan en fase G2 tardía y el inicio de la fase M (Nurse P, 2012).

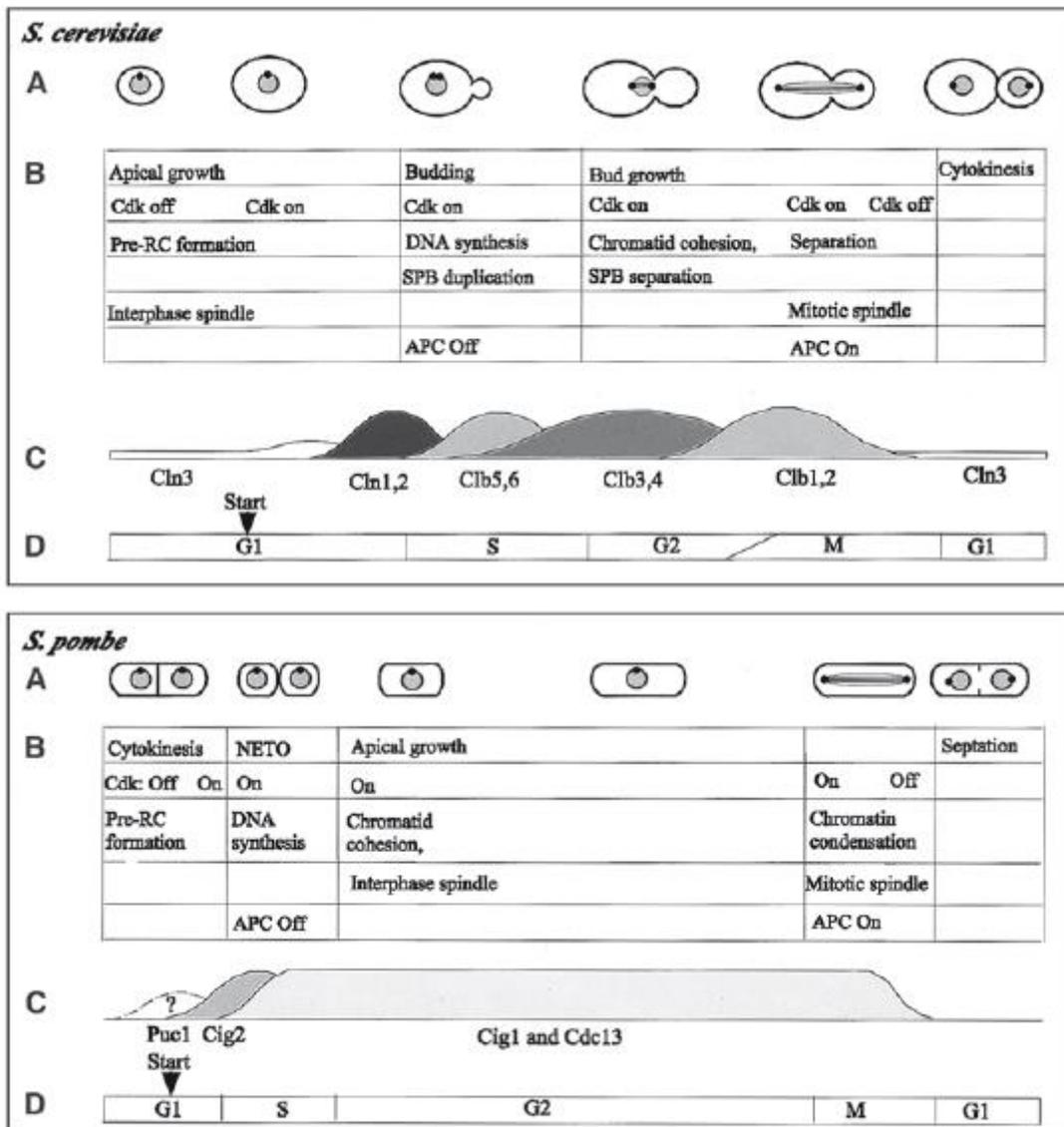


Figura 15. Eventos del ciclo celular en las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae*. En A) Se esquematiza el desarrollo celular durante el ciclo; B) muestra cada una de las etapas y el estado característico a nivel celular, por otro lado los eventos moléculas clave de cada caso; C) Muestra los patrones de expresión de las ciclinas características de cada fase y en D) Se ejemplifica la duración de las fases en cada organismo. (Tomado de: Humphrey y Pearce, 2005)

El segundo proceso notable es la regulación de la actividad de los complejos Ciclina/CDK mediante los CKI. En *S. cerevisiae*, existen 3 inhibidores: Far1, Sic1 y Cdc6. Far1 inhibe la formación de los complejos Cln/Cdc28, mientras que Sic1 a los complejos Clb/Cdc28 que son característicos de fase G2; sin embargo parece que Far1 solo es activa en respuesta a Feromonas durante la fase G1, mismas que promueven la rápida salida de la transición G1/S (Peter y Herskowitz, 1994). Finalmente Sic1 ha sido reportada en unión con Cdc28, coordinando las transiciones G1/S y G2/M, en fase G1, Sic1 es activa

inhibiendo a las Clbs; en fase S, Sic1 es degradada mediante la fosforilación de Cln/Cdc2 por el complejo SCF, y tarde en fase M, Sic1 es desfosforilada por la fosfatasa Cdc14, inhibiendo a Cdc28/Clb2 promoviendo la mitosis (Schneider et al, 1996).

En *S. pombe*, Rim1 es un inhibidor específico de Cig2/Cdc2 y Cdc13/Cdc2 comportándose de forma análoga a Sic1, inhibiendo en fase G1 a Cdc2 por unión inhibitoria, la pérdida de Rum1 resulta en entrada anticipada a fase M desde G1. Además Rum1 parece no solo unirse al complejo Cdc2/Cdc13, sino a Cdc13 marcándola para su proteólisis. (Martin-Castellanos y Moreno, 1996)

Estos mecanismos regulan los patrones de expresión de los complejos Ciclina/CDK, sin embargo la regulación de los patrones de expresión de las ciclinas características de cada fase es un tercer mecanismo que regula las diversas transiciones. Se sabe que el principal mecanismo es la regulación a nivel transcripcional, en el caso de *S. cerevisiae* dos factores transcripcionales son determinantes: SBF y MBF. SBF (Factor de Unión a SCB), reconoce elementos SCB (caja de ciclo celular Swi4/Swi6) y está conformado por las proteínas Swi4 y Swi6; MBF (Factor de unión a MCB), reconoce elementos MCB (caja de ciclo celular M1uI) y se conforma por las proteínas Mbp1 y Swi6. Su principal función es modular genes de ciclinas y algunos otros requeridos para la síntesis de DNA (Breden, 1996) importantes en fase S.

Se sabe que los patrones de expresión de las ciclinas Cln1 y Cln2 de *S. cerevisiae* alcanzan su máximo en fase G1 tardía por lo que son responsables del punto de INICIO, en el caso de Cln3, si bien es menos abundante que Cln1/2, se mantiene presente a lo largo del ciclo, además los complejos Cln3/Cdc28 activan a SBF y MBF dirigiendo la expresión de Cln1 y Cln2, lo que lleva a la activación de los complejos Clb/Cdc28 (Lew et al, 1997). Por su parte las ciclinas Clb5 y Clb6 son requeridas para la fase S, ambas son reguladas vía MBF que es activado por Cln3/Cdc28 en fase G1 tardía, si bien una vez expresadas estas ciclinas pueden formar los complejos Clb/Cdc28, estos permanecen inactivos por la vía de Sic1, pero solo en fase S mediante los complejos Cln/Cdc28 son activados mediante su fosforilación y posterior degradación de Sic1, así los complejos Clb5/Cdc28 y Clb6/Cdc28 inactiva al complejo de pre-replicación inhibiendo una segunda ronda de replicación de DNA (Jorgensen et al, 2002)

Finalmente las ciclinas mitóticas Clb3 y Clb4 son activadas en fase S gracias a los complejos Clb5-6/Cdc28, y son requeridas para la separación del complejo SBF, iniciando así la inactivación de los componentes de G1, por otro lado Clb1 y Clb2 son expresados en fase G2 temprana y son requeridas para el inicio de la anafase. Así los complejos Clb2/Cdc28 inhiben por completo la ruta SBF, inactivando por completo la actividad de las moléculas de fase G1 mediante un asa de retroalimentación negativa

(Futcher, 1996). Así al final para la entrada a fase M, los niveles de Sic1 aumentan gracias a la inactivación de los complejos de G1 (Clb5 y Clb6 en particular) así como Clb2 de G2 por la misma vía, lo que favorece la degradación del uso mitótico y la salida de mitosis. (Lew *et al*, 1997; Futcher, 1996)

En *S. pombe*, los complejos Cdc10-Res1/Sct1 parecen tener un comportamiento similar al de MBF en *S. cerevisiae*, manteniendo el INICIO. Se sabe para el tránsito por este punto los complejos Cig2/Cdc2 son determinantes, sin embargo el efecto del inhibidor de CDKA Rum1 se hace notable en fase G1 tardía disminuyendo los niveles de Cig2/Cdc2 (Martin-Castellanos y Moreno, 1996); para la entrada a fase S Rum1 debe ser degradado mediante los complejos Cig2/Cdc2 y Puc1/Cdc2 (Martin-Castellanos *et al*, 2000), así Cig2 es la ciclina característica de fase S, sin embargo sus niveles son regulados por la vía Cdc10-Res1/Sct1 al tiempo que Cig2 inhibe ese mismo complejo, es decir, Cig2 se auto inhibe por la vía análoga a MBF (Ayte *et al*, 2001).

Por otro lado la ciclina Cdc13 es la ciclina de tipo B expresada en fase S y requerida hasta fase M, durante fase S los complejos Cdc13/Cdc2 son inhibidos por la degradación de Cdc13 y la inhibición de por Rum1; ya durante fase G2 la actividad de Cdc13/Cdc2 es plena inhibiendo nuevamente la replicación del DNA mediante su unión a los orígenes de replicación, así las ciclinas mitóticas Cdc13 y Cig1 se mantienen hasta fase G1 durante el punto INICIO donde son degradadas (Wuarin *et al*, 2002; Blanco *et al*, 2001).

La regulación proteolítica se efectúa por los complejos APC y SCF en ambas levaduras. El complejo APC es codificado por 12 genes en *S. cerevisiae* y 7 en *S. pombe* (Zachariae y Nasmyth, 1999). En las levaduras, APC comienza a ser activo en fase M y persiste hasta antes del INICIO en la fase G1 siguiente, tal actividad es mediada por activadores específicos: Cdc20 y Cdh1/Hct1 en *S. cerevisiae*, Slp1 y Ste9 en *S. pombe*, funcionando como marcadores para diferentes sustratos del complejo APC. Se sabe que la activación de Cdc20 es controlada por los complejos Clb/Cdc28 que directamente la fosforilan, mientras que la fosforilación dependiente de Cdc28 inhibe a Cdh1 previniendo su unión a APC antes de que la anafase es completada. La fosforilación de Cdh1 es removida por la fosfatasa Cdc14, la actividad de APC mediada por Cdh1 permanece hasta la fase S previniendo la expresión prematura de Cdc20; interesantemente Cdc14 parece estar activada por una red de control de salida mitótica similar a la propuesta en otros organismos (Huang *et al*, 2001, Sharad *et al*, 2011).

El papel fundamental de APC es la inhibición de la actividad de CDK para la salida de mitosis mediante la destrucción de las ciclinas mitóticas. La destrucción de las ciclinas mitóticas puede ser efectuada tanto por Cdc20 como por Cdh1/Hct1, sin embargo es interesante apuntar que la actividad de

Cdc20 es ciclo-dependiente por lo que tarde en la mitosis es destruido (Schwab *et al*, 2001; Wasch y Cross, 2002). El ortólogo de Cdh1 en *S. pombe*, Srw/Ste9, funcionando de forma similar, promueve la degradación de las ciclinas mitóticas en G1 sin embargo es negativamente regulada mediante fosforilación dependiente de Cdc2. Cdh1 junto con Sic1 (como Ste9 y Rum1) generan una caída rápida en Cdc28 y Cdc2, respectivamente para la salida de mitosis en fase M y el inicio del siguiente ciclo (Yamaguchi *et al*, 2001). Para una visión gráfica de los eventos anteriores véase la figura 16.

De lo anterior es claro que dos procesos son destacables en la regulación del ciclo celular en eucariontes unicelulares: a) una alta regulación postraducciona l y b) La existencia de mecanismos de retroalimentación entre los complejos moleculares. Un mecanismo sugerido para generar las oscilaciones características del ciclo celular es la existencia de motivos regulatorios positivos y negativos, particularmente asas de retroalimentación entre grupos de ciclinas (Ferrell *et al*, 2011). Se sabe por ejemplo que en la transición G1/S las ciclinas características de G1 activan positivamente la expresión de las ciclinas de fase S (Clb) y estas reprimen a las de G1 en fase S temprana, mientras que las ciclinas mitóticas activan al complejo promotor de la anafase (APC) que a su vez promueve su degradación, estableciendo algunos de los circuitos bioquímicos característicos que generan comportamientos oscilatorios (Tyson y Novak, 2010), sobre ello se discutirá en el capítulo 4 de este trabajo.

2.3 Ciclo celular en animales: el caso particular de los mamíferos

El modelo básico de regulación del ciclo celular ha sido establecido gracias a los estudios pioneros en levaduras como ya se describió en la sección 2.2 de este capítulo, sin embargo estudios en animales, mamíferos en particular, han demostrado un aumento en el número y tipo de complejos CDK-Ciclina a lo largo de la progresión del ciclo celular, sin embargo un número pequeño de ellos parece en realidad efectuar los procesos regulatorios básicos entre las fases, por lo que no queda claro en qué sentido el aumento en el número de elementos regulatorios es una consecuencia de la transición a la multicelularidad (Malumbres y Barbacid, 2005).

El modelo clásico de regulación del ciclo celular en mamíferos establece que complejos específicos de CDKs-Ciclinas son responsables de los eventos conocidos entre la Interfase a la fase M en una forma ordenada (Malumbres y Barbacid, 2009). Muchas preguntas quedan por resolver acerca de los mecanismos de control del ciclo celular en mamíferos, por ejemplo aún no es claro si existen mecanismos de control dependientes del tamaño celular durante la fase G1, ciertamente se ha

generalizado que este podría no ser un mecanismo propio de las células animales dada la variación en tipos celulares no así en la conservación de la transición entre fase G1 y S (Colon y Raff, 2003).

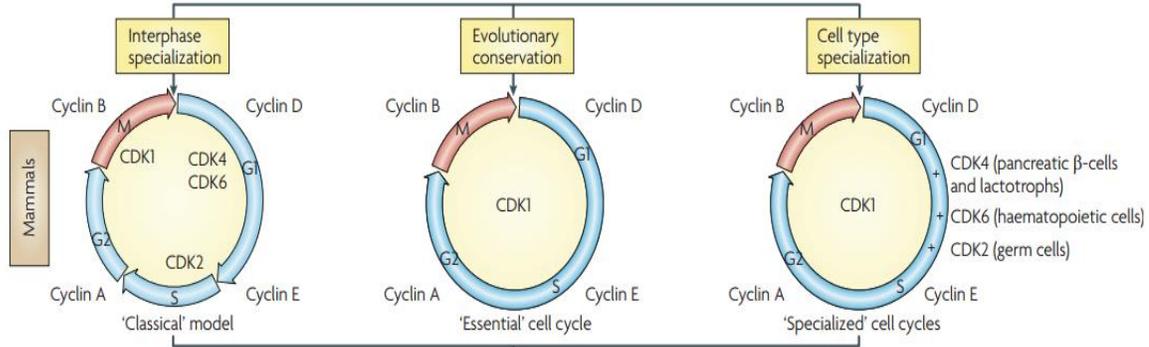


Figura 17. Diversidad de CDKs en mamíferos y los contextos celulares en los que se han descrito. Se ha sugerido que la diversidad de CDKs en el ciclo celular de mamíferos resulta de la necesidad de regular diferentes tipos celulares, sin embargo la idea central es que CDK1 es capaz de regular por sí sola los eventos esenciales del ciclo celular en la mayor parte de los tipos celulares de mamíferos (Tomado de: Santamaria, 2007)

Por otro lado se sabe que en la mayor parte de los tipos celulares de mamíferos se expresan al menos cinco de las diez CDKs descritas: CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6. Así CDK4 y CDK6 regulan el paso por la fase G1, CDK2 regula la entrada y progresión por la fase S y finalmente CDK1 es necesaria para la entrada a fase M (Malumbres y Barbacid, 2005). Lo interesante a matizar es que la existencia de múltiples CDKs parece obedecer a una redundancia de tipo funcional puesto que se ha observado que por sí sola CDK1 es suficiente para la regulación del ciclo celular básico mientras que las otras CDKs son más bien necesarias para la regulación del ciclo en cierto tipos celulares cuyas fases tienen alteraciones en su duración (Vease Figura 17) (Santamaria, 2007).

Una vista rápida de los complejos regulatorios muestra que en general en mamíferos se observan cuatro grupos de ciclinas importantes: por un lado las ciclinas características de fase G1 son las ciclinas de tipo D (CycD1, CycD2, CycD3) que se unen a las CDK4 y CDK6 promoviendo el paso del punto de restricción en G1; las ciclinas de la transición G1/S ejemplificadas por las ciclinas de tipo E (CycE) que en general se asocian a CDK2 y su actividad está relacionada con la iniciación de la replicación de DNA; las ciclinas características de fase S que permiten la progresión son las ciclinas de tipo A (CycA) que se asocian en particular con CDK2 y CDK1; finalmente las ciclinas mitóticas responsables de la mitosis son las ciclinas de tipo A (CycA) y principalmente las de tipo B (CycB) en asociación con CDK1 (Véase Figura 18) (Bardin, 2001; Satyanarayana y Kaldis, 2009)

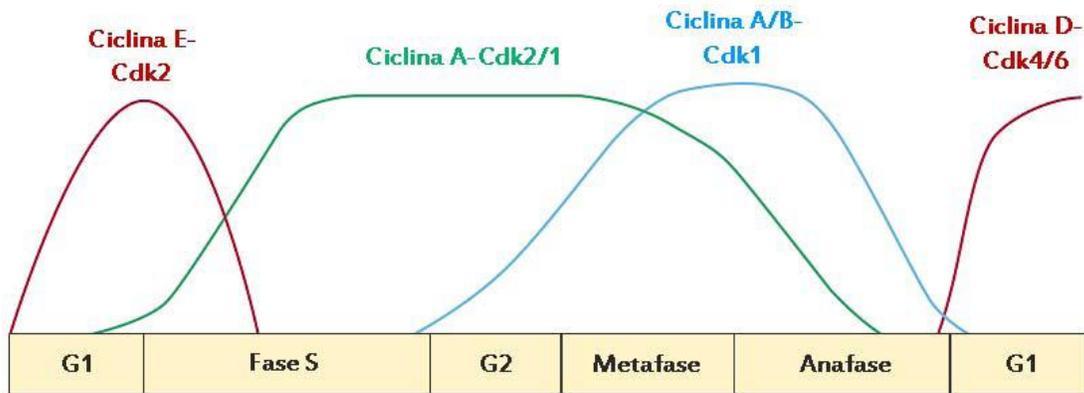


Figura 18. Complejos CDK-Ciclina característicos en las fases del ciclo celular en mamíferos. Conforme el ciclo celular progresa por las diversas fases, se observan fluctuaciones en los complejos de CDK-Ciclina. Los complejos de G1 en rojo, S en verde y G2 en azul permiten la progresión y transición entre cada fase. Los complejos CycE-CDK2 son necesarios en G1 y G1/S, CycA-CDK2/1 desde fase G1 tardía y con máximos en Fase S, G2 y el comienzo de la anafase; la actividad de las CycA/B-CDK1 es suficiente y necesaria para la entrada a mitosis (Tomado de: Bardin, 2001)

Los reguladores negativos de la actividad de las CDKs determinan en gran medida los perfiles oscilatorios CDK-Ciclina observados en las diversas fases del ciclo en mamíferos. Por un lado los CKIs juegan un papel preponderante en la regulación del ciclo en mamíferos, de hecho se sabe que dos familias de CKIs son responsables de la mayor parte de las regulaciones negativas sobre los complejos CDK-Ciclina entre las diferentes fases. Así la familia INK que se compone de $p15^{Ink4b}$, $p16^{Ink4}$, $p18^{Ink4c}$, y $p19^{Ink4d}$, se caracteriza por la presencia de dominios de ankirina que les confiere la capacidad de inhibición específica de las cinasas CDK4 y CDK6; mientras que la familia CIP/KIP con los miembros $p21^{Cip/WAF1}$, $p27^{Kip1}$ y $p57^{Kip2}$, son de mucho más amplia interacción formando complejos heterotriméricos particularmente fuertes con los complejos CDK2-CycE, CDK2-CycA, CDK1-CycA, CDK1-CycB y CDK4-CycDs junto a CDK6-CycDs. Sin embargo ambas familias parecen tener un dominio común en la región amino terminal que interactúa con los complejos CDK/ciclina mientras que la región carboxilo terminal es más bien variable y su papel funcional en la regulación de los complejos CDK no está clara (Bardin, 2001; Malumbres y Barbacid, 2005).

Además, se sabe que tanto p21 como p27 a niveles normales promueven la formación de los complejos CDK4/CycD y CDK6/CycD, mientras que su sobreexpresión inhibe su formación, por lo que se ha propuesto que los complejos CDK4/CycD y CDK6/CycD secuestran a p27 en particular alejándolos de su unión a CDK2/CycE y CDK2/CycA, facilitando la transición por G1/S (Reed, 2002). Por otro lado se ha sugerido que p27 es un regulador negativo maestro de los estados G0 y G1, siendo su regulación primariamente por la vía ubiquitina-proteosoma, su papel en G1 parece estar más ligado al paso del punto de control en esa fase (Slingerland y Pagano, 2000). Sin embargo parece ser que la regulación de p27 es

más fina, por un lado se sabe que la fosforilación de la treonina 187 mediada por el complejo CDK2/CycE permite el reconocimiento por el complejo SCF y su degradación; sin embargo si p27 se encuentra en el núcleo inhibe a CDK2/CycE y solo una fracción de p27 es degradada. Así en principio, p27 parece ser un importante regulador de la proliferación celular y el paso hacia diferenciación (Bloom y Pagano, 2003).

De particular importancia en la regulación del ciclo en mamíferos es la llamada vía E2F-Rb. Se sabe que la familia de factores transcripcionales E2F es importante en la transición G1/S al regular positiva y negativamente varios blancos del ciclo celular, en particular se ha descrito que CycD en unión a CDK4/6 regula la progresión por la fase G1, tal paso es permitido mediante la fosforilación de la proteínas retinoblastoma (pRb), así como resultado, los complejos pRb-E2F son inhibidos y los factores E2F liberados. Estos permanecen unidos como heterodímeros con las proteínas DP1 y DP2 exhibiendo su actividad transcripcional (DeGregori y Johnson, 2006). Los complejos CDK4-CycD y CDK6-CycD son capaces de fosforilar a pRb en fase G1 temprana, mientras que ya hacia fase G1 tardía los niveles de CDK2-CycE aumentan debido a la liberación de algunos E2F y el complejo es capaz de fosforilar a pRb inactivándola por completo aumentando así los niveles de E2F manteniendo además los niveles de pRb en su estado hiperfosforilado. De la misma forma CDK2-CycA puede fosforilar a pRb activando a los heterodímeros E2F-DP1/2, siendo CycA en parte regulada por E2F asegurando la transición por fase S, sin embargo algunos miembros de la familia E2F son negativamente regulados por CycA-CDK1 mediante la inhibición de los complejos E2F-Dp1/2. Así mientras CycE regula positivamente la actividad de E2F, CycA participa en un asa de retroalimentación negativa hacia E2F (Livia y Jansen-Dürr, 1999; Chen et al, 2009)

Tal es la importancia de esta vía de control que se ha sugerido como un mecanismo de control biestable durante el paso a fase S. Se ha demostrado experimental y matemáticamente que la vía convierte señales proliferativas extracelulares de respuestas “todo o nada” para la activación de E2F: así una vez activado E2F este permanece activo aún cuando las señales proliferativas, particularmente de ciclinas, han disminuido permitiendo el paso irreversible del punto de restricción en G1/S (Yao et al, 2011)

Como ya se describió en la sección 2.1 de este capítulo, una importante ruta de control es la degradación proteolítica de los reguladores del ciclo celular mediante la vía ubiquitina-proteosoma. Se considera en general que SCF es activo durante todo el ciclo mientras que el complejo APC/C lo está desde la promefatafase hasta el final de G1 (Van Leuken, 2008)

El complejo APC/C tiene un comportamiento oscilatorio en el ciclo celular de mamíferos, y su

actividad máxima se observa en la transición de metafase-anafase y durante la fase G1 temprana, de hecho si bien el papel principal hasta metafase lo realizan la actividad de las CDK, es la transición a anafase y la salida de mitosis principalmente controlada por la actividad del complejo APC/C. Los principales blancos de APC/C son las ciclinas mitóticas (CycA y CycB en unión a CDK1 particularmente); por un lado y de forma general, la Securina es un inhibidor de la proteína Separasa, de modo que al ser inhibida la Securina, la Separasa se activa teniendo así como principal blanco a la subunidad Scc1 del complejo Cohesina que mantiene unidas las cromátidas hermanas permitiendo así la segregación cromosómica (Vodermaier H.C.,2004), mientras que la degradación de las ciclinas mitóticas inactiva a CDK1, lo que permite los cambios cromosómicos de la anafase y la correcta entrada de los eventos de la telofase. Es decir, con respecto a la mitosis, el complejo APC/C permite la proteólisis de las ciclinas claves mientras que esto inhibe la actividad de CDK1 lo que permite la defosforilación de sus sustratos en el orden en que APC/C efectúa la degradación de las ciclinas mitóticas (Sullivan, 2007)

La actividad de APC/C está determinada por la unión a sus cofactores de activación que le dan la especificidad de sustrato. De particular importancia es UbcH10, una enzima E2 que es suficiente y necesaria para la ubiquitinación *in vitro* en los residuos de lisina 11. Mientras que los coactivadores Cdc20 y Cdh1 son necesarios en diferentes estadios de fase M (Peters, 2006).

Existen diferentes formas del complejo APC/C con una especificidad particular de sustratos en puntos concretos del ciclo. Así durante prometafase se observa a APC/C unido a su coactivador Cdc20, si bien su actividad es limitada, es capaz de ubiquitinar a CycA; mientras que en metafase adquiere una isoforma cuya actividad es máxima inhibiendo a CycB y securina, lo que conlleva a la inactivación completa de CDK, permitiendo la activación del coactivador Cdh1 del APC/C. Con Cdh1, la última forma del APC/C es capaz de degradar a Cdc20, UbcH10 y las aún presentes CycA y CycB, permitiendo así la salida de mitosis (Mainland y Diffley, 2005)

Finalmente como idea puede establecerse que aún no es claro de qué forma los diversos complejos CDK/Ciclina regulan la progresión a lo largo del ciclo celular, esto es mucho más difícil con las observaciones de que CDK1 es suficiente para controlar el ciclo en la mayoría de los tipos celulares (Satyanarayana et al, 2008), lo que podría sugerir que en términos dinámicos el control del ciclo en mamíferos no difiere mucho del observado en levaduras. La cuestión es que si bien el ciclo celular en mamíferos ha evolucionado con el incremento en el número de CDKs, la posible explicación a esto podría estar en la necesidad de regular tipos celulares con mecanismos alternos, particularmente de

fosforilación, trataré de dar una discusión más amplia al final de este capítulo y durante los dos siguientes.

2.4 La regulación del ciclo celular en plantas: *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

Numerosas CDKs han sido caracterizadas en plantas, particularmente en *Arabidopsis thaliana* se han identificado seis clases de CDKs, desde la clase A hasta F, cuya estructura primaria las define, una séptima clase (CDKG) ha sido definida por el mismo criterio y aún no queda muy claro su papel en la regulación del ciclo y sus transiciones (Menges et al, 2005) puesto que en principio sólo las CDKA, CDKB, CDKD y CDKF parecen tener papeles preponderantes en la regulación del ciclo celular (Umeda et al, 2005). Particularmente, CDKA es considerada la CDK canónica en plantas debido a su motivo PSTAIRE similar a cdc2 en levadura y CDK1 en animales, además es la única CDK activa durante las fases G1 a S, por lo que su papel es determinante en la transición G1/S (Pereira et al, 2012); CDKA es codificada por un único gen en *Arabidopsis* y que es esencial para su viabilidad (De Veylder et al, 2007). Las ciclinas dependientes de cinasa de tipo B (CDKB) son específicas de plantas, poseen un motivo PSTAIRE alterado y son determinantes en la transición G2/M (Magyar et al, 2013). Finalmente las CDKD y CDKF funcionan como activadoras de CDK (CAKs).

Se conocen 8 tipos de ciclinas (CYC) en *Arabidopsis thaliana* que van desde el tipo A al T, formando un conjunto del alrededor de 32 miembros con roles putativos en la progresión del ciclo celular (De Veylder et al, 2007). CYCA está implicada en la progresión de fase S y es destruida alrededor de la transición G2/M. Las ciclinas B (CYCB) aparecen durante fase G2, controlan la transición G2/M así como la transición a mitosis y son destruidas cuando la célula entra a anafase. Las ciclinas de tipo D (CYCD) se han establecido como importantes reguladores de la transición G1/S, aunque se han sugerido como participantes también en la transición G2/M (De Veylder et al, 2007; Van Leene et al, 2011)

Este conjunto básico de CDKs y Ciclinas interactúa con las CAKs una vez que el complejo heterodimérico ha formado para su activación; como se mencionó CDKD junto a CYCH o CDKF actúan como CAKs específicas de las transiciones G1/S y G2/M fosforilando a las CDKA y CDKA/B en cada caso. En el mismo sentido, se sabe que la actividad de la fosfatasa CDC25 y la cinasas WEE1 es importante en la transición G2/M en levaduras y mamíferos. Sin embargo, los mutantes del homólogo de WEE1 en *Arabidopsis* que coexpresan una CDKA no fosforilable en las posiciones Thr-14 y Tyr-15, parecen tener diferentes respuestas en la entrada a fase M, aún más, un homólogo de CDC25 no ha sido descrito aún, por lo que la importancia relativa de estos reguladores de la actividad de CDK durante

G2/M parece no estar completamente clara (Bouolf *et al*, 2006; Inagaki y Umeda, 2011)

El siguiente grupo de moléculas clave de la regulación del ciclo celular en plantas lo constituyen los inhibidores de CDK, particularmente los relacionados a las proteínas Kip (KRPs) que recuerdan a los miembros Kip/Cip de inhibidores de CDK en mamíferos. Existen 7 genes de CKIs identificados en *Arabidopsis*. Los KRPs actúan como inhibidores al unirse directamente al complejo CDK-Ciclina. Los siete KRPs interactúan *in vitro* con las ciclinas de tipo D (Inze y De Veylder, 2006), y todos a excepción de KRP5 interactúan con CDKA pero no con CDKB (Inagaki y Umeda, 2011). Se ha descrito que las proteínas KRP son importantes para establecer el comportamiento todo o nada del oscilador de CDKS durante la transición G2/M (Dissmeyer *et al*, 2010).

Un conjunto de reguladores importantes son la proteína relacionada a Retinoblastoma (RBR) y los factores transcripcionales E2F, que constituyen la llamada vía E2F-RB que es determinante para la transición G1/S (van den Heuvel y Dyson, 2008). Tal como sucede en mamíferos, la fosforilación de RBR permite la activación de los heterodímeros E2F/DP, un grupo de factores transcripcionales que permiten la entrada a fase S (Attwoll *et al*, 2004). Se han descrito seis miembros de la familia E2F que van del tipo a al f, así como dos de la familia DP (a y b). Particularmente E2Fa, E2Fb y E2Fc requieren la heterodimerización con DPa o DPb para ser funcionales, regulando así genes necesarios en fase S, por lo que la actividad de estos comienza a aumentar en la transición G1/S (Borghi *et al*, 2010)

Otro factor transcripcional importante lo constituye la familia de proteínas MYB cuya actividad parece ser importante en el control de la expresión de proteínas necesarias durante fase G2 tardía o durante mitosis. (De Veylder *et al*, 2007) Específicamente los MYB3R son activadores transcripcionales que se unen a la denominada región activadora específica de fase M (MSA) en la región del promotor de los genes blancos, así la MSA es suficiente y necesaria para la transcripción en la transición G2/M, específicamente CYCB. Los MYB3R están estructuralmente relacionados a las proteínas c-Myb de animales y se ha descrito que existe un asa de retroalimentación con los complejos CDK/Ciclina (Araki *et al*, 2005)

Finalmente la degradación de las proteínas reguladoras es otro mecanismo importante que asegura la unidireccionalidad del ciclo. Las proteínas a degradar son selectivamente marcadas mediante poliubiquitinación mediada por las ligasas E3 (ver sección 2.1 de este capítulo), y en el caso de *Arabidopsis*, el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) y el complejo Skp1/Cullina/F-box (SCF) son dos de las principales E3 ubiquitina ligasas. Las ciclinas A, B y D son primariamente reguladas por la actividad del complejo APC/C, específicamente CYCA y CYCB contienen en su secuencia cajas

de destrucción que median su interacción con el complejo, mientras que CYCD es principalmente regulada por condiciones extracelulares que determinan su degradación por APC/C (Perez-Perez *et al*, 2008). Paralelamente, los niveles de los reguladores negativos son controlados por medio de su degradación. Los inhibidores de CDK son degradados en la transición G1/S por el complejo SCF, lo que resulta en la entrada a fase S (Frescas y Pagano, 2008).

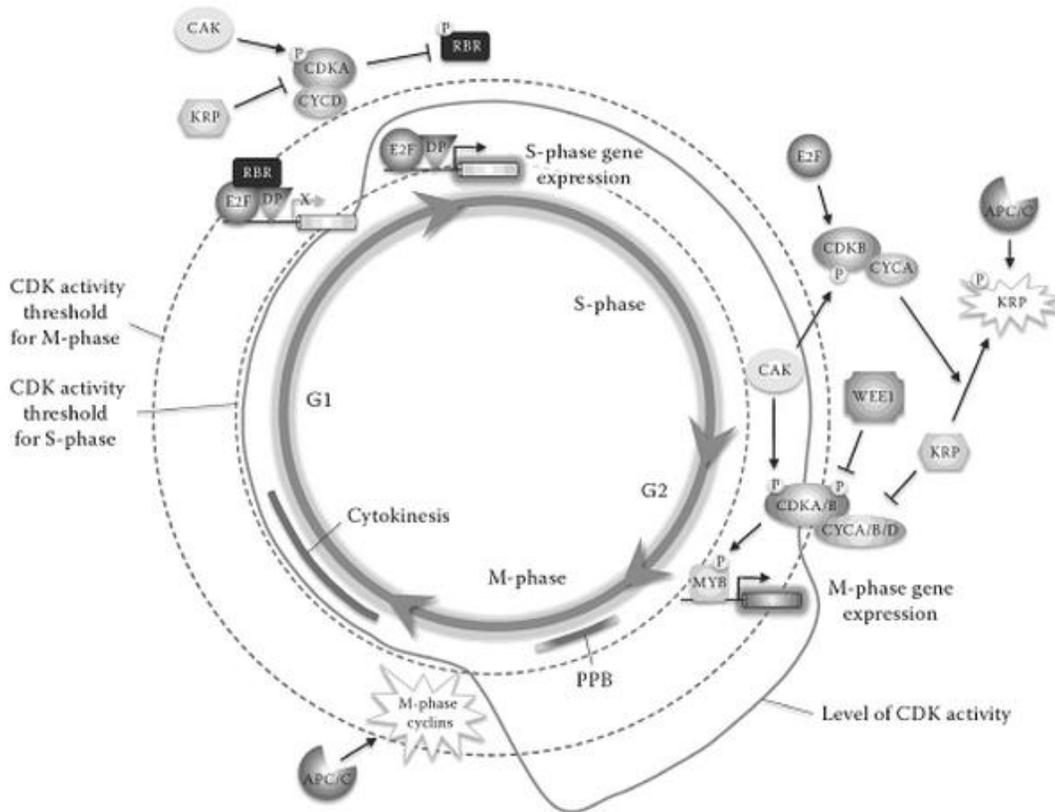


Figura 19. Eventos moleculares que regulan las fases del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. Diagrama esquemático ilustrando las fases canónicas del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana* (G1, S, G2, M y citocinesis) es una muy simplificada ilustración con los mecanismos moleculares en las transiciones más importantes. En G1/S un número importante de genes dependen de la actividad del complejo heterodimérico E2F/DP y esto solo sucede mediante la fosforilación de los complejos CDKA/CYCD sobre el inhibidor RBR. La actividad de CDKA/CYCD es positivamente y negativamente regulado por los CAKs y los KRPs. En la transición G2/M, el aumento en la actividad de CDK resulta en la fosforilación y activación de los factores transcripcionales MYB3R que dirigen la expresión de genes específicos de la fase M; en ellas la actividad de las CDK de tipo B es determinante para la fase M; por otro lado la actividad de WEE1 y la familia KRP es determinante en la disminución de la actividad de CDK para la salida de fase M puesto que la activación de las proteínas KRP es necesaria para la actividad del complejo APC sobre las ciclinas mitóticas y la consecuente salida de M (Tomado y modificado de: Pesarakli, 2014)

Ahora que se han descrito los principales reguladores del ciclo celular en *Arabidopsis*, describiré algunos eventos determinantes en las diversas fases y sus reguladores; en la figura 19 se esquematizan estas ideas mientras que en la figura 22 se describen los reguladores mencionados y su papel específico. Durante G1,

señales exógenas como la sacarosa y estímulos hormonales como las de las auxinas, citocininas y brasinosteoides, resultando en la formación de los complejos activos CDKA/CYCD necesarios para la entrada a fase S (Del Pozo *et al*, 2005; Jhon 2007; Dudits *et al*, 2011). Estos complejos comienzan a fosforilar proteínas blanco como el homólogo de de la proteína retinoblastoma (RBR) y otras relacionados con el ensamblaje de los orígenes de replicación de DNA. Paralelamente muchos genes necesarios para el cruce de la transición G1/S comienzan a ser activados en particular aquellos regulados los factores E2F/DP. En G1 la regulación de la denominada vía E2F/RBR es importante; RBR logra unirse al dominio de transactivación de los factores E2F al tiempo que recluta reguladores de cromatina específicos en las regiones promotoras de los genes por E2F silenciando su expresión (Sabelli y Larkins, 2009), bloqueando genes importantes para la fase S, por lo que la progresión del ciclo celular es detenida en la transición G1/S.

El segundo nivel de regulación ocurre durante fase G2-G2 tardía, los complejos que incluyen a CDKA y CDKB, así como las ciclinas A, B y D comienzan a ser activos. Durante la fase G2 tardía y fase M temprana, la regulación de estos complejos se da principalmente por la actividad de los CAKs (Pessaraki, 2014). La ejecución de la fase M ocurre principalmente a nivel transcripcional mediante la actividad de los MYB que actúan como importantes activadores de genes específicos de la transición a Mitosis. Por otro lado la degradación de las ciclinas mitóticas como CYCB por APC es crítica para la disminución de la actividad de CDK hacia el final de fase M, importante para el ensamblaje de los complejos de replicación de DNA (Bryant y Aves, 2011)

Regulador		Papel funcional
CDKA:	CDKA;1	CDK canónica de plantas, interactúa con las ciclinas D y los KRPs y una de sus esenciales funciones es inactivar a RBR
CDKB	CDKB1	CDK específica de plantas se expresa en las fases G2 y M. Las dos subclases (CDKB1 y CDKB2) se expresan en las transiciones S/G2 y G2/M.
	CDKB2	
CYCD	CYCD1-7	Relacionadas a las ciclinas de tipo D en animales, su expresión está ubicada en las transiciones G1/S y G2/M, están acopladas de forma directa a estímulos externos como fitohormonas o sacarosa.
CYCA	CYCA1	Relacionadas con las ciclinas A en mamíferos, existen tres subclases: CYCA3s tienen su mayor expresión en la transición G1/S interactuando con CDKA;1, CYCA1 y CYCA2 se expresan de fase G2 a M y asociándose con las CDKBs regulando además negativamente el endociclo.
	CYCA2	
	CYCA3	
CYCB	CYCB1	Relacionadas con las ciclinas B en mamíferos, se dividen en tres subclases: B1, B2 y B3, son controladas en su expresión por los llamados elementos promotores de fase M (MSA), son degradadas al final de la fase M por el complejo APC.
	CYCB2	
	CYCB3	
KRP	KRP1-7	Las proteínas relacionadas con KIP (KRP) se relacionan funcionalmente con inhibidores de CDK en levaduras y mamíferos como p27. Interactúan con CDKA;1 y las ciclinas de tipo D, particularmente KRP1/2

		son fosforiladas por CDKA;1 y CDKB1;1 lo que las lleva a degradación.
WEE1	WEE1	Putativamente involucrado en la fosforilación inhibitoria de los residuos de Tyr en las CDK, sin embargo en el caso de CDKA;1 esto parece ser indispensable. Controla el arresto del ciclo en respuesta a la activación del punto de control de la integridad de DNA
CDC25	CDC25	Solo se ha identificado el dominio catalítico del homólogo de Cdc25 de animales en plantas, la región N-terminal parece no estar presente, lo que cuestiona su papel en la regulación de la defosforilación de los residuos de Tyr en CDK
CDC20	CDC20	El complejo APC es activado en la transición de metafase/anafase por CDC20
CCS52	CCS52A1	Son requeridas para mantener durante fase G1 niveles bajos de CDK activando el complejo APC desde la telofase y hasta fase G1. Son reguladores positivos del endociclo celular.
	CCS52A2	
	CCS52B	
RBR	RBR1	Relacionada con la proteína retinoblastoma de animales, es un importante represor transcripcional. RBR es fosforilada e inactivada por los complejos CDK/CYCD. RBR1 también participa en la formación de otros complejos correpresores junto a desacetilasas de histonas.
	RBR2	
E2F	E2FA	Relacionados a los factores E2F de animales, son bloqueados por su unión a la proteína RBR
	E2FB	
	E2FC	
DP	DPA	Forman complejos heterodiméricos con los factores E2F lo que permite su unión a DNA y la activación de genes determinantes en G1/S
	DPB	
R1R2R3-MYB		Estos factores de transcripción son reguladores transcripcionales conservados del ciclo en plantas y animales. Mientras que en plantas su papel central está en la regulación de la transición G1/S, en plantas están relacionados con los eventos de la mitosis y en particular con la unión a elementos MSA, regulando de forma determinante la fase G2/M

Tabla 3. Elementos reguladores determinantes del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. Tabla con información de: Banks *et al*, 2011; Van Leeen *et al*, 2011; Haga *et al*, 2007; Ito, 2005; e Inagaki y Umeda, 2011.

2.5 El ciclo celular eucarionte: comparaciones y restricciones

El dogma central del control del ciclo celular es que la progresión a lo largo de cada una de las fases del ciclo está controlada por la actividad de alguna CDK específica, esta idea ha sido clave para dilucidar las redes subyacentes a la regulación del ciclo celular y proponer mecanismos regulatorios cuando la información ha sido insuficiente.

Sin embargo, dada la diversidad de mecanismos descritos anteriormente tanto para eucariontes unicelulares como para multicelulares, así como las diferencias en la organización temporal de las diversas fases en ellos, una de las cuestiones que surgen en torno a la regulación del ciclo celular es qué componentes están compartidos entre los diferentes eucariontes cuyo ciclo celular ha sido analizado y qué papel funcional tiene en el ciclo.

Como se observa en la Tabla 4, la mayoría de los componentes determinantes de la regulación del ciclo parecen ser homólogos entre los organismos discutidos en este trabajo; sin embargo, dos casos son interesantes puesto que si bien no comparte homología de secuencia, si comparten homología funcional: en primer lugar CYCA3;2 en *Arabidopsis* esta relacionado en secuencia con la familia de ciclinas de tipo A de mamíferos y *Drosophila*, pero funcionalmente tiene relación con las ciclinas de tipo E en la regulación de la transición G1/S (Bulankova, 2013); de la misma forma las proteínas Rb y E2F en el caso de mamíferos y plantas mientras que Whi5 y SBF/MBF en el caso de levaduras, cumplen el mismo rol funcional en la transición G1/S incluso se ha asegurado que las interacciones al interior de sus redes regulatorias parecen tener comportamientos similares, lo que plantea la pregunta de que evolutivamente parece más importante la estructura y función dinámica de las redes en que participan que la identidad bioquímica de los elementos (Hasan *et al*, 2012).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mamíferos	Función	Referencias que sustentan
Cln3	Puc1	CycD	CYCD1-7	CycD	Progresion por fase G1	Vidwans y Su, 2001; Vandepoele <i>et al</i> , 2002; Wang <i>et al</i> , 2004.
Cln1 y Cln2	----	CycE	CYCA3;2	CycE	Transicion de G1/S	Koff <i>et al</i> , 1991; Richardson <i>et al</i> , 1993; Yu <i>et al</i> , 2003.
Clb5/6	Cig2	CycA	CYCA1,2,3	CycA1, CycA2	Progresion por fase S, importante en la transición G2/M	Hao <i>et al</i> , 1995; Nieduszynski <i>et al</i> , 2002.
Clb1/2	Cdc13	CyB	CYCB1,2,3	CycB1,2,3	Progresion de la transición G2/M y control de fase M	Vandepoele <i>et al</i> , 2002; Wang <i>et al</i> ;
Sic1	Rum1	Rux	KRP1 a KRP7	p21, p27	Inhibidores de CDK	Vidwans y Su, 2001; Barberis <i>et al</i> , 2005.
Swel	Wee1, Mik1	Wee1	WEE1	WEE1/Myt1	Inhibidores de ciclinas tipo B	Bähler, 2005
Cdc20	Slp1	Fizzy	Cdc20	Cdc20	Activador del APC. Activo en mitosis	Visintin <i>et al</i> , 1997; Fülöp <i>et al</i> , 2005, Bähler 2005.
Cdh1 (HCT1)	Ste9	Fizzy-related	CCS52A1,CCS52A2	Cdh1	Activador de APC, activo en mitosis tardia y fase G1	Vidwans y Su 2001;Visintin <i>et al</i> , 1997; Fülöp <i>et al</i> , 2005.

SBF, MBF	MBF	E2F1	E2Fa,b,c	E2F1,2,3	Factores transcripcionales, controlan la transición G1/S	Bähler 2005; Ahmed <i>et al</i> , 2004.
Whi5	---	Rb	Rb	Rb	Se une e inactiva a los factores transcripcionales E2F y relacionados	Constanzo <i>et al</i> , 2004; Ahmed <i>et al</i> , 2004;

Tabla 4. Tabla comparativa de los principales reguladores del ciclo celular entre eucariontes. Se observa la homología de secuencia de algunos de ellos y su papel funcional en el ciclo.

Sin embargo, si bien se ha discutido en torno a la evolución de los componentes del ciclo celular eucarionte, particularmente, en su relación con su homología (Ruiz-Trigo *et al*, 2007), poco se ha discutido en relación a las propiedades de las redes de control subyacentes. En ese sentido, existen diferencias sustanciales en la estructura de las redes así como en los tiempos y patrones de expresión de los componentes regulatorios (Jensen *et al*, 2006) que indican que en general si bien la identidad funcional y estructural es mantenida, los procesos temporales de expresión y regulación no parecen estar compartidos entre eucariontes, por lo que su estudio dinámico es imprescindible.

Por lo anterior, es necesario que los estudios sobre los mecanismos de control del ciclo involucren también los aspectos dinámico-estructurales de las redes subyacentes y no sólo limiten su atención en la descripción de la identidad bioquímica de sus reguladores como ya se describió en esta sección. En los dos siguientes capítulos se revisaran los aspectos dinámicos y de organización estructural de las redes de regulación del ciclo celular en levaduras, *Arabidopsis* y mamíferos.

Parte II

Hipótesis, objetivos y métodos

Hipótesis

El ciclo celular eucarionte puede ser entendido en términos dinámicos como un oscilador con propiedades de control determinadas por la estructura de las redes regulatorias subyacentes. Estas propiedades pueden ser descritas mediante ciclos límites que recapitulan las diferentes fases y que resultan de las interacciones no lineales de las moléculas en el tiempo. Por otro lado, las propiedades estructurales locales de tales redes determinan de forma importante el surgimiento de esos comportamientos de tipo oscilatorio. Por tanto, al proponer redes que incorporen la mayor parte de los reguladores del ciclo en diferentes eucariontes y analizar sus propiedades dinámicas y estructurales es posible describir el ciclo celular como un ciclo límite que emerge del acople de propiedades estructurales locales de circuitos que describen comportamientos de tipo oscilatorio sostenido como de las propiedades emergentes resultado de las dinámicas combinatorias de los reguladores moleculares en cada red.

Objetivos

Los objetivos generales de este trabajo de tesis fueron:

- Analizar el modelo de red booleana basada en funciones umbrales de la regulación del ciclo celular en *S. pombe* propuesto por Davidich y Bornholdt revisitando la evidencia que lo sustenta, y derivando las tablas de verdad y las funciones lógicas obtenidas de esta para poder comparar ese formalismo con otro basado en reglas lógicas, particularmente el tipo y número de atractores encontrados al analizar sincrónicamente la red.
- Proponer un modelo de red de regulación booleano basado en reglas lógicas combinatorias, del ciclo celular en *S. pombe*, recuperando la evidencia experimental más reciente, derivando las tablas y reglas lógicas y analizando de forma sincrónica su comportamiento dinámico, haciendo particular énfasis en el tipo y número de los atractores encontrados y en la fases del ciclo que logra representar.
- Proponer un modelo de red booleana basado en reglas lógicas combinatorias para la regulación

del ciclo celular en *S. cerevisiae* tomando como referencia los modelos propuestos por Li y Irons e incorporando información reciente sobre los reguladores, derivar las tablas y reglas lógicas y analizar el modelo de forma sincrónica haciendo particular énfasis en el tipo y número de los atractores encontrados y en la fases del ciclo que logra representar.

- Actualizar el modelo de red booleana de la regulación del ciclo celular genérico en mamíferos propuesto por Fauré, incorporando nuevos reguladores importantes para la fase G1 y la transición G1/S, derivar y actualizar las reglas lógicas y simular la red propuesta de forma sincrónica haciendo particular énfasis en el tipo y número de los atractores encontrados y en la fases del ciclo que logra representar.
- Presentar la propuesta de una red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana* y la información que sustenta cada una de las interacciones propuestas.
- Analizar estructuralmente las redes de control del ciclo celular para *S. pombe*, mamíferos y *A. thaliana*. Obtener mediante una búsqueda exhaustiva, los motivos regulatorios de dos y tres nodos al interior de estas redes y comparar estos motivos con aquellos estudiados previamente de forma teórica y experimental en la literatura y que han sido relacionados con compartamientos de tipo oscilatorio sostenido.
- Comparar los resultados del compartamiento dinámico de las redes analizadas con los motivos encontrados en su interior y correlacionar en términos dinámico-estructurales las propiedades de las redes de control del ciclo celular propuestas a fin de discutir principios generales de organización.

En los capítulos 3 y 4 de este trabajo se presenta la metodología utilizada para analizar dinámica y estructuralmente las redes de control del ciclo celular en las levaduras *S. pombe*, *S. cerevisiae*, la planta *A. thaliana* y la genérica en mamíferos. En el capítulo 3 se presentan los modelos analizados y la metodología propuesta para cada red en particular, haciéndose un cuidadoso análisis de la evidencia experimental recopilada. En el capítulo 4 se presenta el paradigma estructural de las redes regulatorias y se describe la metodología para buscar motivos de regulación al interior de las redes propuestas en el capítulo 3.

Capítulo 3

Modelos de red de la regulación del ciclo celular en eucariontes

En este apartado se describen los modelos de red booleana de la regulación del ciclo celular en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, así como el genérico en mamíferos. En el primer caso se derivaron las tablas de verdad en base a una revisión bibliográfica proponiéndose las reglas lógicas correspondientes a la red de regulación modificando el modelo basado en umbrales previamente propuesto, además se propone un modelo modificado que actualiza la información sobre la red de regulación. En los otros dos casos se revisaron y actualizaron ambas redes, haciéndose una modificación de las reglas lógicas asociadas. Finalmente se propone un modelo de red de la regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana* sin que se deriven las reglas lógicas que describen su dinámica se hace una síntesis de la información disponible describiéndose la estructura de la red y el tipo de interacciones entre los componentes.

“Mathematics Is Biology's Next Microscope, Only Better; Biology Is Mathematic's Next Physics, Only Better”

Joel Cohen

3.1 Modelos de red de la regulación del ciclo celular en eucariontes

Desde la década de 1960 y 1970, existen modelos matemáticos que han tratado de explicar algunos aspectos clave de la regulación del ciclo celular a partir de observaciones fenomenológicas (Véase Koch y Schaechter, 1967; Shields R, 1977; y particularmente Smith y Martin, 1973), sin embargo con la determinación de la estructura de las redes moleculares del control del ciclo celular diferentes modelos de red bajo diferentes formalismos han sido introducidos (Morgan D.O., 2006).

Los primeros trabajos se centraron en pasos particulares del ciclo, por ejemplo, Tyson y Novak (Novak B y Tyson J.J., 1993) encontraron que el acople de dos circuitos de retroalimentación positiva en la actividad de CDKs son suficientes para generar un interruptor de entrada biestable a mitosis en los huevos de *Xenopus laevis* que es capaz de exhibir histeresis¹, estas predicciones fueron validadas experimentalmente algunos años después con los trabajos de Sha y colaboradores (Sha W et al, 2003). Una aproximación similar se estableció para el modelo de red que describe la entrada a fase S en *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al, 2004) mismo que es capaz de recuperar el comportamiento de 120 mutantes reportados en la literatura y predecir la existencia de una fosfatasa clave en la red que controlada la entrada a Mitosis que fue validada experimentalmente poco después (Queralt E et al, 2006). Se han establecido además modelos basados en EDO para el control del ciclo en *Schizosaccharomyces pombe* (Novak y Tayson, 1997; Novak *et al.*, 1998) y células somáticas de mamíferos (Aguda y Tang, 1999).

Sin embargo, para esta tesis, el modelo de red booleana del control global en *Saccharomyces cerevisiae* propuesto por Li y otros (Li et al, 2004) sin duda es seminal. En este trabajo los autores son capaces de reducir el modelo basado en EDO de Chen y otros (Chen et al, 2000) a una red mínima de control que recupera no sólo las fases características y sus transiciones en el orden temporal correcto si no demostrando además que esta red mínima exhibe un comportamiento robusto ante perturbaciones al observarse que en el espacio de estados cerca del 86% de los estados de la red son canalizados a un atractor puntual que corresponde a la fase G1 y cuya trayectoria contiene a las fases anteriores del ciclo.

Desde el trabajo pionero de Li, una serie de modelos de red booleana han sido desarrollados para diferentes organismos modelo: *Schizosaccharomyces pombe* (Davidich y Bornholdt, 2008a; Davidich y

¹ Es la propiedad no lineal que describe a una función con dos trayectorias diferentes que dependen del valor actual de la variable que cambia en el tiempo y de cómo está luego a dicho valor. La diferencia entre ambas trayectorias se conoce como histeresis, cuando el valor de la histeresis es cero, ambas trayectorias coinciden y el comportamiento de la función es la misma independientemente del valor actual de la variable.

Bornholdt, 2008b; Mangla et al., 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (Orlando et al, 2008; Irons D, 2009; Fauré et al, 2009; Mangla et al., 2010), genérico en mamíferos (Huang e Ingber, 2000; Fauré et al 2006). Los modelos propuestos han sido definidos en un formalismo booleano basado en funciones lógicas excepto para los trabajos de Li y Davidich, todos a excepción del modelo de Irons asumen una aproximación sincrónica en su esquema de actualización del estado de los nodos, por lo que en este trabajo se seguirán estos supuestos.

Aun cuando el número de modelos de red booleana del ciclo celular ha aumentado y se han resuelto algunas ideas generales sobre ciertas rutas de control en transiciones particulares como G1/S o el paso a Mitosis (Csikász-Nagy et al, 2006; Fauré et al, 2009; Csikász-Nagy et al, 2009; Ferrell et al, 2011), aún quedan preguntas abiertas en torno a los mecanismos de control del ciclo celular eucarionte. Si bien es cierto que la mayoría de los modelos basados en formalismos booleanos aplicados a contextos diferentes al ciclo celular han sido aproximados como sistemas de decisión del destino celular por lo que su análisis se ha entendido en términos de estados estables (atractores) diferentes que representan tipos celulares o compromisos fenotípicos alternativos, en contraste, en el caso del ciclo celular lo que importa es la secuencia temporal de las transiciones entre los estados de la red y la sucesión de los cambios en los niveles de actividad de los componentes que controlan la progresión de la célula a través de las diferentes fases del ciclo. El hecho de que muchos de los componentes que regulan el ciclo celular tengan comportamientos similares a interruptores biestables (encendido/apagado bien presencia/ausencia), permite aproximar de buena forma su comportamiento dinámico en términos de variable lógicas (Tyson et al, 2003). Por tanto, la importancia fundamental de las aproximaciones de modelos de red booleana del control del ciclo celular eucarionte reside en determinar el núcleo de control básico que explica las condiciones anteriores (Fauré y Thieffy, 2009).

Precisamente en las siguientes secciones describiré algunos de los modelos booleanos más relevantes del control del ciclo celular: en las levaduras *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y Mamíferos, haciendo una revisión de sus supuestos, y modificando o actualizando los datos que les dan sustento comparando con la evidencia experimental disponible. Por otra lado, y dado que hasta ahora no se ha propuesto una red de control del ciclo celular en plantas y en particular en *Arabidopsis thaliana*, se presentará aquí una propuesta de modelo de red y la evidencia que lo sustenta, si bien para los fines de esta tesis la simple descripción de su topología es suficiente, es claro que la determinación de su comportamiento dinámico es necesario, trabajo que escapa de los fines de esta tesis.

3.2 El modelo de red del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

Como se discutió en la sección 2.1 de este trabajo, se tiene una notable caracterización de los eventos moleculares que controlan el ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe* y tales rutas básicas de control han sido usadas para formalizar una serie de modelos basados en EDOs que tratan de explorar el comportamiento dinámico en las cuatro fases características así como las alteraciones suficientes para recuperar diversos mutantes reportados en la literatura (Novak et al, 2001). En particular los modelos de Novak y colaboradores han sido seminales en el desarrollo de aproximaciones formales para su descripción (Csikász-Nagy et al, 2009). En términos generales estos autores proponen una red de control compuesta por 7 nodos: Cdc2-Cdc13, Slp1, Ste9, Rum1, Starter Kinases (SK), Cdc25 y Wee1, y 14 ecuaciones diferenciales y algebraicas que describen su evolución temporal.

En primer lugar la ciclina Cdc13 en unión a Cdc2 determinan la mayor parte del control del ciclo desde fase S a M, su expresión comienza en fase S temprana y alcanzan su máximo en fase G2, sin embargo durante la entrada a fase M los niveles son disminuidos gracias a la actividad de APC que degrada a Cdc13 mediante la acción de las proteínas auxiliares Ste9 y Slp1 que presentan a Cdc13 a degradación por la vía ubiquitin-proteosoma. Así el complejo Cdc2/Cdc13 es denominado el complejo promotor de mitosis o MPF y su regulación se logra principalmente por interacciones antagónicas con sus reguladores. Dos de ellos se activan en fase G1 y determina la transición G1/S mientras que el segundo grupo de reguladores se activa en G2 y regula la transición G2/M. En el primer grupo se encuentra Ste9 que presenta a Cdc13 al complejo APC promoviendo su degradación en fase G1, sin embargo Ste9 es regulado por el complejo MPF (Cdc2/Cdc13) mediante fosforilación inactivándolo. El segundo miembro del primer grupo lo constituye el inhibidor estequiométrico Rum1 que se une a MPF e inhibe su actividad, de la misma forma MPF regula a Rum1 mediante fosforilación promoviendo su ubiquitinación y rápida degradación. Así la fase G1 en este modelo está caracterizada por la alta actividad de Ste9 y Rum1 y por la baja actividad de MPF.

Este antagonismo es notablemente influenciado por el papel de moléculas de salida de fase G1, particularmente durante la transición G1/S, las denominadas cinasas de inicio (SK) un conjunto de complejos Cdk/ciclina compuesto por Cdc2 en unión a las ciclinas Cig1, Cig2 y Puc1 permiten el aumento de MPF al fosforilar a Ste9 y Rum1.

El segundo grupo de reguladores es propio de fase G2. Durante G2 la actividad de Cdc2 está regulada mediante fosforilación por las cinasas Wee1 y Mik1, de tal forma que durante el paso de G2 a

S, MPF se encuentra inactivo por actividad de Wee1-Mik1, y solo durante fase M, estas cinasas presentan bajos niveles de actividad. De forma análoga MPF es capaz de fosforilar e inactivar Wee1-Mik1.

La transición G2/M es propiamente determinada por un asa de retroalimentación positiva, por un lado Cdc2 es activada por la fosfatasa Cdc25 misma que es positivamente regulada por MPF mediante su fosforilación, lo que lleva la entrada a Mitosis y permite el paso irreversible a la misma (Millar et al, 1992)

La existencia de retroalimentación negativa es determinante en la salida de las transiciones y para completar el ciclo. En primer lugar SK debe ser inhibida, si bien el mecanismo de regulación de su actividad no es claro, los autores asumen que el complejo MPF estimula su inhibición al fosforilar su factor de transcripción. Por otro lado los autores proponen que MPF activa y degrada a Slp1, la activación se logra indirectamente mediante una enzima intermediaria.

Con estas interacciones los autores son capaces de recuperar la dinámica reportada para cada una de las proteínas reguladoras y algunos mutantes, particularmente para Wee1 y Cdc25. Sin embargo aun cuando el modelo es suficientemente robusto y su capacidad explicativa es notable, los análisis del plano fase como las simulaciones numéricas dificulta extender su estudio a otro número importante de mutantes e incluso explorar la posibilidad de nuevos nodos reguladores (Davidich y Bornholdt, 2008b), a pesar de ello queda claro que detrás de la regulación del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe* hay dos mecanismos importantes: por un lado la existencia de antagonismo entre grupos de moléculas en las transiciones G1/S y G2/M, y por otro lado, la centralidad de Cdc2 en tales transiciones (Novak et al, 2001).

Con base en la red de control bioquímico anterior y considerando las dos conclusiones anteriores, Davidich y Bornholdt lograron reducir la formulación basada en EDO a una red booleana mediante funciones de tipo umbral (Davidich y Bornholdt, 2008a). Para ello establecen la siguiente red de interacciones simplificada (Figura 3.2) entre los componentes moleculares propuestos por Novak (Novak et al, 2001) como por otros considerados esenciales en la regulación de las G1/S y G2/M (Humphrey y Pearce, 2005).

El modelo se compone de 10 nodos que representan funciones umbral de tipo booleano para cada una de las proteínas reguladoras. En este formalismo se asume que los nodos (proteínas) sólo pueden tener un valor binario $S_i(t) \in \mathbf{V}$ (véase sección 1.3 de este trabajo) para cada nodo i , denotando si la proteína está presente o ausente. La red de interacción está definida por la Tabla 5 donde se establece el efecto que el nodo i tiene sobre el nodo j ; así lo que determina el estado del nodo es la suma de las

interacciones positivas o negativas que sus reguladores ejercen y estableciendo un umbral de activación o inhibición que determina cuando el nodo puede ser 1 o 0 o permanecer sin cambio alguno (Li et al, 2004; Davidich y Bornholdt, 2008).

Nodo	Activación (+1)	Inhibición (-1)
SK (Start Kinase) (Cig1/Cdc2, Cig2/Cdc2, Puc1/Cdc2)	<ul style="list-style-type: none"> Start funciona como indicador positivo de la masa celular, activando a las Cinasas de Inicio tarde en G1 permitiendo la transición G1/S (Martín-Castellanos et al, 2000; Sveiczer et al, 2000) 	
Start		Se propone un mecanismo de auto inhibición por saturación de debido a que ningún nodo lo regula negativamente (Tyson et al, 2002)
Cdc13/Cdc2		Rum1 es capaz de unirse al complejo MPF inactivándolo (Correa-Bordes et al, 1997). Ste9: APC marca a ubiquitinacion a Cdc13 para degradación (Kitamura et al, 1998). Slp1 reconoce y se une a Cdc13 presentandola al complejo APC (Kim et al, 1998) Wee1 y Mik1 fosforilan e inactivan a MPF (Lundgren et al, 1991).
Wee1/Mik1	Se propone una fosfatasa homóloga a Cdc14 que desfosforila a Wee1/Mik1 activándolos (esta puede ser Clp1) (Sveiczer et al, 2000)	En la transición G2/M el complejo MPF es capaz de fosforilar e inactivar a Wee1 (Alingue et al, 1997)
Ste9	Un homólogo de Cdc14, posiblemente Clp1 es capaz de activarla al desfosforilarla (Sveiczer et al, 2000)	Cdc2 inhibe su actividad mediante fosforilación (Blanco et al, 2000). Es fosforilada e inhibida por SK (Martin-Castellanos et al, 2000)
Slp1	En su forma altamente activa (al tener sin fosforilar su residuo Tyr-15), Cdc13/Cdc2* indirectamente activa a Slp1 (Kim et al, 1998; Tyson et al, 2002)	Al no ser regulada negativamente por ningún nodo, se proponen regulación por autoinhibición que es importante durante después de fase M (Sveiczer et al, 2000; Novak et al, 2001)
PP	Slp1/APC degrada a los inhibidores de PP permitiendo se mantenga activa (Sveiczer et al, 2000)	Al no ser regulada negativamente por ningún nodo, se proponen regulación por autoinhibición que es importante durante después de fase M (Sveiczer et al, 2000)
Cdc25	Cdc13/Cdc2 la fosforila, activándola (Millar et al, 1992)	La fosfatasa hipotética PP desfosforila a Cdc25 inactivando la transición a fase M (Sveiczer et al, 2000; Tyson et al, 2002)
Rum1	La fosfatasa hipotética PP activa a Rum1 inhibiendo así la	Es fosforilada e inhibida por SK (Martin-

	actividad de Cdc2/Cdc13 (Tyson et al, 2002)	Castellanos et al, 2000) En su forma altamente activa Cdc2 es capaz de fosforilar e inactivar a Rum1 (Correa-Bordes et al, 1997; Tyson et al, 2002)
Cdc13/Cdc2*		Wee1 y Mik1 fosforilan e inactivan a MPF (Lundgren et al, 1991). Rum1 es capaz de unirse al complejo MPF inactivándolo (Correa-Bordes et al, 1997). Ste9: APC marca a ubiquitinación a Cdc13 para degradación (Kitamura et al, 1998). Slp1 reconoce y se une a Cdc13 presentándola al complejo APC (Kim et al, 1998) Cdc25 desfosforila el residuo Tyr-15 de Cdc2 llevando el complejo a su forma más activa (Millar et al, 1992)

Tabla 5. Interacciones de la red de regulación del ciclo celular de *S. pombe*. (Tomada y actualizada de Davidich y Bormholdt, 2008)

Por lo tanto, si $S_i(t)$ representa el estado del i -ésimo nodo de la red en el tiempo t , entonces el estado siguiente, $S_i(t + 1)$ se define mediante la función:

$$S_i(t + 1) \begin{cases} 0, & \sum_j a_{ij} S_j(t) > \theta_i \\ 1, & \sum_j a_{ij} S_j(t) < \theta_i \\ S_i(t), & \sum_j a_{ij} S_j(t) = \theta_i \end{cases}$$

Donde $a_{ij} = 1$ si la interacción del nodo i al nodo j es activadora, denotada como flechas en la Figura 3.1; $a_{ij} = -1$ si la interacción del nodo i al nodo j es inhibidora, representada como líneas con rombo en la Figura 20; $a_{ij} = 0$ si no existe interacción. Finalmente θ_i es un umbral de activación del nodo i , que para este modelo se fija en 0, sin embargo dos casos particulares se definen para el valor de este umbral. Cdc13/Cdc2* es la forma más activa del complejo Cdc13/Cdc2, este complejo se mantiene activo mediante una señal activadora constante, por lo que la función umbral se fija como $\theta_i = 1$. Además los autores proponen añadir una regla de auto-activación para el nodo Cdc13/Cdc2, lo que se traduce en definir $\theta_i = -1$, puesto que ningún nodo lo regula positivamente, lo que asegura su transición al estado activo.

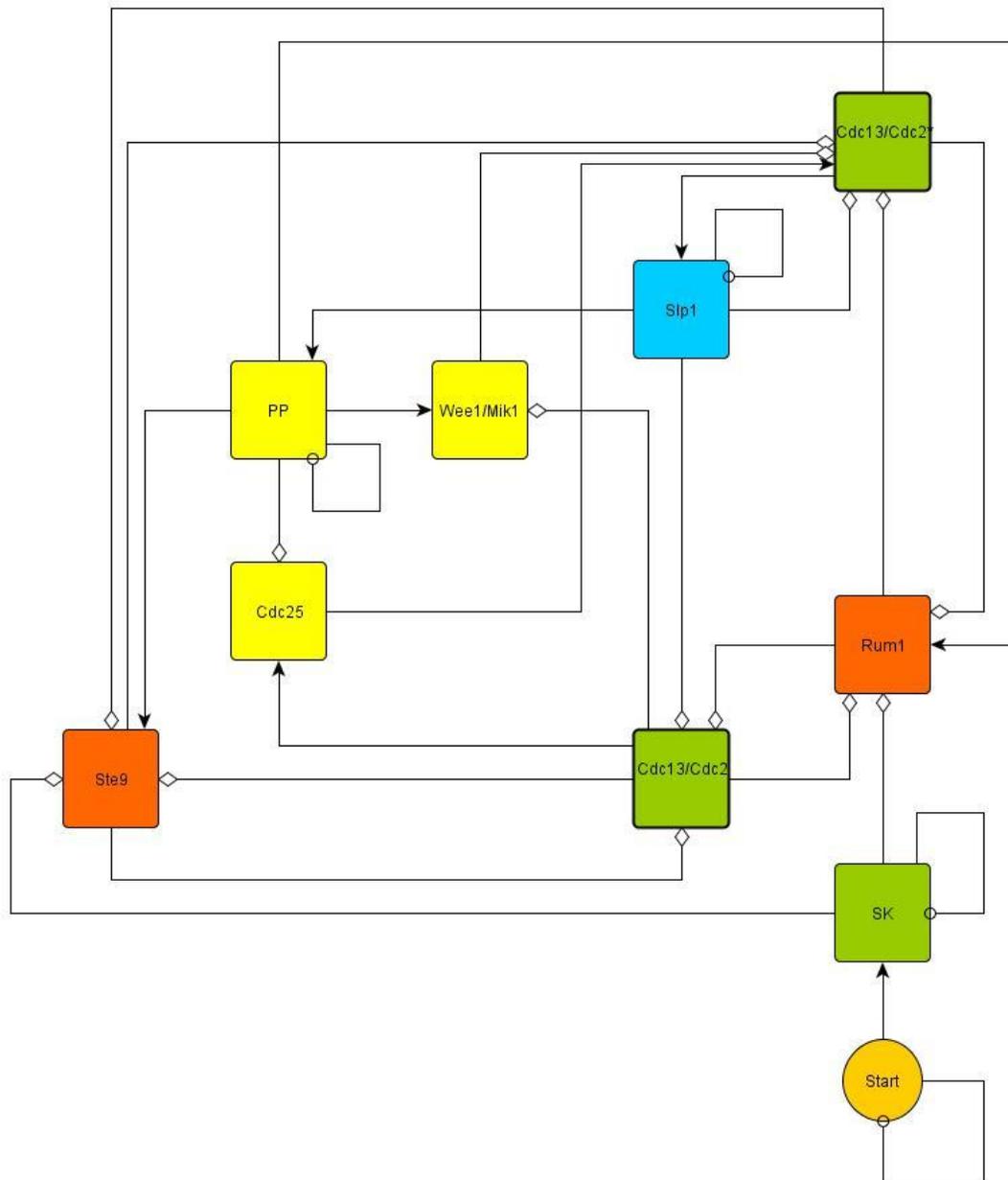


Figura 20. Modelo de red del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*. Los nodos denotan funciones de tipo umbral (Véase Li et al, 2004) que denotan el comportamiento binario (presencia/ausencia) de las proteínas regulatorias, tal como se describe en este trabajo. Las flechas indican interacciones de activación mientras las líneas con rombos indican inhibiciones, además, en particular las líneas con esferas indican autorregulación por inhibición en los nodos Start, SK, Slp1 y PP (Modificado de Davidich y Bornholdt, 2008).

De esta forma para cada nodo se suma el efecto que tiene la entrada positiva o negativa multiplicada por el valor de su estado actual, una vez realizada la suma de productos el valor es comparado con el umbral definido θ_i , si el valor está por encima del umbral el nodo se inactiva y si está por debajo de él se activa.

Con esta metodología los autores son capaces de encontrar un total de 13 atractores, 12 de ellos de punto fijo y un ciclo límite de grado 3 (véase tabla 6), de ellos el primer atractor recupera una configuración similar a la esperada en fase G1 donde la fosfatasa PP esta inactiva y los inhibidores de ciclinas de G1 (Rum1 y Ste9) están activos impidiendo la transición G1/S. Además la trayectoria del atractor es capaz de recuperar la secuencia temporal de activación del ciclo celular desde una fase G1 al inicio de la siguiente incluyendo las transiciones determinantes entre ellas (Véase Figura 22) teniendo además una cuenca de atractor de 762 de los 1024 que componen el espacio de estados de la red, lo que a decir de los autores, sugiere una notable capacidad de canalización del sistema y en términos biológicos una robustez y eficiencia del ciclo celular (Davidich y Bornholdt, 2008)

<i>Atractores de punto fijo</i>										
Start	SK	Cdc2/Cdc13	Ste9	Rum1	Slp1	Cdc2/Cdc13*	Wee1-Mik1	Cdc25	PP	Tamaño de cuenca
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	762
0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	18
0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	18
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	2
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2
0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	2
<i>Atractor de tipo ciclo límite grado 3</i>										
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	208
0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	

Tabla 6. Atractores del modelo de red booleana del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

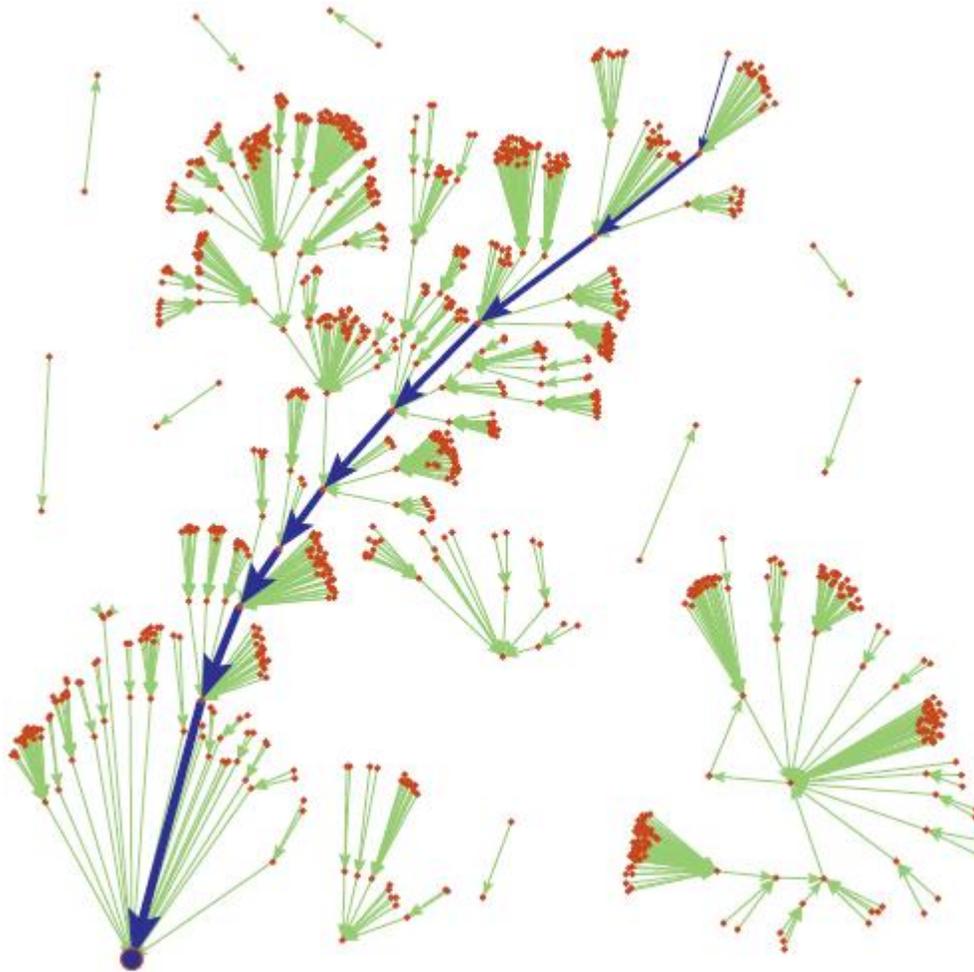


Figura 22. Espacio de estados del modelo de red de la regulación del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*. Se muestran los 13 atractores descriptores en el modelo de Davidich y Bornholdt, el atractor con la mayor cuenca recupera los perfiles de expresión de fase G1 y la trayectoria hacia este contiene las fases del ciclo desde una G1 anterior. (Tomado de Davidich y Bornholdt, 2008)

3.2.1 Derivación de las tablas de verdad y las reglas lógicas correspondientes al modelo de Davidich y Bornholdt

Como se describe en la sección 1.5 de este trabajo, partiendo del conocimiento de la red de interacciones (Figura 20) y de la información bibliográfica referida a la regulación del ciclo celular en *S. pombe* (Véase la sección 2.2), es posible derivar las tablas de verdad que cuantifican bajo qué condiciones cada uno de los nodos de la red está presente/ausente; así, se decidió derivar cada una de las tablas de los 10 nodos que definen al modelo de Davidich y Bornholdt por dos razones: i) No es suficientemente claro de qué manera la información de la tabla 3.2 cuantifica en realidad el efecto de los reguladores en cada nodo y

ii) Dado que los modelos aquí analizados utilizan funciones booleanas para describir el comportamiento dinámico de los nodos en la red, es necesario hacer comparables ambas dinámicas.

Una de las interrogantes que surgen del modelo anterior es si los formalismos de funciones tipo umbral y las funciones lógicas booleanas recuperan exactamente el mismo tipo de comportamientos. Sin embargo lo que sí parece ser una invariante en los pocos modelos que aproximan la dinámica mediante funciones umbral es que en principio el sistema da lugar a un número elevado de atractores de los cuales un número reducido tiene una interpretación biológica directa presentando estas cuencas de atracción muy grandes, sin embargo, puesto que el estado del nodo depende mucho del valor del parámetro umbral, cambios en su valor podrían determinar cambios importantes en el vector de estados de la red como en el tipo y número de atractores (Zanudo et al, 2011).

En ese sentido, para analizar cuan comparables son ambos formalismos, se derivaron las tablas de verdad asociadas a cada nodo en función de la estructura de la red en la figura 20 y la información de la tabla 5, en cada tabla de verdad sólo se consideran las condiciones que aseguran que el nodo en cuestión este activo.

3.2.2 Resultados de la construcción de las tablas de verdad y la dinámica descrita por ellas

En algunos casos las interacciones y la información no son suficientes para determinar la regla lógica así que siguiendo la metodología de Dubrova y colaboradores (Dubrova et al, 2005) se decidió agregar interacciones en algunos de los nodos que son suficientes para que al ser analizado el sistema recupere la misma dinámica que en su contraparte basada en umbrales; por simplicidad se optó por comenzar por asas de autoregulación positiva o negativa del nodo en cuestión, de tal forma que en los nodos Ste9, Cdc2/Cdc13, Rum1, Cdc25. Wee1-Mik1 y Cdc2/Cdc13* son regulados además por sí mismos, las reglas lógicas derivadas fueron verificadas con un generador de tablas de verdad (Borokowski, 2013).

1) Start

Entrada	Salida
Start	Start
1	1

2) SK

Entrada	Salida
Start	SK
1	1

3) Ste9

Entradas					Salida
SK	Ste9	Cdc2/Cdc13	PP	Cdc2/Cdc13*	Ste9
0	1	0	0	0	1
0	*	0	1	0	1
0	1	0	1	1	1
0	1	1	1	0	1
1	1	0	1	0	1

4) Cdc2/Cdc13

Entradas				Salida
Ste9	Cdc2/Cdc13	Rum1	Slp1	Cdc2/Cdc13
0	*	0	0	1
0	1	0	1	1
0	1	1	0	1
1	1	0	0	1

5) Rum1

Entradas					Salida
SK	Cdc2/Cdc13	Rum1	PP	Cdc2/Cdc13*	Rum1
0	0	1	0	0	1
0	0	*	1	0	1
0	0	1	1	1	1
0	1	1	1	0	1
1	0	1	1	1	1

6) PP

Entrada	Salida
Slp1	PP
1	1

7) Cdc25

Entradas			Salida
Cdc2/Cdc13	PP	Cdc25	Cdc25
0	0	1	1
1	0	*	1
1	1	1	1

8) Slp1

Entrada	Salida
Cdc2/Cdc13*	Slp1
1	1

9) Wee1-Mik1

Entradas			Salida
Cdc2/Cdc13	PP	Wee1-Mik1	Cdc25
0	0	1	1
0	1	*	1
1	1	1	1

10) Cdc2/Cdc13*

Entradas						Salida
Ste9	Rum1	Cdc25	Slp1	Wee1-Mik1	Cdc2/Cdc13*	Cdc2/Cdc13*
0	0	1	0	0	1	1

Los asteriscos (*) en las tablas de verdad indican que el nodo es tanto 1 como 0, por simplicidad y compactación se adopta esta notación. En la tabla 7 se muestran las reglas lógicas derivadas de las tablas de verdad anteriores, se utiliza la siguiente notación en cada regla: (|) es equivalente al operador OR, (&) al operador AND y finalmente (!) al operador NOT.

Nodo	Regla lógica
SK	Start
Ste9	$((!(SK \& PP \& Cdc2/Cdc13 \& Cdc2/Cdc13^*)) \& Ste9) ((!SK) \& (Ste9) \& (!Cdc2/Cdc13) \& (!PP) \& (!Cdc2/cdc13^*)) ((!SK) \& (Ste9) \& (!Cdc2/Cdc13) \& (PP) \& (!Cdc2/cdc13^*)) ((!SK) \& (Ste9) \& (!Cdc2/Cdc13) \& (PP) \& (Cdc2/cdc13^*)) ((!SK) \& (Ste9) \& (Cdc2/Cdc13) \& (PP) \& (!Cdc2/cdc13^*)) ((SK) \& (Ste9) \& (!Cdc2/Cdc13) \& (PP) \& (!Cdc2/cdc13^*))$
Cdc2/Cdc13	$(!(Ste9 \& Rum1 \& Slp1 \& Cdc2/Cdc13)) (!(Ste9) \& (Cdc2/Cdc13) \& (!Rum1) \&$

	$(\neg \text{Slp1}) \mid ((\neg \text{Ste9}) \& \text{Cdc2/Cdc13} \& \text{Rum1} \& (\neg \text{Slp1})) \mid (\text{Ste9} \& \text{Cdc2/Cdc13} \& (\neg \text{Rum1}) \& (\neg \text{Slp1})) \mid ((\neg \text{Ste9}) \& \text{Cdc2/Cdc13} \& (\neg \text{Rum1}) \& \text{Slp1})$
Rum1	$((\neg \text{SK}) \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& \text{Rum1} \& (\neg \text{PP}) \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}^*)) \mid ((\neg \text{SK}) \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& \text{Rum1} \& \text{PP} \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}^*)) \mid ((\neg \text{SK}) \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& (\neg \text{Rum1}) \& \text{PP} \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}^*)) \mid ((\neg \text{SK}) \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& \text{Rum1} \& \text{PP} \& \text{Cdc2/Cdc13}^*) \mid ((\neg \text{SK}) \& \text{Cdc2/Cdc13} \& \text{Rum1} \& \text{PP} \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}^*)) \mid (\text{SK} \& (\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& \text{Rum1} \& \text{PP} \& \text{Cdc2/Cdc13}^*)$
PP	Slp1
Cdc25	$(\text{Cdc25} \& (\neg \text{Cdc2}) \& (\neg \text{PP})) \mid ((\neg \text{PP}) \& \text{Cdc2} \& \text{Cdc25}) \mid (\text{Cdc25} \& \text{Cdc2} \& \text{PP}) \mid ((\neg \text{PP}) \& \text{Cdc2} \& (\neg \text{Cdc25}))$
Slp1	Cdc2/Cdc13*
Wee1-Mik1	$((\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& (\neg \text{PP}) \& \text{Wee1-Mik1}) \mid ((\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& \text{PP} \& \text{Wee1-Mik1}) \mid ((\neg \text{Cdc2/Cdc13}) \& \text{PP} \& (\neg \text{Wee1-Mik1})) \mid (\text{Cdc2/Cdc13} \& \text{PP} \& \text{Wee1})$
Cdc2/Cdc13*	$(\neg \text{Ste9}) \& (\neg \text{Rum1}) \& (\text{Cdc25}) \& (\neg \text{Slp1}) \& (\neg \text{Wee1}) \& (\text{Cdc2/Cdc13})$

Tabla 7. Reglas lógicas derivadas para el modelo de Davidich y Bornholdt

Con las reglas lógicas anteriores se simuló la red en BoolNet considerando un enfoque sincrónico. Se encontró un único atractor de tipo punto fijo que se muestra en la Tabla 8, y que recupera los perfiles de expresión observados en el modelo de Davidich y Bornholdt. Sin embargo, dado que no se realizó el análisis de las cuencas

Atractores encontrados

<i>Atractores de punto fijo</i>										
Start	SK	Ste9	Cdc2/Cdc13	Rum1	PP	Cdc25	Slp1	Wee1-Mik1	Cdc2/Cdc13*	<i>Tamaño de cuenca</i>
0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1024

Tabla 8. Atractor de punto fijo obtenido del modelo derivado. Se presenta el atractor de punto fijo obtenido al simular la dinámica de la red de interacciones definida por Davidich y Bornholdt y cuyas reglas lógicas fueron derivadas.

3.2.3 El modelo modificado de la regulación del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

Uno de los problemas que se observan en el modelo de Davidich y Bornholdt, es la presencia del nodo Start que es necesario para comenzar la actividad de la red y que simula un estado de señalización previo al punto de control en G1, sintetizando el efecto de las condiciones de nutrición y tamaño necesarias para activar a las Cinasas del Inicio del ciclo celular (Start Kinases), representadas por el nodo SK; el nodo SK considera como única la actividad de los complejos de cicinas de tipo B (Cig1,Cig2) y Puc1

(relacionada con Cln de *S. pombe*) con Cdc2, sin embargo es necesario distinguir cada complejo por separado para establecer su papel en la regulación de la transición G1/S.

Así, es más indicado eliminar el nodo SK e introducir en su lugar los nodos Cig1 (Cig1/Cdc2), Cig2 (Cig2/Cdc2) y Puc1 (Puc1/Cdc2) que junto con el nodo Cdc13 (Cdc13-Cdc2) considera el papel de las cuatro ciclinas clave en el ciclo celular de *S.pombe*, particularmente se ha observado que las mutantes que carecen de Cig1, Cig2 y/o Puc1 puede sufrir alteraciones del ciclo como la modificación temporal de las fases y la modificación del tamaño celular (Matsuoka et al, 2002).

El complejo Cig1/Cdc2 facilita la transición hacia la fase S promoviendo la degradación del inhibidor de CDKs, Rum1, mediante su fosforilación, sin embargo el complejo no es inhibido por Rum1 (Martin-Castellanos et al, 2000; Blanco et al, 2000). Así mismo, Cig1/Cdc2 es inactivado por Ste9 que promueve su degradación por ubiquitinación (Blanco et al, 2000).

Por otro lado el complejo Cig2/Cdc2 es un cinasa de inicio en la transición G1/S y su expresión está regulada por el factor de transcripción Cdc10/Res. El complejo puede inhibir la actividad de Ste9/APC mediante su fosforilación, y promover la degradación de su inhibidor Rum1 mediante fosforilación durante la fase G1 tardía (Mondesert et al, 1996; Jaime et al, 2000). Rum1 puede unirse al complejo Cig2/Cdc2 e inhibir su actividad, sin embargo tal inhibición no es tan fuerte como la observada hacia Cdc13/Cdc2 que la inactiva por completo. En adición, Cig2/Cdc2 puede desfosforilar el complejo Cdc13/Cdc2. (Mondesert et al, 1996). Es interesante apuntar que Cig2 es estabilizado por unión a Rum1, siendo no susceptible a degradación por APC, así en G1, Rum1 y Cig2 están presentes (Martin-Castellanos et al, 2000) La degradación de Cig2 es mediada por Slp1 y no por Ste9 (Rupeš I, 2002).

Finalmente el complejo Puc1/Cdc2 si bien puede promover el inicio de la transición G1/S, el complejo es incapaz de iniciar la fase S de forma independiente a las ciclinas Cig1, Cig2 y particularmente Cdc13 (Moser et al, 2000). Puc1 es inactivada por Rum1 y Ste9 por fosforilación; la unión inhibitoria de Rum1 al complejo Puc1/Cdc2 no es fuerte, mientras que es notable que los niveles de Puc1 permanezcan bajos durante todo el ciclo celular (Blanco et al, 2000).

Finalmente, los autores toman en consideración el papel de la fosfatasa sin identificar PP, sin embargo evidencia experimental reciente apunta a que Clp1, miembro de la familia de fosfatasas Cdc14, puede tomar ese papel funcional en la red. Se ha demostrado que Clp1 inhibe la actividad de Cdc25 uniendose y desfosforilandola (Wolfe et al, 2004).

En la figura 23 se muestra la red de interacción para esta red propuesta, como en las figuras previas las flechas negras indican interacciones positivas y los rombos interacciones de tipo negativo,

mientras que la tabla 9 muestra las reglas lógicas derivadas para la misma red, se adopta la misma simbología ya explicada al inicio de este capítulo.

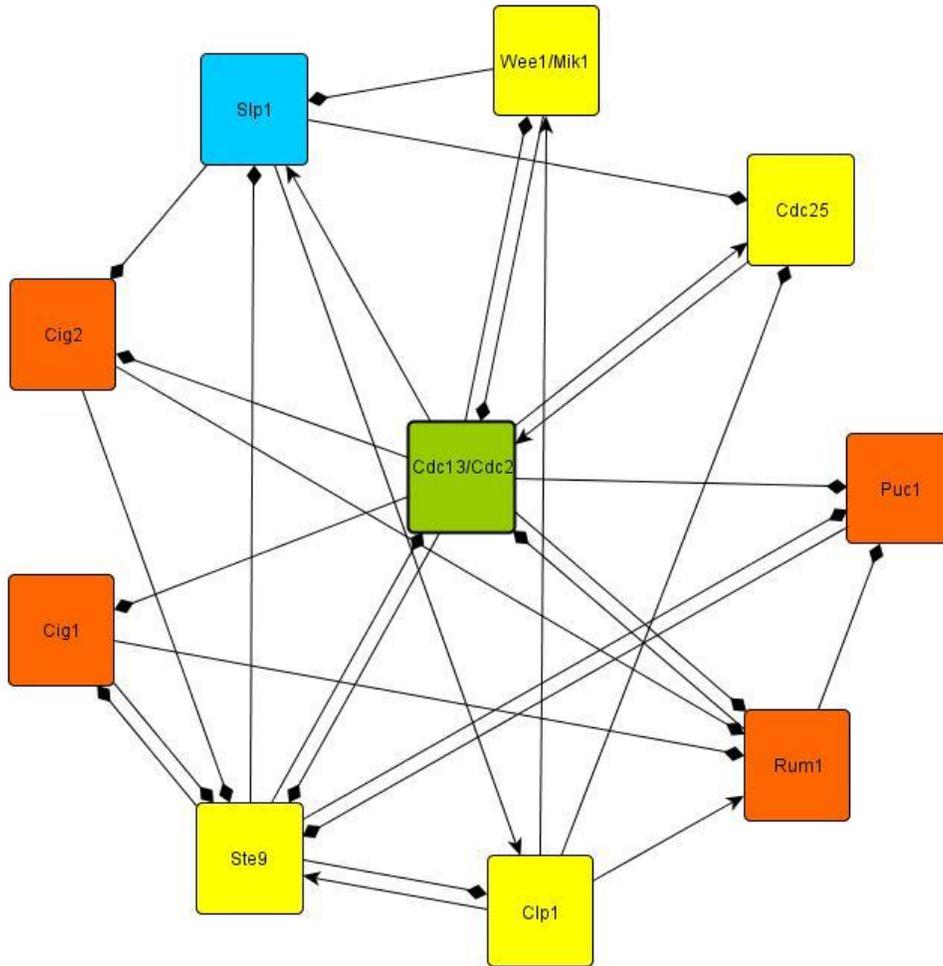


Figura 23. Red de regulación modificada del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*.

Nodo	Regla lógica
Cig1	$(\neg \text{Ste9}) \ \& \ (\neg \text{Cdc2})$
Cig2	$(\neg \text{Slp1}) \ \& \ \neg \text{Cdc2}$
Puc1	$\neg (\text{Rum1} \ \& \ \text{Ste9}) \ \& \ \neg \text{Cdc2}$
Cdc2	$(\neg \text{Ste9} \ \& \ \neg \text{Rum1}) \ \ (\neg \text{Wee1} \ \& \ \neg \text{Clp1}) \ \& \ \text{Cdc25}$
Wee1	$\text{Clp1} \ \& \ \neg \text{Cdc2}$
Ste9	$((\neg \text{Cig2} \ \& \ \neg \text{Cig1} \ \& \ \neg \text{Puc1}) \ \ (\neg \text{Cdc2})) \ \& \ \text{Clp1}$

Rum1	$((!(Cig1 \ \& \ Cig2)) \ \& \ ! \ Cdc2) \ \& \ Clp1$
Cdc25	$(! \ Slp1) \ \& \ (Cdc2) \ \& \ (Clp1)$
Slp1	$Cdc2 \ \& \ (!Wee1 \ \& \ !Ste9)$
Clp1	$(!Ste9) \ \& \ Slp1$

Tabla 9. Reglas lógicas del modelo modificado propuesto para la red de la figura 23.

3.2.3.1 Resultados

Se encontró un único atractor de tipo ciclo límite de grado 7 con una cuenca de 1024 estados (Véase la Tabla 10). Se puede observar que el atractor recupera algunos perfiles importantes de la regulación del ciclo celular que ya recuperaba el modelo de Davidich y Bornholdt, particularmente de las fases G1, G2 y M, aunque no logra recuperar de forma completa las transiciones G1/S o fase G2/M, y la fase S parece no estar completamente caracterizada.

Cig1	Cig2	Puc1	Cdc2	Wee1	Ste9	Rum1	Cdc25	Slp1	Clp1	Posible correspondencia
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	G1 temprana
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	G1/S
1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	S temprana
0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	S tardia
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	G2 temprana
0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	G2 Tardia
0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	Salida de M

Tabla 10. Atractor del modelo de red booleana de la regulación del ciclo celular propuesto para *S. pombe*. Se observan con diferentes colores las diferentes fases o transiciones que se logran recuperar en este modelo.

Lo interesante de esto es que la incorporación de las cinasas de inicio parece ser importante y la simple incorporación de estas como la revisión de sus reglas y la regulación de la fosfatasa Clp1 canalizan el sistema a un atractor cíclico como el reportado por ejemplo en el modelo de Fauré y colaboradores. Esto podría ser relevante al momento de elaborar un modelo mucho más elaborado de la red de control, puesto

que la modificación aquí hecha está muy lejos de ser un modelo completo. Discutiré estos resultados en la sección 5.2 de este trabajo.

3.3 El modelo de red del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*

Como se describió en la sección 2.2 de este trabajo, uno de los organismos modelo de los que se tiene mayor caracterización de los componentes moleculares que controlan el ciclo celular es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lo que ha facilitado la implementación de modelos de red en muy diferentes formalismos: basados en ODE (Ciliberto *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2010), basados en ecuaciones diferenciales estocásticas (Zhang *et al.*, 2006; Braunewell y Bornholdt, 2007; Okabe y Sasai, 2007) e híbridos (Barberis *et al.*, 2007). Sin embargo, para los fines de esta tesis, el modelo de red booleana propuesto por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2004), es fundamental.

En su modelo, los autores plantean una red de control mínima compuesta por 11 nodos: cuatro grupos de ciclinas en unión a cdc28, representadas por los nodos Cln1-2, Cln3, Clb1-2, Clb5-6; el inhibidor estequiométrico Sic1; los nodos Cdc20/Cdc14 y Cdh1 que activan al complejo APC; los factores transcripcionales SBF y MBF para las ciclinas Cln1-2 y Clb5-6 respectivamente, Mcm1/SFF para las ciclinas Clb1-2 y Swi5 para el inhibidor Sic1 (Véase la figura 24). Tal como sucede en el modelo de Davidich y Bornholdt, la dinámica de la red esta descrita por un formalismo basado en umbrales (Véase la sección 3.1)

El conjunto de eventos moleculares que estos nodos controlan pueden ser descritos sintéticamente así: Al alcanzar un tamaño crítico, una señal de inicio activa al complejo Cln3/cdc28, este activa a los factores transcripcionales MBF y SBF que dirigen la síntesis de las ciclinas Clb5-6 y Cln1-2 respectivamente, mientras que la activación de las ciclinas Clb5-6 marca el inicio de fase S, la de Cln1-2 a la fase G1 y la transición G1/S. Durante G1 la ciclina Clb1-2 esta inactiva debido a que su factor transcripcional, Mcm1/SFF está inactivo, debido a que Cdh1/APC se encuentra presente para degradarlo, sin embargo, la actividad de Clb5-6 permite la inactivación de Cdh1, lo que lleva a la activación de Clb1-2 durante fase G2 teniendo máximo hacia M, además es importante destacar que Clb1-2 es un activador positivo de su propio factor de transcripción haciendo un asa de retroalimentación positiva.

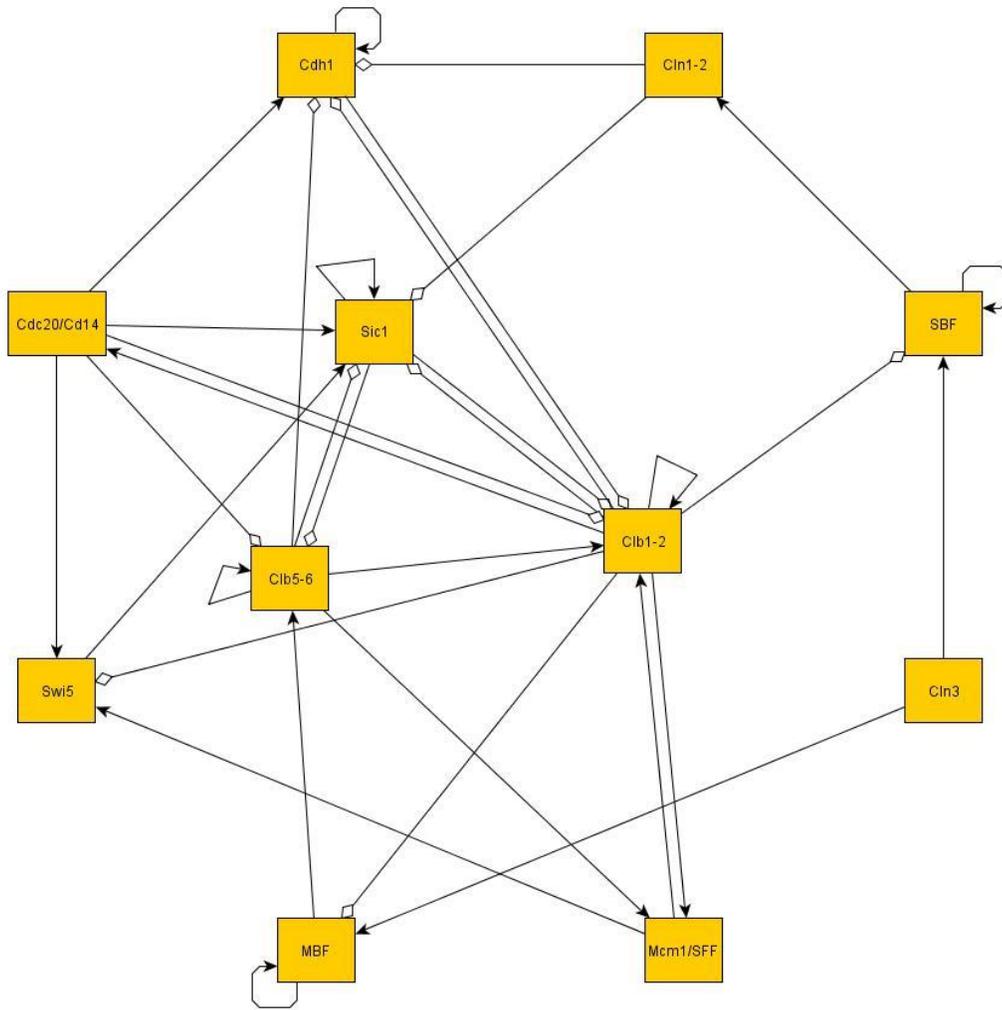


Figura 24. Red de regulación del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*. Las flechas indican interacciones de tipo positivo y los rombos indican interacciones de tipo negativo, las flechas de regulación de un nodo a sí mismo indican auto-activación. (Modificado de: Li et al, 2004).

Conforme se transita por fase G2, Clb1-2 inactiva al factor transcripcional SBF, lo que al mismo tiempo ocasiona la inactivación de MBF, siendo no muy claro que tan dependiente de Clb1-2 es este mecanismo en cascada, sin embargo para los autores este es un proceso determinado por Clb2; finalmente la activación de Clb1-2 conduce la entrada a Mitosis. Para asegurar la salida de mitosis es necesaria la activación de Cdc20, por un lado permitiendo la degradación de Clb5-6 y parcialmente a Clb1-2 (dado que Cdh1 directamente degrada a este nodo), sin embargo Clb1-2 activa a Cdc20

iniciando así mismo la salida de mitosis.

El modelo de Li logra recuperar 7 atractores de punto fijo que se observan en la Tabla 11. Como se observa, la mayor parte de estos son atractores presentan tamaños de cuenca pequeños, y sólo uno de ellos parece tener interpretación en los datos experimentales a decir de los autores. Este atractor, que aparece en la tabla 11 con el número 1 concentra el 86.13% de los 2048 estados de la red y sus configuraciones, parecen recuperar el comportamiento de una fase G1 estacionaria. Para evaluar la concordancia con los datos experimentales, los autores analizaron esta cuenca y encuentran que justamente la trayectoria al atractor contiene la evolución temporal de difentes estados del ciclo celular en el orden preciso en que debería ocurrir.

Como se muestra en la tabla 12, una trayectoria particular en la cuenca que parte del estado que corresponde al INICIO (CLN3 encendida), transita a lo largo de otros 11 estados hasta alcanzar el atractor, correspondiente cada estado intermedio a las diferentes fases y transiciones del ciclo. De esta forma los autores aseguran que esta red esta robustamente constituida puesto que el sistema se canaliza a este atractor (Véase Li *et al.*, 2004 y el capítulo 5 de este trabajo para una discusión más amplia).

Atractor	Cln3	MBF	SBF	Cln1,2	Cdh1	Swi5	Cdc20	Clb5,6	Sic1	Clb1,2	Mcm1	Tamaño de la cuenca
1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1,764
2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	151
3	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	109
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9
5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	7
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Tabla 11. Atractores encontrados en el modelo de Li *et al.*, 2004. Se observa que el atarctor 1 tiene una cuenca con 86.13% de los estados totales de la red y que corresponde una fase G1 estacionaria.

A pesar de estos resultados, este modelo es incapaz de recuperar el perfil completo de expresión a la salida de mitosis así como mostrar inconsistencias con diversos fenotipos mutantes. Por tales razones se han propuesto adaptaciones que incoporan variaciones temporales en la activación de los nodos, particularmente, formalismos que permiten retrasos temporales en diferentes nodos mediante

la incorporación de nodos que representan fases del ciclo y no reguladores al interior de este (Irons, 2009; Mangla *et al*, 2010). De ellos, el modelo propuesto por Irons es destacable no sólo por la incorporación de retrasos en la activación algunos nodos, sino porque es capaz de recuperar los perfiles de activación/inactivación reportados para diferentes mutantes que el modelo de Li no lograba recuperar. Si bien es cierto, como se discutió para el modelo de Davidich y Bornholdt, que el enfoque booleano basado en umbrales puede no necesariamente describir el efecto combinatorio que los diferentes nodos tienen en la red, el tener un modelo basado en reglas lógicas es más adecuado para los fines de este trabajo, sin embargo, y aún cuando el modelo de Irons logra describir con mayor detalle las fases del ciclo y sus respectivas transiciones, la incorporación de retrasos temporales dificulta el análisis y la extensión a modelos con muchos más nodos o acoplados a otras redes que regulen el ciclo.

Cln3	MBF	SBF	Cln1,2	Cdh1	Swi5	Cdc20/Cdc14	Clb5,6	Sic1	Clb1,2	Mcm1SFF	Fases
1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	INICIO
0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	G1
0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	G1
0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	G1
0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	S
0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	G2
0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	M
0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	M
0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	M
0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	M
0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	M
0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	G1
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	G1 Estacionaria

Tabla 12. Secuencia temporal de estados en la trayectoria hacia el atractor 1 del modelo de Li *et al*. Se observa que desde el inicio hay 13 pasos de tiempo hasta que el sistema se canaliza en el 86.13% de sus estados a un único atractor que representa una fase G1 estacionaria.

En ese sentido, partiendo de la información disponible en los modelos de Irons y Li, se propone aquí un modelo que incorpora las interacciones más importantes entre ambas redes con las reglas

lógicas actualizadas y considerando un enfoque booleano sincrónico sin retrasos temporales como el derivado anteriormente para la red del control del ciclo celular en *S. pombe*. Resultara evidente para el lector que muchos reguladores no fueron considerados en esta propuesta, y la razón de ello es simple, muchas rutas aún no están completamente claras y la información experimental es confusa como para incorporar en este modelo, por otro lado, algunas de las interacciones incorporadas en el modelo de Irons sólo tienen sentido si se consideran diferentes niveles de expresión de los nodos o bien reglas alternativas en función de diferentes tiempos de expresión, por lo que su incorporación puede no ser adecuada en el esquema aquí considerado; por lo anterior, en la siguiente sección se detalla el modelo sugerido.

3.3.1 Una propuesta de modelo de red booleana de la regulación del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*

Considerando la información previa de los modelos de Li e Irons así como de la evidencia experimental de la sección 2.1, en esta sección se propone una red que incorpora algunos de los reguladores más importantes y suficientes para recuperar las fases y transiciones características del ciclo en *S. cerevisiae*. Este modelo de red no incorpora los retrasos temporales que el modelo de Irons utiliza y formaliza la red mediante la derivación de las reglas lógicas a diferencia del modelo propuesto por Li, se incorporan además interacciones propuestas en redes de interacción inferidas por microarreglos (Véase Landry *et al.*, 2014; y Haase y Wittenberg, 2014)

En términos generales se ha descrito que el ciclo celular en *S. cerevisiae* está regulado por este conjunto clave de moléculas: Cln3 activa a Cln1 y Cln2, estas inhiben a Cdh1 y Sic1 lo que permite la activación de Clb5 y Clb6 permitiendo la entrada a fase S por un lado, y por otro Clb1 y Clb2 comienzan a ser activadas permitiendo la entrada a fase M; el inhibidor de CDK Sic1; los activadores del APC: Cdc20 y Cdh1; los factores transcripcionales SBF y MBF de las ciclinas Cln1,2 y Clb5,6 respectivamente, SFF de Clb1,2 y Swi5 de Sic1 como de Cln3. Además, en esta propuesta se incorporan los reguladores Yox1, Yhp1, Hcm1, Cdc14 y las vías FEAR y MEN (Véase la Tabla 13 y la Figura 25).

Nodo	Regla lógica	Argumento de apoyo
MBF	CLN3	El complejo activo Cdk1-Cln3 activa a los factores transcripcionales SBF y MBF (De Bruin <i>et al.</i> , 2004)
SBF	(CLN3 MBF) & !(YOX1 YHP1)	El complejo activo Cdk1-Cln3 activa a los factores transcripcionales

		SBF y MBF (De Bruin <i>et al.</i> , 2004).
CLN3	SWI5 & !(YOX1 YHP1)	Swi5 regula directamente la transcripción de Cln3 al unirse a múltiples sitios en su promotor (Di Talia <i>et al.</i> , 2009). Yhp1 y Yox1 pueden inhibir la actividad de Cln3 en fase M tardía. Cuando alguna de las dos proteínas está presente (entre fase M y G1 temprana), solo la actividad de Mcm1 es capaz de contrarrestar su inhibición (Wittenberg y Reed, 2005; Bähler, 2005).
CLN12	(SBF MBF) & ! CLB12	La transcripción de Cln1 y Cln2 es controlada positivamente por SBF y MBF (Nasmyth y Dirick, 1991), y negativamente por las Clb2 (Koch <i>et al.</i> , 1996)
YHP1	SBF MBF	La transcripción de YHP1 puede ser efectuada por SBF o MBF de forma independiente (Horak <i>et al.</i> , 2002)
YOX1	SBF & MBF	YOX1 está bajo el control transcripcional tanto de SBF y MBF (Spellman <i>et al.</i> , 1998; Horak and Snyder, 2002; Pramila <i>et al.</i> , 2002)
HCM1	SBF & MBF	El promotor de HCM1 contiene sitios de unión para MBF y SBF; ambos factores transcripcionales se unen a HCM1 <i>in vivo</i> , mientras que los análisis de mutantes muestran que la transcripción de HCM1 está sujeta a regulación positiva redundante por SBF y MBF, por lo que se ha propuesto que ambos son necesarios para su transcripción (Spellman <i>et al.</i> , 1998; Iyer <i>et al.</i> , 2001)
SFF	SBF & HCM1	Hcm1 regula positivamente la transcripción de FHK1 y FHK2 que son parte del complejo SFF (Pramila <i>et al.</i> , 2006). La actividad de SFF parece estar correlacionada positivamente con la actividad de SBF, por lo que puede suponerse que SBF es un regulador transcripcional positivo de SFF, en particular de FHK2 (Haase <i>et al.</i> , 2014)
SWI5	SFF	Una vez activas, SFF regulan proteínas importantes de fase M, entre ellas, SFF activa transcripcionalmente a Swi5 (Lyndall <i>et al.</i> , 1991; Wittenberg y Reed, 2005).
CLB56	! CDC20 & ! SIC1 & MBF	La transcripción de Clb5 y Clb6 es activada por MBF (Ayte <i>et al.</i> , 2001). La degradación de ambas ciclinas es activada por Cdc20 (Visintin <i>et al.</i> , 2001). Sic1 es un inhibidor estequiométrico de los complejos Cdc28/Clb5 (Schwob, <i>et al.</i> , 1994).
CDC20	CLB12 & SFF	SFF activa transcripcionalmente a Cdc20 (Wittenberg y Reed, 2005). La fosforilación de Cdc20 por parte de Clb2 es necesaria para su activación (Rudner y Murray, 2000).
CDH1	!(CLN12 & CLB56 & CLB12) CDC14	Cln2, Clb5 y Clb2 fosforilan e inhiben a Cdh1 desde G1 tardía a fase M (Zachariae <i>et al.</i> , 1998; Verma <i>et al.</i> , 1997; Nash <i>et al.</i> , 2001). Cdc14 puede desfosforilar a Cdh1-APC, inhibiendo su degradación y permitiendo su acumulación (Visintin <i>et al.</i> , 1998)
SIC1	(SWI5) !(CLN12 & CLB56 & CLB12)	Swi5 regula positivamente la transcripción de Sic1 (Knapp <i>et al.</i> ,

		1996). La fosforilación de Sic1 por complejos Cdk-ciclina la llevan a degradación por la vía SCF (Verma <i>et al.</i> , 1997).
CLB12	SFF & ! (CDC20 & CDH1)	La transcripción de Clb2 es controlada por SFF, mismo que es activado mediante Clb2 mediante un feedback positivo (Amon <i>et al.</i> , 1993; Pic-Taylor <i>et al.</i> , 2004), La degradación de Clb1 y Clb2 es activada por Cdc20 (Wasch y Cross, 2002) y Cdh1 (Visintin <i>et al.</i> , 1997)
CDC14	FEAR & MEN	Cdc14 es inactivado por Net1 y Sir2. Net1 es inactivado por la fosforilación de Cdc5 que es parte de la vía FEAR. Dos poblaciones de Cdc14 son identificables: una primer población que es activada en el núcleo por la vía FEAR (Pereira <i>et al.</i> , 2002; Saunders, 2002), sin embargo esta activación es insuficiente para asegurar la salida de mitosis. Además Cdc14 es el último elemento de la vía MEN (Jaspersen y Morgan, 2000). Por otro lado la activación por MEN es necesaria para la salida de Mitosis. Se ha propuesto que la actividad de Cdc14 sólo ocurre cuando Cdc14 y Net1 están fosforiladas, proceso ocurre cuando la vía FEAR es activa (Visintin <i>et al.</i> , 2003)
FEAR*	CDC20	La actividad de la red FEAR es iniciada por la actividad de APC-Cdc20 que induce la degradación de Pds1, después de la proteólisis de Pds1, la separasa Esp1 corta las cohesinas, activando FEAR (Pereira <i>et al.</i> , 2002)
MEN*	FEAR & CLB12	FEAR y Clb2 activan la red MEN vía Tem1. Clb2 activa a Cdc5 que junto a Sp1 (parte de FEAR), inhiben a PP2A y Bub2-Bfa1, activando MEN (Hu <i>et al.</i> , 2001; Queralt <i>et al.</i> , 2006)

Tabla 13. Reglas lógicas del modelo de red booleana de la regulación del ciclo en *S. cerevisiae* propuesto. El nodo CLB12 conjunta la actividad de Clb1 y Clb2, el nodo CLB56 la actividad de Clb5 y Clb6, CLN12 a la de Cln1 y Cln2. Los asteriscos (*) en los nodos FEAR y MEN hacen referencia a que estos nodos en realidad comprenden dos subredes de regulación importantes en la transición anafase-metafase, por simplicidad se asumió como un conjunto la actividad de estas redes en la regulación de los elementos aquí considerados, un discusión más amplia al respecto se describe en el capítulo 5.

Cdc14 es una fosfatasa requerida para la salida de mitosis (Bardin y Amon, 2001), efectuando su actividad básicamente en mitosis tardía; se ha observado que su sobreexpresión lleva a las células a arresto en fase G1, mientras que los mutantes de pérdida de función presentan arresto en telofase con una alta actividad de CDK. Es además un importante regulador de Cdh1 y Sic. Sus niveles se mantienen constantes durante el ciclo mientras que su actividad se observa en fase M tardía, mientras que en G1, S y la transición S/G2 como en M temprana es inactivo (Fisher *et al.*, 2012)

Hcm1 es miembro de los factores de transcripción tipo FOX, y regula los genes de fase S tardía encargados de la segregación de los cromosomas como de la gemación, así como de la regulación de

observado en mutates que expresan formas no degradables de ciclinas mitóticas. Se ha sugerido que la via MEN es importante para la entrada a anafase y la correcta salida de mitosis, por lo que su incorporacion en esta red es necesaria para la descripción de la fase M, en particular los eventos que permiten la activación de la fosfatasa Cdc14 (Dumitrescu y Sauders, 2002; Jones *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha sugerido que una via paralela es importante y necesaria para los eventos de fase M, y particularmente, la regulación de Cdc14. (Rock *et al.*, 2009)

Por otro lado la via FEAR es un importante regulador de la actividad de Cdc14 en etapas tempranas en anafase. FEAR es el acrónimo de Fourteen Early Anaphase Release, compuesta de 4 proteínas importantes: Esp1, Slk19, Cdc5 y Spo12. La red FEAR es crítica en el control de la correcta segregación de los cromosomas y su integración con otros eventos durante anafase, críticamente la liberación de Cdc14 del nucleo que en etapas tempranas de la anafase es critica para el control de la actividad de los complejos Clb-CDK (Rock y Amon, 2009). En conjunto, las redes FEAR y MEN son críticas para la salida de mitosis (Weiss, 2012), por lo que su incorporación en el modelo de red es importante para describir los eventos de fase M.

En la tabla 14 se presentan los resultados de la simulación de la red especificada en la figura 25 y bajos las reglas propuestas en la tabla 13. Como en el caso anterior, se siguió un enfoque sincrónico con la ayuda del paquete BoolNet (Véase el apéndice A)

3.3.1.1 Resultados

Se obtuvieron 2 atractores, un atractor de punto fijo con un tamaño de cuenca de 102400 estados, el segundo atractor es un ciclo limite de grado 5 con un tamaño de cuenca de 28672 estados como se observa en la tabla 14. En la sección 5.2 se analizan estos resultados.

	MBF	SBF	YOX1	HCM1	YHP1	SFF	SWI5	CLN3	CLN12	CLB12	CDC20	CLB56	SIC1	CDH1	CDC14	FEAR	MEN	Posible fase
Atracto																		
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	G1- Quiescente
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	G1

B	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	G1/S
	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	S
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	G2
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	M

Tabla 14. Atractores encontrados al simular dinámicamente el comportamiento del modelo de red propuesto.

3.4 El modelo de red de regulación del ciclo celular genérico en mamíferos

En este apartado se describirán los eventos moleculares que caracterizan el modelo genérico en mamíferos propuesto por Novak y Tyson (Novak y Tyson, 2004) y su reducción a un modelo booleano por Fauré y otros (Fauré *et al*, 2006). Partiendo de este modelo de red simplificado y su revisión, se actualizaron algunas reglas lógicas incorporando datos nuevos y comprobando que su comportamiento dinámico se caracteriza por un único atractor de punto fijo que representan G0 y un atractor cíclico de grado 7 que caracteriza la transición desde G1 a M. Se discute la regulación en el modelo y se hace una revisión de los componentes moleculares de la red de interacción.

Una red de CDKs dirige la progresión a lo largo de las cuatro fases sucesivas G1, S, G2 y M del ciclo celular en mamíferos. Estas fases forman parte de un estado característicamente proliferativo, sin embargo cuando las células no se encuentran en alguna de estas fases, permanecen en un estado quiescente, denominado G0. La red de regulación que controla las transiciones del ciclo celular está caracterizada por conjuntos de circuitos interconectados efectuando retroalimentaciones positivas y negativas. Esta complejidad estructural hace difícil establecer un modelo completo de la regulación del ciclo, por lo que la mayoría de los modelos se han centrado en puntos particulares de control como la transición G1/S (Pfeuty, 2012), el punto de restricción en G1 (Novak y Tyson, 2004) y la transición G2/M (Aguda, 1999), o bien partiendo de aproximaciones similares a ciclos circadianos describiendo la progresión de todas las fases y reduciendo al mínimo los componentes necesarios (Chauhan et al, 2011).

Considerando lo anterior, Novak y Tyson (Novak y Tyson, 2004) propusieron un modelo de la regulación durante el paso al punto de restricción en G1. Este es un punto de control sin retorno durante la fase G1 a través del cual la célula pasa irreversiblemente y se incorpora al ciclo celular, para ello deben existir los factores de crecimiento necesarios para salir de G0 (estado quiescente) pasando a G1 temprano ya en estado proliferativo, una vez pasado el punto de restricción la célula es capaz de completar el ciclo sin presencia de factores de crecimiento.

En su modelo, Novak y Tyson proponen que el paso a mitosis está determinado por la actividad

de la CDK de tipo 1 (Cdk1) en complejo con las ciclinas de tipo B (CycB) mismas que permanecen ausentes en G1 y se acumulan en las fases S, G2 y M. Para fines de modelación, los autores suponen que CycB es capaz de exhibir un comportamiento autocatalítico similar al observado las ciclinas Clb1 y Clb2 (de tipo B) en *Saccharomyces cerevisiae* (véase la sección 3.2). Por otro lado, los complejos Cdk1-CycB están negativamente regulados por la actividad del Complejo Promotor de la Anafase (APC) que ubiquitina a CycB llevándola a degradación por la vía del proteosoma, sin embargo, esta degradación no es directa si no que es mediada por proteínas adaptadoras que reconocen a CycB presentándola al complejo APC, particularmente se sabe que las proteínas Cdc20 y Cdh1 son capaces de interactuar con CycB y llevarla a degradación. Lo interesante de este mecanismo de regulación negativa es que Cdc20 es activada por los complejos Cdk1-CycB particularmente en la anafase; en cambio Cdh1 es inhibida por los complejos Cdk1-CycB, siendo activa durante la fase G1.

Lo que se observa aquí es un comportamiento antagónico entre Cdh1 y APC con respecto al heterodímero Cdk1-CycB, lo que supone, en principio, la existencia de dos estados funcionales importantes: G1 con actividad de Cdh1 y baja o nula actividad de CycB y otro en S-G2-M con altos niveles de CycB. (Novak y Tyson, 2004). Estos dos estados son referidos como el INICIO y el FIN del ciclo celular en mamíferos.

Fauré y colaboradores (Fauré et al, 2006) redujeron este modelo a uno booleano simplificando el análisis y recuperando las mismas dinámicas reportadas por Tyson y Novak. En este caso el modelo describe explícitamente las siguientes consideraciones:

La red se compone de los nodos CycD, Rb, E2F para agrupar la familia de factores de transcripción E2F, CycE, CycA, p27, Cdh1 y Cdc20, Ubch10 y CycB. CycD es necesaria para la inactivación total de Rb y para el abatimiento de la actividad de p27, es decir, CycD la inhibe directamente. Por otro lado p27 es un inhibidor de la actividad de CycE y CycA al formar un complejo con ellas: así cuando p27 y CycE o CycA están activas, el complejo se forma y la actividad de las ciclinas es bloqueada. Para modelar este hecho los autores proponen que p27 actúa de forma contraria en los blancos de estas ciclinas, es decir, en la red se modela explícitamente con interacciones desde p27 a los blancos de CycE y CycA con un signo opuesto al de las ciclinas.

Con respecto a Rb, este forma un complejo con los miembros de la familia E2F pasando estos de activadores transcripcionales a represores en parte mediante el reclutamiento de remodeladores de cromatina. Por esa razón los autores consideran la actividad de Rb sobre E2F mediante inhibición directa de E2F y sus blancos.

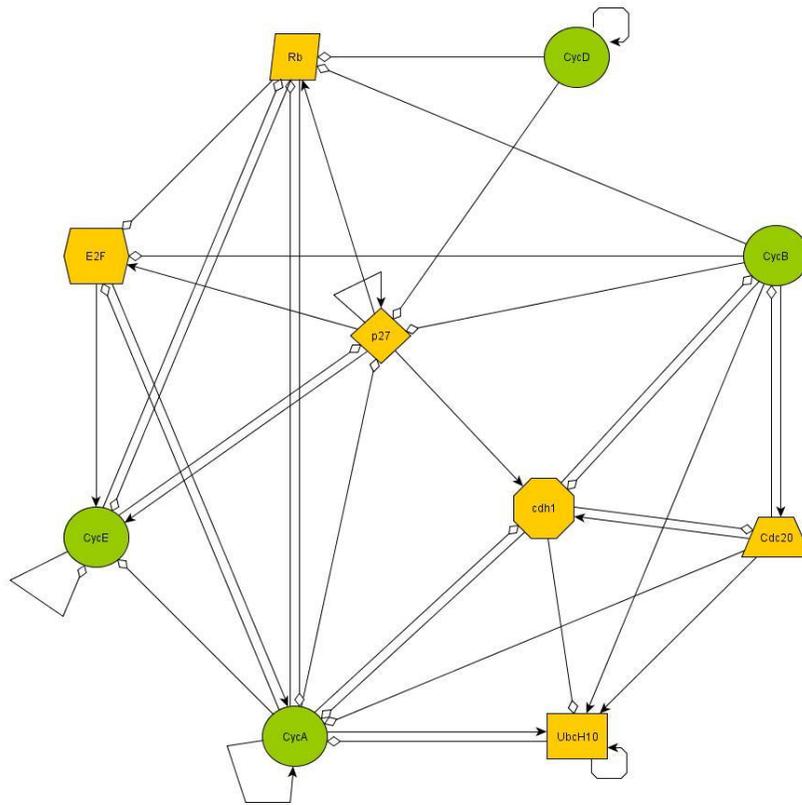


Figura 26. Red de regulación del control del ciclo celular en mamíferos. Los rombos blancos indican regulación negativa mientras que las flechas indican activación positiva (Tómada y modificada de: Fauré et al, 2006)

En la transición G1/S, E2F activa la transcripción de CycE, que a su vez promueve la inactivación de Rb así como la fosforilación de p27 llevandola a su degradación. La inactivación de Rb por fosforilación permite su disociación de E2F permitiendo así la transcripción de más CycE, creando un loop positivo donde se incrementa la fosforilación de Rb y la degradación de p27, como se observa en la Figura 26. Otro blanco de E2F es CycA, que es activado ligeramente después de CycE cuando Rb esta completamente inactiva, por otro lado, CycA contribuye a la inactivación de Rb y p27.

La degradación de los diferentes complejos proteicos es representada por la actividad de los activadores del APC: Cdh1 y Cdc20. Por un lado en la transición G2/M, CycA inactiva a Cdh1, manteniendo así al complejo APC inactivo y permitiendo la acumulación de CycB. Por otro lado CycB activa a Cdc20, activación así su degradación puesto que CycB es un blanco de Cdc20, permitiendo así la transición de metafase a anafase. Además Cdc20 es responsable de la degradación de CycA, e

indirectamente por ello, activa a Cdh1. Cdh1 completa la inactivación de CycA y CyB e inactiva a Cdc20.

Finalmente la enzima de la familia E2, UbcH10 es necesaria para la inactivación Cdh1 dependiente de CycA pero no así de otros sustratos, así cuando todos los sustratos han sido degradados, UbcH10 se ubiquitina a sí misma previniendo la degradación de CycA por parte del APC. Esto hace coherencia con la activación de CycA en fase S junto con la presencia de Cdh1. Así este hecho permite incorporar, a decir de los autores, la inactivación de CycA por Cdh1.

Para simplificar las interacciones anteriores y las consideraciones generales del modelo propuesto por Fauré y colaboradores, en la Tabla 15 se establecen las reglas lógicas que determinan las interacciones entre los diferentes nodos de la red regulatoria (Véase la Figura 26)

Nodo	Regla lógica	Argumento
CycD	CycD	CycD es entrada y es considerada como una constante referida a la señalización por mitogenos
Rb	(! CycA & ! CycB & ! CycD & ! CycE) (p27 & ! CycB & ! CycD)	Rb se expresa en ausencia de ciclinas que la inhiben por fosforilación (Taya,1997), se expresa en presencia de CycA o CycE siempre que su actividad es bloqueada por p27 (Coqueret, 2003)
E2F	(! Rb & ! CycA & ! CycB) (p27 & ! Rb & ! CycB)	Se activa en ausencia de Rb que inhibe su autoactivación transcripcional (Helin, 1998), y en ausencia de CycA y CycB que inhiben a E2F (Novak y Tyson, 2004), siempre que p27 bloquee la actividad de CycA, esta puede estar presente (Coqueret, 2003)
CycE	(E2F & ! Rb)	La presencia de E2F es critica para la activación de E2F mientras que Rb inhibe su actividad al bloquear a E2F (Helin, 1998).
CycA	(E2F & ! Rb & ! Cdc20 & ! (Cdh1 & UbcH10)) (CycA & ! Rb & ! Cdc20 & ! (Cdh1 & UbcH10))	E2F en ausencia de Rb activa la transcripción de CycA (Helin, 1998), además es necesaria la ausencia de Cdc20, así como el par formado por Cdh1 y UbcH10 que llevan a CycA a degradación (Rape y Kirschner, 2004)
p27	(! CycD & ! CycE & ! CycA & ! CycB) (p27 & ! (CycE & CycA) & ! CycB & ! CycD)	p27 es activa en ausencia de ciclinas, una vez presente, bloquea la acción de CycE o CycA sobre su actividad mediante secuestro (Conqueret, 2003)
Cdc20	CycB	CycB indirectamente activa a Cdc20 (Harper et al, 2002)
Cdh1	(! CycA & ! CycB) (Cdc20) (p27 & ! CycB)	Cdh1 es activado en ausencia de CycB y CycA quienes la inhiben por fosforilacion, además Cdc20 activa a Cdh1, mientras que en presencia de p27 la actividad de CycA es bloqueada (Herper et al, 2002)
UbcH10	! Cdh1 (Cdh1 & UbcH10 & (Cdc20 CycA CycB))	Es activa en ausencia de Cdh1; por otro lado, su actividad es mantenida en presencia de Cdh1 siempre que su efecto sea inhibido por CycA, CycB o Cdc20 (Rape y Kirschner, 2004)
CycB	! Cdc20 & ! Cdh1	En presencia de Cdc20 y Cdh1, CycB es llevada a degradación (Harper et al, 2002)

Tabla 15. Reglas lógicas y argumentos que las justifican en el modelo de red booleana del ciclo celular en mamíferos. (Adaptado y modificado de: Fauré *et al.*, 2006)

Considerando las reglas de la tabla anterior y un enfoque sincrónico, los autores recuperan 2 atractores para la red de regulación descrita (Ver Tabla 16): un atractor de punto fijo con un tamaño de cuenca de 512, y un atractor tipo ciclo límite de grado 7 con un tamaño de cuenca de 512. El primer atractor recupera los estados de activación esperados para una fase G0 o quiscente, en donde la actividad de Rb, p27 y Cdh1 mantiene el sistema regulado de forma negativa y la inactivación de CycD indica una ausencia de estímulos externos que inicien la actividad de las CDKs.

Atractor de punto fijo										Possible fase	Tamaño de la cuenca
CycD	Rb	E2F	CycE	CycA	p27	Cdc20	Cdh1	UbcH10	CycB		
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	G0	512
Atractor de tipo ciclo límite de grado 7											
1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	G1	512
1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	G1 tardía	
1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	G1/S	
1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	S temprana	
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	S tardía	
1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	G2	
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	M	

Tabla 16. Atractores resultantes en el modelo de Faúre y colaboradores. Se presentan los dos atractores que resultan de la dinámica descrita por las reglas de la tabla y bajo un enfoque sincrónico. (Datos de: Fauré *et al.*, 2006)

En contraste, el segundo atractor es un ciclo límite compuesto por 7 estados sucesivos que recuperan las siguientes evidencias: En el primer estado se observa la presencia de CycD, Rb, CycE y CycA, por lo que este estado corresponde a una fase G1 temprana. El segundo estado corresponde de forma muy general a una fase G1 tardía donde la presencia característica de E2F y CycA, que en conjunto con CycD, puede caracterizar esta fase. La presencia de Cdh1 y UbcH10, si bien puede deberse a un artefacto del modelo, aunque se ha sugerido que ambos reguladores están presentes en G0 y G1, pero sin actividad (Listovsky *et al.*, 2004)

El tercer estado correspondería a la transición G1/S donde la presencia de CycE es evidente, la actividad de E2F y la inactivación de Rb, se observa que p27 está inactivo y CycD aún se encuentra activa (Blagosklonny y Pardee, 2002).

El cuarto estado correspondería a fase S temprana, se observa la presencia de CycD y CycE y aún más importante, la presencia de CycA que es necesaria para la activación de los eventos de fase S, en

particular los complejos CycA-Cdk2 son necesarios para la replicación del DNA. Se vuelve a observar la presencia y UbcH10 así como de Cdc20, lo cual no corresponde con la actividad de ambos reguladores en esta fase. El quinto estado del ciclo límite correspondería a una fase S tardía donde la actividad de CycD y CycA únicamente regulan los eventos tardíos de la replicación del DNA. El sexto estado correspondería a una fase G2 temprana donde se observa la activación de CycB, y siguen presentes CycD y CycA. La actividad de CycA-Cdk2 es importante en conjunto con CycB-Cdk1 en los procesos de regulación del centrosoma. La presencia de UbcH10 es importante en el final de fase G2 pues su actividad es crítica en la transición G2/M al regular la degradación de CycA y CycB (Lin *et al.*, 2002)

Finalmente el séptimo estado corresponde a una fase M temprana con la característica expresión de Cdc20, UbcH10 y Cdh1. Cdc20 activa al complejo APC en la transición metafase-anafase iniciando la salida de mitosis, mientras que Cdh1, entonces activa al complejo APC en fase M tardía manteniéndose activa hasta fase G1 temprana, mientras que como se mencionó UbcH10 es importante en la degradación de las ciclinas mitóticas, evento necesario para la salida de mitosis, la presencia de CycD y CycB indicaría en la misma dirección, una fase M temprana a los eventos de mitosis (Iwabuchi *et al.*, 2002)

Si bien el modelo anterior recupera algunas de los eventos más importantes durante la transición del ciclo celular en mamíferos, existe algunas inconsistencias que ya se mencionaron como la activación de los complejos Cdh1 y UbcH10 en la transición G1/S y la fase S respectivamente, o la inactividad de p27 en ausencia de CycE, su principal regulador. Sin embargo, y como apuntan los autores, los perfiles de expresión de las diferentes ciclinas características de cada fase es el mismo reportado en la literatura, y aún más, el modelo logra recuperar la fase M de una forma mucho más detallada. En la siguiente sección se presenta una propuesta de red que incorpora la información previa y otra que no ha sido considerada.

3.4.1 Propuesta de red de regulación del ciclo celular genérico en mamíferos

Para los fines de este trabajo, es importante hacer notar que ningún modelo previo ha considerado el papel tan importante de la oncoproteína c-Myc en la regulación de ciclo celular. En términos generales c-Myc es un regulador positivo de CycE en complejo con CDK2 así como de CycD/CDK4 en menor medida. Al menos cuatro rutas generales de control son conocidas por parte de c-Myc sobre el ciclo celular: i) la activación funcional de inhibidor p27, ii) inducción de la fosfatasa Cdc25A, iii) la regulación de CycE mediante su activación indirecta y iv) la retroalimentación de la actividad de c-Myc mediante

CycD junto con el regulador p107 (Amati et al, 1998). En consecuencia, c-Myc parece tener un rol crítico entre la transición de G0 a fase S, particularmente al permitir la entrada a G1 en respuesta a señales inducidas por mitógenos (Alboran et al. 2001).

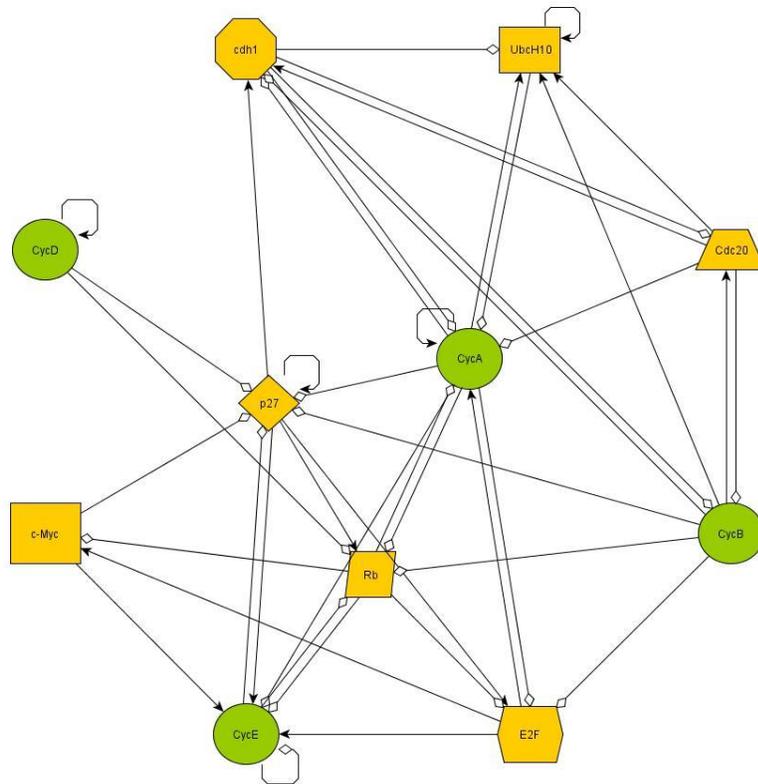


Figura 27. Red e interacción de la regulación del celular en mamíferos modificada. Las interacciones negativas se representan por líneas con rombos vacíos y las interacciones positivas por flechas en color negro

Con el fin de explorar el papel de c-Myc en la dinámica regulatoria del ciclo celular, se modificó el modelo de Fauré y colaboradores incluyendo este regulador y actualizando las reglas lógicas. Para ello, se describirá brevemente la evidencia experimental que apoya la incorporación del nodo c-Myc a esta red de regulación.

i) c-Myc antagoniza la función de p27

La expresión constitutiva de Myc abate la actividad de p27, esto parece ser mediado por el secuestro no covalente de p27, de tal forma que es incapaz de unirse e inhibir a CycE/Cdk2, sin embargo c-Myc no se une directamente a p27 la cual supone que una

proteína (s) media esta acción, si bien se ha propuesto a CycD/Cdk4 como la posible efectora dado que compite con CycE/Cdk2 por unión competitiva con p27, sin embargo, la sobreexpresión de c-Myc no aumenta la unión de las ciclinas D con p27, por lo que por el momento esta interacción es indirecta (Vlach et al, 1996)

ii) c-Myc aumenta la expresión de CycE

La expresión constitutiva de c-Myc incrementa los niveles de expresión de CycE (Perez-Roger et al, 1997), este efecto es rápido y ocurre a nivel transcripcional, y no parece requerir de alguna proteína mediadora; con tales observaciones es fácil suponer que CycE es un blanco transcripcional de c-Myc, sin embargo no existe evidencia formal que soporte este hecho, ya sea de su secuencia o de estudios puntuales del promotor de CycE. Sin embargo, dado que CycE es un blanco de E2F, quizás un mecanismo indirecto mediado por E2F podría ser descrito. No obstante, se ha observado que la sobreexpresión de c-Myc en líneas de fibroblasto en estado quiescente disminuye notablemente el tiempo de entrada a fase G1, aún más, la inducción de CycE exógena es insuficiente para la entrada ya que el efecto que p27 tiene sobre ella rápidamente lleva a arresto en G0 y sólo la co-expresión con c-Myc exógeno permite mantener los niveles de los complejos CycE/Cdk2 aún en presencia de p27 llevando a fase G1 (Müller et al, 1997)

iii) c-Myc es regulada por la actividad de E2F

Se ha propuesto que existe un mecanismo de retroalimentación entre la actividad de pRb y E2F sobre c-Myc. Ya se ha dicho que c-Myc es un regulador positivo de CycE que regula negativamente a pRb, que a su vez regula la actividad de E2F de forma negativa impidiendo la transición G1/S, sin embargo, E2F parece regular a c-Myc, existe evidencia experimental que muestra que la actividad del promotor de c-Myc críticamente depende de la presencia de un sitio de unión con E2F, así la expresión de E2F1 eficientemente induce la transcripción de c-Myc, además la actividad de pRb inhibe la expresión del promotor de c-Myc P2 (Oswald et al, 1994)

Esta evidencia experimental está incluida en la tabla 17, para lo cual las respectivas reglas lógicas de CycE y p27 fueron modificadas incluyéndose además el nodo c-Myc y las respectivas reglas de regulación por pRb y E2F. En la figura 27 se observa la red de regulación modificada propuesta.

Nodo	Regla lógica	Argumento
CycD	CycD	CycD es entrada y es considerada como una constante referida a la señalización por mitogenos
Rb	(! CycA & ! CycB & ! CycD & ! CycE) (p27 & ! CycB & ! CycD)	Rb se expresa en ausencia de ciclinas que la inhiben por fosforilación (Taya,1997), se expresa en presencia de CycA o CycE siempre que su actividad es bloqueada por p27 (Coqueret, 2003)
E2F	(! Rb & ! CycA & ! CycB) (p27 & ! Rb & ! CycB)	Se activa en ausencia de Rb que inhibe su autoactivación transcripcional (Helin, 1998), y en ausencia de CycA y CycB que inhiben a E2F (Novak y Tyson, 2004), siempre que p27 bloqueé la actividad de CycA, esta puede estar presente (Coqueret, 2003)
CycE	(E2F & ! Rb & c-Myc)	La presencia de E2F es critica para la activación de E2F mientras que Rb inhibe su actividad al bloquear a E2F (Helin, 1998). Si bien el mecanismo no es claro, la actividad de c-Myc aumenta los niveles de expresión de CycE y su expresión es necesaria para la entrada a fase G1 desde el estado quiescente (Perez-Roger et al, 1997)
CycA	(E2F & ! Rb & ! Cdc20 & ! (Cdh1 & UbcH10)) (CycA & ! Rb & ! Cdc20 & ! (Cdh1 & UbcH10))	E2F en ausencia de Rb activa la transcripción de CycA (Helin, 1998), además es necesaria la ausencia de Cdc20, así como el par formado por Cdh1 y UbcH10 que llevan a CycA a degradación (Rape y Kirschner, 2004)
p27	(! CycD & ! CycE & ! CycA & ! CycB & ! c-Myc) (p27 & ! (CycE & CycA) & ! CycB & ! CycD)	p27 es activa en ausencia de ciclinas, una vez presente, bloquea la acción de CycE o CycA sobre su actividad mediante secuestración (Conqueret, 2003). En presencia de c-Myc la actividad de p27 es abatida mediante secuestración con una proteína diferente a c-Myc, así el efecto de la expresión de c-Myc es indirectamente desregular a p27 (Vlach et al, 1996)
Cdc20	CycB	CycB indirectamente activa a Cdc20 (Harper et al, 2002)
Cdh1	(! CycA & ! CycB) (Cdc20) (p27 & ! CycB)	Cdh1 es activado en ausencia de CycB y CycA quienes la inhiben por fosforilacion, además Cdc20 activa a Cdh1, mientras que en presencia de p27 la actividad de CycA es bloqueada (Herper et al, 2002)
UbcH10	! Cdh1 (Cdh1 & UbcH10 & (Cdc20 CycA CycB))	Es activa en ausencia de Cdh1; por otro lado, su actividad es mantenida en presencia de Cdh1 siempre que su efecto sea inhibido por CycA, CycB o Cdc20 (Rape y Kirschner, 2004)
CycB	! Cdc20 & ! Cdh1	En presencia de Cdc20 y Cdh1, CycB es llevada a degradación (Harper et al, 2002)
c-Myc	E2F & ! Rb	La actividad del promotor es directamente regulada mediante un sitio de unión a E2F (Oswald et al, 1994), pRb inhibe la actividad del promotor c-Myc P2 y al inactivar a E2F disminuye su expresión (Oswald et al, 1994)

Tabla 17. Reglas lógicas del modelo de red booleana modificado de la regulación del ciclo celular en mamíferos

3.4.1.1 Resultados

Atractor de punto fijo											Tamaño de la cuenca	Posible fase
CycD	Rb	E2F	CycE	CycA	p27	Cdc20	Cdh1	UbcH10	CycB	c-Myc		
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1024	G0
Atractor de tipo ciclo límite de grado 7												
1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1024	G1
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1		G1 tardia
1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1		G1/S
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1		S
1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		G2
1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0		G2/M
1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0		M

Tabla 18. Atractores encontrados para la red modificada de la regulacion del ciclo celular genérica en mamíferos.

Se encontraron nuevamente 2 atractores con un tamaño de cuenca de 1024 estados en ambos casos (Ver tabla18). Un atractor de punto fijo que describe la fase G0 y donde característicamente están activos los inhibidores Rb, p27 y Cdh1, además puesto que c-Myc está inactivo es imposible la entrada a fase G1 siendo c-Myc el nodo maestro de control de la salida del estado quiescente y la entrada a proliferación. El segundo atractor es un ciclo límite de grado 7 que recupera los perfiles de expresión de las fases: G1, G1 tardia, transición G1/S, S, G2, transición G2/M y M. En la sección 5.2 se analizan los resultados con respecto a la evidencia experimental y se discute la pertinencia del modelo.

3.5 Una propuesta de red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*

En la sección 2.4 se estableció de forma muy general cuales son las rutas generales de control del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*, algunas de ellas compartidas con los mecanismos de control en otros organismos eucariontes y otras específicas de plantas. Sin embargo, no se ha logrado proponer una red de regulación que integre de forma coherente todos estos mecanismos. Existen trabajos que han enfocado su atención sólo en fases particulares del ciclo y han tratado de modelar la red subyacente para describir su comportamiento dinámico, por ejemplo, Zhao y colaboradores describen mediante un sistema de EDO no lineales, el modulo que guía el paso por la transición G1/S e irreversiblemente controla la entrada a

fase S, este modulo implica regulación negativa entre 4 componentes de la maquinaria molecular descritos ya en el capitulo 2 de este trabajo (Véase la figura 28): RBR regula negativamente a FLB17 (una proteína relacionada a la familia F-box), FLB17 media la degradación de los inhibidores KRP, por otro lado los KRPs inhiben la actividad de CDKA;1 y finalmente CDKA;1 activa es capaz de fosforilar a RBR e inactivarla. Este modulo parece describir el comportamiento reportado experimentalmente y donde el principal parámetro de transito a fase S es la concentración de los inhibidores KRP, mientras que la actividad de FLB17 depende en gran medida de la actividad de CDKA;1, tal y como se ha reportado experimentalmente. Se observa en este modelo un comportamiento biestable (fase G1 o fase S), (Zhao et al, 2012).

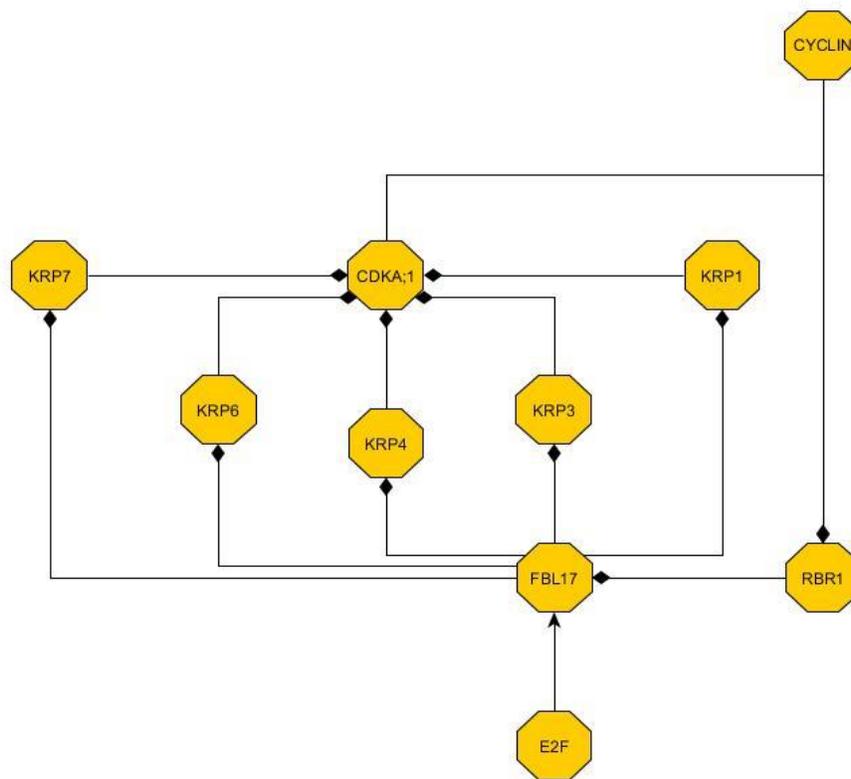


Figura 28. Modulo de control de la transición G1/S en *Arabidopsis thaliana*. La flecha indica regulación positiva mientras que los rombos indican regulación negativa. En el caso del nodo CDKA;1 y CYCLIN, estos actúan en conjunto para inactivar a RBR1, sin embargo aparecen separados puesto que la regulación negativa por parte de los KRP se da únicamente sobre CDKA;1. (Tomada y modificada de: Zhao et al, 2012)

Sin embargo el modelo anterior es incapaz de describir los eventos que anteceden a la transición G1/S, la permanencia en fase S, la entrada a G2, la transición G2/M y la salida a mitosis, y por otro lado

si incorpora de forma notable la vía E2F/RBR crítica para esta transición

En consecuencia, y como parte de un proyecto mucho más general implementado en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo, Epigenética y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la UNAM, varios miembros hemos estado involucrados en el desarrollo de un modelo de red booleana de la regulación del ciclo celular en *Arabidopsis* con énfasis en la raíz, puesto que esta es un excelente modelo para estudiar los mecanismos que determinan el equilibrio entre diferenciación y proliferación celular como de su morfogénesis.

En particular, el objetivo del proyecto es poder recuperar mediante una red de regulación booleana el oscilador biológico subyacente que describe cada una de las fases y transiciones características del ciclo, considerando aquellos reguladores suficientes y necesarios con base a una búsqueda bibliográfica o bioinformática extensa. Si bien es cierto que muchos reguladores moleculares han sido ya delimitados en la literatura, muchos otros sólo han sido propuestos y su validación experimental aún no ha sido hecha.

Uno de los aspectos determinantes del modelo que se pretende desarrollar es que este pueda incorporar diferentes niveles de regulación (transcripcional, postraduccional, etc), y puesto que los modelos propuestos para otros organismos eucariontes no han logrado incorporar esa regulación multinivel del ciclo, creemos necesario analizarlo desde la perspectiva de su comportamiento dinámico. Para los fines de esta tesis la descripción de la topología de la red regulatoria es lo más importante, por lo que el análisis de sus propiedades dinámicas se omitirá, sin embargo, en el siguiente capítulo se analizará como a partir de las propiedades topológicas es posible evidenciar algunas propiedades dinámicas importantes

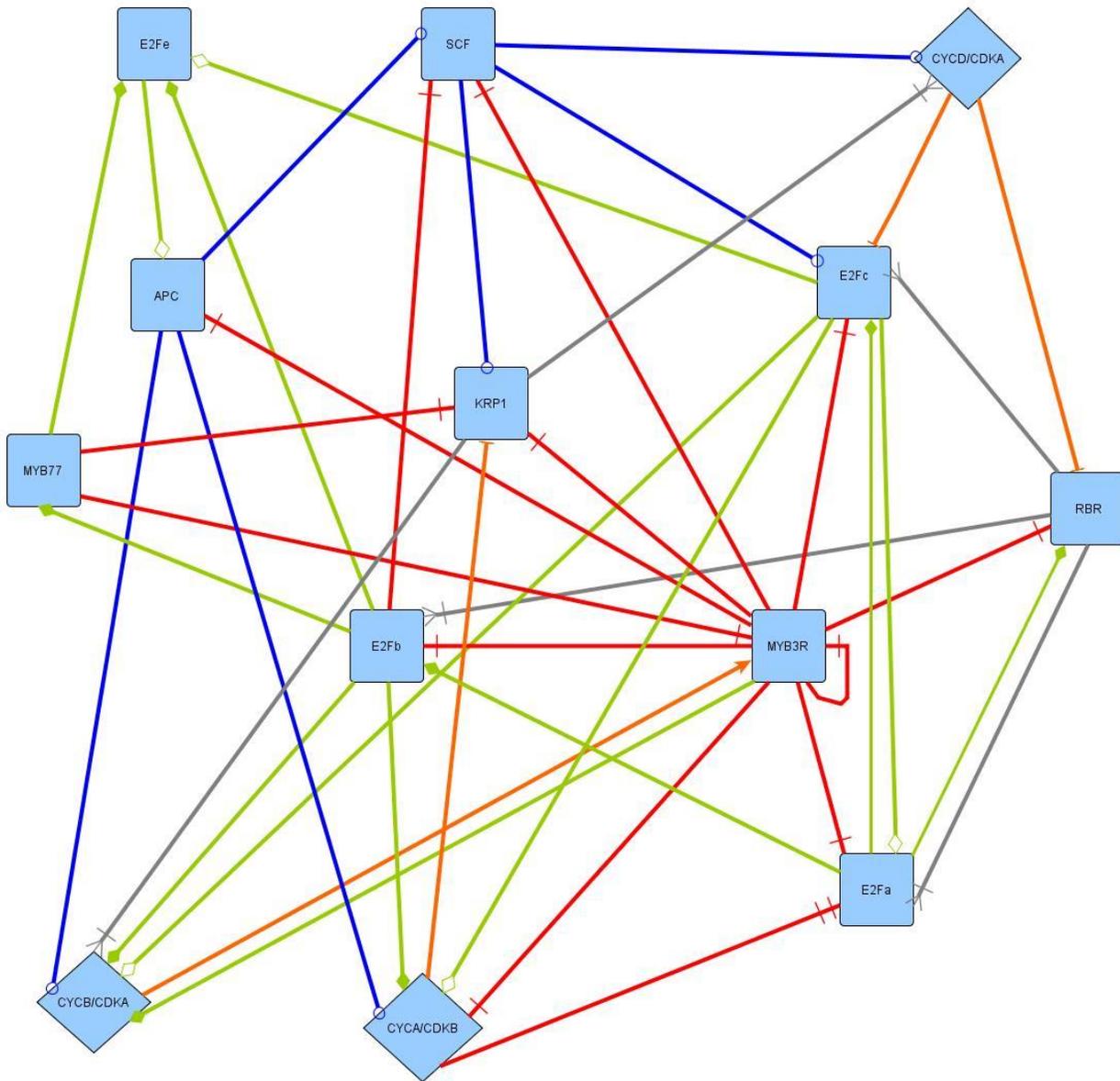


Figura 29. Propuesta de red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana* construida con las interacciones descritas en la Tabla 19. Las líneas de color azul que terminan en esferas representan interacciones negativas por ubiquitinación. Las líneas verdes con rombos vacíos representan interacciones negativas de tipo transcripcional. Las líneas verdes con rombos rellenos representan interacciones positivas de tipo transcripcional. Las líneas naranjas con flecha representan interacciones positivas por fosforilación, mientras que las líneas naranjas con terminación en línea perpendicular representan interacciones negativas por fosforilación. Las líneas color gris con terminación en tridente representan interacciones represivas de tipo físico. Las líneas rojas con terminación T invertida representan interacciones transcripcionales positivas obtenidas por análisis bioinformático de, mientras que las líneas roja con doble barra terminal representan interacciones transcripcionales negativas.

Así, hemos logrado determinar una primer red de regulación que incorpora diferentes niveles de regulación (Véase la Figura 29). Para los fines de este trabajo, las propiedades dinámicas serán omitidas del análisis y únicamente se describirán las evidencias que apoyan la topología de la red y las interacciones en ella descritas. Para simplificar la información, en la Tabla 19 se sintetizan los datos de la siguiente forma: se especifica el nodo, sus reguladores, el tipo de interacción y las referencias que dan sustento a tales interacciones.

Varias interacciones de la Tabla 19, tienen un asterico (*) que las identifica como interacciones propuestas a partir de análisis bioinformáticos o por que se ha hipotetizado que funcionan de forma análoga a como sucede en levaduras o células de mamíferos. Los datos de expresión de genes ciclo-dependientes se obtuvo de: Menges *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2003; Menges *et al.*, 2005. Por otro lado la secuencia consenso usada para identificar los blancos de MYB77 fue CNGTTR de acuerdo con: Romero *et al.*, 1998 y Shin *et al.*, 2007; mientras que para los MYB3R fue AACGG de acuerdo con: Haga *et al.*, 2011. Estos motivos fueron buscados en todos los nodos de la red de la figura mediante la herramienta Pathmacht tool (<http://arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>) de TAIR. Las secuencias regulatorias de TAIR que fueron usadas fueron: TAIR10 Loci Upstream Sequence-1000bp y TAIR10 5' UTRs. Los resultados pueden observarse en la tabla de interacciones propuestas para la red regulatoria.

Regulador	Nodo blanco	Interacción	Tipo de interacción	Referencia
SCF	CYCD	La degradación de la ciclina CYCD3;1 es dependiente del proteasoma 26S, se ha demostrado que plantas con reducidos niveles de RBRX1 (parte del complejo SCF) muestran acumulación de CYCD3;1 indicando que SCF esta implicado en su degradación.	Negativa (Ubiquitinación)	Lechner <i>et al.</i> , 2002; Liu <i>et al.</i> , 2004; Planchais <i>et al.</i> , 2004.
SCF	KRP1	SCF conteniendo a las proteínas con caja F SKP2A y SKP2B es responsable de la degradación de KRP1. Se ha demostrado que la sobreexpresión de SKP2B inhibe la acumulación de KRP1 y suprime el fenotipo sobreexpresante de KRP1.	Negativa (Ubiquitinación)	Ren <i>et al.</i> , 2008; Marrocco <i>et al.</i> , 2010.
SCF	E2Fc	La proteína SKP2A recluta a E2Fc para su ubiquitinación mediante el reconocimiento en su	Negativa (Ubiquitinación)	Del Pozo <i>et al.</i> , 2002.

		región N-terminal, esto se ha demostrado mediante su coimmunoprecipitación en extractos obtenidos de semillas de <i>Arabidopsis</i> .		
RBR	E2Fa	RBR es un regulador negativo de la actividad transcripcional de E2Fa.	Negativa (Interacción física)	Magyar <i>et al.</i> , 2012.
RBR	E2Fb	RBR es un regulador negativo de la actividad transcripcional de E2Fb.	Negativa (Interacción física)	Magyar <i>et al.</i> , 2012.
RBR	E2Fc	RBR es un regulador negativo de la actividad transcripcional de E2Fc	Negativa (Interacción física)	Shen <i>et al.</i> , 2002
E2Fa	E2Fb	La actividad de E2Fb es inducida en líneas de sobreexpresión de E2Fa	Positiva (Transcripcional)	Vandepoele <i>et al.</i> , 2005.
E2Fa	E2Fc	E2Fc tiene sitios de unión para E2Fa, la actividad de E2Fc es inducida con la sobreexpresión de E2Fa-DPa.	Positiva (Transcripcional)	Sozzani <i>et al.</i> , 2006; Vandepoele <i>et al.</i> , 2005.
E2Fa	RBR	El silenciamiento de E2Fa disminuye los niveles de expresión de RBR1. Por otro lado, en células en ciclo mitótico, los niveles de RBR1 y E2Fa parecen estar corregulados puesto que muestran elevados coeficientes de correlación de la expresión mediante análisis de microarreglos. Por lo que RBR es regulada positivamente de forma transcripcional por la actividad de E2Fa.	Positiva (Transcripcional)	He <i>et al.</i> , 2004; Magyar <i>et al.</i> , 2012.
E2Fb	CYCB1;1	La expresión de CYCB1;1 es inducida cuando los niveles de E2Fb se incrementan. Los blancos de E2Fb son genes necesarios para la transición G2/M.	Positiva (Transcripcional)	Magyar <i>et al.</i> , 2005; Sozzani <i>et al.</i> , 2006; Magyar <i>et al.</i> , 2012.
E2Fb	CDKB1;1	Los niveles de expresión de los transcritos AtCDKB1;1 en mutantes de sobre expresión de E2Fb se ven aumentados en comparación con los controles.	Positiva (Transcripcional)	Magyar <i>et al.</i> , 2005; Sozzani <i>et al.</i> , 2006
E2Fb	E2Fe	En mutantes de sobreexpresión de E2Fb, los niveles de mRNA de E2Fe son reducidos en comparación con el control.	Negativa (Transcripcional)	Berckmans <i>et al.</i> , 2011.
E2Fc	CDKB1;1	La expresión inducida por E2Fb de CDKB1;1 puede ser contrarrestada por la expresión de E2Fc, la desestabilización de E2Fc incrementa la expresión de CDKB1;1.	Negativa (Transcripcional)	Beckermans <i>et al.</i> , 2011; Lopez <i>et al.</i> , 2008. Del pozo <i>et al.</i> , 2006.
E2Fc	CYCB1;1	Se ha observado que las plantas con niveles reducidos de E2Fc tienen un aumento significativo en los niveles de expresión de CYCB1;1 así como un incremento en el número de células en división.	Negativa (Transcripcional)	Del Pozo <i>et al.</i> , 2007; Magyar <i>et al.</i> , 2005; Sozzani <i>et al.</i> , 2006;

		Por el contrario, la sobreexpresión de E2Fc dramáticamente reduce los niveles de CYCB1;1. Estos resultados indican que E2Fc funciona como un regulador.		
E2Fc	E2Fa	Los mensajeros de E2Fa se incrementan cuando la expresión de E2Fc es silenciada	Negativa (Transcripcional)	Del Pozo <i>et al.</i> , 2006.
E2Fc	E2Fe	E2Fc contrarresta el efecto positivo que E2Fb tiene en la expresión de E2Fe.	Negativa (Transcripcional)	Berckmans <i>et al.</i> , 2011.
E2Fe	APC/C	La expresión de CCS52A, una subunidad del complejo APC/C, es disminuida por E2Fe	Negativa (Transcripcional)	Lammens <i>et al.</i> , 2008.
MYB3R1/4	CYCB1;1	MYB3R1/4 reconoce la secuencia AACGG requerida por la expresión de CYCB1;1	Positiva (Transcripcional)	Planchais <i>et al.</i> , 2002; Haga <i>et al.</i> , 2011.
CDKB1;1	CYCA2;3	CYCA2; 3 interactúa con CDKB1;1 para formar un complejo funcional.	Formación de complejo	Van Leene <i>et al.</i> , 2010; Boudolf <i>et al.</i> , 2009.
CDKB1;1	CYCB1;1	Las ciclinas de tipo B interactúan con las CDK de tipo B.	Formación de complejo funcional	Van Leene <i>et al.</i> , 2010; Weingartner <i>et al.</i> , 2004.
CDKB1;1- CYCA2;3	KRP1	El complejo CDKB1;1-CYCA2;3, promueve la proteólisis de KRP1, regulando así la transición G2/M.	Negativa (Fosforilación)	Verkest <i>et al.</i> , 2005; Boudolf <i>et al.</i> , 2009; Weinl <i>et al.</i> , 2005;
CDKA;1	CYCB1;1	Las ciclinas de tipo B interactúan con las CDK de tipo A	Formación de complejo	Van Leene <i>et al.</i> , 2010; Weingartner <i>et al.</i> , 2004.
CDKA;1- CYCB1;1	MYB3R1/4	La sobreexpresión de MYB3R4 aumenta al doble la actividad de sus promotores blancos en comparación con líneas silvestres. La coexpresión con CYCB1;1 aumenta en 4 veces la actividad de MYB3R4	Positiva (fosforilación)	Ito M., 2005; Haga <i>et al.</i> , 2007; Araki <i>et al.</i> , 2004;
KRP1	CYCD3;1	KRP1 es capaz de interactuar con CDKA;1 y CYCD3;1	Negativa (interacción física)	Veylder <i>et al.</i> , 2007; Ren <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 1997; Wang <i>et al.</i> , 1998,
KRP1	CYCB1;1	KRP1 se une a CDKA;1 e inhibe el complejo CDKA-CYCB1;1	Negativa (Interacción proteína-proteína)	Wang <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 1997
APC/C	CYCB1;1	El complejo APC/C ubiquitina a CYCB1;1 para degradación-	Negativa (ubiquitinación)	Fulop <i>et al.</i> , 2005,
APC/C	CYCA2;3	CYCA2;3 es estabilizada en mutantes de pérdida de función de las subunidades de APC/C o por mutaciones en su caja D.	Negativa (ubiquitinación)	Boudol <i>et al.</i> , 2009; Imai <i>et al.</i> , 2006.
*E2Fb	SCF	La proteína con caja-F, Skp2, parte del complejo	Positiva	Zhao <i>et al.</i> , 2012;

		SCF es regulada transcripcionalmente por E2F1 en humanos. En <i>A. thaliana</i> se ha reportado que solo los factores E2F regulan a FBL17, una proteína con caja-F.	(Transcripcional)	Zhang y Wang, 2006.
*E2Fb	MYB77	La regulación directa entre E2F y MYB ha sido reportada en <i>S. cerevisiae</i> y mamíferos, pero en plantas, esta podría incluir alguna intermediario; <i>A. thaliana</i> podría tener una regulación similar debido a que se observan ondas transcripcionales en las transiciones G1/S y G2/M como en levaduras y mamíferos. Se propone a MYB77 como un mediador de la regulación de los E2F y la familia MYB. Con información de microarreglos, se encontró que MYB77 muestra expresiones dependientes del ciclo celular con un máximo en fase M. En adición, MYB77 tiene sitios de unión para E2F, se propone aquí que MYB77 regula a los MYB3R y otros blancos del ciclo celular.		Zhu <i>et al.</i> , 2004; Rusti <i>et al.</i> , 2004; Menges <i>et al.</i> , 2002; Menges <i>et al.</i> , 2003; Menges <i>et al.</i> , 2005
*MYB77	E2Fe, MYB3R1/4, KRP1, CYCB1;1, CYCA2;3, CDKB1;1, CCS52A2.	La secuencia consenso CNGTTR es reconocida por MYB77, haciendo un análisis bioinformático, se propusieron estos blancos, varios de ellos se expresan justamente después de la transición G2/M.	Positiva (Transcripcional)	Romero <i>et al.</i> , 1998 y Shin <i>et al.</i> , 2007
*MYB3R1/4	SCF, RBR, CDKB1;1, CYCA2;3, APC/C, E2Fc, MYB3R, KRP1, CYCB1;1	El sitio consenso de unión de MYB3R fue encontrado en SKP2A, RBR, CDKB1;1, CYCA2;3, CCS52A2, KRP1, E2Fc, MYB3R y CYCB1;1. El análisis bioinformático se describe al inicio de esta sección. La secuencia MSA es reconocida en los genes NtmybA1 y NtmybA2 de tabaco, con la peculiaridad de poder regularse transcripcionalmente a sí mismos. Los MYB3R pueden promover la expresión de KRP1 dado que este presenta un pico de expresión en la transición G2/M y tienen ocho posibles regiones MSA. La regulación de CYCB1;1 cuenta con soporte experimental.	Positiva (Transcripcional)	Ito <i>et al.</i> , 2005, Winl <i>et al.</i> , 2005.
*CDKB1;1- CYCA2;3	E2Fa	Se ha hipotetizado que una de las causas de que haya pocos niveles de E2Fa pueda deberse a la alta	Negativa (Fosforilación)	Boudol <i>et al.</i> , 2009; Maygnar <i>et al.</i> , 2005; Sozzani <i>et al.</i> , 2006;

		tasa de recambio debida a la fosforilacion por CDKB1;1. E2Fa tiene sitios putativos de fosforilacion por CDKB1;1 en su región N-terminal. Esta idea esta soportada por observaciones similares en células de mamíferos.		Leone <i>et al.</i> , 1998.
*APC/C	SCF	Se ha propuesto que las funciones de APC/C y SCF son mutuamente excluyentes durante la progresión del ciclo. En células de mamíferos en proliferación los niveles de Skp2, una subunidad de SCF, oscila similarmente a como lo hacen los sustratos de APC/C. Aun más, la subunidad Cdh1 de APC/C participa en la degradación de Skp2.	Negativa (ubiquitinación)	Peters <i>et al.</i> , 1998; Vodermaier <i>et al.</i> , 2004; Bashir <i>et al.</i> , 2004; Marroco <i>et al.</i> , 2010.

Tabla 19. Interacciones propuestas para la red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. Los asteriscos en algunos de los reguladores indican interacciones propuestas por análisis bioinformático o por comparación en otros sistemas modelo.

Capítulo 4

Análisis estructural de los modelos de red estudiados

En esta sección se analiza el paradigma estructura-función de redes de regulación biológica mediante la búsqueda de motivos de red en los modelos previamente analizados.

Se explica las propiedades de organización de las redes biológicas desde una escala global para dar paso a una descripción detallada de las propiedades estructurales locales, específicamente los motivos de red. Se describe algunas propiedades de los motivos desde una perspectiva dinámica y se ejemplifican algunas ideas que se han implementado entorno a su papel en el comportamiento de circuitos bioquímicos, particularmente para la generación de comportamientos dinámicos de tipo oscilatorio.

Posteriormente se hace particular énfasis en las metodologías de análisis de motivos en redes regulatorias biológicas, y se extiende la discusión a las redes de regulación del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*, Mamíferos y *Arabidopsis thaliana*, haciendo una búsqueda extensiva de motivos. Finalmente se analizan los resultados de tal búsqueda discutiendo su posible papel en el comportamiento dinámico de cada red.

“We need from an overall conception of the organism as a fundamental entity of biology and how it is divided into parts that meet its intrinsic order - to provide a harmoniously integrated organization despite its complexity”

Brian Goodwin

4.1 Principios de organización en las redes de regulación biológica

En el capítulo anterior el análisis de los modelos de red se centró en sus propiedades dinámicas y para ello se revisaron las reglas lógicas en cada modelo, sin embargo, y como ya se ha comentado, una de las grandes interrogantes al analizar redes biológicas es la relación entre la estructura de la red y su comportamiento dinámico, aún más, su evolución (Barabasi y Oltvai, 2004). En ese sentido lo que ha guiado al análisis estructural de redes biológicas ha sido la idea de que estas siguen algunos principios de organización que las distinguen, no sólo eso, tales principios de organización estructural parecen operar a diversas escalas dentro de las redes, desde nodos aislados a comportamientos colectivos que involucran a todos los nodos, de tal forma que describiendo tales principios de organización es posible, al menos como hipótesis, determinar el comportamiento dinámico de la red (Watts y Strogatz, 1998).

En general algunos autores sostiene que para analizar las propiedades estructurales de una red de regulación biológica se puede bien comenzar por revisar las propiedades estructurales globales y después moverse hacia la identificación de propiedades al interior de estas, o bien, analizar las propiedades locales para tratar de describir patrones de interacción y mediante su identificación explicar las propiedades globales de la red (Milo, et al, 2002; Longabaugh y Bolouri, 2006). En este capítulo se procederá mediante la segunda aproximación; así, se analizará el paradigma estructura-función de los modelos de red analizados, y en ese sentido, se discutirán algunos principios de organización estructural de las redes de regulación biológica aquí revisadas, sin embargo antes se describirán algunas propiedades globales de las redes biológicas que son importantes para entender el paradigma estructura-función.

Como se describía en la sección 1.1, una de las primeras propiedades de organización de las redes de regulación biológica es la direccionalidad o no direccionalidad de la misma. En general se ha observado que las redes de interacción entre proteínas, redes filogenéticas y las redes de correlación son de tipo no direccionado puesto que representan relaciones de unión o interacción mutua; por otro lado las redes de regulación genética, redes metabólicas y las redes ecológicas son direccionadas, así las aristas representan flujos de información específica entre los nodos (Junker y Schreiber, 2008).

La segunda propiedad estructural que caracteriza a las redes de regulación biológica es el grado o conectividad k de un nodo determinado en la red (Figura 30), esta propiedad denota el número de conexiones que un nodo tiene con otros al interior de una red (Barabasi y Oltvai, 2004; Albert 2005). En el caso de redes dirigidas se distingue una k de entrada y una k de salida para agrupar cuantas aristas llegan y salen respectivamente de un nodo determinado; en el caso de redes no dirigidas la conectividad

promedio $\langle k \rangle$ es la medida que muestra cuantas conexiones en promedio por nodo existen en la red (Zhu *et al*, 2014).

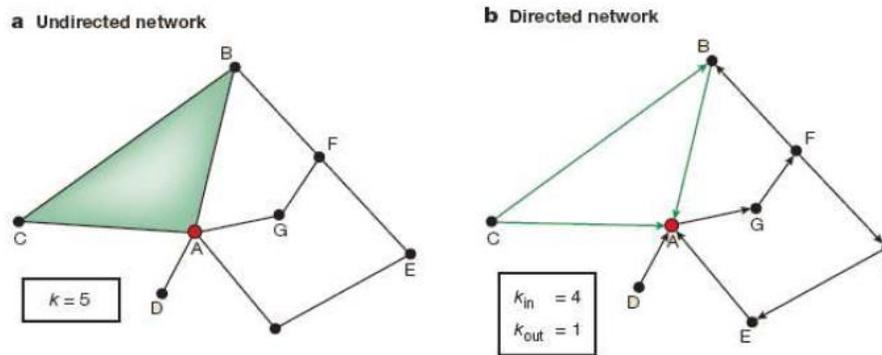


Figura 30. Conectividad de una red no dirigida y una dirigida. a) Para una red no dirigida la conectividad de un nodo es el número de aristas k con otros nodos, b) En una red dirigida existe una conectividad de entrada k_{in} y una de salida k_{out} para distinguir las aristas dirigidas hacia el nodo y las que salen de él (Tomado de: Barabasi y Oltvai, 2004)

Con respecto a la conectividad, la tercera propiedad de organización de las redes biológicas hace referencia al carácter regular o aleatorio de su estructura. En una red regular todos los nodos tienen el mismo número de conectividad, mientras que una red aleatoria sigue una distribución de Poisson, es decir, que la probabilidad de encontrar nodos con una alta conectividad es baja. Sin embargo, se ha logrado demostrar que las redes biológicas siguen una distribución de tipo ley de potencias, esto es, que la probabilidad $P(k)$ de que un cierto nodo tenga una conectividad k , es de la forma $P(k)=k^{-\alpha}$, donde $2 \leq \alpha \leq 3$ (Albert, 2005); las redes biológicas que siguen distribuciones tipo ley de potencias tienen muchos nodos cuya conectividad es baja, y un número pequeño de nodos con una alta conectividad denominados *hubs*. Debido a una ausencia de una escala típica en la conectividad de los nodos, este tipo de redes son llamadas también redes libres de escala (Albert y Barabási, 2002). La propiedad de tener una organización estructural libre de escala se ha observado primero en redes de regulación metabólica (Jeong *et al*, 2000), aunque la evidencia apunta a que es una propiedad más general encontrándose en redes genéticas, de interacción proteína-proteína e incluso ecológicas (Rodríguez-Caso y Solé, 2007).

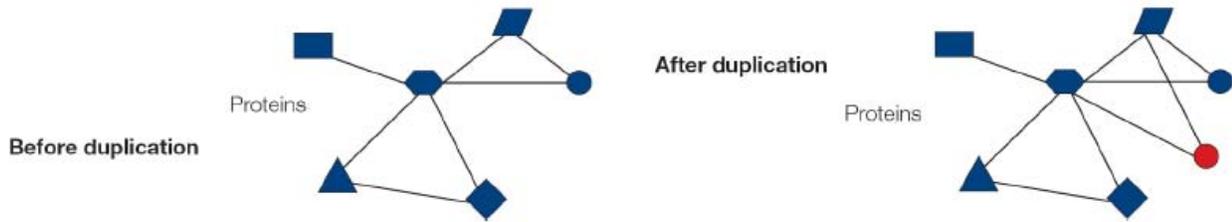


Figura 31. Crecimiento y unión preferencial de nodos basado en duplicación génica en redes de interacción proteína-proteína. En este caso el gen que codifica para la proteína, que es representada como un círculo, es duplicado y la nueva proteína tiene el mismo patrón de interacción que la proteína original. Se puede observar que el *hub* central (proteína representada por un hexágono) gana conexiones si cualquiera de las proteínas es duplicada mientras que la proteína con menor conectividad (rectángulo) solo lo gana si el *hub* completo es duplicado. (Tomado de: Barabasi y Oltvai, 2004)

De esta manera se ha observado que las redes libres de escala son estructuralmente robustas, esto es, resistentes ante cambios aleatorios en su estructura. Aun cuando un gran número de nodos son removidos, un número importante de nodos se mantiene debido a la alta conectividad de los *hubs* por lo que la red no se desintegra y pueden mantener gran parte de sus propiedades dinámicas (Solé, 2012). Además si el número de *hubs* es relativamente pequeño en comparación con nodos con poca conectividad, la pérdida aleatoria de nodos mantiene aún más la estructura determinada por los *hubs*. Sin embargo la remoción intencional de los hubs es crítica para la integridad de la red, por lo tanto, las redes libres de escala tienen gran vulnerabilidad en nodos de alta conectividad.

En consecuencia, la pregunta es cómo surge esta organización libre de escala, y en qué sentido, esta propiedad confiere a las redes biológicas regulatorias ventajas funcionales con respecto a las redes aleatorias y a las redes con estructura regular. Se ha tratado de explicar esto en función de dos procesos: el crecimiento de la red y la unión preferencial entre nodos (Albert 2005; Zhu *et al*, 2014). El crecimiento de la red se refiere al proceso por el cual más nodos son agregados a la red sobre un periodo largo de tiempo mientras que la unión preferencial se refiere a que los nuevos nodos tienden a unirse a nodos que tienen una alta conectividad, lo que lograría dar a la red una estructura libre de escala (Solé, 2012).

Por otro lado, los procesos de crecimiento y unión preferencial han sido investigados y relacionados con los mecanismos de duplicación génica en redes de interacción entre proteínas, de esta manera, se ha propuesto que dado que los genes que se han duplicado tienen proteínas similares que interactúan con patrones parecidos dentro de sus respectivas redes, el resultado es el aumento de la conectividad entre proteínas cuyos genes han sufrido duplicación génica (Klanin, 2006). De tal forma, si las probabilidades de duplicación para todos los genes en promedio son iguales, entonces las proteínas

con mayor conectividad tendrán más interacciones con nuevas proteínas que aquellas con poca conectividad, lo que conllevaría a una estructura libre de escala (Ver Figura 31). Por lo tanto, los procesos de duplicación génica parecen ser relevantes en la estructura libre de escala de muchas redes genéticas e incluso metabólicas (Lima-Mendez y van Helden, 2009)

La última propiedad global de las redes regulatorias se relaciona con la conectividad de la red. Supóngase que se tiene una red de tres nodos A, B, C (véase la Figura 32): si el nodo A y B son los únicos que se conectan a C, y sólo existe una arista entre A y B, para cuantificar este grado de unión local entre nodos se utiliza el llamado coeficiente de agrupamiento C . Para nuestra red hipotética, el coeficiente de agrupamiento del nodo C, $C_C=1$, dado que todos sus vecinos están unidos entre sí, en caso contrario si los vecinos no están unidos entre sí, el coeficiente es $C_C=0$. Así el coeficiente de agrupamiento de un nodo en una red varía entre 0 y 1, en función del número de nodos vecinos que están unidos a él y entre sí. Sin embargo usualmente se caracteriza a la red en términos del coeficiente de agrupamiento promedio de la red $\langle C \rangle$ (Nadav y Alon, 2007).

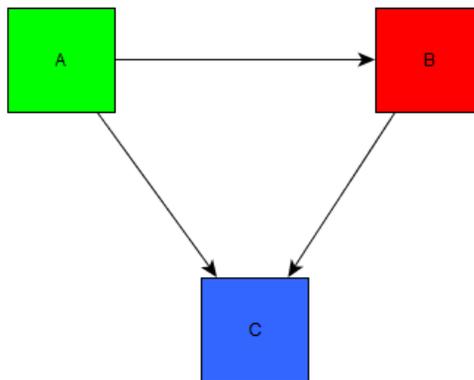


Figura 32. Red hipotética para ejemplificar la conectividad.

Las redes biológicas tienen altos valores de $\langle C \rangle$ en comparación con redes aleatorias o redes completamente regulares. Esta observación ha sugerido que las redes biológicas tienen una estructura modular (Nadav y Alon, 2007; Lüttge, 2012). El concepto de modularidad asume que las funciones celulares pueden ser particionadas en una colección de módulos; cada módulo es una entidad discreta de múltiples componentes (nodos) que interactúan y realizan una función definida, separable de las funciones de otros módulos y relativamente independiente (Hartwell et al, 1999; Rao y Arkin, 2001; Ravasz et al, 2002; Barabasi y Oltvai, 2004; Callebaut y Rasskin-Gutman, 2005; Nadav y Alon, 2007; Lüttge, 2012). Este hecho corresponde con la evidencia experimental que demuestra que a nivel celular,

ciertos grupos de moléculas interactúan para corregular ciertos procesos formando pequeños grafos de interacción (módulos) que son relativamente pero no completamente independientes de otros procesos.

Por ejemplo, ya se ha explorado como la red de interacción metabólica de *E. coli* funciona de manera modular con la propiedad de auto similitud: existen pequeños módulos metabólicos como aquellos que involucran al nodo acetil-CoA y Piruvato, que se agrupan en grandes módulos (como el ciclo el Krebs) que a su vez se integran en grandes módulos catabólicos o anabólicos (Ravasz et al, 2002), se ha propuesto que esta organización modular del metabolismo explicaría el rápido flujo de materia y energía en la integración de diversas funciones celulares (Guimera y Amaral, 2005).

En ese sentido, parece claro que el análisis de ciertos patrones locales (motivos) permitiría entender la organización global de las redes biológicas, por lo que en las siguientes dos secciones me centraré en describir la organización local de las redes biológicas y en particular cómo ciertos patrones de organización local permiten aproximar el estudio del comportamiento dinámico de redes de regulación como las descritas en el capítulo anterior.

4.2 Características locales de la arquitectura de redes de regulación biológica: Motivos de red

En el apartado anterior se describieron algunas propiedades globales de las redes biológicas como su organización libre de escala y cómo esta confiere características importantes como la robustez estructural. En este apartado se discutirá como ciertos patrones estructurales locales denominados motivos de red permiten entender algunas propiedades importantes del comportamiento dinámico de las redes de regulación biológica.

En un sentido muy general, los motivos de red o simplemente motivos, son patrones recurrentes y significativos de interacción entre los elementos de una red. De manera más formal, un grafo H es un motivo en una red G si H aparece como subgrafo de G de manera más frecuente en versiones generadas al azar de G . De la misma forma un grafo H' es un antimotivo si aparece de forma menos frecuente en versiones generadas al azar de un grafo G (Artzy-Randrup *et al*, 2004). La definición más usada establece que un motivo de red es un patrón o subgrafica que esta presente con mayor frecuencia al interior de una red, que en versiones de la misma red generadas al azar y donde el número de nodos y el grado de cada uno es mantenido fijo (Milo *et al*, 2002).

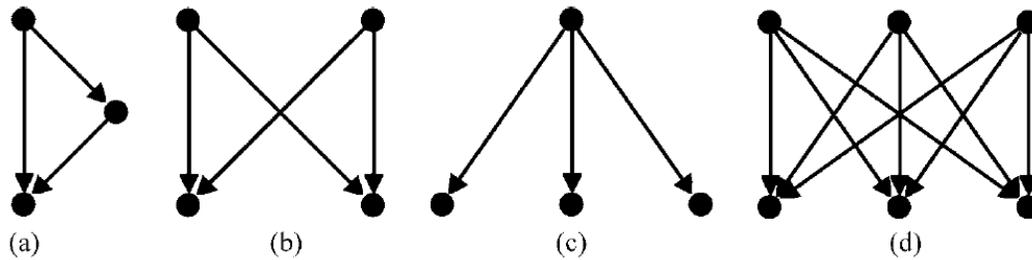


Figura 33. Motivos de red de relevancia en redes biológicas. a) Feed-Forward Loop (FFL), b) Bifan (BF), c) Motivo de una sola entrada (SI), d) Motivo de multiples entradas (MI) (Tomado de: Junker y Schreiber, 2008)

La recurrente presencia de estos patrones locales de organización ha sido relacionado con diferencias sistemáticas en las propiedades funcionales de diferentes redes biológicas; así en analogía a los circuitos eléctricos constituidos por pequeños elementos básicos estructurales como las compuertas lógicas, se ha sugerido que los motivos en redes biológicas tienen el papel de pequeñas unidades funcionales o computacionales que interactúan en el contexto local para regular funciones celulares más globales (Milo *et al*, 2004). Trabajos recientes parecen indiciar que su comportamiento dinámico influencia el comportamiento dinámico de toda la red en la que se encuentran, mostrando abundancia específica en diferentes redes (Prill *et al*, 2005)

Al respecto, se han descrito una serie de motivos que parecen identificarse con mayor frecuencia al interior de las redes de regulación biológica: en la figura 33 y en la siguiente tabla se enumeran algunos de ellos y el tipo de redes en las cuales se han descrito de forma recurrente:

Motivo	Nombre	Redes de regulación genética	Redes neuronales	Redes metabólicas	Redes de interacción protein-proteína	Redes ecológicas
	Feedback Loop	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
	Cadena triple	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
	Feedback loop de tres nodos	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

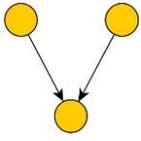
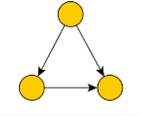
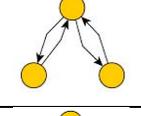
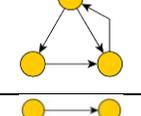
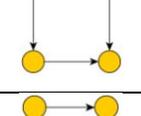
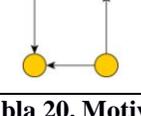
	Compuerta lógica	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
	Feed-forward loop tres nodos	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
	Feedback loop amplificado	Presente	Presente	Presente	Presente	ND
	Feed-forward loop amplificado	Presente	Presente	Presente	Presente	ND
	Biparalelo	ND	Presente	ND	ND	Presente
	Bifan	Presente	Presente	Presente	ND	ND

Tabla 20. Motivos más recurrentes en diferentes redes biológicas. (Tomado y modificado de Junker y Schreiber, 2008)

Para poder describir la importancia dinámica y estructural que los motivos de red confieren a las redes de regulación biológica, y en particular, las redes genéticas, en la siguiente sección discutiré el paradigma estructura función de redes haciendo énfasis en las propiedades dinámicas descritas para algunos motivos de red

4.3 El paradigma estructura-función de redes

El análisis de motivos de red en redes regulatorias recientemente ha sido extendido a su comportamiento dinámico, con el fin de entender en que medida tales patrones de organización local permiten entender el comportamiento dinámico global de la redes en las que aparecen (Prill *et al*, 2005). En trabajos previos, se ha demostrado que, por ejemplo, que ciertos componentes en redes de señalización celular actúan de forma contexto independiente como módulos funcionales, así rutas tan divergentes en el desarrollo animal como la vía Wnt, Hedgehog o la vía Notch parecen tener funciones dinámicas similares en contextos biológicos diferentes (Barolo y Posakony, 2002).

De los motivos estudiados dinámicamente, el llamado *Feed-Forward Loop* (FFL), es el más analizado teorica y experimentalmente al interior de redes de regulación genética (Mangan y Alon, 2003; Mangan *et al*, 2003; Wall *et al*, 2005) (véase Tabla 19). En general, este motivo esta construido apartir

de dos reguladores, uno general y otro específico; el general regulando el específico y ambos regulando a un gen blanco. El comportamiento dinámico puede ser entendido a partir del efecto neto que ambos reguladores tienen sobre el gen blanco, si globalmente las interacciones son de tipo positivo se tiene un FFL coherente, mientras que si son de tipo negativo un FFL incoherente. Los FFL coherentes parecen responder solo a señales persistentes sobre el regulador general y no así para las señales transientes, actuando como un filtro para las señales fluctuantes. Se ha demostrado que el FFL funciona como un circuito de retrasos asimétrico: muestra respuestas retardadas de activación para señales persistentes y una rápida respuesta para desactivar las señales una vez que están han cesado (Shen *et al*, 2002). Este tipo de comportamiento dinámico ya ha sido comprobado experimentalmente al interior de la red de regulación genética de uso de L-Arabinosa en *Escherichia coli* (Mangan *et al*, 2003).

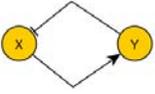
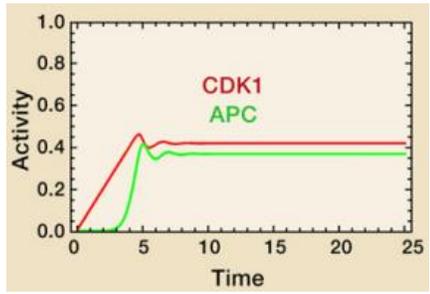
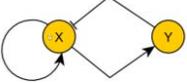
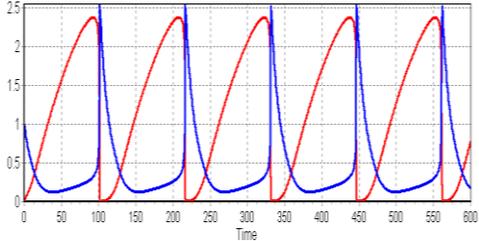
Otros motivos han tenido mucha menos atención, uno de ellos es el motivo Bifan. Este motivo se compone de dos reguladores y dos genes regulados, cada uno de estos regulado por ambos reguladores (Véase la Tabla 19). Dinámicamente este motivo exhibe un comportamiento poco heterogéneo pero que recuerda mucho a las compuertas lógicas características de circuitos eléctricos. Se ha observado que permite regular señales pulsadas de forma acumulativa de tal forma que la activación de los genes blanco sólo sucede cuando los reguladores alcanzan un umbral crítico, por otro lado son capaces de diferir señales activadoras funcionando como resistores en paralelo, lo que parece ser importante en diferentes redes regulatorias que involucran vías de transducción de señales (Lipshtat *et al*, 2008)

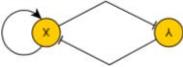
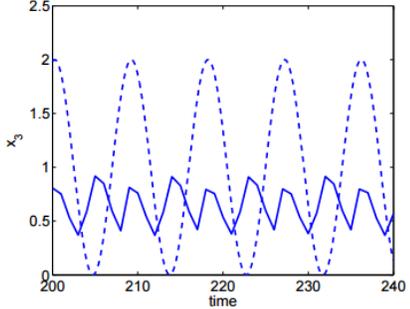
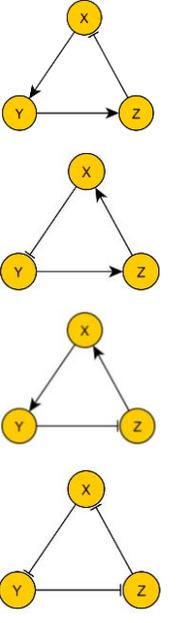
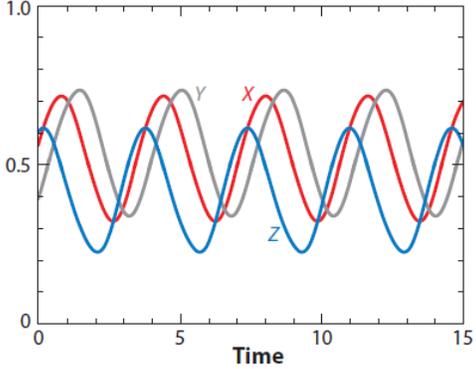
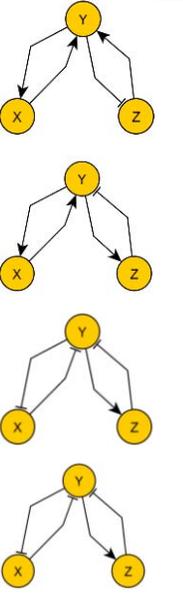
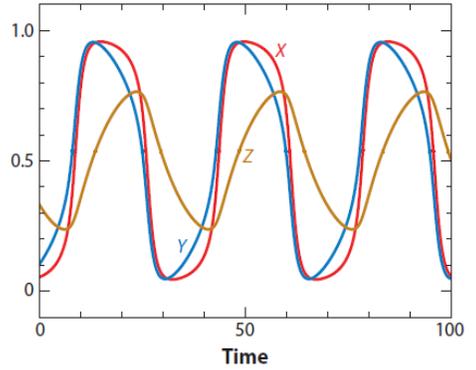
Recientemente se ha analizado las propiedades dinámicas de motivos de tres y cuando nodos, extendiéndose su análisis hacia propiedades dinámicas globales de las redes en las que se han identificado, particularmente en redes genéticas, de transducción de señales y neurales, determinándose lo que se ha definido como estabilidad estructural entendida como la probabilidad de que tras una pequeña perturbación el motivo pueda regresar a un estado estable (Prill *et al*, 2005). Mediante esta idea, se ha logrado clasificar en tres clases de comportamiento a los motivos: motivos estables sin retroalimentaciones, motivos moderadamente estables con una retroalimentación entre dos vértices y motivos inestables con retroalimentación entre más de 3 vértices. Algunos ejemplos de motivos en las clases anteriores son el feed-forward loop, el feed-forward loop amplificado y el feedback loop amplificado respectivamente (Ver Tabla 20) (Prill *et al*, 2005; Ingram *et al*, 2006;). La estabilidad de estas clases parece contribuir, a decir de los autores, en la organización tan característica de las redes biológicas, y pone de manifiesto la relación entre la estructura y función de motivos de red.

En la misma dirección, esta aproximación ya ha sido analizada en el contexto del ciclo celular

eucarionte con la finalidad de explorar qué tipo de circuitos regulatorios son capaces de exhibir comportamientos oscilatorios como los que caracterizan al ciclo celular (Ferrell et al, 2011), por un lado para entender que circuitos son suficientes y necesarios para tales comportamientos y por otro, para tratar de discernir una topología mínima de las redes de control del ciclo celular eucarionte (Tyson y Novak, 2010).

Evidencia reciente apunta a que ciertos motivos son capaces de exhibir un comportamiento oscilatorio bajo una serie de principios regulatorios particulares (Vease Tyson y Novak, 2010; Ferrell *et al*, 2011). En consecuencia, el análisis motivo-estructural y sus propiedades dinámica en el contexto del ciclo celular es importante por dos razones: por un lado demuestra que dada una cierta estructura de los motivos es posible derivar su comportamiento dinámico para un conjunto de condiciones específicas; y por otro, que los comportamientos de tipo oscilatorio al interior de motivos característicos de circuitos bioquímicos de control del ciclo celular son importantes para entender la regulación global del ciclo celular. En la tabla 21 se resumen aquellos motivos cuyo comportamiento dinámico ha sido analizado teóricamente describiéndose para ellos oscilaciones con diferentes grados de variación, estos motivos son el punto de partida de los análisis de este capítulo y se discuten con más detalle al final del capítulo como en el siguiente.

Motivo	Nombre	Tipo de comportamiento dinámico	
	Feedback negativo	Para un conjunto pequeño de parámetros el sistema genera oscilaciones que rápidamente llegan a un comportamiento estable, generando un sistema oscilatorio amortiguado (Ferrell <i>et al</i> , 2011)	
	Oscilador relajado	Este sistema es capaz de mostrar oscilaciones para valores grandes de coeficiente de Hill, en general cuando las señales son respuestas todo o nada (Jin y Sendhoff, 2008)	

	<p>Interregutor con autorregulación</p>	<p>Se comporta de forma muy similar que el oscilador relajado para valores del coeficiente de Hill muy grandes, sin embargo en general los periodos de oscilación son mas pequeños (Jin y Sendhoff, 2008)</p>	
	<p>Feed-back loop negativo</p>	<p>Oscilaciones sostenidas para un rango de parámetros muy reducido. El análisis de bifurcaciones muestra que el sistema tiende a presentar un cambio de atractor de un ciclo limite a un punto fijo en un rango mucho mas amplio que en aquellas condiciones en las que el ciclo es sostenido (Tyson y Novak, 2011).</p>	
	<p>Feedback Loop Negativo amplificado</p>	<p>El acople de un Feedback Loop positivo y un Feedback Loop negativo mediante un intermediario común permite la generacion de ciclos limites (Tyson y Novak, 2011)</p>	

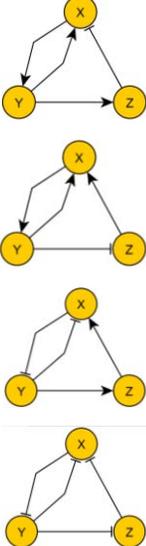
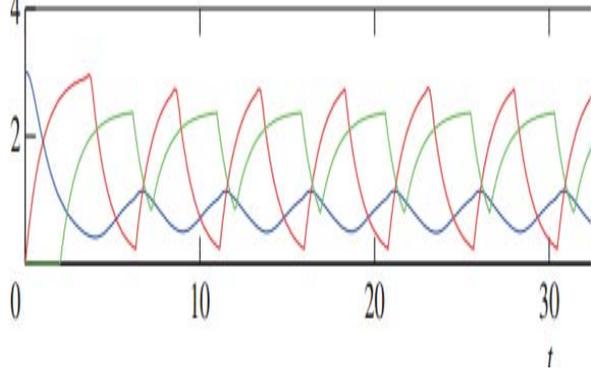
	<p>Feedback positivo de dos nodos insertado en un feedback negativo de tres nodos</p>	<p>Coexisten dos comportamientos para las cuatro combinaciones de motivos: por un lado un punto fijo y por otro un ciclo limite estable. Se observa que el sistema presenta bifurcaciones conforme los parámetros del feedback negativo cambian, lo que aleja el comportamiento del punto fijo al ciclo limite estable generando así oscilaciones sostenidas. En el espacio de parámetros, el sistema es muy robusto observándose bifurcaciones de Hopf de forma frecuente lo que indica que ante perturbaciones el sistema rápidamente pasa a un ciclo limite (Griffiths <i>et al.</i>, 2012; Li <i>et al.</i>, 2012)</p>	
---	---	--	--

Tabla 21. Motivos que generan osciladores con diferente grado de variación. En general se ha observado que el rango de parámetros en los que se observa un comportamiento tipo ciclo limite es muy limitado para feedback negativos, al ser interados dentro de feedback positivos el rango de los parámetros aumenta y se observa que en general las bifurcaciones tipo Hopf son mas robustas (Tomado y modificado de Tyson y Novak, 2011; Jin y Sendhoff, 2008)

Para explorar el hecho de que ciertos motivos son capaces de generar comportamientos oscilatorios sostenidos con diferentes grados de variación en sus periodos, es necesario discutir tres puntos importantes sobre el paradigma estructura-función: por un lado, ¿Es posible clasificar los motivos de red en un conjunto de patrones claramente definidos al interior de las redes de control del ciclo celular?, por otro, dado este conjunto de patrones de interacción local, ¿Es posible identificar posibles funciones de cada motivo?, y finalmente, dado ese conjunto de potenciales funciones y comportamientos dinámicos, ¿Es posible, para un conjunto de motivos representados en las redes regulatorias del ciclo celular previamente discutidas, poder inferir su papel dinámico en el comportamiento global de la red?. Para poder discutir estas cuestiones se presenta aquí el análisis motivo-estructural de las redes de control

del ciclo celular revisadas anteriormente: la red propuesta por Davidich y Bornholdt para *S. pombe*, la propuesta de red de control del ciclo celular en *A. thaliana* y la genérica en mamíferos propuesta por Fauré y colaboradores.

4.4 Análisis motivo-estructural de los modelos de red de regulación del ciclo celular en eucariontes

Considerando la discusión de las secciones anteriores, en este apartado se analizan estructuralmente los modelos de red revisados con miras a identificar motivos funcionales que puedan dar pista de patrones dinámicos comunes de la organización del ciclo celular eucarionte.

El análisis de motivos en una red de interés se centra en el análisis de la frecuencia de un motivo particular. Supongase que se tienen una red de interés G_T y una red motivo patrón G_P de interés que se desea buscar al interior de G_T . Se define entonces un *match* G_M como una subgráfica de G_T que es isomorfica a G_P . Se dice que dos graficas $G_1 = (V_1, E_1)$ y $G_2 = (V_2, E_2)$ son isomorficas si existe una correspondencia uno a uno entre sus vértices y las correspondientes aristas entre ellos, es decir, la misma conectividad (Véase la figura 33). Así, la frecuencia de un motivo G_P en una red determinada se define como el número máximo de matches de este patrón (Staphanopoulos *et al*, 2004) Existen diferentes conceptos para determinar la frecuencia de un motivo dependiendo de si los elementos del subgrafo pueden ser compartidos por dos matches o no simultaneamente, de estas las frecuencias F_1 , F_2 y F_3 son las más relevantes (Schreiber y Schwöbbermeyer, 2005a).

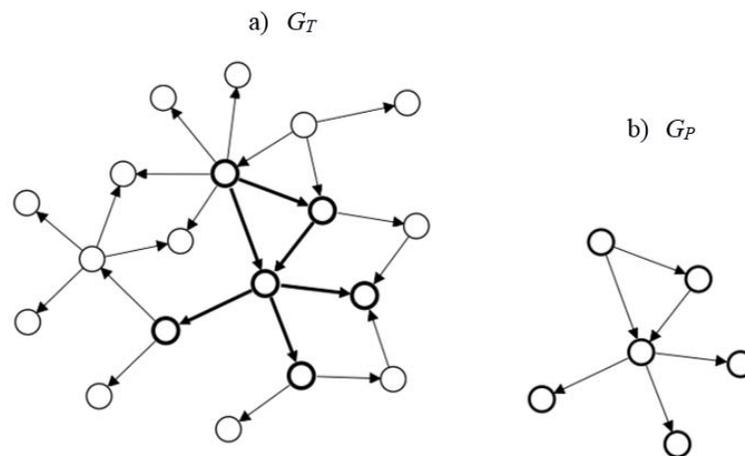


Figura 33. Red de interacción y red motivo patrón para el análisis de motivos de red. a) Se observa la red de interés o G_T

en la que se desea analizar la existencia de patrones de interés. b) Red motivo patrón o simplemente patrón G_P , ejemplifica la topología a buscar al interior de la red de interacción. (Tomado y modificado de Schreiber y Schwöbbermeyer, 2005a)

La frecuencia F_1 cuantifica cada match de este patrón, dando una completa descripción de todas las posibles ocurrencias de un motivo aún cuando los elementos de la red G_T han sido usados varias veces. Es decir, este concepto describe el potencial de la red de exhibir determinados motivo. Por otra parte, los conceptos F_2 y F_3 restringen el reuso de los elementos de la red compartidos por diferentes matches de un motivo. Si diferentes matches comparten elementos de la grafica, estos no son considerandos en la frecuencia. Particularmente F_2 permite cuantificar matches que comparten vértices pero no aristas, en consecuencia, F_2 calcula el número de veces que un motivo aparece en la red con aristas disjuntas. Por otro lado, la frecuencia F_3 describe matches que no comparte ni aristas ni nodos, por lo que puede ser entendida como la descripción de conjuntos no sobrelapados de motivos en la red de interés (Schereiber y Shwöbbermeyer, 2005b).

La obtención de las frecuencias anteriores tiene sentido sólo bajo la elección de un modelo de hipótesis nula adecuado en la generación de las redes aleatorias en las que se compara el motivo de interés. En particular el algoritmo más ampliamente sugerido para generar hipótesis nula es aquel dada una red de interés se reconectan las aristas de forma arbitraria de forma local. Así dadas dos aristas (A , B) y (C, D), el algoritmo reconecta A con D y C con B, permitiendo así que ninguna de las nuevas aristas pudieran existir en la nueva red generada. A esto se agregan condiciones tales como la preservación del número de aristas bidireccionales en la red aleatoria o la preservación de motivos de tamaño $n-1$ cuando se buscan motivos de tamaño n . La idea esencial de este algoritmo es la conservación de la conectividad de cada vértice. Puesto que la distribución de conectividad des una propiedad característica de una red, este algoritmo asegura que si bien la topología local de la red cambie se preserve la distribucion de conectividad a nivel global, permitiendo así obtener un modelo nulo para calular la significación estadística de un motivo de red (Véase la Figura 34, Schereiber y Shwöbbermeyer, 2005)

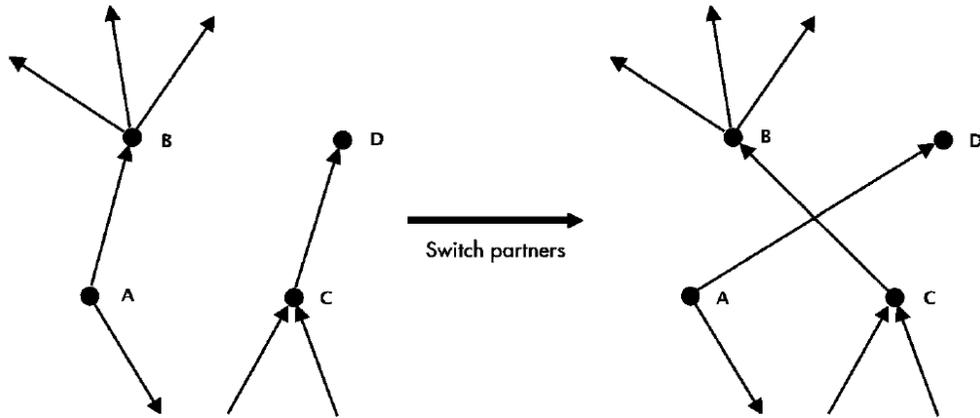


Figura 34. Ejemplo del algoritmo de generación de redes aleatorias basado en la reconexión de aristas. Dos aristas (A, B) y (C, D) son reconectadas de tal forma que A se une a D y C con D. (Tomado de Schreiber y Shwöbbermeyer, 2005b)

Como se mencionó, además de las medidas de frecuencia, el análisis de un motivo de red esta acompañado con el análisis de su significación estadística. La significación estadística de un motivo para una red particular puede ser medida mediante el cálculo de dos valores: Z-score y el P-value, usando principalmente la frecuencia F_l . Los perfiles de significación basados en el Z-score para un motivo en particular son útiles para comparar diferentes redes, sin embargo, ambos resultados dependerán del apropiado uso del criterio nulo descrito previamente:

- ❖ Z-score [$Z(m)$]: se define como la diferencia de la frecuencia F_l de un motivo m en la red de interés y su frecuencia media $\overline{F_{1,r}}$ en un conjunto suficientemente grande de redes aleatorias, dividido por la desviación estándar σ_r de los valores de frecuencia de esas redes aleatorias (Maslov *et al.*, 2003; Milo *et al.*, 2002)

$$Z(m) = \frac{F_1(m) - \overline{F_{1,r}(m)}}{\sigma_r(m)}$$

- ❖ P-value: Representa la probabilidad $P(m)$ de que un motivo m aparezca en una red aleatoria en igual o mayor número de veces que en la red analizada. Si F_l es la frecuencia del motivo en la red de interés, $F_{l,r}$ es la frecuencia del motivo en una red aleatoria y N denota el numero de redes aleatorias generadas, entonces:

$$P(m) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \delta c(n) \quad \text{Donde } c(n): F_{1,r_n}(m) \geq F_1(m)$$

$\delta c(n)$, la delta de Kronecker, es 1 sólo cuando la condicion $c(n)$ se mantiene, en otro caso es cero. Para

un cálculo razonable se utilizan no menos de 1000 redes aleatorias, en caso de tener menos de 1000 redes, el P-value es ignorado y el motivo es considerado estadísticamente sobrerrepresentado sólo si el Z-score es mayor que 2.0 (Kashtan *et al.*, 2002).

Considerando lo anterior, en esta sección se presenta el análisis motivo-estructural de las redes de *Schizosaccharomyces pombe*, mamíferos y *Arabidopsis thaliana* siguiendo los siguientes métodos:

- I. Se importó la topología de cada red en formato GML al software de análisis de motivos de red MAVisto (Schreiber, F y Schwöbbermeyer H, 2005c)
- II. Cada red fue modificada con el editor gráfico de MAVisto: las interacciones fueron identificadas como inhibidoras (i), marcadas con aristas de color rojo, o activadoras (a), marcadas con aristas de color verde (Véanse las figuras 35, 36 y 37)
- III. En el panel de exploración de MAVisto se modificaron los parámetros de número de nodos (*size*), número de redes aleatorias para generar (*Randomizations*), se fijaron los siguientes valores para analizar diferentes motivos en cada red:
 - a. Número de nodos: 2 y 3.
 - b. Número de redes aleatorias a generar para cada exploración: 2000
- IV. Se recolectaron los datos de la exploración de cada red en una tabla conteniendo:
 - i) Un identificador para cada motivo:
 - FYCC para los motivos correspondientes a la red de *Schizosaccharomyces pombe*, seguidos de un número que lo identifica.
 - MCC para los motivos encontrados en la red de regulación en mamíferos seguido de su correspondiente número.
 - ACC y su correspondiente número para los motivos explorados en la red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*.
 - ii) La topología del motivo analizado
 - iii) Los parámetros estadísticos calculados: F_1 , F_2 , F_3 , *P-value* y *Z-score*

iv) La identificación gráfica al interior de la red considerando únicamente la frecuencia F_3

4.4.1 Resultados

i. Análisis de motivos de la red de regulación del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

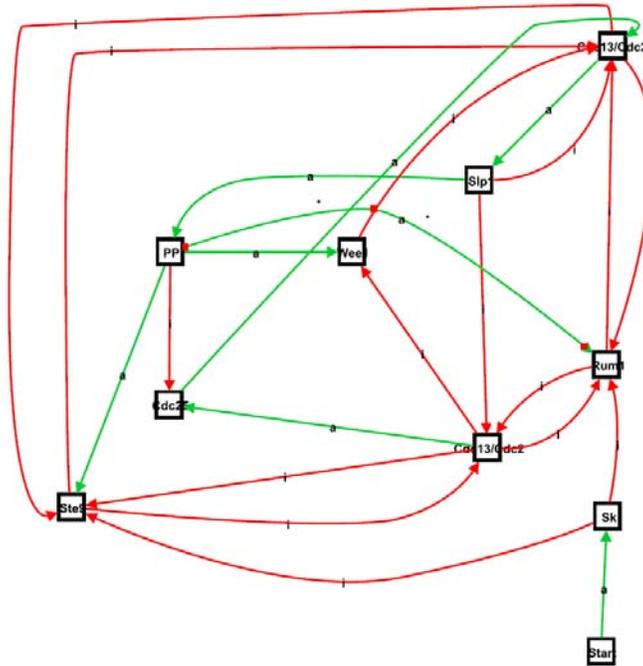
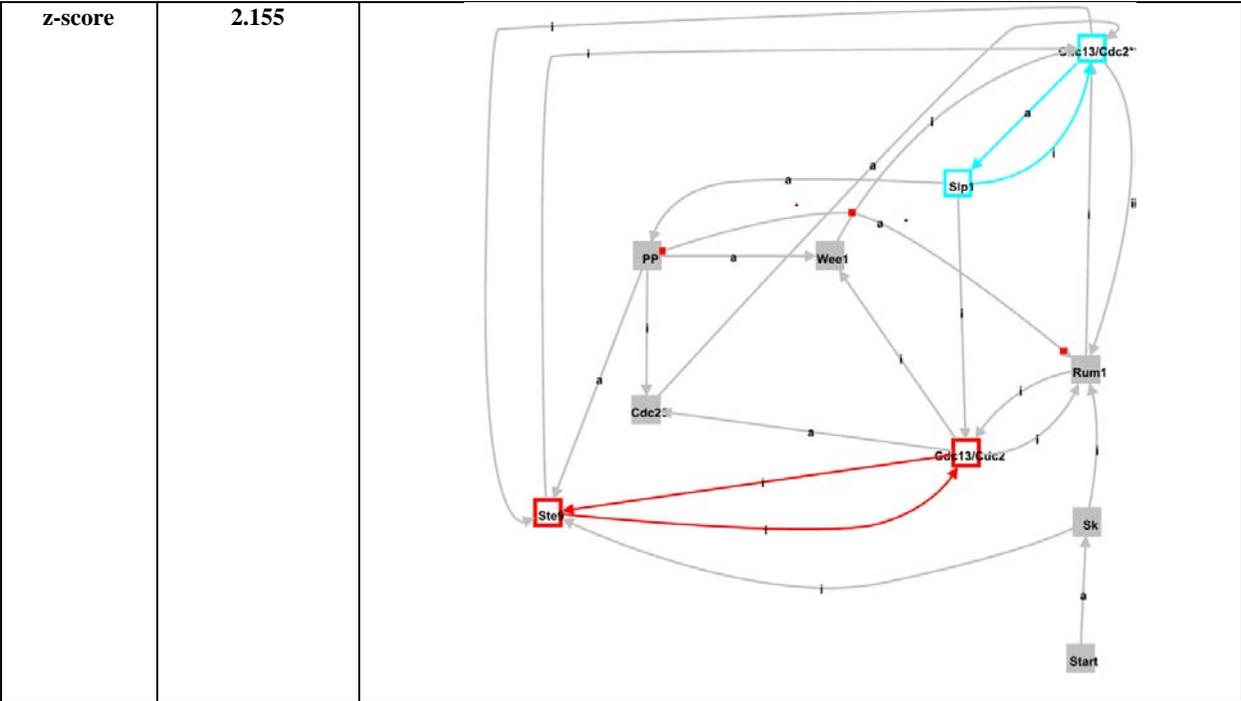
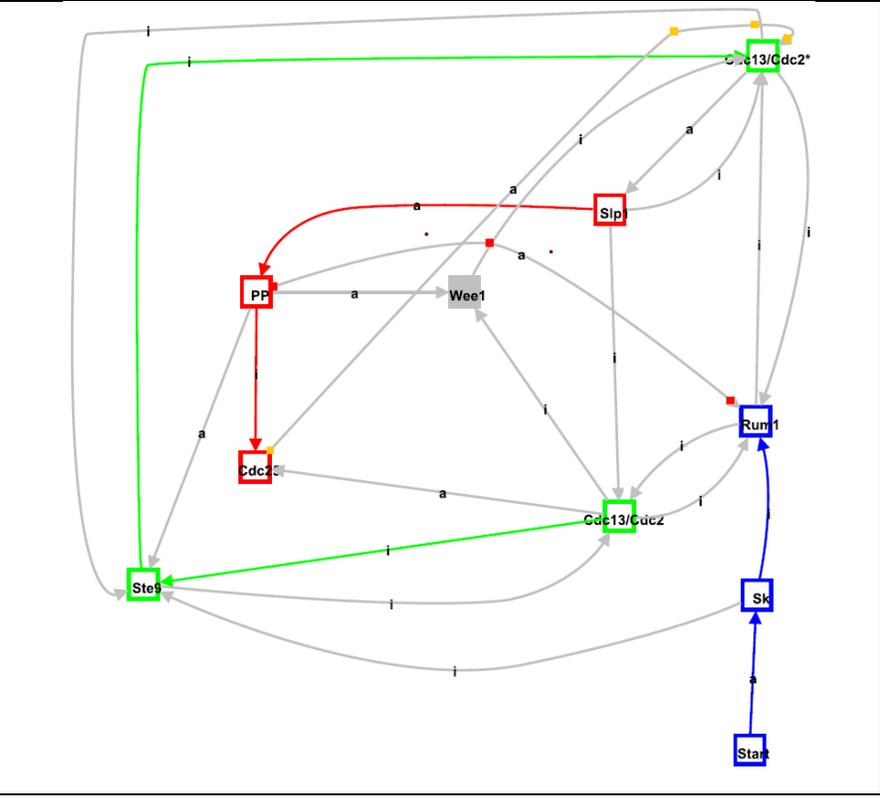


Figura 35. Red de interacciones para análisis estructural de la regulación del ciclo celular en *S. pombe*. Se simplificaron las interacciones en dos grandes grupos, aquellas que son positivas o activadoras (a) aparecen en verde, y aquellas que son inhibidoras o negativas (i) aparecen en rojo.

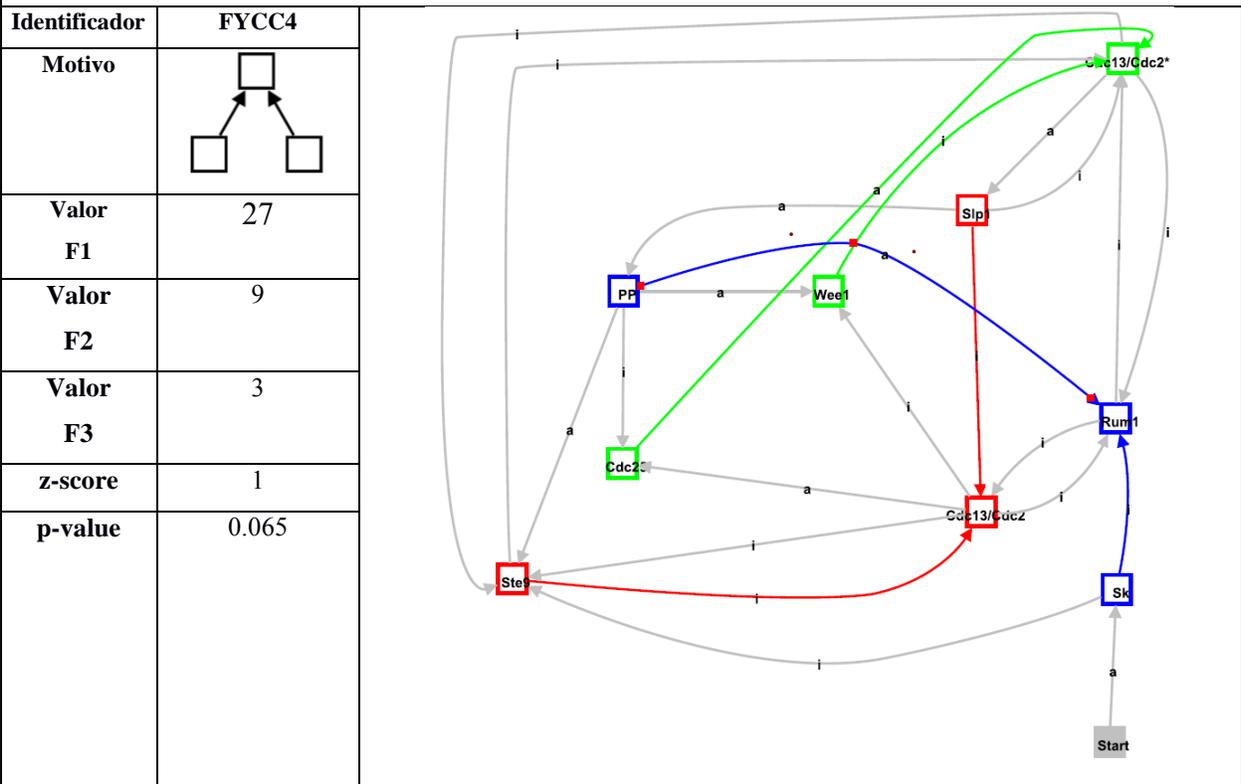
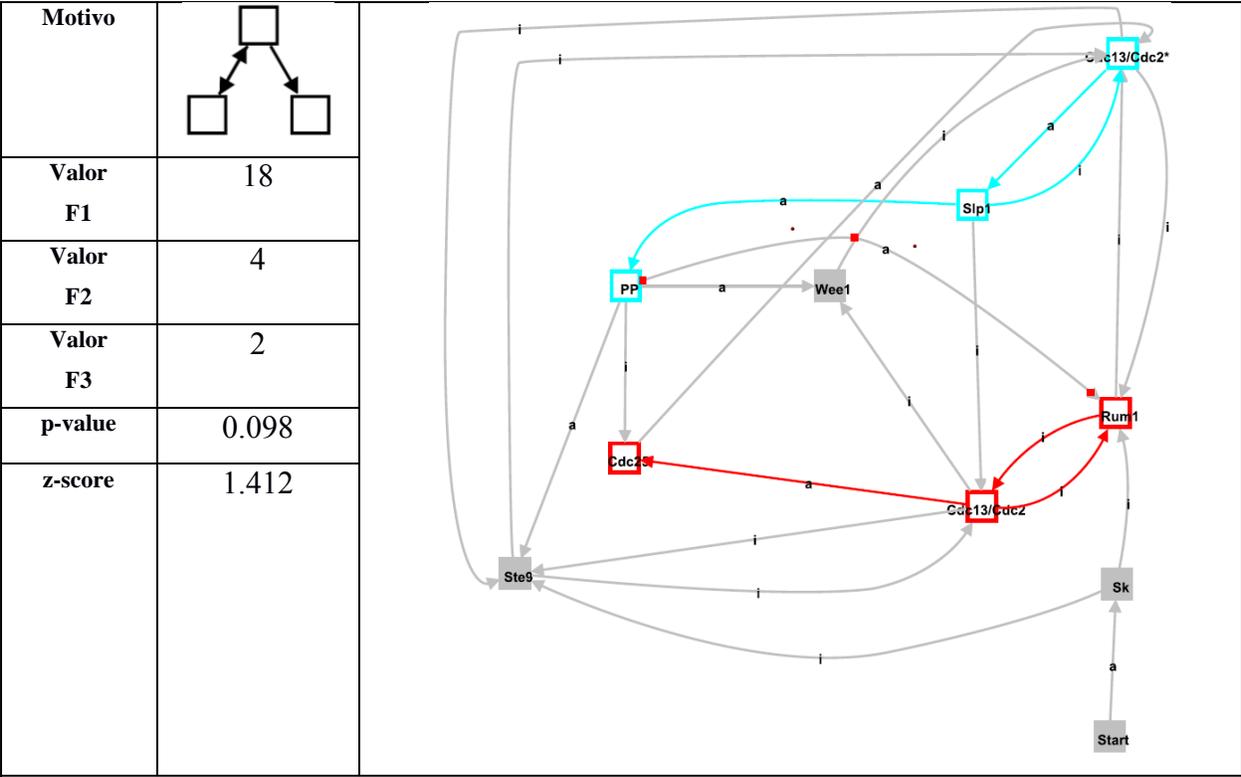
Identificador	FYCC1
Motivo	
Valor F1	5
Valor F2	5
Valor F3	2
p-value	0.00562



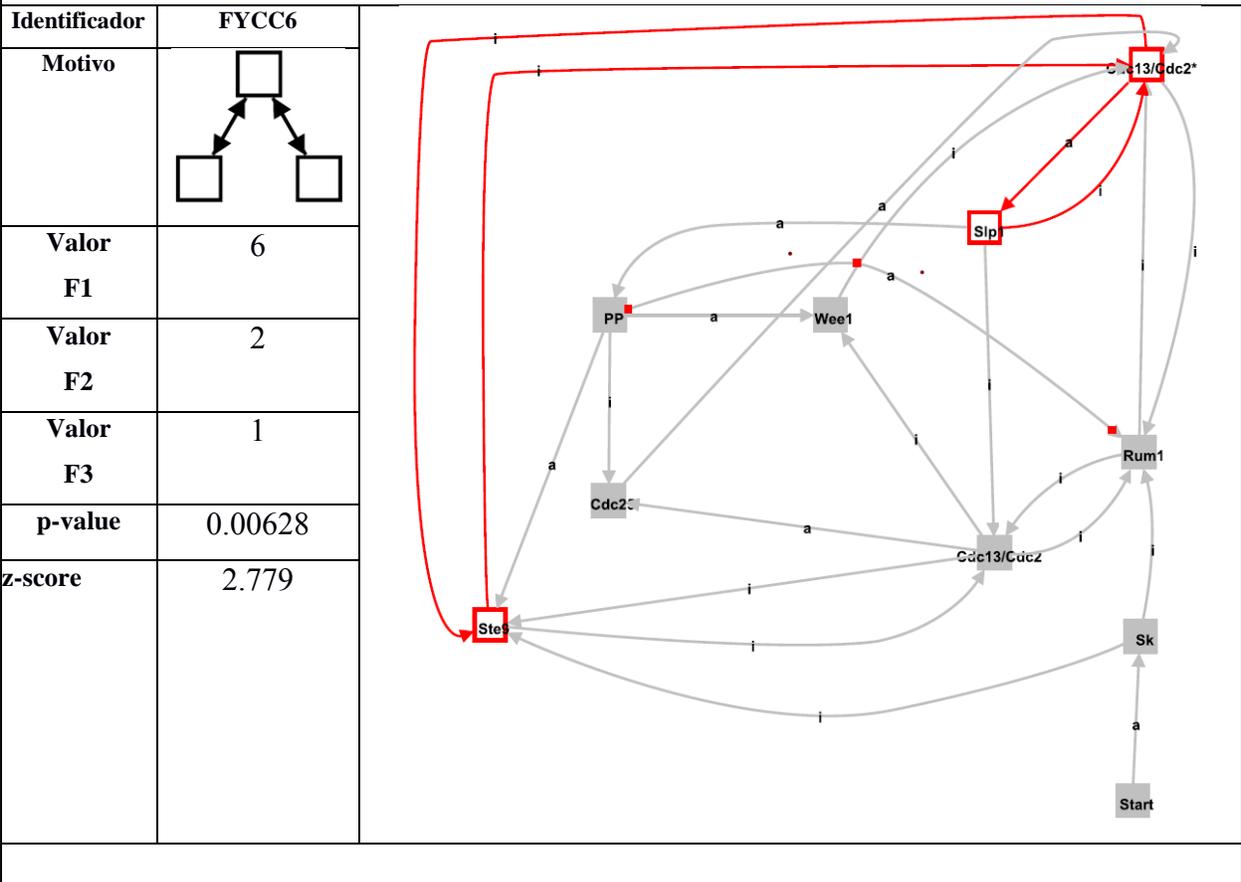
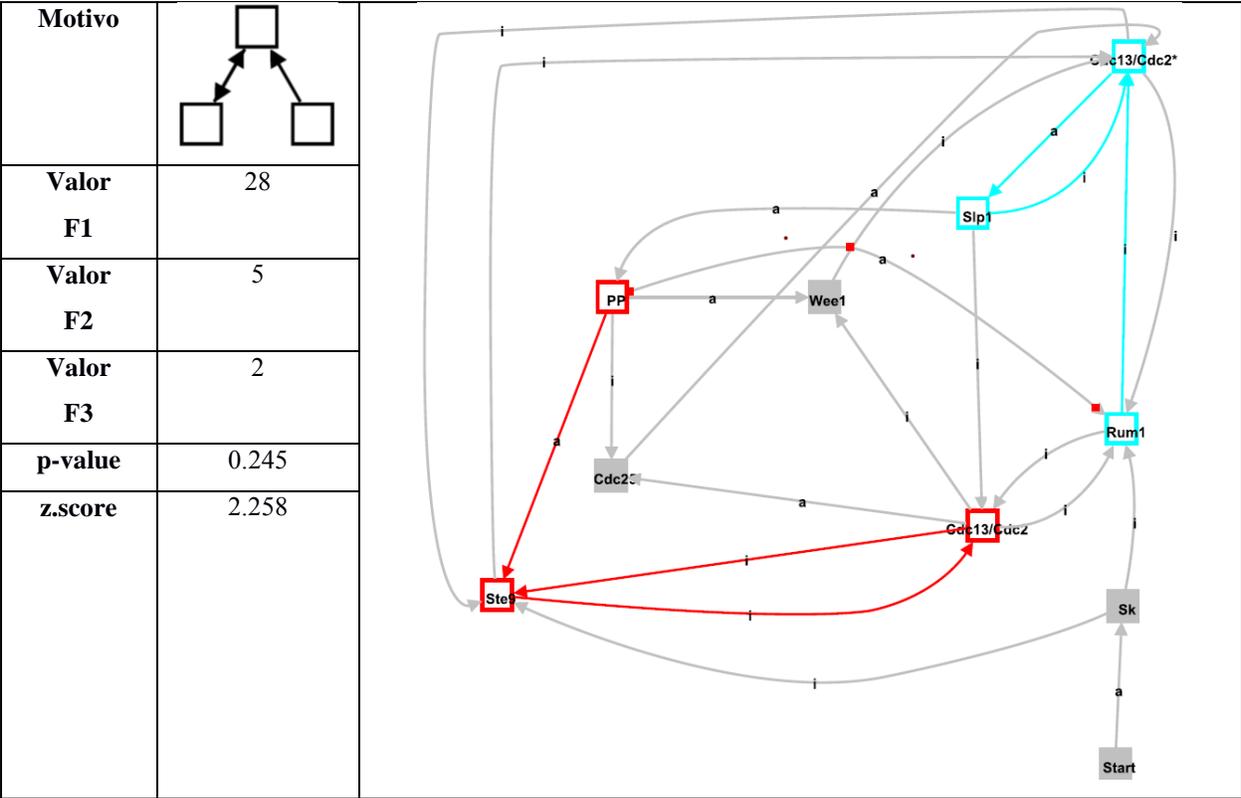
Identificador	FYCC2
Motivo	
Valor F1	46
Valor F2	10
Valor F3	3
p-value	0.977
z-score	1.424



Identificador	FYCC3
----------------------	--------------



Identificador	FYCC5	
----------------------	-------	--



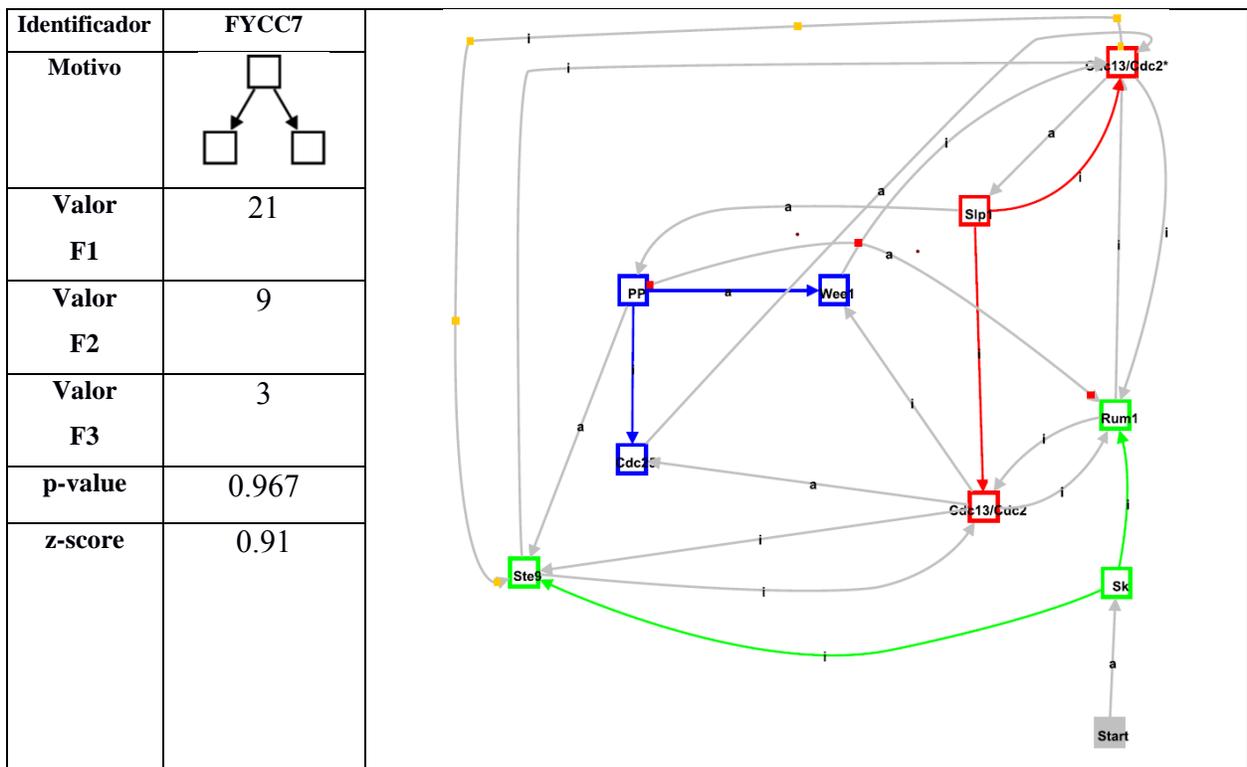


Tabla 22. Motivos encontrados en el análisis estructural de la red de regulación del ciclo celular en *S. pombe*

ii. Análisis de motivos de la red de regulación del ciclo celular en Mamíferos

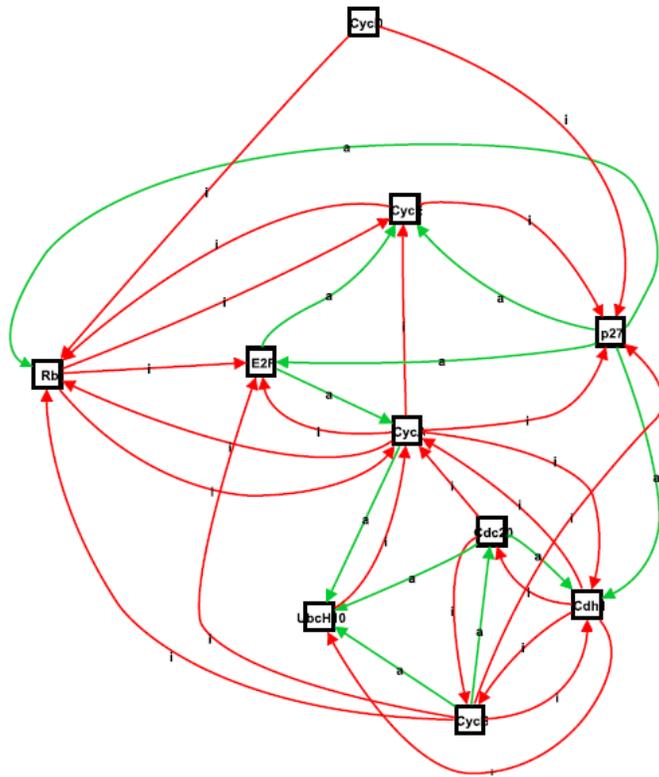
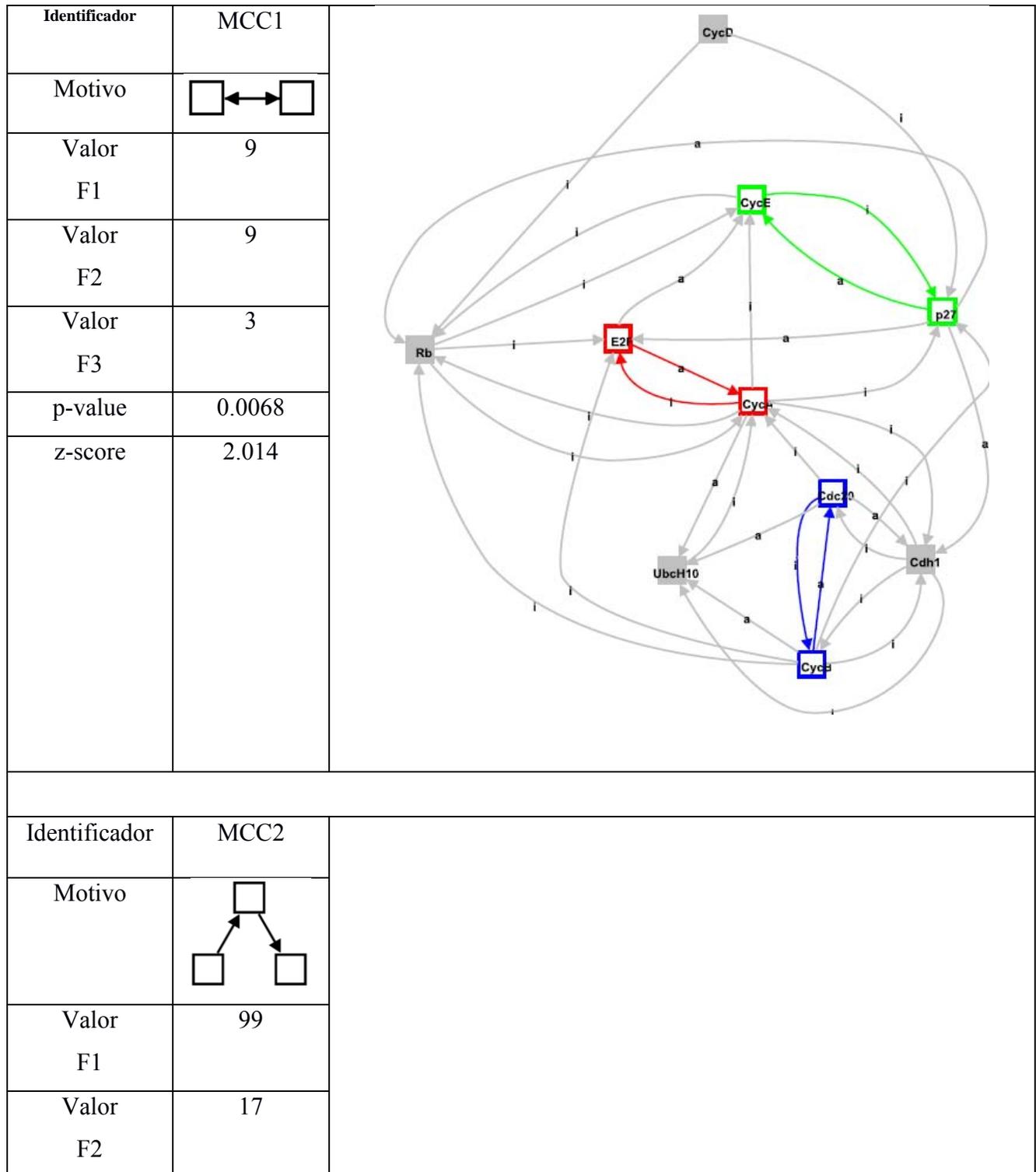
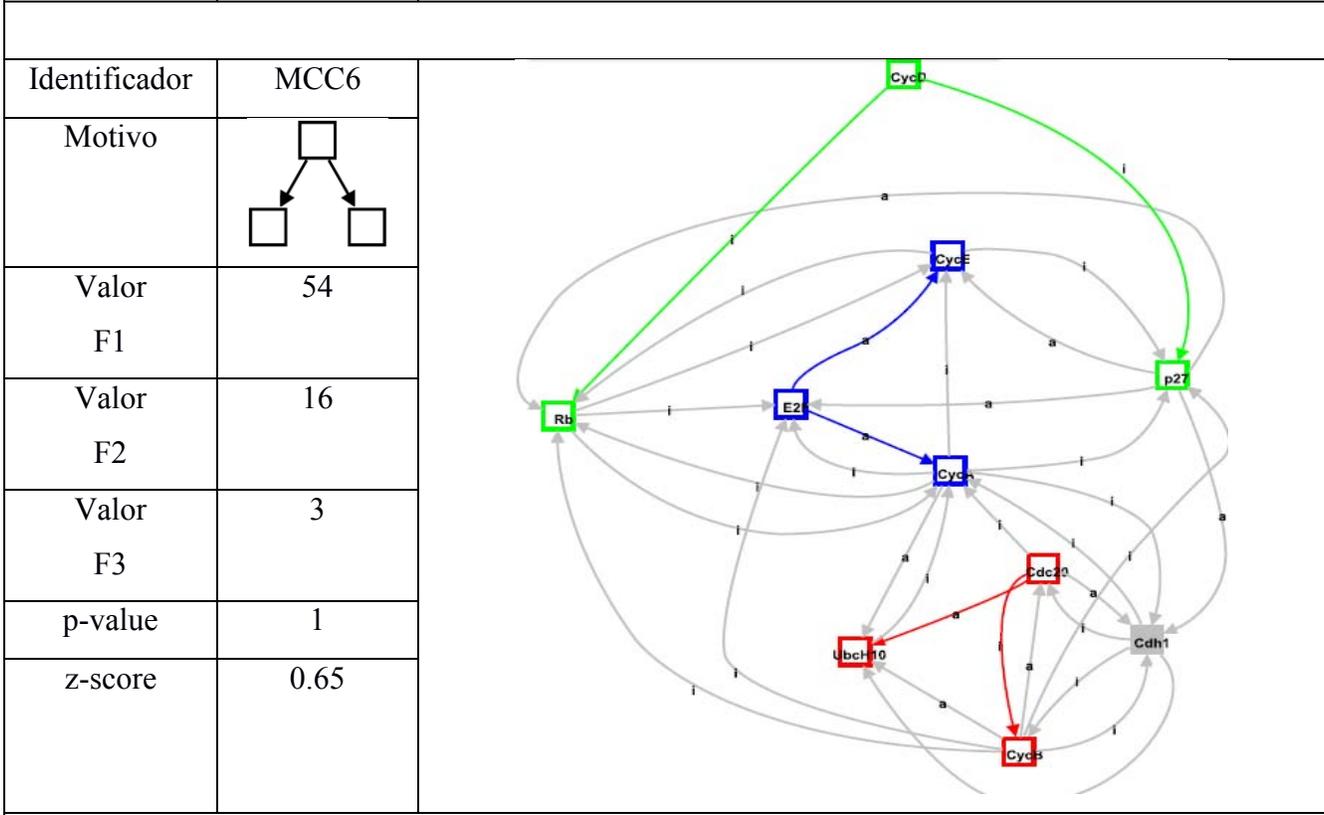
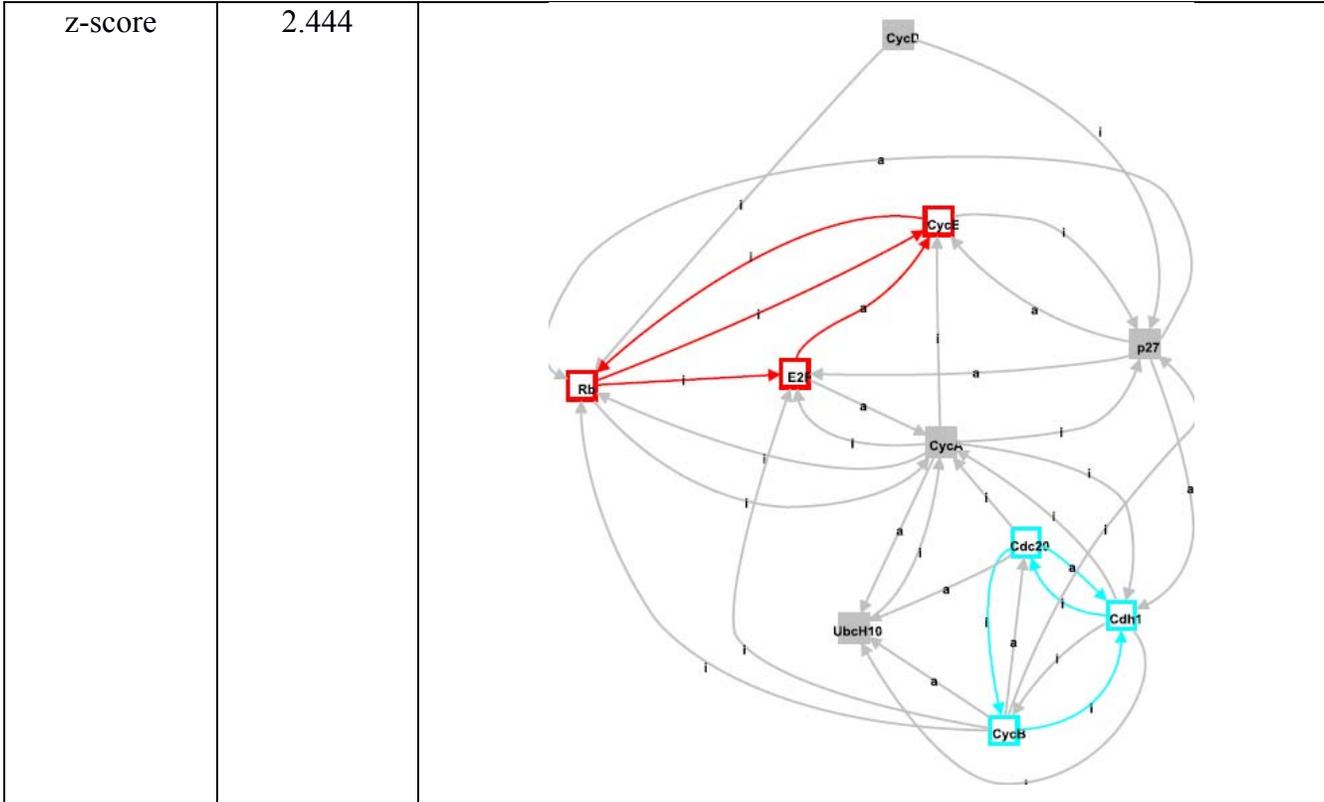
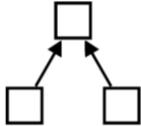
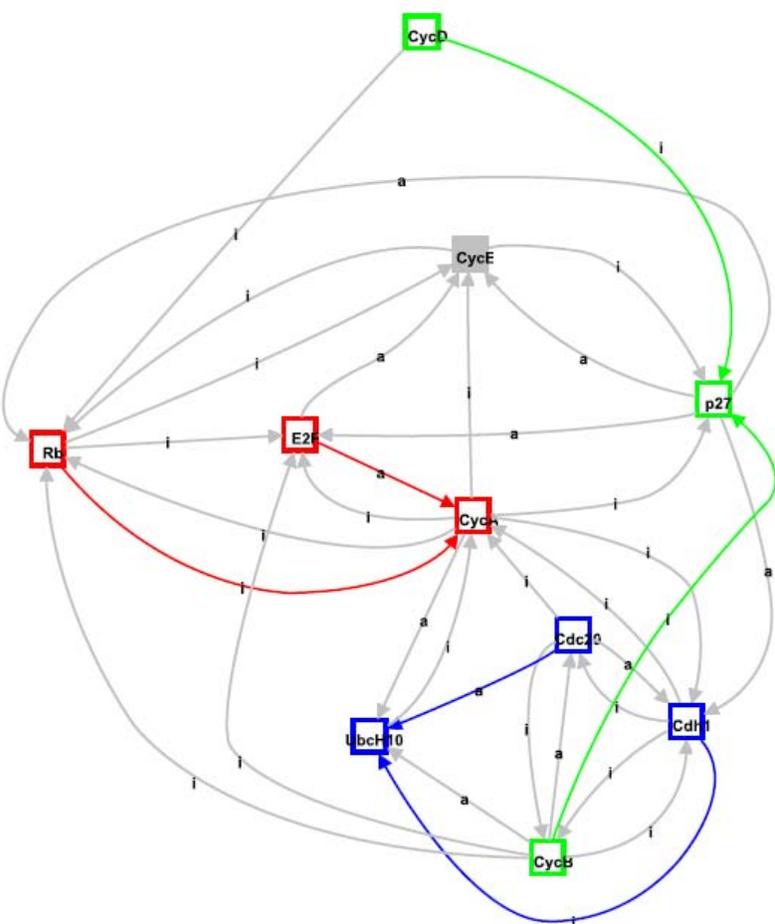


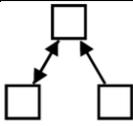
Figura 36. Red de interacciones para análisis estructural de la regulación del ciclo celular en mamíferos. Se simplificaron las interacciones en dos grandes grupos, aquellas que son positivas o activadoras (a) aparecen en verde, y aquellas que son inhibitoras o negativas (i) aparecen en rojo.

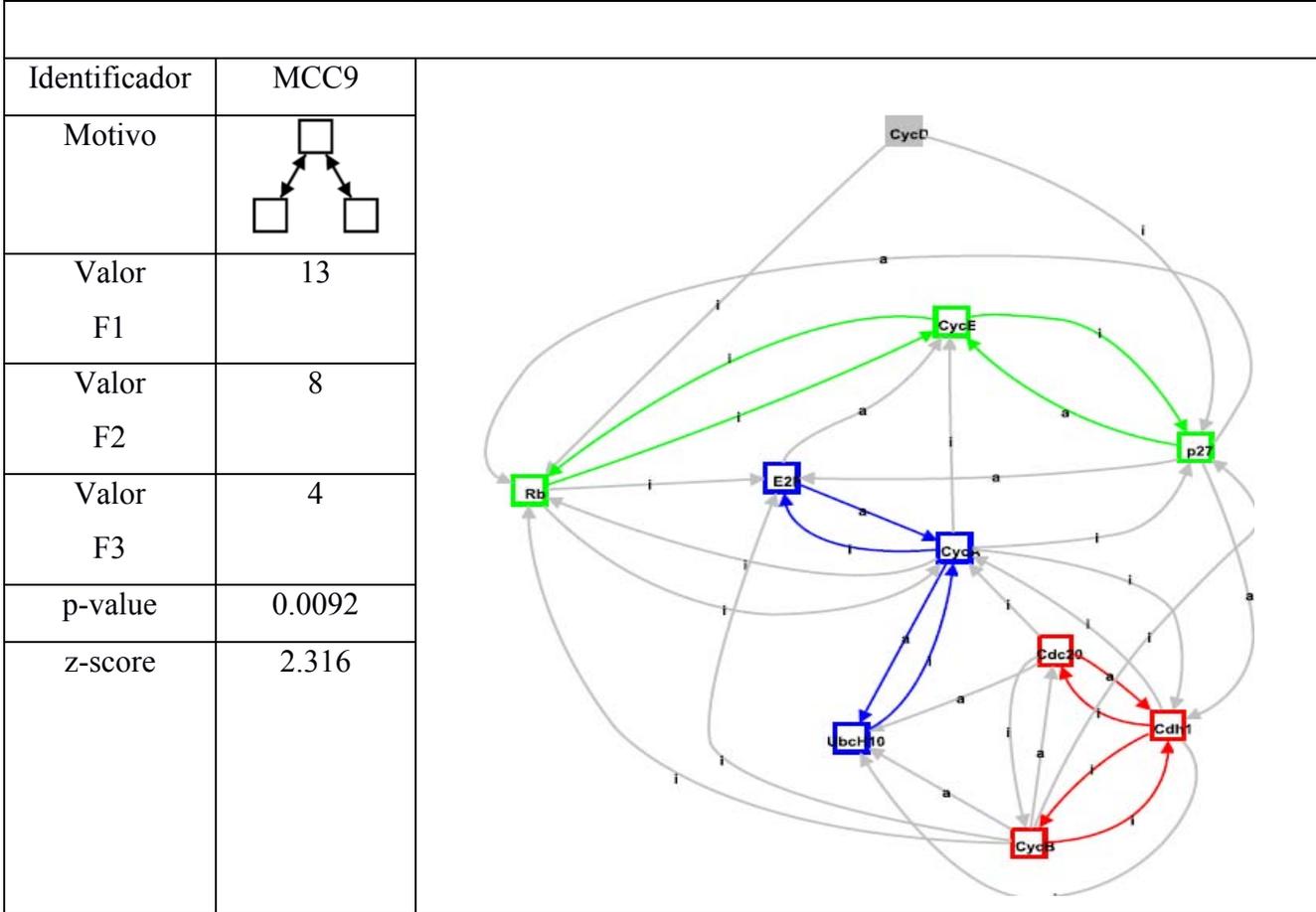
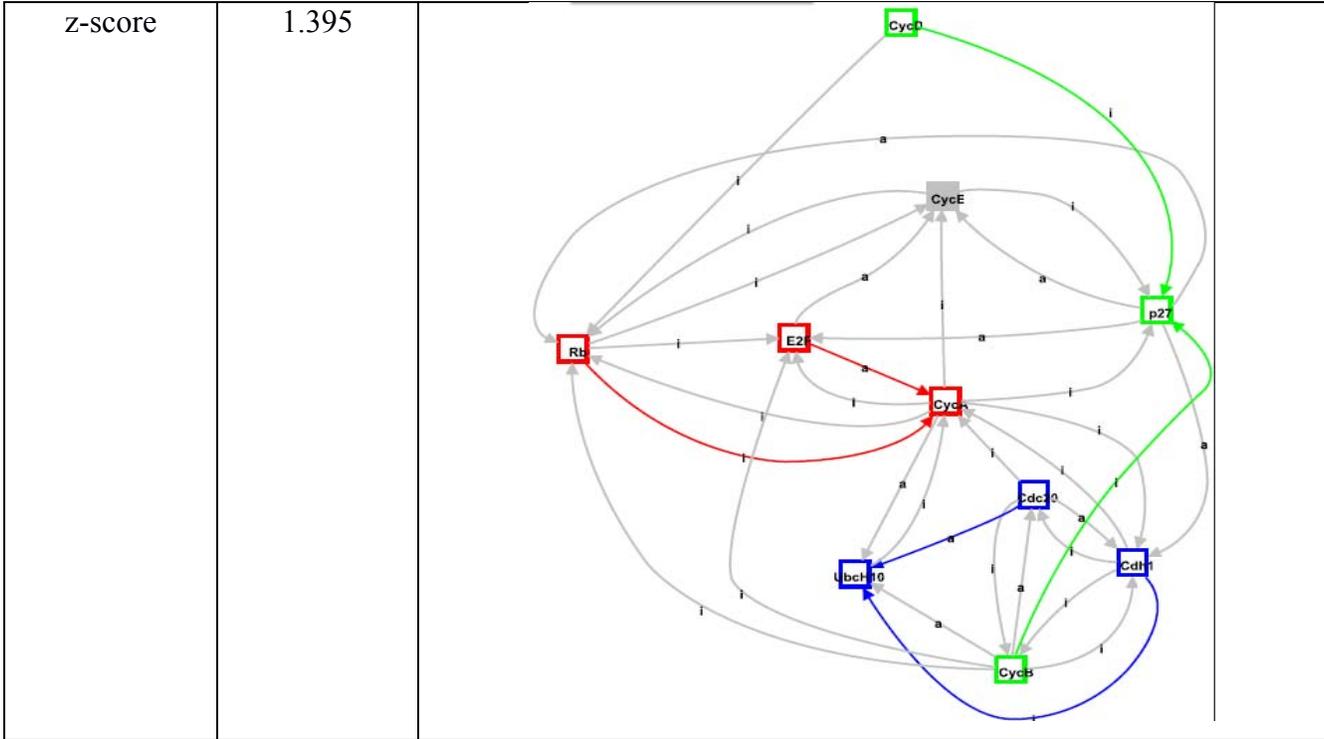


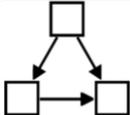
Identificador	MCC4	
Motivo		
Valor F1	17	
Valor F2	7	
Valor F3	2	
p-value	0.639	
z-score	1.173	
Identificador	MCC5	
Motivo		
Valor F1	22	
Valor F2	7	
Valor F3	4	
p-value	0.0095	

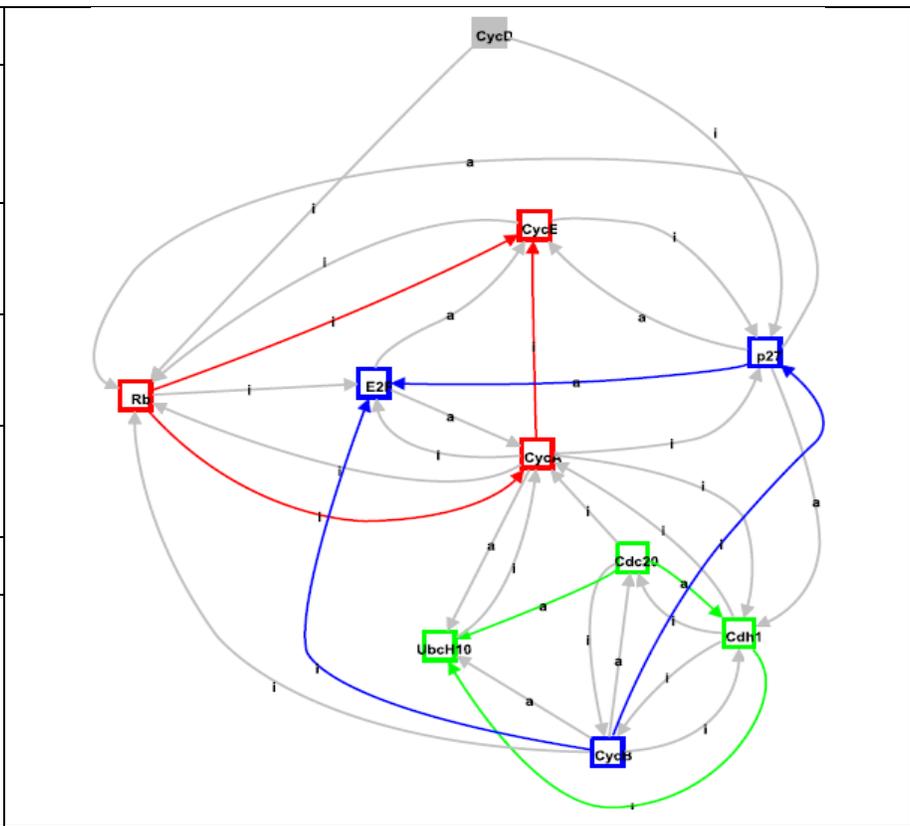


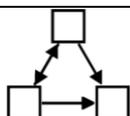
Motivo		
Valor F1	52	
Valor F2	16	
Valor F3	3	
p-value	1	
z-score	0	

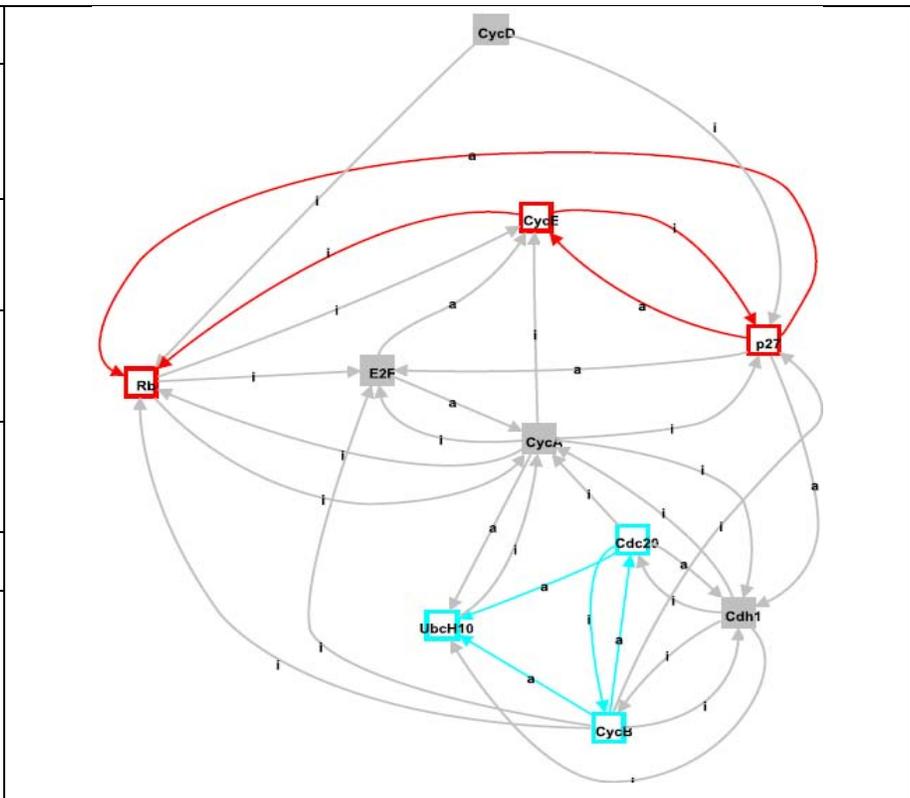
Identificador	MCC8	
Motivo		
Valor F1	52	
Valor F2	8	
Valor F3	3	
p-value	0.093	



Identificador	MCC10
Motivo	
Valor F1	44
Valor F2	9
Valor F3	3
p-value	0.389
z-score	1.466



Identificador	MCC11
Motivo	
Valor F1	12
Valor F2	4
Valor F3	2
p-value	0.146
z-score	1.96



Identificador	MCC12	
Motivo		
Valor F1	10	
Valor F2	4	
Valor F3	2	
p-value	0.283	
z-score	0.742	

Identificador	MCC13	
Motivo		
Valor F1	11	
Valor F2	4	
Valor F3	2	
p-value	0.283	
z-score	1.042	

Identificador	MCC14	
Motivo		
Valor F1	5	
Valor F2	3	
Valor F3	2	
p-value	0.00138	
z-score	2.047	

Tabla 23. Tabla de motivos de la red de regulación del ciclo celular genérica en mamíferos

iii. Análisis de motivos de la red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*

Se efectuó un análisis estructural de la red de regulación del ciclo celular propuesta en la sección 3.5 con la finalidad de localizar motivos estructurales con la capacidad de generar comportamiento dinámico de tipo oscilatorio, para ello se simplificaron las interacciones en dos grandes grupos: activadoras (a) e inhibidoras (i) como en las dos redes anteriores.

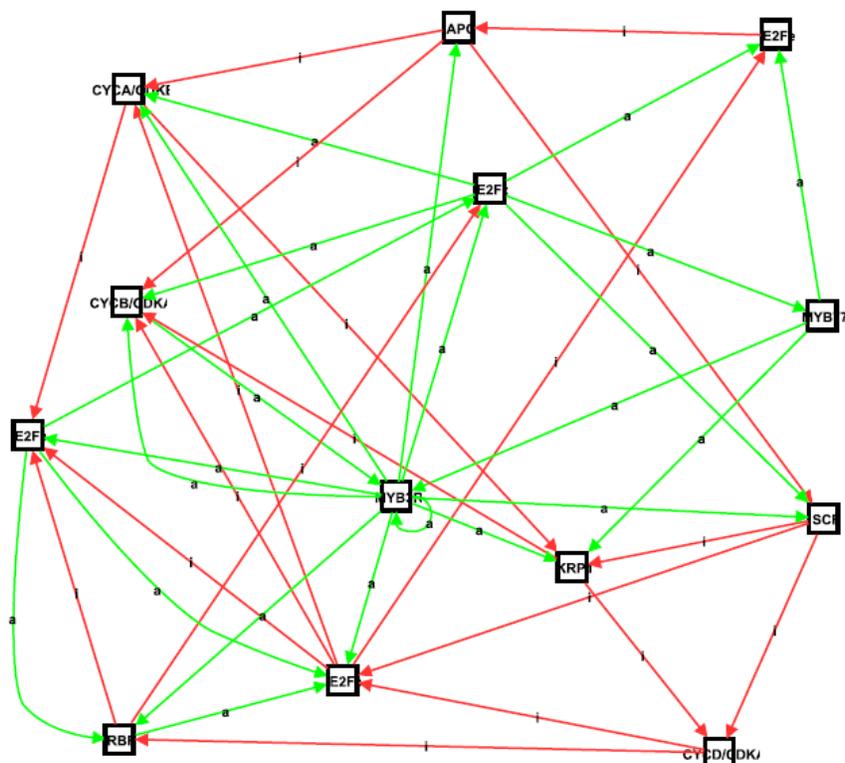
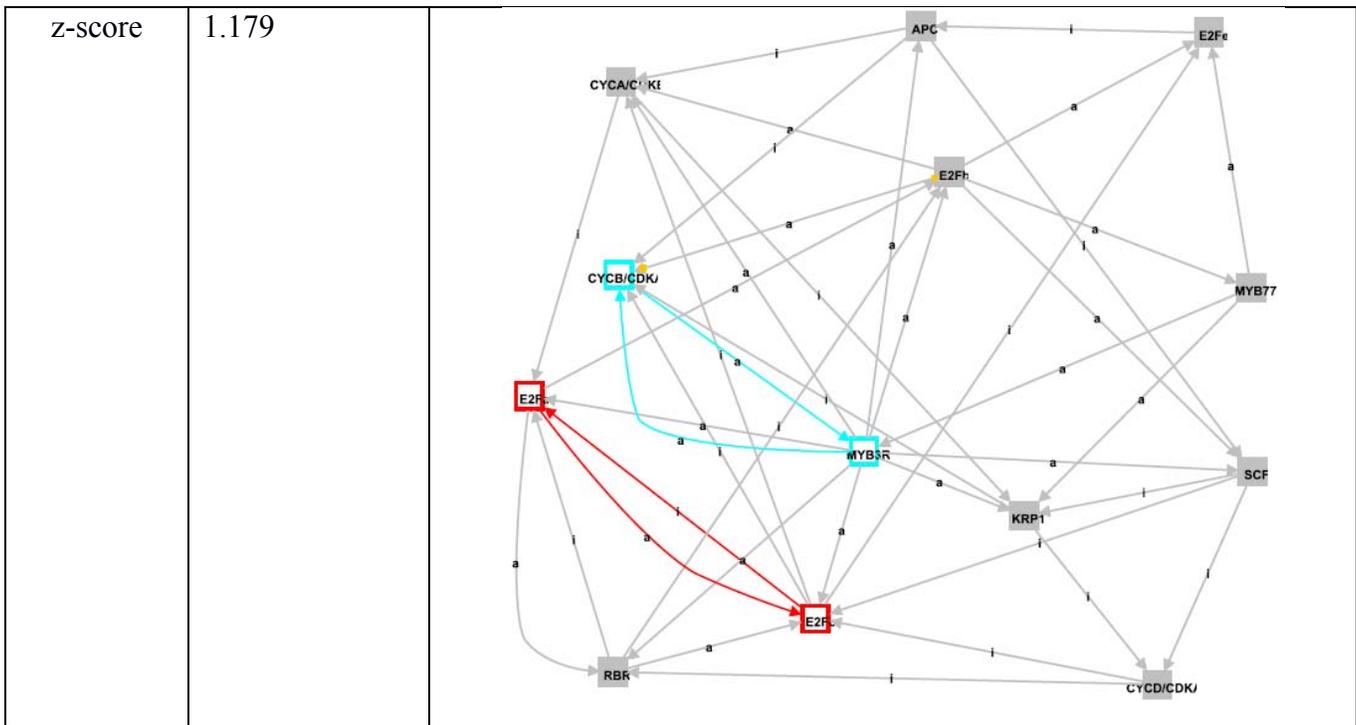
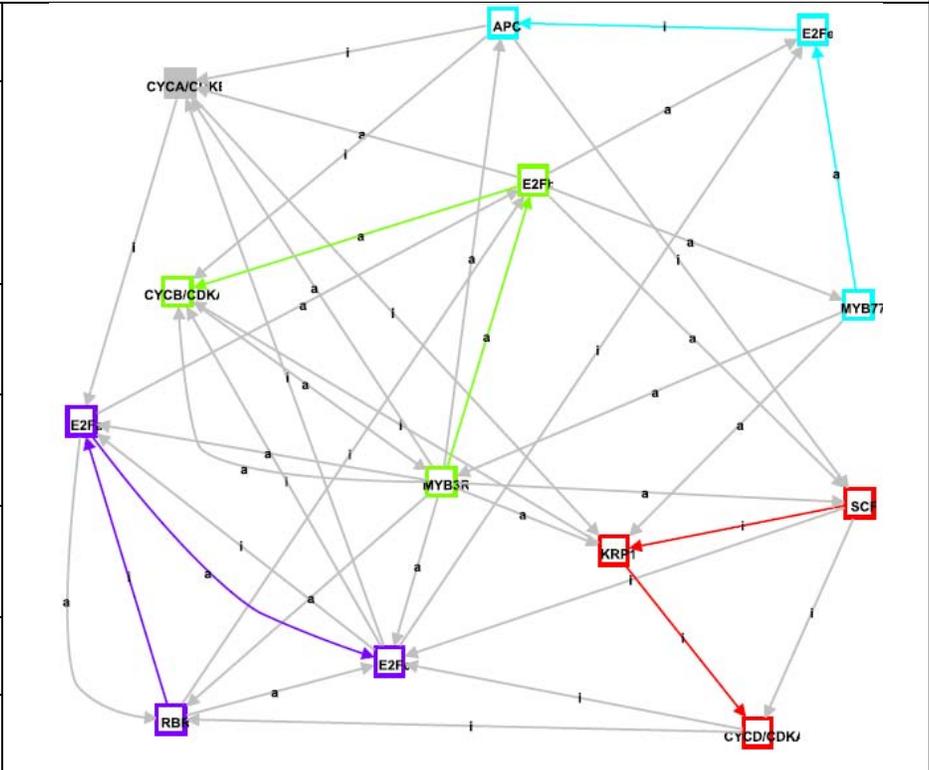


Figura 37. Red de interacciones para análisis estructural de la regulación del ciclo celular en *A. thaliana*. Se simplificaron las interacciones en dos grandes grupos, aquellas que son positivas o activadoras (a) aparecen en verde, y aquellas que son inhibidoras o negativas (i) aparecen en rojo.

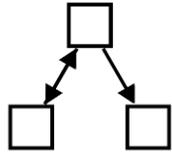
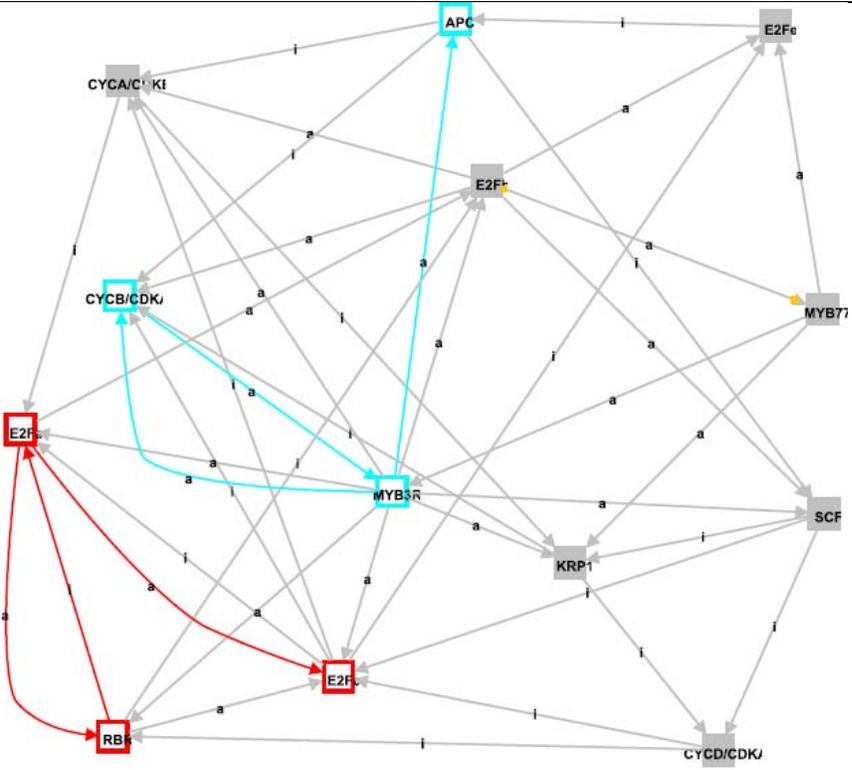
Identificador	ACC1
Motivo	
Valor F1	3
Valor F2	3
Valor F3	2
p-value	0.945

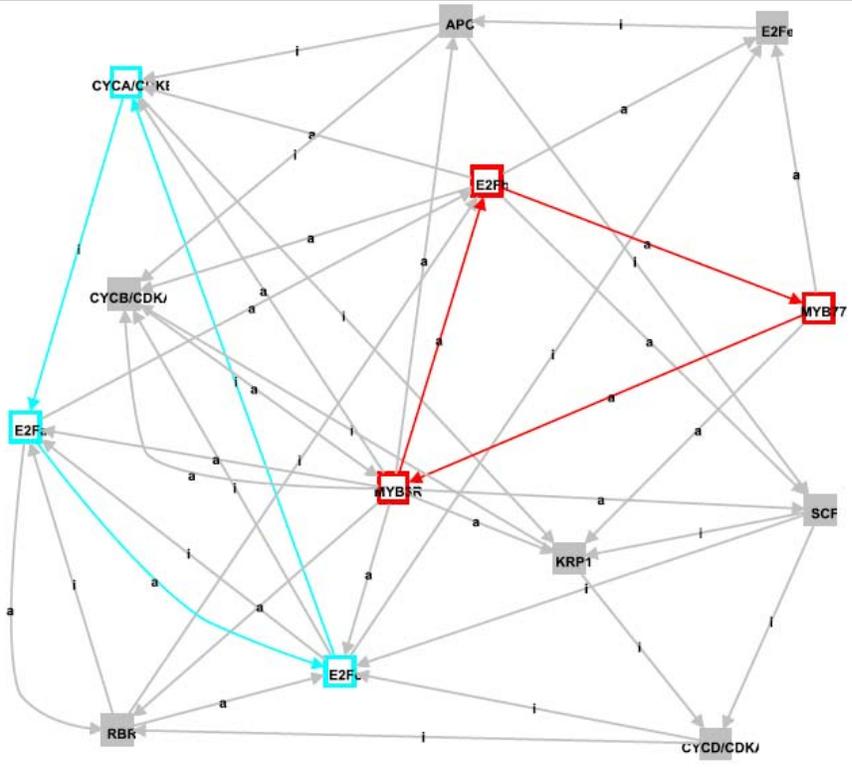
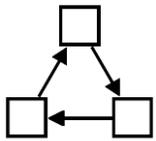


Identificador	ACC2
Motivo	
Valor F1	114
Valor F2	20
Valor F3	4
p-value	0.188
z-score	1.239



Identificador	ACC3
---------------	------

Motivo		
Valor F1	17	
Valor F2	3	
Valor F3	2	
p-value	0.924	
z-score	1.466	

Indetificador	ACC4	
Motivo		
Valor F1	8	
Valor F2	4	
Valor F3	2	
p-value	0.644	
z-score	0.205	

Identificador	ACC5	
Motivo		
Valor F1	7	
Valor F2	2	
Valor F3	2	
p-value	0.0086	
z-score	2.414	

Identificador	ACC6	
Motivo		
Valor F1	70	
Valor F2	16	
Valor F3	4	
p-value	0.89	
z-score	1	

Identificador	ACC7	
Motivo		
Valor F1	53	
Valor F2	17	
Valor F3	4	
p-value	0.63	
z-score	1.2	

Identificador	ACC8	
Motivo		
Valor F1	31	
Valor F2	10	
Valor F3	4	
p-value	1	
z-score	0.8	

Identificador	ACC9	
Motivo		
Valor F1	8	
Valor F2	3	
Valor F3	3	
p-value	0.0029	
z-score	2.9	

Identificador	ACC10	
Motivo		
Valor F1	7	
Valor F2	2	
Valor F3	3	
p-value	0.006	
z-score	2.103	

Identificador	ACC11	
Motivo		
Valor F1	9	
Valor F2	2	
Valor F3	4	
p-value	0.008	
z-score	1.961	

Identificador	ACC12	
Motivo		
Valor F1	17	
Valor F2	3	
Valor F3	2	
p-value	0.758	
z-score	0.759	

Identificador	ACC13	
Moti		
Valor F1	8	
Valor F2	4	
Valor F3	2	
p-value	0.0088	
z-score	2.802	

Tabla 24. Motivos en la red de regulación propuesta para el control del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*.

Parte III

Análisis de resultados y conclusiones

En el capítulo 5 se presenta un análisis integrativo de los resultados obtenidos en los capítulos 3 y 4 de este trabajo, se presenta el análisis de los atractores encontrados en las redes propuestas en el capítulo 3 y se discute la pertinencia de estos resultados en términos del tipo de atractor, las fases que recupera y la escala regulatoria. Se presentan también el análisis de los motivos de red encontrados en el capítulo 4 y se discute la pertinencia de estos en la generación de comportamientos de tipo oscilatorio sostenido y su probable rol regulatorio en las diferentes fases y transiciones del ciclo celular en cada organismo.

Se discute además en términos generales la importancia del paradigma estructura-función en el análisis de la regulación dinámica del ciclo celular eucariote y se presentan algunas pautas generales a seguir en trabajos posteriores.

Capítulo 5

Discusión y perspectivas sobre los modelos de red de la regulación del ciclo celular

En el presente capítulo se discute a modo de conclusión el papel que la biología de sistemas y en particular, el uso de modelos de redes de regulación, ha adquirido en el entendimiento de los procesos biológicos en la escala celular.

Además, se discuten los resultados obtenidos sobre la modelación dinámica y las propiedades estructurales descritas en los capítulos 3 y 4 de esta tesis a la luz de una visión integrativa del estudio del ciclo celular eucarionte. Se discute al final algunas ideas que surgieron durante el análisis de los modelos y que, a manera de propuesta, podrían ser implementados a futuro, particularmente, la extensión de los modelos de red aquí analizados a modelos de red basados en EDO y la aplicación de herramientas de la teoría de control al análisis de estas redes.

“Evolution is not just "chance caught on the wing". It is not just a tinkering of the *ad hoc*, of bricolage, of contraption. It is emergent order honored and honed by selection.”

Stuart A. Kauffman

5.1 Discusión y perspectivas sobre los modelos de red booleana como herramientas para entender diferentes procesos biológicos

Como se mencionó en el capítulo 1, los modelos de red son una herramienta que permite integrar y analizar dinámicamente el comportamiento de múltiples componentes interconectado de manera no lineal, por lo que han sido exitosamente usados desde la escala molecular, celular, tisular, orgánsmica y poblacional (Proulx *et al.*, 2005). El enfoque de redes regulatorias ha permitido abordar preguntas sobre el comportamiento dinámico de diferentes sistemas desde las interacciones entre los componentes, su conservación evolutiva o su contraste con redes similares, y de forma muy importante, en el estudio de las propiedades dinámicas emergentes resultado de las interacciones entre todos los elementos del sistema y que no pueden ser entendidas mediante el estudio aislada de cada uno de los componentes.

La simplicidad del formalismo booleano ha permitido el análisis de tales propiedades emergentes al interior de las redes regulatorias en la escalar celular y molecular, permitiendo estudiar diferentes procesos que hasta hace poco sólo habían sido descritos de forma estática, así se ha aplicado este formalismo, entre otros casos: en el circuito de regulación de lisis/lisogenia en la bacteriófaga lambda (Thieffry y Thomas, 1995), la especificación de los órganos florales en *A. thaliana* (Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998; Mendoza *et al.*, 1999; Espinosa-Soto *et al.*, 2004), la respuesta de polarización del sistema inmune (Mendoza, 2006) o la determinación del patrón de segmentación en los embriones de *Drosophila melanogaster* (Sánchez and Thieffry, 2001; Albert and Othmer, 2003; Sánchez and Thieffry, 2003; Chaves *et al.*, 2006; Chaves and Albert, 2008; Sánchez *et al.*, 2008), en los que se ha reproducido en forma preciso las observaciones experimentales. Particularmente es interesante el estudio sistemático de estos enfoques para la descripción de la red que subyace la diferenciación de los tipos celulares en *Arabidopsis thaliana* en la que con las diversas versiones y actualizaciones de la red se han obtenido 10 atractores puntuales que corresponden a los 10 patrones de expresión observados experimentalmente, lo que refuerza la tesis expuesta por Stuart Kauffman de que los atractores pueden corresponder a destinos o comportamientos celulares particulares (Kauffman, 1969)

La exitosa aplicación de los modelos de red booleana se debe en parte a que permiten la integración de observaciones de tipo cualitativo entre las interacciones de los componentes moleculares (genes, proteínas, factores de transcripción, hormonas, etc.) de forma coherente con un mínimo de información acerca de los detalles cinéticos de su comportamiento. Por otro lado, el análisis de los modelos de red booleana es más tratable que el necesario para el análisis de modelos basados en

ecuaciones diferenciales que inevitablemente tienen un mayor número de parámetros desconocidos, mientras que en los modelos booleanos se facilita el estudio sistemático de los posibles estados estables y sus cuencas de atracción (Kauffman, 1993).

Sin embargo, ha habido algunas críticas al modelo propuesto por Kauffman. Se considera que estas aproximaciones son poco realistas desde el punto de vista biológico puesto en que en primer lugar la mayoría de los modelos booleanos describen la activación de los genes de forma sincrónica, en segundo lugar el carácter discreto del estado de los genes y finalmente el que no se considera que muchos de los genes tiene diferentes tiempos de relajación (Le Novère, 2015). Sin embargo, y como apuntan diversos autores, la riqueza de los modelos de red booleana para la representación de procesos genético-moleculares radica justamente en su simplificación misma que evidencia que la dinámica de la red depende de las propiedades generales de su topología (Glass, 1975; Albert y Othmer, 2003; Bornholdt, 2005)

Algunos de estas críticas parecen ser superadas por un lado con la introducción de enfoques de actualización asincrónica (Garg *et al.*, 2008), lo que puede permitir observar comportamientos en los atractores que es imposible observar al considerar que todos los genes se activan al mismo tiempo (Albert *et al.*, 2008). Un ejemplo interesante puede observarse en el modelo propuesto por Fauré y colaboradores, en el que se propone una metodología basada en un enfoque sincrónico/asincrónico en el que dependiendo el elementos regulatorio es posible suponer una completa sincronía o asincronía de la actualización de su estado, logrando recuperar con este método algunas oscilaciones transitorias que podrían suponer comportamientos complementarios al ciclo canónico (Fauré *et al.*, 2006)

Finalmente, los modelos de red booleana constituyen una herramienta útil en muchos contextos, por un lado han sido útiles en la predicción de nuevas interacciones entre componentes moleculares: el red de regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae* (Orlando *et al.*, 2008), la red de regulación de los tipos celulares de la flor de *Arabidopsis thaliana* (Espinosa-Soto *et al.*, 2004), la red de control de células B humanas (Basso *et al.*, 2005) o la cascada de señalización de las MAPK (Calzone *et al.*, 2005); por otro lado explorar el efecto que las perturbaciones externas e internas a la red tienen sobre el comportamiento de la misma en diferentes contextos celulares (Li *et al.*, 2007).

Una interesante perspectiva deriva del enfoque de la biología de sistemas en el cual las redes booleanas adquieren un papel importante es el de probar hipótesis experimentales *in silico*, el diseño de experimentos dirigidos basados en resultados de simulaciones computacionales y la complementación de estrategias dirigidas a optimizar diseños experimentales. Las redes booleanas, por su simplicidad y

rápida implementación, pueden ser una herramienta fundamental en la descripción de procesos celulares puesto que complementan la investigación experimental y en conjunto permiten establecer un marco descriptivo más integrativo.

5.2 Análisis, discusión y perspectivas sobre el comportamiento dinámico de las redes de regulación del ciclo celular en eucariontes

En el capítulo 3 de este trabajo se analizó el comportamiento dinámico de tres redes de regulación del ciclo celular en formalismo booleano: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y genérica en mamíferos. También se propuso una red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana* cuyo comportamiento dinámico no fue analizado en este trabajo, sin embargo se discutirá más adelante sobre este modelo en esta sección.

Como se describió en la sección 3.2, se propuso un modelo de red modificada de la regulación del ciclo celular en *S. pombe* a partir del modelo propuesto por Davidich y Bornholdt (Davidich y Bornholdt, 2008) debido a las siguientes consideraciones: a) El uso de formalismos booleanos basados en funciones con umbrales donde la actividad de un nodo resulta de la sumatoria de sus reguladores y el resultado es comparado con un valor umbral de activación, b) La incorporación de la actividad de las ciclinas de inicio en un sólo nodo aun cuando éstas tenga diferente regulación y blancos, c) La actividad de Clp1 como la posible fosfatasa PP previamente propuesta en ese modelo, d) La presencia de un único atractor de tipo punto fijo y la posibilidad de modificar el modelo con más evidencia experimental y poder obtener un atractor de tipo ciclo límite en cuyos estados se encontraran representadas las fases del ciclo.

El primer paso en el análisis de este modelo fue la comparación del formalismo booleano basado en umbrales con uno basado en reglas lógicas por lo cual se derivaron las tablas de verdad descritas por la información propuesta por Davidich y Bornholdt, para una vez obtenidas, simular su comportamiento dinámico. Como se observa en las tablas 6 y 8, la derivación de estas reglas logra recuperar un único atractor de punto fijo cuyo perfil de activación es similar al presentado por los autores como el correspondiente a fase G1, sin embargo, en este trabajo no se realizó el análisis de la cuenca de atracción del atractor para confirmar si este resultado era dinámicamente equivalente al propuesto por los autores al incluir en su cuenca las fases del ciclo celular previas y en el orden temporal adecuado, por lo que en ese sentido, esté primer paso es inconcluyente puesto que no podemos asegurar que ambos formalismos

sean equivalentes en sus resultados.

El segundo paso fue la descripción de un modelo modificado que resolviera los puntos problemáticos del modelo de Davidich y Bornholdt previamente descritos. Como se presenta en la sección 3.2.3, se construyó un modelo de red que es capaz de recuperar un único atractor de tipo ciclo límite de grado 7 que corresponden a las fases: G1 temprana, transición G1/S, S temprana, S tardía, G2 temprana, G2 tardía y salida de M. Sin embargo, es importante hacer notar que se logra describir y que no parece coincidir dada la evidencia experimental. Como se observa en la Tabla 10, el primer estado se observa que sólo Ste9 y Rum1 permanecen encendidos lo que concuerda con el hecho de que en fase G1, los niveles de Cdc13 son bajos debido a que Ste9 la lleva a degradación y por otro lado Rum1 inhibe la formación de los complejos Cdk-ciclina. En la transición G1/S que podría estar representada en el siguiente estado, poco a poco los niveles de Cdc13 comienzan a aumentar y la activación de las ciclinas de inicio comienza a ser evidente (Clg1, Puc1, Cig2). Debido a esto, en el siguiente estado del atractor se observa que la actividad de Rum1 y Ste9 son abatidas por la actividad de las ciclinas de inicio en unión con Cdc13. Conforme se pasa a fase S, la actividad de las cinasas de inicio comienza a ser elevada en complejo con Cdc13 y las cinasas Wee1/Mik1 comienzan a ser activas. Si bien la actividad de estas dos cinasas comienza a ser evidente desde fase S, el máximo de actividad se observa durante fase G2 temprana. Por otro lado en G2 tardía, Wee1/Mik1 es fosforilada e inactivada por Cdc13, mientras que la fosforilación de la Tyr-15 en Cdc13 es removida por Cdc25 que es activada al mismo tiempo que Wee1 es inhibida. Es durante esta fase que se esperaría observar también que la fosfatasa Clp1 comience a ser activa, permitiendo así la regulación de la transición G2/M al inhibir la actividad de Cdc25 (Navarro y Pearce, 2012; Navarro *et al.*, 2012)

Finalmente se observa en el último estado la actividad de Ste9, lo que sugiere la activación del complejo APC y el inicio de la fase M, mientras que la actividad previa de Clp1 mantiene un loop positivo en la activación de Ste9 y el inicio de otros eventos como la activación de la separasa para la salida de M. Se observa además que Rum1 está presente, lo que sugiere que el mecanismo de entrada a G1 y el inicio del nuevo ciclo comienza (véase una detallada explicación en: Humphrey y Pearce, 2005)

Los resultados anteriores sugieren que si bien este modelo considera algunas inconsistencias experimentales que deben ser resueltas: La activación temprana de Rum1 en fase M; la activación de Wee1 desde la transición G1/S ya que es durante fase G2 que comienza a ser activa e inactivada en G2 tardía por Cdc2 (Sveiczer *et al.*, 2000); y de forma muy importante la activación de Clp1 en la transición G1/S y fase S y su ausencia en G1 temprana y G2 temprana lo que se esperaría dada la evidencia

experimental que apunta que efectivamente Clp1 es relocada desde el nucléolo sólo al inicio de fase G2, activando la subred controlada por SIN, permitiendo así la correcta citocinesis (Wolfe, 2004); las transiciones importantes del ciclo descritas anteriormente parecen estar ejemplificadas en la dinámica de forma muy general y pueden ser el principio para integrar modelos más coherentes de la regulación del ciclo celular en *S. pombe*

El segundo modelo analizado fue el modelo de red de la regulación del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*. Con base en el modelo de Li (Li *et al.*, 2004), y con la información experimental recuperada por Irons (Irons, 2009) y Mangla (Mangla *et al.*, 2010), se propuso un modelo de red booleana cuyas reglas lógicas fueron derivadas desde un inicio. Como se mostró en la sección 3.3.1, este modelo incorporará a los reguladores Cln12 (que incluye a Cln1 y Cln2), Cln3, Cdh1, Sic1, Clb56 (incluye a Clb5 y Clb6), MBF, SBF, YHP1, YOX1, HCM1, SFF, Swi5, Cdc20, Clb12 (incluye a Clb1 y Clb2), Cdc14 y las subredes FEAR y MEN. El modelo simulado bajo un enfoque sincrónico, logra recuperar dos atractores, el primero es un atractor de punto fijo con un tamaño de cuenca de 102400 estados y el segundo atractor es un ciclo límite de grado 5 con un tamaño de cuenca de 28672 estados (Ver tabla 14).

Con respecto al primer atractor podemos observar que únicamente aparecen encendidos Sic1 y Cdh1. Sic1 se espera tener un nivel de expresión alto durante el final de mitosis y hasta antes del punto de INICIO. Por otro lado Cdh1 si bien permanece constante durante el ciclo, es sólo durante fase G1 que es capaz de unirse al APC. Con respecto a esto, podríamos considerar que este atractor corresponde a un tipo de estado quiescente previo a al punto de INICIO (Gray *et al.*, 2004)

Por otro lado, el ciclo límite se compone de 5 estados consecutivos. El primer estado se observa la activación de Cln3, Sic1 y MEN. Este estado podría corresponder a una fase G1 temprana donde tras el punto de INICIO las señales externas activan la expresión de Cln3, si bien Sic1 y MEN están activos en este estado. El siguiente estado se observa la activación de SBF, MBF, Cln12, lo que podría corresponder a una fase G1 tardía o la transición G1/S puesto que en este estado, una vez que Cln3 ha sido activado, este activa a los factores transcripcionales SBF y MBF, que a su vez permiten la expresión de Cln1 y Cln2, que están involucradas en la transición G1/S. En el tercer estado se observan activos SBF, Yox1, Yhp1, Hcm1, Cln12, Clb56. YOX1 y YHP1 funcionan como inhibidores de la actividad de Cln3 durante fase S y hasta fase M, por lo que su presencia es indicio de fase S. Si bien es cierto que aún está presente SBF, esta comenzara a ser inactivada gracias a la actividad de Yox1 y Yhp1. Por otro lado la actividad de Clb56 en conjunto con Cln12 son importantes indicadores del inicio de fase S (Hu y

Aparicio ,2005).

En el cuarto estado se observan activos YHP1, SFF, Clb12, Clb56, CDH1 y FEAR. Esto podría corresponder a una fase G2. En esta fase se observa que Clb12 es activa gracias a que SFF promueve su transcripción, y puesto que la actividad de SFF está controlada por SBF y Hcm1 del estado anterior, es posible observar a estos dos reguladores (SFF y Clb12) en esta fase. La actividad de FEAR comienza a observarse preparando los eventos de entrada a fase La actividad de YHP1 es evidente

Finalmente, en el quinto estado se observan activos a Swi5, Clb12, Cdc20, Clb56, Cdc14, Sic1, Cdh1, FEAR y MEN. Se espera que Clb12 está activo puesto que es necesaria para la entrada a mitosis, por otro lado la actividad de Cdc20 y Swi5, la actividad de Swi5 es necesaria para la activación de Sic1, mientras que Cdc20 activa a las vías FEAR y MEN necesarias para la actividad de Cdc14. Esto eventos son necesarias para ejecutar la transición a la anafase. Posteriormente, Cdc14 es necesaria para la activación de Cdh1, que permitirá la salida de mitosis y preparar la división celular (Humphrey y Pearce, 2005; Haase y Wittenberg, 2014)

En conclusión se pueden advertir dos aspectos de este modelo: por un lado el modelo no logra recuperar completamente los eventos característicos de las diferentes fases como si lo logran hacer otros modelos como el de Irons (Irons, 2009), lo que parece ser logrado incorporando retrasos temporales en la expresión de algunos nodos como de la presencia de otros nodos que caracterizan diferentes fases particulares: Cln3 en respuesta a Yhp1; Cln2, Clb5 y Yhp1 en respuesta a SBF y MBF; y la actividad de Cdc20 y Swi5 en respuesta a SFF pueden tomar hasta dos veces el tiempo que los demás nodos (Bähler, 2005), por lo que esta temporalidad tiene que ser captura formalmente en modelos más completos. En segundo lugar, hay algunas expresiones de nodos en el modelo que no deberían presentarse, en particular: MEN se expresa en el primer estado del ciclo límite, Clb56 permanece desde fase S a M, y Clb2 comienza a aparecer incluso antes de la activación de SFF. A pesar de estos hechos, parece que las fases G1 y M parecen estar muy bien caracterizadas con los reguladores más importantes, por lo que este modelo es una muy buena aproximación a la descripción dinámica del ciclo en *S. pombe*, y en particular de los eventos de fase M, algo que ya se observaba en modelos mucho más elaborados basados en EDO (Barik *et al*, 2010), lo que supone que la aproximación aquí adoptada podría ser un buen camino para establecer un modelo más completo de la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

Por otro lado, la incorporación de las vías MEN y FEAR aún parece ser un tema de discusión. Por un lado se sabe que la actividad de Cdc14, que juega un papel importante en la inactivación de los complejos Cdk-ciclina durante la salida a mitosis, en la mayor parte del ciclo permanece en el núcleo

inactiva y sólo después de la anafase es liberada mediante la actividad de la vía MEN. Sin embargo Cdc14 es liberada en anafase temprana también por la vía FEAR que parece no ser esencial para la correcta actividad de Cdc14, por lo que el rol relativo de ambas parece ser un tema de discusión todavía (Kamieniecki *et al.*, 2005; Attner y Amon, 2012)

El tercer modelo analizado fue la red de regulación del ciclo celular genérica en mamíferos. Considerando el modelo propuesto por Fauré, se decidió actualizar las reglas lógicas e incorporar a la red al regulador c-Myc. La evidencia sugiere que c-Myc es un importante regulador de la transición del estado quiescente al estado proliferativo puesto que se ha observado que los mutantes nulos de c-myc presentan retrasos en la entrada a fase G1 o bien no logran pasar el punto de INICIO del ciclo celular, permaneciendo en estado quiescente (Schmidt, 1999). El análisis de esta red actualizada y modificada bajo un enfoque sincrónico permitió obtener dos atractores: el primero es un atractor de punto fijo con un tamaño de cuenca de 1024 estados, mientras que el segundo es un ciclo límite de grado 7 con un tamaño de cuenca de 1024 estados.

El atractor de punto fijo parece describir la fase G0, donde característicamente están activos los inhibidores Rb, p27 y Cdh1, además puesto que c-Myc está inactivo es imposible la entrada a fase G1 siendo c-Myc el nodo maestro de control de la salida del estado quiescente y la entrada a proliferación (Dang, 2012)

El segundo atractor, es un atractor de tipo ciclo límite de grado 7 en el que se observa lo siguiente: Las primeras ciclinas expresadas son las ciclinas D (CycD) que comienzan a expresarse en fase G1 temprana permitiendo la progresión a lo largo de G1. Las siguientes ciclinas en activarse son las ciclinas de tipo E (CycE), que comienzan a expresarse en fase G1 permitiendo el paso por la transición G1/S. Por otro lado, las ciclinas A (CycA) comienzan a ser expresadas en fase S temprana permitiendo la progresión en la fase S en conjunto con CDK2, mientras que en conjunto con CDK1 funcionan como reguladoras de fase G2 e importantemente en la transición G2/M. Finalmente las últimas ciclinas en activarse son las ciclinas B (CycB), que comienzan a expresarse lentamente al final de fase S teniendo su máximo durante la transición G2/M regulando su paso por ella y la progresión por fase M. c-Myc se ha sugerido comienza su actividad en fase G1 a G1 tardía permitiendo la inactivación de p27, que a su vez activa a CycE vía la actividad de E2F permitiendo el paso en la transición G1/S, por lo que su activación máxima se esperaría hacia en la transición G1/S y hasta G2, al tiempo que la actividad de Rb, el blanco de CycE, comienza a ser abatida. Por otro lado con la activación de CycE se espera que la actividad de p27 disminuya. La actividad de CycA contribuye a mantener la inhibición de Rb y p27,

inactivando de esta forma a E2F y CycE, como al complejo APC. Puesto que CycA inactiva a Cdh1, la actividad de Cdh1 se espera nula en G1/S y S, mientras que este hecho permite observar la actividad de CycB (Gérard *et al.*, 2009)

Por otro lado, se esperaría que Cdh1 comience su actividad de fase M tardía y hasta fase G1 tardía del siguiente ciclo, mientras que la actividad de Cdc20 se esperaría con un máximo en fase M, aunque su activación comenzara en la transición G2/M. Finalmente la actividad de UbcH10 es máxima en fase M, por lo que el ultimo estado concuerda con el hecho de que Cdc20 y Cdh1 caracterizan fase M, mientras que si bien se observa la actividad de CycD, podría considerarse un artefacto del modelo referente a los tiempos de relajación de la actividad de este nodo (Lim *et al.*, 2013)

Considerando lo anterior, es claro que este modelo aún no logra recuperar completamente los perfiles de expresión de los reguladores considerados conforme la evidencia experimental, sin embargo es una buena aproximación puesto que como se describió, de forma muy general se recuperan los eventos clave de las diferentes fases como las transiciones G1/S y G2/M. Un punto interesante de este modelo y que debe ser considerado con suma atención es que el proto-oncogen C-myc parece ser un importante regulador de fase G1, particularmente del llamado punto de INICIO Se ha descrito de forma muy importante, que muchos genes de respuesta temprana, como c-Myc, son importantes en el tránsito de estado quiescente a proliferativo, exhiben retraso, y que parecen, en principio, ser de importancia dinámica en la transición G1/S, de ellos C-myc parece ser un importante regulador maestro (Gérard y Goldbeter, 2010; Dong *et al.*, 2014)

Finalmente, como se explicó en la sección 3.5, la propuesta de red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*, forma parte de un proyecto más amplio que pretende entender la organización del nicho de células troncales en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y que involucra además de la red aquí presentada, la red de control de la diferenciación de los tipos celulares en el nicho de células troncales (Azpeitia *et al.*, 2010)

Recientemente, la topología de red aquí presentada fue utilizada y extendida para formalizar un modelo de red booleana que logra recuperar los patrones de expresión característicos de los diferentes reguladores en cada una de las fases del ciclo. El modelo incorpora 29 interacciones de los reguladores, de las cuales 3 son evidencia propuesta con base en interacciones reportadas en animales: E2Fb activa positivamente a SCF, CDKB1;1 en complejo con CYCA2;3 inhibe a E2Fa y finalmente el complejo APC/C regula negativamente a SCF, así como 16 interacciones inferidas mediante análisis bioinformático (Véase la sección 3.5 y Ortiz-Gutierrez E *et al.*, 2015; para más

detalles). El modelo recupera un único atractor de tipo ciclo límite de grado 11 al cual convergen todas las trayectorias: los estados 1 y 2 corresponden a fase G1 donde durante fase G1 temprana los complejos CDKA-CYCD3 (ejemplificada por la presencia de CYCD3) están ausentes por la presencia de KRP1. Por otro lado no están presentes las ciclinas mitóticas CYCA2;3 ni CYCB1;1, el complejo APC/C presente en G1 tardía. Se observa la presencia de RBR lo que se espera para mantener a los E2F inactivos. El tercer estado corresponde a la transición G1/S donde la presencia de CYCD3;1 induce la fosforilación de RBR y su posterior inactivación. La cuarta configuración corresponde a fase S con la actividad de CYCD3;1, E2Fa y E2Fe. El estado cinco se observa la actividad de E2Fc y E2Fb, lo que será necesario para la actividad de la transición G2/M. El sexto estado, MYB77 es activo junto con los reguladores del quinto estado. En el estado siete se observa la actividad de MYB77, MYB3R, KRP1, CYCA2;3, CDKB1;1, CYCB1;1, E2Fe, E2Fb, E2Fa y SCF, constituyendo así los estados seis y siete a la fase G2. El estado ocho corresponde a la transición G2/M donde KRP1 es inactivado por CDKB1;1-CYCA2;3, caracterizando así esta fase. En los estados nueve y 10 se observa que la ausencia de KRP1 promueve la activación de los complejos mitóticos CDKA;1-CYCB1;1 que promueven la mitosis. La ausencia de APC en los estados nueve y diez es consistente con que esta solo es necesaria para la salida de mitosis que ocurre justamente en el estado once (Ortiz-Gutierrez *et al.*, 2015). La importancia de que la topología de la red propuesta así y su validación dinámica en el trabajo previamente citado, hace evidente que esta red es suficiente para recuperar el oscilador característico en *Arabidopsis*. Es importante considerar que si bien en esta tesis no se abordó el comportamiento dinámico, los aspectos estructurales deben ser importantes en el comportamiento de la red, por lo que la discusión en ese sentido debe ser atendida sobre los motivos regulatorios de la red de control aquí presentada y las consideraciones dinámicas descritas en el trabajo de Ortiz-Gutierrez y colaboradores.

En los modelos analizados anteriormente, uno de los puntos importantes fue la descripción de atractores de tipo ciclo límite en cuyos estados se recuperan parcial o completamente las diferentes fases y transiciones características del ciclo considerado. Como se observa en los modelos de Irons (Irons, 2009) y Orlando (Orlando *et al.*, 2008), este resultado parece ser el punto de partida en la descripción del ciclo mediante redes booleanas. Se ha sugerido que el ciclo celular, en general, debe ser entendido como un comportamiento tipo ciclo límite en el que las oscilaciones sostenidas de los complejos cdk-ciclina y sus reguladores resulta del tránsito dinámico a lo largo de un ciclo límite estable, y este comportamiento tipo ciclo limite sugiere que el ciclo celular puede ser visto como un

ritmo celular autónomo correspondiente a la auto-organización espacio temporal de la red regulatoria. Así, el comportamiento de tipo ciclo límite permite una base dinámica explícita a la secuencia de tránsito de los reguladores moleculares que es independiente de las reglas matemáticas impuestas por diferentes formalismos (Gérard y Goldbeter, 2012).

En ese sentido, se ha sugerido que las redes con un mayor número de interacciones negativas en su interior son capaces de exhibir comportamientos de tipo ciclo límite (Glass, 1975). La búsqueda de ciclos límites al interior de redes booleanas no es un problema trivial y se conoce como el problema NP-Hard (Just W., 2006). Se ha sugerido además que los ciclos límite son altamente sensitivos al esquema de actualización de la red, particularmente, se ha sugerido que redes carentes de circuitos negativos o con un número reducido de estos, pueden desaparecer como resultado de cambios en el esquema de actualización (Goles y Salinas, 2008). La importancia de analizar modelos que logren describir comportamientos con ciclos límite por tanto es muy amplio, y en la descripción de tales modelos es importante el analizar cuidadosamente el esquema de actualización y los algoritmos usados para su análisis.

Considerando lo anterior, la comparación entre los modelos descritos en este trabajo muestra algunos resultados interesantes. En primer lugar se observa la presencia de varias duplicaciones en los elementos de las redes, particularmente en *A. thaliana*. En este organismo existen hasta más de diez copias de algunos genes claves de la red de control del ciclo celular, particularmente familias de CYCs y CDKs. Mientras que en mamíferos y levaduras las copias son menores en número. El caso particular de la proteína retinoblastoma llama la atención, puesto que como se observa en la tabla 19, *A. thaliana* sólo tiene una copia mientras que en mamíferos (humanos) existen 3 (Giacinti y Giordano, 2006); la pregunta que surge es: ¿Qué propiedades dinámicas provee a las redes de control la presencia de múltiples copias de genes de las redes de control?, una posibilidad puede ser que estos genes duplicados se unan dinámicamente a vías de control diferentes, lo que posibilita que la red adquiera nuevos niveles de regulación en el tiempo, siendo más robusta ante señales externas, o bien, que la presencia de estas duplicaciones en los elementos funcione como un mecanismo de compensación ante mutaciones en esos genes, permitiendo que el sistema de control sea robusto dinámicamente, esto es, que la respuesta en el tiempo sea la misma aun cuando algunos de los elementos tengan mutaciones y no sean funcionales. Por otro lado y como se apuntó en el capítulo 4, estos eventos de duplicación son un posible mecanismo mediante el cual las redes de control biológico adquieren su estructura libre de escala lo que les confiere robustez estructural y dinámica

(Barabasi y Oltvai, 2004)

La segunda e interesante diferencia es la importante regulación transcripcional en la red de *Arabidopsis* y en menor medida la genérica de mamíferos, mientras que en el caso de las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae* por no existen tantos reguladores transcripcionales, particularmente estas levaduras no tiene homólogos de RBR, pero en *S. cerevisiae* Whi5 toma un papel funcional parecido mientras que en *S. pombe* no se ha identificado alguno. En el caso de los reguladores E2F, tanto *Arabidopsis* como mamíferos cuentan con familias grandes de estos mientras que en *S. pombe* y *S. cerevisiae* S/MBF y SBF tienen un papel análogo en la transición G1/S aunque sus redes regulatorias no parecen compartir estructuras similares (Wittenberg y Reed, 2005). En el caso de los reguladores transcripcionales MYB, no existen análogos en *S. pombe* ni *S. cerevisiae*, pero Map1 (Oliva *et al*, 2005) y Mcm1 (Althoefer *et al.*, 1995) parecen cumplir ese rol funcional en la transición G2/M en cada levadura respectivamente.

Finalmente, con respecto a la comparación con los modelos basados en umbrales, y como se mencionó previamente, se ha cuestionado mucho el uso de los modelos basados en umbral debido a que los resultados dependen mucho del valor del umbral utilizado en la función de cada nodo, aún más, el uso de funciones basadas en umbrales requiere que se asuma que el estado de cada nodo en el tiempo resulta de un efecto aditivo de la activación o inhibición de sus reguladores (Zañudo, 2010; Darabos, *et al*, 2011), en contraste el modelo propuesto aquí supone que la actividad de los nodos depende de la acción combinatoria de sus reguladores, así este comportamiento combinatorio depende de la presencia o ausencia de otros reguladores en cada nodo (Perissi *et al*, 2010). Si bien ciertos procesos celulares modelados mediante funciones booleanas basadas en umbrales han sido descritos coherentemente (Li *et al*, 2004), otros parecen estar mejor integrados bajo la descripción de un enfoque combinatorio basado en reglas (Espinosa-soto *et al*, 2004;

5.3 Discusión y perspectivas sobre las propiedades estructurales de las redes de regulación del ciclo celular en eucariontes

Como se describió en la sección 4, los valores del z-score y el p-value son los parámetros usados para determinar cuándo la frecuencia de un motivo es estadísticamente significativo. El valor del z-

score como se describió es calculado encontrando la diferencia en la frecuencia del motivo en la red de interés y la frecuencia media del motivo en redes aleatorias dividida entre la desviación estándar de la frecuencia en redes aleatorias. Entre más grande el valor del z-score del motivo, más sobrerrepresentado está en la red de interés. Se ha asumido que el umbral por encima del cual se considera que un motivo está sobrerrepresentado es $Z=2$. Por otro lado el p-value analiza si la probabilidad de que el número de veces que un motivo aparece en una red aleatorio es igual o mayor que el número de veces que el motivo está presente en la red en cuestión. Entre más bajo el valor del p-value, significa que es más significativo el motivo. El umbral por debajo del cual el p-value debe ser considerado significativo es 0.01. En conjunto estos dos parámetros permiten distinguir entre subgrafos sobrerrepresentados y aquellos que no lo están (Schreiber y Shwöbbermeyer, 2005; Kashtan et al., 2002). Considerando lo anterior, en esta sección se analizarán los resultados de los motivos encontrados en las tres redes analizadas en la sección 4.4.1:

i. Motivos de la red de regulación del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

Como se observa en la tabla 22, el motivo FYCC1 tiene valores de $Z=0.00562$ y $p\text{-value}=2.155$, por lo que puede ser considerado como una subgráfica sobrerrepresentada. En la red de regulación se observa dos motivos, el primero conformado por Slp1-Cdc13*: Slp1 inactiva a Cdc13, y al mismo tiempo Cdc13 activa a Slp1; el segundo conformado por Ste9-Cdc13: Ste9 inactiva a Cdc13, por otro lado, Cdc13 inactiva a Ste9. Como se describe en la tabla 21, el motivo Slp1-Cdc13* corresponde a la estructura de un feedback negativo, por lo que se esperaría que bajo ciertas condiciones de parámetros este motivo describa pequeñas oscilaciones que finalmente terminen en un estado estacionario de la misma forma en que lo hace un oscilador amortiguado (Pigolotti *et al.*, 2007)

Por otro lado el motivo Ste9-Cdc13 corresponde a un feedback positivo. La evidencia sugiere que el comportamiento dinámico para un conjunto amplio de parámetros, es similar a un interruptor, donde se observa que el sistema rápidamente adquiere un semiciclo de activación para decaer a un estado estable (Nóvak y Tyson, 2008; Tyson y Novak, 2010). Se discutirá en el siguiente capítulo más al respecto de estos motivos.

El siguiente motivo destacado es el motivo FYCC6 con parámetros estadísticos $Z=2.779$ y $p=0.00628$, que se considera estadísticamente significativo. En la red se observa que

únicamente existe un motivo con esta topología: Ste9 inactiva a Cdc13* y Cdc13* inactiva a Ste9, así mismo Cdc13* activa a Slp1 y Slp1 inactiva a Cdc13*. Este motivo corresponde a un feedback negativo amplificado como se muestra en la tabla 21. Como se describe, este motivo presenta oscilaciones sostenidas para un amplio rango de parámetros (Tyson y Novak, 2010), lo que sugiere que este circuito es un excelente candidato para generar oscilaciones dentro de la red regulatoria. Por otro lado, si se observa, este motivo se compone de Ste9 (homólogo de Cdh1) y Slp1 (homólogo de Cdc20), son los reguladores del complejo APC, mientras que Cdc13* es la ciclina clave de la transición G2/M. Se ha sugerido que la apropiada ejecución del ciclo depende de la actividad oscilatoria de Cdc13/cdc2 entre niveles de actividad baja (fase G1), intermedia (fases S y G2) y alta (fase M) (Stern y Nurse, 1996), por lo que este circuito, que involucra a dos de los reguladores negativos de Cdc13, podría ser importante en la correcta emergencia del patrón general de oscilación al interior de la red descrita.

ii. Motivos de la red de regulación del ciclo celular genérica en mamíferos

Como se muestra en la tabla 23, se encontraron un total de 14 motivos de regulación al interior de la red de regulación del ciclo celular genérica en mamíferos. Como en el apartado anterior, se considerará como significativo un motivo con valores de $Z > 2$ y $p < 0.01$.

El motivo MCC1 tiene valores $Z\text{-score}=2.014$ y $p\text{-value}=0.0068$. Tres subgrafos comparten esta estructura: el subgrafo compuesto por CycE y p27 donde el primero inactiva a p27 y p27 que activa a CycE; el subgrafo compuesto por E2F y CycA donde E2F activa a CycA y este inactiva a E2F; finalmente el subgrafo compuesto por Cdc20 y CycB donde Cdc20 inactiva a CycB y este activa a Cdc20. Como se observa de la tabla 21, estos tres motivos corresponden a la estructura de un feedback negativo, por lo que podría esperarse que bajo ciertos parámetros exhibieran un comportamiento oscilatorio amortiguado.

Se ha sugerido que el circuito p27-CycE y E2F-CycA son controladores determinante del paso a través del punto de restricción en la fase G1, alteraciones oscilaciones de las concentraciones de CycE y p27, guiadas por la actividad de E2F-CycA, son suficientes para generar retrasos temporales en el ciclo posteriores a la entrada al punto de restricción y en conjunto con la vía E2F-Rb, logran describir un interruptor biestable de la transición G1/S.

Análisis de controlabilidad sugieren que tales oscilaciones podrían ser resultado del acople de varios feedback negativos que involucran a estos circuitos (Conradie *et al.*, 2010). Finalmente, el feedback negativo entre Cdk1-CycB y APC-Cdc20 parece ser determinante en la salida de mitosis. Se ha demostrado que este circuito permite respuestas oscilatorias amortiguadas de actividad de CycB suficientes y necesarias para la transición metafase-anafase, se ha sugerido que este mecanismo es un sistema ultra sensitivo de respuesta en la salida de fase M (Yang y Ferrell, 2013), por lo que su incorporación en redes de control es importante para la caracterización dinámica de fase M.

El motivo MCC5 presenta valores de Z-score=2.444 y de p-value=0.0095. Dos subgrafos comparten esa estructura al interior de la red: la red que involucra a Cdc20 que inactiva a CycB y activa a Cdh1, CycB inactiva a Cdh1 y Cdh1 inactiva a Cdc20; el segundo se compone de Rb que inactiva a E2F y CycE, E2F activa a CycE y finalmente CycE inactiva a Rb. El primer subgrafo corresponde al denominado Feedback negativo incoherentemente amplificado (Novák y Tyson, 2008), difiere de los presentados en la tabla 21, en que el feedback positivo tiene tres componentes mientras que el feedback negativo tiene dos componente. Se ha demostrado analíticamente que este motivo es incapaz de generar ningún tipo de oscilación para ningún conjunto de ecuaciones no lineales ni conjunto de parámetros, sin embargo es un sistema interesante con multiestabilidades debido a la presencia de bifurcaciones de tipo *punto silla*, lo que podría ser importante en el establecimiento de concentraciones altas, medias y bajas de CycB en fase M (Kapuy *et al.*, 2009)

El segundo subgrafo corresponde a un Feedback positivo de dos nodos insertado en un feedback negativo de tres nodos, que exhibe comportamientos oscilatorios sostenidos al describir ciclos limites bajo un rango mucho más amplio de parámetros (Li *et al.*, 2012). Se sabe que si la interacción negativa de CycE a Rb es débil, el feedback negativo de tres nodos puede oscilar sin ningún problema, por lo que en particular este sistema, así, la adición del bucle de retroalimentación negativa CycE-Rb amortigua la propensión del bucle de retroalimentación negativa de tres componentes a oscilar demasiado, esto es interesante considerando que la regulación de Rb por CycE es importante en la transición G1/S que ha sido sugerida como un switch biestable, por lo que este sistema de amortiguador-oscilador podría ser importante en la conformación de este switch (Gérard y Goldbeter, 2012)

El motivo MCC9 presenta valor de z-score=2.316 y de p-value=0.0092. En la red, tres

subgrafos comparten su estructura: un subgrafo compuesto por Rb que inactiva a CycE y este a su vez inactiva a Rb, por otro lado CycE inactiva a p27 y este último activa a CycE; el segundo subgrafo se compone de E2F que activa a CycA y este a su vez inactiva a E2F, por otro lado CycA activa a UbcH10 y este último inactiva a CycA; el tercer motivo se compone de Cdc20 que activa a Cdh1 y este a su vez inactiva a Cdc20, por otro lado Cdh1 inactiva a CycB y CycB inactiva a Cdh1. Estos motivos corresponden a la estructura de un Feedback negativo amplificado (ver Tabla 21) que es capaz de generar oscilaciones sostenidas cuando el acople sucede entre un feedback positivo (PF) y uno negativo (NF).

El primer y tercer subgrafo, cuyos componentes ya han sido comentados anteriormente, se observa la presencia de un feedback positivo acoplado con un feedback negativo. Este tipo de motivos puede tener tanto propiedades de PF como de NF, pero en general funcionan como circuitos de supresión de ruido. Las oscilaciones sostenidas se observan si la interacción del feedback negativo es superior, aunque la amplitud y frecuencia de estas es más pequeña que en el caso de un feedback negativo, en caso contrario pueden generar oscilaciones amortiguadas o amplificando señales de entrada por periodos cortos de tiempo, lo cual sería interesante en la regulación de la transición G1/S puesto que el punto de restricción al final de fase G1 es un ejemplo claro de un supresor de ruidos y amplificador de señales por mitógenos (Pomerening, 2009).

En el caso del tercer subgrafo, se ha sugerido que tal y como sucede en la regulación de la fase M de *Xenopus*, un doble feedback negativo acoplado entre Cdk1-CycB, APC-Cdh1 y APC-Cdc20 podría ser el mecanismo mediante el cual se mantienen altas tasas de degradación de CycB durante la salida de mitosis y cuya actividad se mantiene hasta inicios de fase G1, punto interesante en aquellos tipos celulares con un alta tasa de división (Zhang y Nývák, 2013)

El segundo subgrafo se compone de un doble feedback negativo acoplado. Este tipo de circuitos aplican las respuestas de señales en el tiempo. En muchos tipos de osciladores circadianos la presencia de estos motivos hace suponer que promueven las oscilaciones sostenidas cuya característica es la presencia de oscilaciones con amplitudes grandes al inicio que poco a poco son amortiguadas hasta generar oscilaciones sostenidas de mucha menor amplitud (Kim, 2008). Dado el papel de los nodos involucrados en este motivo (CycA, UbcH10 y E2F), estos comportamientos podrían ser importantes en la regulación de los

eventos de G2. Se sabe que el comportamiento de CycA es similar al de un oscilación amortiguada en la que se observa un único máximo de actividad entre fases S y G2, la supresión de ruido mediante dobles feedbacks acoplados podría ser un mecanismo para generar esto puesto que la activación de CycA depende en gran medida de ondas de activación dirigidas por E2F, lo que se ha sugerido para comportamiento en el circuito equivalente de levadura (Oikonomou y Cross, 2010)

Finalmente, el motivo MCC14 presenta valores de $z\text{-score}=2.047$ y $p\text{-value}=0.00138$, por lo que es un motivo que puede ser considerado significativo. Un único subgrafo comparte esta estructura, este se compone de los nodos Cdc20, Cdh1 y CycB: Cdc20 inactiva a CycB y activa a Cdh1, CycB inactiva a Cdh1 y activa a Cdc20, finalmente Cdh1 inactiva tanto a Cdc20 como a CycB. Este motivo, de tres componentes y 6 aristas, no parece haber sido estudiado dinámicamente, de hecho sus topologías son tan densamente conectadas que es difícil proponerlos como motivos regulatorios y aún más como motivos oscilatorios, por lo que parece difícil asignarle algún tipo de comportamiento dinámico, sin embargo los trabajos pioneros de Rössler en los que se analizan subredes densamente conectadas muestran que su comportamiento dinámico muestra un importante componente caótico, por lo que es difícil pensar en oscilaciones en su interior (Rössler, 1977). Sin embargo puesto que no tenemos información suficiente para apoyar o desechar esta posibilidad al interior de un motivo de tres componentes y seis aristas, no podemos asegurar que este motivo sea importante en la dinámica del control del ciclo celular (Nóvak, 2008; Tyson y Novák, 2010)

iii. Motivos de la red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*

En la tabla 24 se muestran los resultados de la búsqueda de motivos en la red de regulación del ciclo celular en *Arabidopsis thaliana*. Se encontraron un total de 13 motivos al interior de la red y como en los apartados anteriores, se considerará como significativo un motivo con valores de $Z>2$ y $p<0.01$, por lo que se describirán solo aquellos subgrafos que cumplan estas condiciones, sin embargo en el siguiente capítulo se discutirán los demás motivos.

El motivo ACC5 presenta valores de $z\text{-score}=2.414$ y $p\text{-value}=0.0086$. Dos subgrafos comparten esa topología: el primero se compone de CYCA/CDKB que inactiva a E2Fa y este

a su vez inactiva a E2Fc, por otro lado EFc inactiva tanto a E2Fa como a CYCA/CDKB; el segundo subgrafo involucra a E2Fb que activa a CYCB/CDKA y este activa a los MYB3R, por otro lado MYB3R activa tanto a E2Fb como a CYCB/CDKA. Ambos subgrafos corresponden a la estructura de un Feedback negativo de dos nodos insertado en un feedback negativo de tres nodos como se observa en la tabla 21, por lo que se esperaría que para un conjunto de parámetros amplio se observarían comportamientos de tipo ciclo límite.

El motivo ACC9 presenta valores de $z\text{-score}=2.9$ y $p\text{-value}=0.0029$. Un motivo comparte esta estructura y se compone de MYB3R que activa a E2Fa y RBR, por otro lado E2Fa activa a RBR y este último a su vez inactiva a E2Fa. Por su estructura, correspondería a un Feedback negativo de dos nodos insertado en un feedback positivo de tres nodos. Este motivo se ha sugerido que no general oscilaciones y en realidad presenta multiestabilidad, por lo que actuaría como un posible mecanismo de biestabilidad (Novák, 2008)

El motivo ACC10 presenta valores de $z\text{-score}=2.103$ y $p\text{-value}=0.006$, por lo que puede ser considerado estadísticamente sobrerrepresentado. El motivo que comparte esta estructura involucra a E2Fa que activa a RBR y E2Fc, RBR inactiva a E2Fa y activa a E2Fc y finalmente E2Fc inactiva a E2Fa. La estructura corresponde a un doble feedback negativo sobrelapado (Novák, 2008) Este motivo es capaz de generar oscilaciones cuando la interacción positiva es mucho menos fuerte que las interacciones de los dos feedbacks negativos, hecho que ha sido utilizado para generar osciladores circadianos sintéticos (Rust et al., 2007), en otro caso este circuito exhibe una marcada biestabilidad (Zhang et al., 2009). Esto es interesante puesto que los reguladores involucrados son importantes reguladores de la transición G1/S que se ha sugerido que tiene un comportamiento similar a un switch biestable con un importante componente de histéresis (Zhao et al., 2012), aún es discutible que tanto el acople de un circuito que puede oscilar y también puede ser biestable puede ser un mecanismo importante del control de la transición G1/S en plantas. Desde un punto de vista dinámico, este es un circuito interesante para la generación de biestabilidad y muy marginalmente de oscilaciones amortiguadas.

Finalmente el motivo ACC13 presenta valores de $z\text{-score}= 2.802$ y de $p\text{-value}=0.0088$. El motivo que comparte esta estructura se compone de un doble feedback negativo acoplado que involucra a E2Fa, RBR y E2Fc de la siguiente forma: E2Fa activa a RBR y a E2Fc, mientras que RBR y E2Fc inactiva a E2Fa. Como ya se discutió en el caso de mamíferos, los feedback

negativos acoplados son capaces de generar oscilaciones sostenidas y oscilaciones sostenidas en las que se observa un comportamiento inicial con una mayor amplitud de onda para después amortiguarse y sostener oscilaciones de menor amplitud (Kim, 2008)

En general, hay muy pocos trabajos que aborden los aspectos dinámicos del control del ciclo celular. Sin embargo es interesante hacer notar que los motivos descritos anteriormente involucran mucho a los reguladores de la transición G1/S: Rb y E2F (particularmente los motivos ACC10 y ACC13). Como se apunta, el único modelo disponible que estudia esa transición es el propuesto por Zhao (Ver sección 3.5), sin embargo este se centra en la actividad de los KRP en generar comportamientos biestables sobre la actividad de CDKA. Sin embargo, y como apunta Harashima y colaboradores, es muy interesante notar que en el caso de animales como en levaduras los reguladores de Rb/Whi5 forman con estos circuitos de tipo doble feedback negativo acoplado, por lo que en particular ACC13 podría ser un motivo importante del control de la transición G1/S. Sin embargo en ningún trabajo se ha descrito la relativa importancia de este tipo de circuitos dobles de generar biestabilidad u oscilaciones amortiguadas en función de la intensidad de las interacciones positivas involucradas. (Kim, 2008)

Mucho ya se ha discutido en torno al paradigma estructura-función de redes, particularmente sobre que subgrafos son suficientes para describir los comportamientos biestables u oscilatorios en las transiciones G1/S, G2/M y la salida de mitosis. Un punto importante del análisis presentado en este trabajo tiene que ver con la capacidad de comparar modelos de redes del control del ciclo celular para diferentes organismos. Así, si estos módulos han sido resultado de un proceso de selección durante la evolución, como se ha sugerido (Wagner *et al*, 2007), es posible que algunos patrones generales de organización hayan sido conservados o seleccionados, lo que hace importante el análisis de redes completas, y de forma aún más importante, de motivos al interior de estas (Wold y Arkin, 2003). Se ha sugerido que este enfoque comparativo es importante en el entendimiento de procesos cuyo comportamiento dinámico es de tipo oscilatorio como el ciclo celular o los ciclos circadianos, como apuntan Ingolia y Murray (Ingolia y Murray, 2004), sistemas muy diferentes en términos de sus componentes moleculares muestran arquitecturas en las redes de control subyacentes muy similares en la producción de comportamientos de tipo oscilatorio. Específicamente se ha especulado que al interior de las redes de control del ciclo celular existe una importante cantidad de feedbacks negativos de dos componentes acoplados entre sí, lo que es en parte una de las condiciones de la emergencia

del comportamiento oscilatorio global (Pomerening *et al*, 2005)

Una revisión cuidadosa de los circuitos presentados en la sección 4.4 en los que se simplifican las interacciones a activadores (positivas) e inhibidoras (negativas), como de la revisión del modelo de Irons se presenta en la siguiente tabla:

	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i> (Irons, 2009)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mamíferos
Circuitos negativos	Cdc13*/Slp1	Clb12/Cdc20	CYCB/MYB3R/APC	CycB/Cdc20
Circuitos positivos	Cdc13/Ste9 Cdc13/Rum1	Clb2/Cdh1	—	CycB/Cdh1 Rb/CycE Rb/CycA

De lo anterior puede observarse que dos circuitos parecen ser importantes y se encuentran en la mayoría de las 4 redes analizadas: un circuito negativo que involucra a los homólogos de las ciclinas B de mamíferos y Cdc20, y otro circuito positivos de los homólogos de CycB y Cdh1.

Como se observa, sólo en la red de *Arabidopsis* no hay un circuito directo entre las ciclinas B y el complejo APC, sin embargo basta recordar que la actividad de los MYB es importante en la regulación de la fase G2 en plantas, por lo que el rol relativo de este circuito es debatible. Como se discutió en la sección 4, el feedback negativo es insuficiente para generar oscilaciones sostenidas, sin embargo su modificación a oscilador relajado es capaz de mantener oscilaciones sostenidas para coeficientes grandes de Hill, este último puede entenderse como un parámetro de afinidad entre compuestos, por lo que es una forma de aproximar la cuantificación de complejos en redes bioquímicas (Jin y Sendhoff, 2008). Como se observa en la tabla de circuitos, los circuitos negativos considerados tienen esta estructura, excepto para *Arabidopsis* en donde el circuito implica además de las ciclinas de tipo B y al complejo APC, a lso MYB3R, por lo que su discusión tendrá que ser evaluada con otros datos. Sin embargo, es importante notar que el feedback negativo entre Cdc20/CycB ha sido considerado crucial desde el punto de vista dinámico (Murray y Kirschner, 1989; Novák y Tyson), en el comportamiento de fase G2 y M. De forma aún más destacada es el hecho de que Cdc20 ha sido descrito por Jensen y colaboradores (Jensen *et al*, 2006) uno de los componentes del ciclo cuya periodicidad está conservada entre los eucariontes, por lo que su relación con la expresión periódica de otros componentes aún debe ser considerada.

El rol de circuitos positivos y negativos interconectados tanto en los motivos presentados en la sección 4.4.1 y por los discutidos previamente podrían ser cruciales en la emergencia de oscilaciones sostenidas al interior de las redes de control del ciclo celular eucarionte (Pomerening *et al.*, 2005), por lo que no parece tan exagerado considerarlos como un punto de partida para la construcción de un módulo general de control del ciclo eucarionte (Cross, 2003).

5.4 Conclusiones generales y perspectivas futuras en torno a las redes de control del ciclo celular en eucariontes

El ciclo celular es un proceso complejo y altamente regulado que involucra la coordinación de diferentes moléculas que controlan diferentes pasos en la replicación y división celular. La maquinaria molecular de control en las diferentes fases está ordenada por un conjunto de puntos de control que aseguran el correcto orden de los eventos moleculares junto con integración de las señales intra y extracelulares, por lo que su descripción dinámica es importante para entender el control global del ciclo (Novák y Tyson, 2003; Sible, 2007)

El enfoque de modelación lógico como el presentado aquí, es relativamente fácil de definir y no es necesario un detallado conocimiento cuantitativo de los diferentes componentes moleculares como el necesario para establecer modelos cinéticos basados en ecuaciones diferenciales. Varias herramientas se han desarrollado para estudiar la dinámica de modelos lógicos como los booleanos: BooleanNet (Albert I et al, 2008), SimBoolNet (Zheng et al, 2010) y BoolNet (Mussel et al, 2010), GINsim (Gonzalez et al, 2006) y SQUAD (Di Cara et al, 2007); estas herramientas son útiles en la identificación de los estados estables, el análisis del rol relativo de los diferentes circuitos al interior de estas redes, así como para analizar las redes bajo diferentes perturbaciones o simular diferentes mutantes (Fauré *et al.*, 2009).

Una de las ventajas de los modelos booleanos es su capacidad composicional, es decir, de poder ser integrados diferentes modelos lógicos elaborados por separado a manera de módulos e integrar así redes mucho más detalladas, de esta forma el núcleo central de control del ciclo celular puede ser dividido en módulos específicos que controlen cada transición incluyendo aquellos módulos de respuesta a factores de crecimiento o de regulación de la integridad del DNA. Un ejemplo de este enfoque es el modelo modular lógico del ciclo celular en *S. pombe* propuesto por Fauré y colaboradores (Fauré *et al.*, 2009), en el que se logra acoplar tres modelos previos del control del ciclo en uno sólo: el módulo de control mitótico denominado el núcleo de control, el módulo de control morfogénico de gemación que

dependen de un parámetro de control de masa y el módulo de salida de mitosis, que en conjunto, logran recapitular la mayor parte de los estados observados durante el paso del ciclo así como algunos mutantes.

Sin embargo, aún con estas ventajas, los modelos booleanos son insuficientes para explicar muchos aspectos dinámicos y estructurales de las redes de control del ciclo celular que otros enfoques podrían describir de una forma más precisa, particularmente sobre los tiempos de activación de los reguladores, retrasos temporales en su expresión o ligeras variaciones en su concentración, por ejemplo, como se muestra en el modelo modular propuesto para *S. pombe* (Fauré *et al.*, 2009) este enfoque es insuficiente para lograr recuperar la regulación de las separasas y securinas durante mitosis. Una aproximación modular utilizando el enfoque continuo basados en ODEs ha permitido paliar algunos de estos inconvenientes en el caso de puntos particulares del ciclo, como se ha observado en el caso del punto de control de fase G1 en mamíferos (Qu *et al.*, 2003; Swat *et al.*, 2004; Barberis *et al.*, 2007; Pfeuty *et al.*, 2008)

Como se ha discutido, los modelos aquí propuestos como aquellos publicados en la literatura basados en el formalismo booleano son relativamente simples, enfocándose primordialmente en el núcleo de regulación del ciclo celular de cada organismo, por lo que varios componentes e interacciones no han sido consideradas y podrían ser importantes en muchas de las fases del ciclo. Por ejemplo, en el modelo propuesto por Fauré (Fauré *et al.*, 2006) basado de forma importante en los datos de Novak y Tyson (Novák y Tyson, 2004), se omitió la evidencia que sugiere la posibilidad de que p27 también secuestra a los complejos CycB-Ciclina, lo que podría ser importante en la regulación de la transición G2/M y la salida de mitosis (Aleem *et al.*, 2005).

La complejidad de los mecanismos de regulación del ciclo en eucariontes multicelulares debida a la redundancia funcional de familias de componentes es un reto importante en el entendimiento de los mecanismos básicos del control. Numerosas bases de datos (Joshi-Tope *et al.*, 2005; Alfieri *et al.*, 2007) muestran que muchos otros reguladores podrían ser de importancia en la regulación del ciclo celular en fases particulares, sobre todo en los puntos de control de la transición G1/S y G2/M

Dado que los modelos lógicos no pueden generar predicciones cuantitativas, es importante generar puentes entre los formalismos lógicos como los booleanos y los cuantitativos basados en ecuaciones diferenciales y sus variantes. Ya se han dado algunas interesantes aproximaciones, por ejemplo el modelo propuesto por Singhania y colaboradores (Singhania *et al.*, 2011), logra acoplar un modelo discreto con otro continuo para describir la regulación del ciclo celular genérico en mamíferos, particularmente, este modelo recupera la dinámica de expresión de las ciclinas A, B y E, y corrobora las

observaciones previas obtenidas mediante citometría de flujo sobre la expresión de estas ciclinas, permitiendo hacer inferencias sobre la importancia de la temporalidad de expresión de estas durante las transiciones de ciclo, específicamente en células que presentan retrasos temporales en algunas fases. Por otro lado, ya se ha apuntado que en general una estrategia a seguir es la elaboración de ambos tipos de modelos (discretos booleanos y continuos basados en ODEs) por separado y la posterior integración de los resultados obtenidos por los dos métodos (Le Novère, 2015)

Una aproximación complementaria e interesante al trabajo presente es el uso de herramientas computacionales que permiten la traducción de modelos booleanos a modelos basados en ODEs, entre ellos SQUAD (Di Cara et al, 2007) y Odefy (Krumisiek *et al.*, 2010). Una ventaja de estos métodos es que son sistemas automatizados que aproximan el sistema booleano inicial a uno basado en EDOs con un muy reducido número de parámetros mediante interpolaciones polinomiales descritas bajo una cinética sigmoideal de tipo Hill, la cual que parece ser una buena aproximación a sistema del tipo saturación (Wittmann *et al.*, 2009). La comparación de los modelos aquí propuestos con aproximaciones continuas permitiría explorar el papel de ciertos parámetros como las tasas de reacción en la dinámica del sistema así como representar fielmente procesos de activación e inactivación de reguladores cuya respuesta temporal es difícil de capturar con enfoques puramente lógicos. Esta aproximación ya ha sido aplicada en el estudio de la red que subyace la diferenciación de los órganos florales en *Arabidopsis thaliana*, donde fue posible recuperar mediante una modelación booleana y una posterior transformación a un modelo continuo mediante SQUAD, el mismo tipo atractores con tamaños de cuenca similares (Sánchez-Corrales *et al.*, 2010). Esta aproximación podría permitirnos explorar el comportamiento de las redes de ciclo aquí propuestas y observar el comportamiento de componentes con respuestas temporales rápidas o más lentas y explorar el tipo y tamaño de los atractores obtenidos y la robustez de estos.

Otro tipo de aproximaciones proponen transformar las funciones lógicas AND, OR y NOT con una serie de operadores de la forma:

$$\begin{aligned}
 X_i(t) \wedge X_j(t) &\rightarrow X_i(t) * X_j(t) \\
 X_i(t) \vee X_j(t) &\rightarrow X_i(t) + X_j(t) - [(t) * X_j(t)] \\
 \neg X_i(t) &\rightarrow 1 - X_i(t)
 \end{aligned}$$

Con estas transformaciones se propone una ecuación diferencial compuesta por una función logística en la que se incluyen estas reglas de asignación y a la que se acopla una tasa decaimiento para cada gen. Esta metodología ha sido útil para explorar el papel de circuitos genéticos pequeños como el feedforward loop (Mangan y Alon, 2003) o de propuestas de feedbacks negativos amplificados en el caso

de redes genéticas que describen el carcinoma en cultivos celulares de (Lu *et al.*, 2013). Pero de mayor interés es su reciente uso para explorar el efecto que las tasas de decaimiento de cada gen tiene sobre la transición entre diferentes atractores en la red de regulación que subyace la determinación de los tipos celulares de la flor, es decir, que tan fácil es dado un valor de la tasa, poder moverse de un atractor a otro sin modificar las reglas lógicas o perturbaciones sobre la red a manera de parámetro de orden de control de la integridad de los atractores entendidos estos como los diferentes tipos celulares en la inflorescencia de *Arabidopsis* (Dávila-Velderrain *et al.*, 2015). Una interesante aproximación que podría ser utilizada en el caso de las redes de control del ciclo para explorar por un lado la transición entre estados de quiescencia a estados proliferativos, esto es, de atractor de punto fijo a ciclo límite, así como tratar de explorar que tan controlable es el sistema y que parámetros y circuitos al interior de la red pueden ser utilizados como controladores.

Esta idea de control de ciclo celular parte de una importante herencia en el estudio de los sistemas de control no lineales (Nijmeijer y Van der Schaft, 2013) y ha cobrado interés en el estudio de redes booleanas, particularmente, los conceptos de observabilidad y controlabilidad heredados de la teoría de control (Cheng y Qi, 2009). En ese sentido, se dice que un sistema con n variables de estado y p entradas, es controlable si para cualquier estado inicial X_0 y cualquier estado final X_f , existe una entrada al sistema que transfiere el comportamiento de X_0 a X_f en un tiempo finito; es decir, un sistema es controlable si es posible ir entre estados del sistema mediante un estímulo externo o entrada al sistema. Esto involucra describir una matriz de coeficientes, la matriz de controlabilidad, que relaciona las entradas y salidas del sistema, y se caracteriza por tener un rango máximo.

En esa dirección, mucho se ha discutido sobre la descripción de principios de control generales al interior de las redes regulatorias del ciclo celular, particularmente en levaduras y mamíferos. Por ejemplo, inspirados en el concepto de controlabilidad, se han tratado de describir parámetros de control al interior de las redes de regulación del ciclo (Ledzewicz y Schättler, 2002) con la finalidad de establecer rutas generales mediante las cuales el ciclo establece mecanismos de transición entre diferentes estados y como estos retroalimentan a los ciclos subsecuentes en el caso de alteraciones en su funcionamiento, específicamente en cáncer (Swierniak, 1996)

El estudio de la controlabilidad en redes booleanas ha llevado a formalizar conceptos importantes sobre el control en sistemas discretos, particularmente, se ha propuesto ya una metodología basada en el denominado producto semitensorial (Cheng *et al.*, 2004; Cheng y Qi, 2009; Cheng *et al.*, 2010), para describir la matriz de control en redes booleanas determinísticas y obtener la controlabilidad del sistema,

permitiendo explorar la posibilidad de transitar entre atractores modificando el comportamiento de las entradas sobre el sistema. Esta aproximación es interesante junto con la metodología anterior basada en tasas de decaimiento porque permitiría explorar el papel de sistemas de control inherentes a la dinámica del ciclo celular y que dependen por un lado de los estímulos externos como de las propiedades particulares de la estructura de la red.

Propongo, como una posible extensión del trabajo previo, comenzar a analizar las redes propuestas aquí bajo ambos enfoques y determinar las propiedades de control a las que puede ser sometidas cada red del ciclo celular a la luz de la transición del estado quiescente al estado proliferativo entendidos por transiciones entre los atractores de las redes. Utilizando el enfoque de la matriz de controlabilidad mediante el producto semitensorial es posible traducir el sistema de reglas lógicas a un sistema algebraico con el cual poder establecer dos puntos importantes del ciclo que no se han considerado y que desde el modelo de Li (Li *et al*, 2004) ha sido de vital importancia: cómo se integran la señales extracelulares en la redes de ciclo celular y cómo estas integran respuestas específicas de control entre transiciones de quiescencia a proliferación así como en la respuesta temporal de paso a las diferentes transiciones (Swierniak *et al*, 2003)

Referencias bibliográficas

- Albert R, Othmer HG. (2003). The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the *Drosophila* segment polarity genes. *J Theor Biol* 223: 1-18.
- Albert R. (2005). Overview of systems biology. *Plant Systems Biology*. G Coruzzi, Oxford: Blackwell Scientific, en prensa.
- Albert R., (2004). Boolean modeling of genetic regulatory networks. *Complex networks*. Editors: Ben-Naim E, Frauenfelder H, Toroczkai Z. Springer Verlag
- Albert, I., Thakar, J., Li, S., Zhang, R., Albert, R., (2008). Boolean network simulations for life scientists. *Source Code Biol. Med.* 3, 16.
- Albert, R. (2005). Scale-free networks in cell biology. *Journal of cell science*, 118(21), 4947-4957.
- Albert, R. (2007). Network inference, analysis, and modeling in systems biology. *The Plant Cell Online*, 19(11), 3327-3338.
- Albert, R. and Barabási, A. (2002). Statistical mechanics of complex networks. *Rev. Modern Phys.* 74, 47-97.
- Alboran IM, O'Hagan RC, Gartner F, Malynn B, Davidson L, Rickert R., Rajewsky K, Depinho RA, Alt FW. (2001). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*. 14, 45.
- Alfieri, R., Merelli, I., Mosca, E., & Milanesi, L. (2007). A data integration approach for cell cycle analysis oriented to model simulation in systems biology. *BMC systems biology*, 1(1), 35.
- Aligue, R., Wu, L., & Russell, P. (1997). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Wee1 tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13320-13325.
- Alon U, Surette MG, Barkai N, Leibler S (1999) Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature* 397: 168-171.
- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics*, 8(6), 450-61.
- Althoefer, H., Schleiffer, A., Wassmann, K., Nordheim, A., & Ammerer, G. (1995). Mcm1 is required to coordinate G2-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular biology*, 15(11), 5917-5928.
- Álvarez-Buylla, E. R., Chaos, Á., Aldana, M., Benítez, M., Cortes-Poza, Y., Espinosa-Soto, C., & Padilla-Longoria, P. (2008). Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLoS One*, 3(11), e3626.
- Amati, B., Alevizopoulos, K., & Vlach, J. (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, 3, d250-d268.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R. y Machida, Y. (2005). Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J. Biol. Chem.* 279, 32979-32988.
- Attner, M. A., & Amon, A. (2012). Control of the mitotic exit network during meiosis. *Molecular biology of the cell*, 23(16), 3122-3132.
- Ayte, J., Schweitzer, C., Zarzov, P., Nurse, P., and DeCaprio, J. A. (2001). Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat. Cell Biol.* 3, 1043-1050.
- Bahler J. (2005) Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* 39:69-94.
- Bansal, M., Belcastro, V., Ambesi-Impiombato, A., & Di Bernardo, D. (2007). How to infer gene networks from expression profiles. *Molecular systems biology*, 3(1).
- Barabási, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*, 5(2), 101-113.
- Bardin, A. J., and Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), 815-826.

- Barik, D., Baumann, W. T., Paul, M. R., Novak, B., & Tyson, J. J. (2010). A model of yeast cell-cycle regulation based on multisite phosphorylation. *Molecular systems biology*, 6(1).
- Benítez, M., Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., & Alvarez-Buylla, E. R. (2008). Interlinked nonlinear subnetworks underlie the formation of robust cellular patterns in Arabidopsis epidermis: a dynamic spatial model. *BMC systems biology*, 2(1), 98.
- Blanco, M. A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J. M., and Moreno, S. (2000). APC (ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G (1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J.* 19, 3945–3955.
- Blanco, M. A., Sanchez-Diaz, A., Prada, J. M. (2000). APC^{ste9/srw1} promotes degradation of mitotic cyclins in G1 and is inhibited by Cdc2 phosphorylation, *EMBO J.*, 19(15): 3945–3955.
- Bloom J y Pagano M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignat transformation. *Seminars in Cancer Biology* 13: 41-47.
- Bolouri, H. (2008). *Computational Modeling of Gene Regulatory Networks: A Primer*, Imperial College Press, 2008.
- Bonneau, R., Reiss, D. J., Shannon, P., Facciotti, M., Hood, L., Baliga, N. S., & Thorsson, V. (2006). The Inferelator: an algorithm for learning parsimonious regulatory networks from systems-biology data sets de novo. *Genome Biol*, 7(5), R36.
- Bornholdt S. (2005). Systems biology. Less is more in modeling large genetic networks", *Science*, vol. 310, pp. 449-451.
- Bornholdt, S. (2005). Less Is More in Modeling Large Genetic Networks. *Science*, 310(5747), 449-450.
- Borowski, B. 2013 Truth Table Generator Version 3.0, publicado por el autor.
- Breeden, L. (1996) Start-specific transcription in yeast. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 208, 95–127.
- Breitling, Rainer. (2010). What is systems biology? *Frontiers in Physiology* 1
- Bruggeman, F. J., & Westerhoff, H. V. (2007). The nature of systems biology. *TRENDS in Microbiology*, 15(1), 45-50.
- Bruggeman, F. J., Hornberg, J. J., Boogerd, F. C., & Westerhoff, H. V. (2007). Introduction to systems biology. In *Plant Systems Biology* (pp. 1-19). Birkhäuser Basel.
- Bruggeman, F. J., Westerhoff, H. V., and Boogerd, F. C. (2002). BioComplexity: a pluralist research strategy is necessary for a mechanistic explanation of the “live” state. *Philos. Psychol.* 15, 411–440.
- Callebaut, W. G., & Rasskin-Gutman, D. (Eds.). (2005). *Modularity: understanding the development and evolution of natural complex systems*. The MIT Press.
- Carneiro, C., and Koff, A. (2004). Cell Cycle Inhibitory Proteins. *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer*, 237.
- Carrier TA and Keasling JD (1999) Investigating autocatalytic gene expression systems through mechanistic modeling. *J Theor Biol* 201: 25-36.
- Chaos, Á. (2008). *Atalia* version 1. Publicado por el autor, México.
- Chaos, A., Aldana, M., Espinosa-Soto, C., de León, B. G. P., Arroyo, A. G., & Alvarez-Buylla, E. R. (2006). From genes to flower patterns and evolution: dynamic models of gene regulatory networks. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(4), 278-289.
- Chen, H. Z., Tsai, S. Y., y Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 785-797.
- Chen, K.C., Csikasz-Nagy, A., Gyorfyy, B., Val, J., Novak, B. and Tyson, J.J. (2000). Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Mol. Biol. Cell* 11:369-391.
- Conlon, I., y Raff, M. (2003). Differences in the way a mammalian cell and yeast cells coordinate cell growth and cell-cycle progression. *Journal of biology*, 2(1), 7.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.*, 13, 65–70.

- Cross, F. R., Buchler, N. E., & Skotheim, J. M. (2011). Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3532-3544.
- Csikász-Nagy, A. (2009). Computational systems biology of the cell cycle. *Briefings in bioinformatics*, 10(4), 424-434.
- Csikász-Nagy A., Battogtokh D., Chen K.C., Novak B. y Tyson J.J. (2006). Analysis of a generic model of eukaryotic cell-cycle regulation, *Biophysical Journal*: 90(12), 4361-44379.
- D, Kaplan and L, Glass. 1995. *Understanding Nonlinear Dynamics*. Springer
- Daga, R. R. y Jimenez, J. (1999) Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J. Cell Sci.* 112, 3137–3146.
- Davidich, M., & Bornholdt, S. (2008b). The transition from differential equations to Boolean networks: a case study in simplifying a regulatory network model. *Journal of theoretical biology*, 255(3), 269-277.
- Davidich, M., Bornholdt, S. (2008a). Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. *PLoS ONE* 3, e1672
- De Souza, C.P. y Osmani S.A.. (2007) Mitosis, not just open or closed. *Eukaryotic Cell*. 6:1521-1527.
- De Veylder, L., Beeckman, T., & Inzé, D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 655-665.
- DeGregori, J., y Johnson, D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6, 739-748.
- Di Cara A, Garg A, De Micheli G, Xenarios I and Mendoza L. (2007). Dynamic simulation of regulatory networks using SQUAD. *BMC Bioinform.*, 8 462.
- Dong, P., Maddali, M. V., Srimani, J. K., Thélot, F., Nevins, J. R., Mathey-Prevot, B., & You, L. (2014). Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. *Nature communications*, 5.
- Ellner, S. P., & Guckenheimer, J. (2011). *Dynamic models in biology*. Princeton University Press.
- Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla ER (2004). A gene regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* 16: 2923-2939.
- Fall, C.P., Marland, E.S., Wagner, J. M. y Tyson, J.J. (2002). *Computational Cell Biology*. (New York, Springer-Verlag).
- Fauré A. y Thieffry D. (2009) Logical modelling of cell cycle control in eukaryotes: a comparative study. *Mol Biosyst*, 5:1569-1581.
- Fauré, A., Naldi, A., Lopez, F., Chaouiya, C., Ciliberto, A., Thieffry, D., (2009). Modular logical modelling of the budding yeast cell cycle. *Mol. BioSyst.*, 5:1787–1796.
- Fauré, A., Naldi, A., Chaouiya, C., Thieffry, D., 2006. Dynamical analysis of a generic boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics* 22, 124–131.
- Ferrell J. E., Tsai T. Y.-C. y Yang, Q. (2011). Modeling the cell cycle: why do certain circuits oscillate? *Cell*, 144(6), 874–85.
- Fisher DL, Nurse P. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J.* 1996 Feb 15;15(4):850–860.
- Forsburg, S. L., Nurse, P. (1994) Analysis of the Schizosaccharomyces pombe cyclin pucl: Evidence for a role in cell cycle exit, *J. Cell Sci.*, 107:601–613.
- Fuß H., Dubitzky W., Stephen C. D., y Jo K. M. (2005). Mathematical models of cell cycle regulation. *Brief Bioinform.* 6(2): 163-177.
- Garg A, Di Cara A, Xenarios I, Mendoza L, De Micheli G. (2008). Synchronous versus asynchronous modelling of gene regulatory networks. *Bioinformatics* 1; 24 (17): 1917-1925.

- Gérard, C., & Goldbeter, A. (2009). Temporal self-organization of the cyclin/Cdk network driving the mammalian cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21643-21648.
- Gérard, C., & Goldbeter, A. (2010). A skeleton model for the network of cyclin-dependent kinases driving the mammalian cell cycle. *Interface Focus*.
- Gérard, C., & Goldbeter, A. (2012). The cell cycle is a limit cycle. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 7(06), 126-166.
- Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227.
- Glass L, Kauffman S.A. (1973). The logical analysis of continuous, nonlinear biochemical control networks. *J Theor Biol* 39: 103-129.
- Goles, E., Salinas, L., 2008. Comparison between parallel and serial dynamics of Boolean networks. *Theoretical Computer Science* 396 (1–3), 247 –253.
- Gonzalez A G, Naldi A, Sanchez L, Thieffry D and Chaouiya C. (2006). GINsim: a software suite for the qualitative modelling, simulation and analysis of regulatory networks. *Biosystems* 84, 91–100.
- Gopinathan, L., Ratnacaram, C. K. and Kaldis, P. (2011). Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. *Results Probl. Cell Differ.* 53, 365-389.
- Gould, K. L. and Nurse, P. (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342, 39–45.
- Guimera, R., & Amaral, L. A. N. (2005). Functional cartography of complex metabolic networks. *Nature*, 433(7028), 895-900.
- Gutierrez, C. (2009). The Arabidopsis cell division cycle. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 7.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology*.
- Harper, J.W., Burton, J.L., Solomon, M.J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis anymore. *Genes Dev.*, 16, 2179–2206.
- Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402, C47-C52.
- Helin, K. (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8, 28–35.
- Huang, J. N., Park, I., Ellingson, E., Littlepage, L. E., and Pellman, D. (2001). Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. *J. Cell Biol.* 154, 85–94.
- Huang, S., & Ingber, D. E. (2000). Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Experimental cell research*, 261(1), 91-103.
- Humphrey, T. y Pearce, A. (2005). Cell cycle molecules and mechanisms of the budding and fission yeasts. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 296(4), 3–29.
- Hunding A, Kauffman SA, Goodwin BC. (1990). Drosophila segmentation: Supercomputer simulation of prepattern hierarchy. *J Theor Biol* 145: 369 384.
- Irons, D.J. (2009). Logical analysis of the budding yeast cell cycle. *J. Theor. Biol.* 257 (4), 543–559.
- Ivanov, I., & Dougherty, E. R. (2006). Modeling genetic regulatory networks: continuous or discrete?. *Journal of Biological Systems*, 14(02), 219-229.
- Jaime, C. B., Gulli, M. P., Nurse, P. (1997). P25^{rum1} promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56^{cdc13} during G1 of the fission yeast cell cycle, *EMBO J.*, 1997, 16(15): 4657–4664.
- Jensen L. J., Jensen T. S., de Lichtenberg U., Brunak S., y Bork P. (2006). Co-evolution of transcriptional and post-translational cell-cycle regulation. *Nature*, 443(7111), 594-597.

- Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N., & Barabási, A. L. (2000). The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*, 407(6804), 651-654.
- Jong H (2002) Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *Journal of Computational Biology* 9(1): 67-103.
- Johnsonbaugh, R. (1999). *Matemáticas Discretas*. Prentice Hall. México
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breikreutz, B. J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395–400
- Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., ... & Stein, L. (2005). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic acids research*, 33(suppl 1), D428-D432.
- Junker, B. H. and Schreiber, F. (2008). *Analysis of Biological Networks (Wiley Series in Bioinformatics)*. Wiley-Interscience
- Just, W. (2006). The steady state system problem is NP-hard even for monotone quadratic Boolean dynamical systems. submitted to *Annals of Combinatorics*.
- K. C. Chen, A. Csikasz-Nagy, B. Györfy, F. R. Cross, B. Novak, J. J. Tyson. (2004). Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, pp. 3841–3862.
- K. C. Chen, A. Csikasz-Nagy, B. Györfy, J. Val, B. Novak, J. J. Tyson. (2000). Kinetic analysis of a molecular model of budding yeast cell cycle. *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, pp. 369–391.
- Kaldis, P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 284–296.
- Kamieniecki, R. J., Liu, L., & Dawson, D. S. (2005). FEAR but not MEN genes are required for exit from meiosis I. *Cell Cycle*, 4(8), 4093-4098.
- Karlebach, G., & Shamir, R. (2008). Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), 770-780.
- Karlebach, G., & Shamir, R. (2008). Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), 770-780.
- Kashtan, N., & Alon, U. (2005). Spontaneous evolution of modularity and network motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13773-13778.
- Kauffman S.A. (1993) *The Origins of Order: Self Organization and Selection in Evolution*. Oxford University Press, New York, New York.
- Kauffman, S., Peterson, C., Samuelsson, B., & Troein, C. (2004). Genetic networks with canalizing Boolean rules are always stable. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17102-17107.
- Kauffman S. A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theor Biol* 22: 437-467.
- Khanin, R., & Wit, E. (2006). How scale-free are biological networks. *Journal of computational biology*, 13(3), 810-818.
- Kim SH, Lin DP, Matsumoto S, Kitazono A, Matsumoto T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* ;279:1045–1047.
- Kitamura K, Maekawa H, Shimoda C. (1998). Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Mol Biol Cell* 9:1065–1080.
- Kitano, H. (2002). Systems biology: a brief overview. *Science*, 295(5560), 1662-1664.
- Koh B.T., Tan R.B.H. and Yap M.G.S. (1998) Genetically structured mathematical modeling of trp attenuator mechanism. *Bioprocessing* 58: 502-509.
- Kondo, S., & Miura, T. (2010). Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science*, 329(5999), 1616-1620.

- Krauss, G. Regulation of the Cell Cycle. En: Krauss, Gerhard (2003). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-Vch Verlag: 429-468.
- Lavia, P., y Jansen-Dürr, P. (1999). E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays*, 21(3), 221-230.
- Lew, D. J., Weinert, T., and Pringle, J. R. (1997) Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*, in *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Pringle, J. R., Roach, J. R., and Jones, E. W., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 607–695.
- Lew, D. J., Weinert, T., and Pringle, J. R. (1997). Cell Cycle Control in *S. cerevisiae*. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology.*, J. Pringle, J. Broach, and E. W. Jones, eds. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory): 607-695.
- Li F, Long T, Lu Y, Quyang Q, Tang C (2004) The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 4781-4786.
- Li S, Assmann SM, Albert R (2006) Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLOS Biol.* e312(10): 1732-1748.
- Li, B., Shao, B., Yu, C., Ouyang, Q., y Wang, H. (2010). A mathematical model for cell size control in fission yeast. *J. Theor. Biol.* 264, 771–781.
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
- Lima-Mendez, G., & van Helden, J. (2009). The powerful law of the power law and other myths in network biology. *Molecular BioSystems*, 5(12), 1482-1493.
- Longabaugh, W., & Bolouri, H. (2006). Understanding the dynamic behavior of genetic regulatory networks by functional decomposition. *Current genomics*, 7(6), 333.
- Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D.(1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* ; 64:1111–1122.
- Lüttge, U. (2012). Modularity and emergence: biology’s challenge in understanding life. *Plant Biology*, 14(6), 865-871.
- Malumbres, M. y Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., y Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature cell biology*, 11(11), 1275-1276.
- Malumbres, M., y Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153-166.
- Mangla, K., Dill, D.L., and Horowitz, M.A. (2010). Timing robustness in the budding and fission yeast cell cycles. *PLoS ONE* 5
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M. A., de Prada, J. M. (2000). The Puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size, *Mol. Biol. Cell*, 11: 543–554.
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M. A., de Prada, J. M., and Moreno, S. (2000). The puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol.Biol. Cell* 11, 543–554.
- Matsuoka, K., Kiyokawa, N., Taguchi, T. et al, Rum1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues, *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269: 3511–3521.
- Mendoza L, Alvarez-Buylla ER. (1998). Dynamics of the genetic regulatory network of *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. *H Theor Biol* 193: 307-319
- Mendoza L, Thieffry D, Alvarez-Buylla ER (1999). Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics* 15: 593-606.

- Mendoza, L., & Pardo, F. (2010). A robust model to describe the differentiation of T-helper cells. *Theory in Biosciences*, 129(4), 283-293.
- Mendoza, L., Thieffry, D., & Alvarez-Buylla, E. R. (1999). Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics*, 15(7), 593-606.
- Mendoza, L., Thieffry, D., & Alvarez-Buylla, E. R. (1999). Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics*, 15(7), 593-606.
- Millar JB, Russell P.(1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* ;68:407–410.
- Mondesert, O., McGowan, C. H., Russell, P. (1996). Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Cell Biol.*, 16: 1527–1533.
- Monod, J. and Jacob, F. (1961). General conclusions: Telenomic mechanisms in celular metabolism, growth and diferrentiation Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 389-401.
- Morgan D.O. (2007) The cell cycle: Principles of control. New Science Press Ltd. 4-9.
- Moser, B. A. y Russell, P. (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 631–636.
- Moser, B. A., Russell, P. (2000). Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Curr. Opin. Microbiol.*, 3: 631–636.
- Müller D., C. Bouchard, B. Rudolph, P. Steiner, I. Stuckmann, R. Saffrich, W. Ansorge, W. Huttner & M. Eilers. (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene* 15, 2561-2576.
- Müssel C, Hopfensitz M, Kestler HA., 2010. BoolNet--an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*, 26(10):1378-1380
- Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Chen K, Tyson JJ. (1998). Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophys Chem* 72(1–2):185–200.
- Novak B, Kapuy O, Domingo-Sananes MR, Tyson JJ. (2010). Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle decisions. *Curr Opin Cell Biol* 22(6):801–808.
- Novak B, Pataki Z, Ciliberto A, Tyson JJ. (2001). Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos* 11(1): 277–286
- Novak B, Toth A, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Tyson JJ, Nasmyth K. (1999) Finishing the cell cycle. *J Theor Biol* 199(2):223–233.
- Novak B, Tyson JJ (1993) Modeling the cell-division cycle—Mphase trigger, oscillations, and size control. *J Theor Biol* 165(1): 101–134
- Novak B, Tyson JJ (1995) Quantitative-analysis of a molecular-model of mitotic control in fission yeast. *J Theor Biol* 173(3):283–305
- Novak B, Tyson JJ (1997) Modeling the control of DNA replication in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(17):9147–9152
- Novak B, Tyson JJ (2008) Design principles of biochemical oscillators. *Natl Rev Mol Cell Biol* 9(12):981–991.
- Novak B, Tyson JJ. (1993). Numerical analysis of a comprehensive model of M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts and intact embryos. *J Cell Sci*; 106(Pt 4):1153–68.
- Novak, B., & Tyson, J. J. (2004). A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *Journal of theoretical biology*, 230(4), 563-579.
- Novak, B., Tyson, J. J., Gyorffy, B., & Csikasz-Nagy, A. (2007). Irreversible cell-cycle transitions are due to systems-level feedback. *Nature cell biology*, 9 (7), 724-728.
- Novák, Béla, Sible, Jill C, and Tyson, John J. (2003) Checkpoints in the Cell Cycle. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Novak,B., Tyson,J.J. (2004). A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J. Theor. Biol.*, 230, 563–579.
- Nurse P (2003). Understanding cells. *Nature* 424 (6951):883.

- Nurse, P. (2012). Finding CDK: Linking yeast with humans. *Nature Cell Biology*, 14(8), 776-776.
- Oliva A, Rosebrock A, Ferrezuelo F, Pyne S, Chen HY, Skiena S, Futcher B, Leatherwood J (2005) The cell cycle-regulated genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Plos Biol* 3(7):1239–1260.
- Oliva, A., Rosebrock, A., Ferrezuelo, F., Pyne, S., Chen, H., Skiena, S., ... & Leatherwood, J. (2005). The cell cycle-regulated genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS biology*, 3(7), 1239.
- Orlando, D.A., Lin, C.Y., Bernard, A., Wang, J.Y., Socolar, J.E., Iversen, E.S., Hartemink, A.J., and Haase, S.B. (2008). Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature* 453, 944–947.
- Ortiz-Gutiérrez E, García-Cruz K, Azpeitia E, Castillo A, Sánchez MdIP, Álvarez-Buylla ER (2015) A Dynamic Gene Regulatory Network Model That Recovers the Cyclic Behavior of *Arabidopsis thaliana* Cell Cycle. *PLoS Comput Biol* 11(9): e1004486. doi:10.1371/journal.pcbi.1004486
- Perez-Roger I, D. L. C. Solomon, A. Sewing & H. Land. (1997). Myc activation of cyclin E/CDK2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27Kip1 binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14, 2373-2381.
- Peter, M. and Herskowitz, I. (1994) Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265, 1228–1231.
- Pinheiro D., y Sunkel C. (2012). Mechanism of cell cycle control. *Canal Bq*. 9:4-17.
- Powell, A., and Dupre, J. (2009). From molecules to systems: the importance of looking both ways. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* 40, 54–64.
- Pringle, J. R. (1997) Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*, in *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Pringle, J. R., Roach, J. R., and Jones, E. W., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 607–695.
- Qu, Z., MacLellan, R., Weiss, J. (2003). Dynamics of the Cycle: Checkpoints, Sizers, and Timers. *Biophys J.*: 85(6), 3600-3611.
- Queralt E, Lehane C, Novak B. (2006). Downregulation of PP2A (Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell*; 125:719–32.
- Rao, C. V., & Arkin, A. P. (2001). Control motifs for intracellular regulatory networks 1. *Annual review of biomedical engineering*, 3(1), 391-419.
- Rape, M., Kirshner, W.W. (2004). Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature*, 432, 588–595.
- Ravasz E, Somera A, Mongru D, Oltvai Z, and Barabási A. (2002). Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, 297:1551–1555.
- Ribeiro, A., Zhu, R., & Kauffman, S. A. (2006). A general modeling strategy for gene regulatory networks with stochastic dynamics. *Journal of Computational Biology*, 13(9), 1630-1639.
- Rieder CL (2011) Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res* 19, 291-306.
- Rodríguez-Caso, C., & Solé, R. V. (2007). Networks in cell biology. In *Fundamentals of Data Mining in Genomics and Proteomics* (pp. 203-226). Springer US.
- Ruiz-Trillo I, Burger G, Holland PW, King N, Lang BF, Roger AJ, Gray MW. (2007). The origins of multicellularity: a multi-taxon genome initiative. *Trends Genet*, 23(3):113–118
- Rupes I. (2002) Checking cell size in yeast. *Trends Genet* 18(9):479–485
- S. Barolo and JW. Posakony. (2002). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes & Development*, (16):1167-1181.

- Sanchez L, Thieffry D. (2001). A logical analysis of the Drosophila gap-gene system. *J Theor Biol* 211: 115-141.
- Sanchez-Corrales, Y. E., Alvarez-Buylla, E. R., & Mendoza, L. (2010). The Arabidopsis thaliana flower organ specification gene regulatory network determines a robust differentiation process. *Journal of theoretical biology*, 264(3), 971-983.
- Santos, S. D., & Ferrell, J. E. (2008). Systems biology: On the cell cycle and its switches. *Nature*, 454(7202), 288-289.
- Satyanarayana, A., Berthet, C., Lopez-Molina, J., Coppola, V., Tessarollo, L., y Kaldis, P. (2008). Genetic substitution of Cdk1 by Cdk2 leads to embryonic lethality and loss of meiotic function of Cdk2. *Development*, 135(20), 3389-3400.
- Satyanarayana, A., y Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925-2939.
- Sauro, H. M. (2008). Modularity defined. *Molecular systems biology*, 4(1).
- Schlitt, T., & Brazma, A. (2007). Current approaches to gene regulatory network modelling. *BMC bioinformatics*, 8(Suppl 6), S9.
- Schneider, B. L., Yang, Q. H., and Futcher, A. B. (1996) Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* 272, 560–562.
- Schreiber, F. and Schwöbbermeyer, H. (2005) Mavisto: a tool for the exploration of network motifs. *Bioinformatics*, 21, 3572–3574.
- Schwab, M., Neutzner, M., Mocker, D., and Seufert, W. (2001). Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *EMBO J.* 20, 5165–5175.
- Sha W, Moore J, Chen K,. (2003). Hysteresis drives cell-cycle transitions in *Xenopus laevis* egg extracts. *ProcNatl Acad Sci*; 100:975–80.
- Sharad, P. A., & Venkatesh, B. K. V. (2011). Mathematical modeling of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle: exploring the role of multiple phosphatases, 115–129.
- Shmulevich, I., & Aitchison, J. D. (2009). Deterministic and stochastic models of genetic regulatory networks. *Methods in enzymology*, 467, 335-356.
- Sible, J. C., y Tyson, J. J. (2007). Mathematical modeling as a tool for investigating cell cycle control networks. *Methods*: 41(2), 238–47.
- Smolarkiewicz, M., y Dhonukshe, P. (2013). Formative Cell Divisions: Principal Determinants of Plant Morphogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 54(3), 333-342.
- Solé, R. V. (2012). Complex networks: structure, robustness and function.
- Stein, G. S., Medina, R., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B. and Owen, T. A. (2011). *Cell Cycle*. eLS.
- Stephanopoulos G., Alper H., and Moxley J. (2004). Exploiting biological complexity for strain improvements through systems biology. *Nature Biotechnology*, 22:1261–1267.
- Szederkényi, G., Banga, J., & Alonso, A. (2011). Inference of complex biological networks: distinguishability issues and optimization-based solutions. *BMC systems biology*, 5(1), 177.
- Teng, H., Huang X., Xiu, Z., y Feng, E., (2005). An integrative model and analysis of the cell cycle in fission yeast. *Chinese Science Bulletin*. Vol. 50 (17): 1896-1903.
- Thakar, J., Saadatpour-Moghaddam, A., Harvill, E. T., & Albert, R. (2009). Constraint-based network model of pathogen-immune system interactions. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(36), 599-612.
- Thattai, M., & van Oudenaarden, A. (2001). Intrinsic noise in gene regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8614-8619.
- Thomas, R. (1973). Boolean formalization of genetic control circuits. *Journal of theoretical biology*, 42(3), 563-585.
- Tyson JJ, Chen, KC., y Novak B (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways

in the cell. *Curr. Op. Cell Biol.* 15, 221-231.

- Tyson, J. J., Csikasz-Nagy, A., & Novak, B. (2002). The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays*, 24(12), 1095-1109.
- Tyson, J.J. y Novak, B. (2011). Cell cycle: who turns the crank? *Curr. Biol.* 21:R185-187.
- Tyson, J.J., y Novak, B. (2010). Functional motifs in biochemical reaction networks. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 61:219-240.
- Vlach J., S. Hennecke, K. Alevizopoulos, D. Conti & B. Amati. (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J.* 15, 6595-6604.
- Vodermaier, H. C. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Current biology*, 14(18), 787-796.
- Vodermaier, H. C. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Current Biology*, 14(18), R787-R796.
- von Dassow G, Meir E, Munro EM, Odell GM (2000) The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 406: 188 192.
- Wang, R.S., Saadatpour, A., y Albert, R. 2012. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Physical biology*, 9(5).
- Wasch, R. and Cross, F. R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556–562.
- Westerhoff HV, Palsson BO. (2004). The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat Biotechnol* 22: 1249–1252
- Wittenberg C, Reed SI. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene*. 2005 4; 24(17):2746–55
- Wolfe, Benjamin A., and Kathleen L. Gould. (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *The EMBO journal* 23.4 : 919-929.
- Woolf, P.J., Prudhomme, W., Daheron, L., Daley, G.Q., and Lauffenburger, D.A. (2005). Bayesian analysis of signaling networks governing embryonic stem cell fate decisions. *Bioinformatics* 21: 741–753.
- Wuarin, J., Buck, V., Nurse, P., and Millar, J. B. (2002). Stable association of mitotic cyclin B/Cdc2 to replication origins prevents endoreduplication. *Cell* 111, 419–431.
- Yamaguchi, S., Okayama, H., and Nurse, P. (2001). Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *EMBO J.* 19, 3968–3977.
- Yao, G., Tan, C., West, M., Nevins, J. R., y You, L. (2011). Origin of bistability underlying mammalian cell cycle entry. *Molecular systems biology*, 7(1).
- Zanudo, J. G., Aldana, M., & Martínez-Mekler, G. (2011). Boolean Threshold Networks: Virtues and Limitations for Biological Modeling. En: *Information Processing and Biological Systems* (pp. 113-151). Springer Berlin Heidelberg.
- Zhao, X. A., Harashima, H., Dissmeyer, N., Pusch, S., Weimer, A. K., Bramsiepe, J., y Schnittger, A. (2012). A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, 8(8), e100284
- Zheng J, Zhang D, Przytycki P F, Zielinski R, Capala J and Przytycka T M. (2010) SimBoolNet—a Cytoscape plugin for dynamic simulation of signaling networks. *Bioinformatics* 26 141–2.

Apéndices

A. Script R para determinar los atractores en las redes analizadas

```
#Linea que hay que cambiar para decir en donde está la red
setwd("dirección del directorio de trabajo aquí")

library("BoolNet")

####Atractores en tabla
#library(BoolNet)
#atCC <- loadNetwork("nombre del archivo .txt que contiene las reglas")
#attrcs <- getAttractors(atCC)
#par(mfrow=c(2,length (attrcs$attractors)))
#plotAttractors(attrcs)

#Atractores Grandes en tabla
#library(BoolNet)
atCC <- loadNetwork("nombre del archivo .txt que contiene las reglas lógicas")
plotNetworkWiring(atCC)
attrcs <- getAttractors(atCC)
par(mfrow=c(1,length(table(sapply(attrcs$attractors,
function(attractor){length(attractor$involvedStates)}))))
plotAttractors(attrcs)
attractorsToLaTeX(attrcs, file="attractores.tex")

###Atractores en gráfica
#library(BoolNet)
#atCC <- loadNetwork("RedCC.txt")
#attrcs <- getAttractors(atCC)
#par(mfrow=c(1,length (attrcs$attractors)))
```

```
#plotAttractors(atrcs, mode="graph")
```

```
###Graficar la red
```

```
#plotNetworkWiring(atCC)
```

```
###Los caminos anteriores y siguientes de una cuenca específica (1)
```

```
#getBasinOfAttraction(atrcs,1)
```

```
###Para obtener el camino a un atractor
```

```
#camino <- getPathToAttractor(atCC, c(0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1))
```

```
#camino
```

```
#Regresando al directorio anterior
```

```
setwd("Directorio de trabajo aquí")
```