



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA COMPLEJIDAD  
BIOLOGÍA MATEMÁTICA Y COMPUTACIONAL

EL PAPEL DE LOS MECANISMOS REGULATORIOS DE LA  
TRANSCRIPCIÓN EN LA RETROACCIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS  
POR PARTE DEL  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Libertad Pantoja Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Juan Carlos Martínez García  
Instituto de Ecología, UNAM  
Departamento de Control Automático, CINVESTAV

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Elena Álvarez-Buylla Roces  
Instituto de Ecología, UNAM

Adriana Garay Arroyo  
Instituto de Ecología, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX  
Marzo 2017



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.

Libertad Pantoja Hernández: *El papel de los mecanismos regulatorios de la transcripción en la retroacción* , tesis presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias por parte del Doctorado en Ciencias Biomédicas, © Marzo 2017

DIRECTOR DE TESIS:

Juan Carlos Martínez García

COMITÉ TUTORAL:

Elena Álvarez-Buylla Roces

Adriana Garay Arroyo

COMITÉ JURADO:

Pedro Eduardo Miramontes Vidal

Luis Antonio Mendoza Sierra

Rafael Peña Miller

Osbaldo Resendis Antonio

Juan Carlos Martínez García

PRESENTADO EN:

Ciudad Universitaria, CDMX. Marzo 2017.

Las representaciones que construimos en nuestro cerebro son, objetos físicos, “modelos reducidos” del mundo exterior y de nuestro propio mundo interior. No pueden aspirar a una descripción integral, al agotamiento de la realidad del mundo. Siempre existirá un margen de incertidumbre, un espacio para volver a cuestionar todo avance del conocimiento científico. ¿Es ésta una razón para renunciar a saber más?

—Jean-Pierre Changeux [16]

Complexity is the prodigy of the world.

Simplicity is the sensation of the universe.

Behind complexity, there is always simplicity to be revealed.

Inside simplicity, there is always complexity to be discovered<sup>1</sup>

— Gang Yu [42]

Esta tesis está dedicada a mis padres, a mi hermana y a mis dos familias, la de sangre y la elegida por mí. Gracias a todos por su apoyo.



<sup>1</sup> La complejidad es el prodigio del mundo. La simpleza es la sensación del universo. Tras la complejidad, siempre hay simplicidad para ser develada. Dentro de la simplicidad, siempre hay complejidad que descubrir. Traducción de la autora de esta tesis.



*Nihil sub sole novum nec valet quisquam dicere ecce hoc recens est iam enim  
praecessit in saeculis quae fuerunt ante nos*<sup>2</sup>

— Ecclesiastes 1:10

---

## ABSTRACT

---

**H**EREBY, I present the analysis on how the transcription factor binding mechanism affects retroactivity. Retroactivity is a property that arises from the interconnection of systems or modules. To fulfill the former, I chose several binding mechanisms where I evaluated the consequences of having many downstream binding sites. Our aim was to determine which mechanisms are the most sensitive and which are the most resistant to retroactivity effects. We also wanted to assess if there is an actual heterogeneity in the effects that retroactivity can have on each of them. This work shall contribute to the better understanding and application of such mechanisms in real regulatory networks.

In order to evaluate retroactivity effects, I constructed four models of ordinary differential equations with their rule based model counterpart. These models explain in a summarized way four possible ways of binding (and thus interconnection) for transcription factors to downstream binding sites. In such models, I tested the retroactivity effects both in the differences of numbers of molecules of free functional transcription factor and the variation of such amounts of molecules.

The results indicate that the most affected mechanism is the dimer binding, while the most conserved one is the simple monomer binding. Another interesting aspect of this study is that in connected cases -mechanisms with downstream regulatory sites- the variability of free functional transcription factor is larger. Even if this variability seems to be independent of the used mechanism, for dimer binding it is larger than for any of the other mechanisms



<sup>2</sup> Es imposible decir que hay algo nuevo. La idea a gestarse ya estaba en cabeza de alguien mucho tiempo antes de que diéramos con ella (interpretación de la autora de esta tesis).



---

## RESUMEN

---

**E**N este documento, presentamos el análisis de cómo impacta el mecanismo de unión de los factores transcripcionales (TFs por sus siglas en inglés) a la retroacción, la cual es una propiedad importante de sistemas interconectados. Para ello seleccionamos varios mecanismos de unión de factores transcripcionales en los cuales evaluamos las consecuencias de conectar diversos sitios de unión (sitios operadores en el genoma) a regular río abajo. Esto con el fin de determinar cuáles mecanismos son los más sensibles y resistentes a los efectos de la retroacción, así como si hay una heterogeneidad en cuanto a los efectos que puede tener la retroacción cuando actúa sobre cada uno de ellos. Esto contribuirá a mejorar el entendimiento de la distribución y uso de tales mecanismos de regulación en redes biológicas reales.

Para evaluar los efectos de la retroacción, construimos cuatro modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (de aquí en adelante EDO's) con su contraparte en modelado basado en reglas BioNetGen. Estos modelos explican en forma simplificada cuatro posibles mecanismos de unión de un factor transcripcional a un sitio operador. En dichos modelos, evaluamos el efecto de la retroacción tanto a nivel de número de moléculas de factor transcripcional libre y capaz de unirse al ADN, como a nivel de la variación en el número de moléculas del mismo. Nuestros resultados indican que el mecanismo más afectado por la conexión río abajo es la unión exclusiva de TFs como dímeros (DB por sus siglas en inglés), mientras que el más conservador es el de unión de un sólo monómero (CSB).

Otro aspecto interesante de nuestro estudio es que en los casos conectados (mecanismos con sitios a regular río abajo), la variabilidad de la señal de salida (número de moléculas del TF de interés) es mayor. Dicha variabilidad parece ser independiente del mecanismo utilizado. Sin embargo, la variabilidad intrínseca de FFTF (factor transcripcional funcional por sus siglas en inglés) en el mecanismo DB (*i.e.* la que se presenta en el caso desconectado) es mayor que la de cualquiera de los demás mecanismos.



<sup>3</sup> Es imposible decir que hay algo nuevo. La idea a gestarse ya estaba en cabeza de alguien mucho tiempo antes de que diéramos con ella (interpretación de la autora de esta tesis).





---

## PUBLICACIONES

---

La mayor parte de las ideas y figuras plasmadas en esta tesis han aparecido en las siguientes publicaciones previas: el artículo de revisión “Retroactivity in the context of modularly structured biomolecular systems” [51] y el artículo de investigación original para obtención de grado “Retroactivity effects dependency on the transcription factors binding mechanisms” [52]. La portada del artículo de revisión, así como el artículo de investigación original completo pueden encontrarse en el Apéndice C.



*When I'm not thank'd at all, I'm thank'd enough,  
I've done my duty, and I've done no more.*<sup>4</sup>

— Henry Fielding,  
The Life and Death of Tom  
Thumb the Great (1730),  
Act I, scene 3

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer primero que nada a mis padres, quienes me han mantenido en el camino de la ciencia a pesar de mis múltiples y naturales desvíos hacia otras áreas.

Gracias a Sami porque sin querer ha sido la principal instigadora de mi creatividad.

Agradezco a Rafa porque siempre está ahí. Estamos juntos.

Gracias a todos los compañeros y amigos con los que he compartido todas las alegrías y desaveniencias que implica una carrera en ciencias (y sobretodo un doctorado): Esther, Renan, Eli, Moni, Vale, Consuelo, Paz, Banda, Luis B., Ale M., Mario, Yalbi, Aurora, Santiago, Orlando, Gama, Miguel, Carlita, Carlos V., Marianita B., Checo y Lore entre otros.

Gracias todos mis amigos y compañeros de caminos que evitan que olvide otros senderos que amo (y a los que farolean de mí diciendo que puedo clonar un dinosaurio aunque no sea cierto): Angel C., Manuel R., Pedro J., Cecilia, Alberto C., Raquel C., Gabriel R., Raúl A., B. Mariana, Mine, Davo, Adre, Lalo, Hei y Amilcar, entre otros.

Gracias a todos los que tuvieron la santa paciencia de esperar a que concluyera este proceso y esta etapa (muchas gracias Montse, Tom y Romi).

### 0.1 DE DETALLES DE LA TESIS:

Muchas gracias a Esther, Rafa y Yalbi por dejarme tomar su tesis como base para hacer esto.

Gracias a todos los sinodales por su tiempo, paciencia y recomendaciones.

Gracias a Rafa V. V. y a Pedro J. por sus correcciones de último minuto.

Muchas gracias a Alberto Soria López por la extensa revisión que hizo del artículo publicado para obtener este título.

Muchas gracias a Juan Carlos, a Elena y Adriana por guiarme con paciencia en la medida de sus posibilidades por este experimento de vida.

◆—————◆

<sup>4</sup> Cuando no se me agradece, se me agradece suficiente. He hecho mi deber. Eso es todo (traducción de la elaboradora de esta tesis).

Para realizar este trabajo recibí una beca de doctorado de CONACYT con el número 325016, así como el apoyo del proyecto CONACYT 180380 y del Centro de Ciencias de la Complejidad.

---

## ÍNDICE GENERAL

---

Abstract . . . . .	v
Resumen . . . . .	vii
Publicaciones . . . . .	ix
Agradecimientos . . . . .	xi
0.1 De detalles de la tesis: . . . . .	xi
Contenido . . . . .	xiii
Acrónimos . . . . .	xv
Tablas . . . . .	xvi
<b>i INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	<b>1</b>
1 INTRODUCCIÓN . . . . .	3
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . .	7
3 OBJETIVOS . . . . .	9
3.1 Objetivo general . . . . .	9
3.1.1 Objetivos específicos . . . . .	9
4 RELEVANCIA . . . . .	11
<b>ii ANTECEDENTES</b> . . . . .	<b>13</b>
5 ANTECEDENTES . . . . .	15
5.1 Transcripción y regulación transcripcional . . . . .	15
5.1.1 Factores transcripcionales . . . . .	16
5.2 Módulos biológicos funcionales . . . . .	16
5.2.1 Modularidad y transcripción . . . . .	17
5.3 La retroacción y sus efectos . . . . .	18
5.3.1 Posibles funciones de la retroacción . . . . .	19
5.3.2 La retroacción en el contexto de la transcripción . . . . .	20
5.3.3 Mecanismos o vías de transcripción . . . . .	20
<b>iii DESARROLLO</b> . . . . .	<b>23</b>
6 MODELOS . . . . .	25
6.1 Supuestos generales . . . . .	27
6.2 Selección de Mecanismos . . . . .	28
6.3 Supuestos particulares . . . . .	28
6.3.1 Primer mecanismo: pegado de monómero sencillo o SMB (Simple monomer binding) . . . . .	32
6.3.2 Segundo mecanismo: pegado de dímero (DB) . . . . .	35
6.3.3 Tercer caso: Pegado secuencial cooperativo (CSB). . . . .	37
6.3.4 Cuarto caso: Pegado secuencial de monómeros coope- rativos y dimerización (CSBD). . . . .	40
7 MÉTODOS . . . . .	43
7.1 Cálculo de S . . . . .	43

7.2	Simulaciones deterministas . . . . .	44
7.2.1	Cálculo del Estado estacionario (SS) . . . . .	44
7.2.2	Degradación no lineal . . . . .	45
7.3	Simulaciones estocásticas . . . . .	45
8	RESULTADOS . . . . .	47
8.1	Aproximaciones Deterministas . . . . .	48
8.1.1	Comparaciones en el estado estacionario (SS) con distintos parámetros . . . . .	48
8.1.2	Efectos de la degradación no lineal . . . . .	54
8.1.3	Simulaciones deterministas . . . . .	58
8.2	Aproximaciones Estocásticas . . . . .	62
8.2.1	CV y las diferencias entre las distribuciones de los casos desconectados . . . . .	63
8.2.2	Simulaciones de FFTF . . . . .	65
iv	CONCLUSIÓN . . . . .	71
9	CONCLUSIONES . . . . .	73
v	APÉNDICES . . . . .	79
A	APÉNDICE A . . . . .	81
A.1	Comparación de simulaciones deterministas contra estocásticas . . . . .	81
A.2	Influencia de los parámetros en el SS . . . . .	81
A.2.1	$\delta_1$ . . . . .	81
A.2.2	$\delta_2$ . . . . .	81
A.2.3	$\delta_3$ . . . . .	81
A.2.4	$k_{on}$ . . . . .	89
A.2.5	$k_{off}$ . . . . .	89
A.2.6	$k_{on}$ vs $k_{off}$ . . . . .	89
B	APÉNDICE B . . . . .	93
B.1	Modelos en BioNetGen . . . . .	93
B.1.1	Caso 1: Unión de monómero sencillo (SMB) . . . . .	93
B.1.2	Caso 2: Unión de dímero (DB) . . . . .	96
B.1.3	Caso 3: Unión de dos monómeros cooperativos secuenciales sin dimerización (CSB) . . . . .	99
B.1.4	Caso 4: Unión de dos monómeros cooperativos secuenciales con dimerización (CSB_D) . . . . .	102
B.2	Figuras Suplementarias . . . . .	106
C	APÉNDICE C . . . . .	129
	BIBLIOGRAFÍA . . . . .	153

---

## ACRÓNIMOS

---

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**mRNA** Ácido ribonucleico mensajero por sus siglas en inglés

**BS** Sitio de pegado o unión por sus siglas en inglés

**CSB** Unión de monómero cooperativo por sus siglas en inglés

**CSBD** Unión de monómero cooperativo con dimerización por sus siglas en inglés

**DB** Unión de dímero por sus siglas en inglés

**EDOs** Ecuaciones diferenciales ordinarias

**FFTF** Factor transcripcional libre y funcional por sus siglas en inglés

**KD** Constante de disociación

**SMB** Unión de monómero simple por sus siglas en inglés

**SS** Estado estacionario por sus siglas en inglés

**TF** Factor transcripcional por sus siglas en inglés

**TFBP** Proceso de unión de un factor transcripcional por sus siglas en inglés



---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1	Parámetros involucrados en las suposiciones generales de los modelos. ‡ [8] ∞ [67] § [54] ★ [25] *En contraste con los otros mecanismos, los 300 BS de SMB son simples ( <i>i.e.</i> solo involucran una secuencia de unión) mientras que para los otros mecanismos son dobles. . . . . 29
Tabla 2	Valor de entrada (S) para cada mecanismo. El valor de S se calculó por ensayo y error y corresponde número de moléculas. . . . . 30
Tabla 3	Mecanismos utilizados en este trabajo y algunos procesos biológicos asociados a ellos. . . . . 30
Tabla 4	Parámetros particulares involucrados en los modelos de mecanismos. Todos estos parámetros se obtuvieron de: [17] *Para SMB consideramos que las tasas de asociación y disociación son las mismas que para el dímero en DB y CSB_D. Lo hicimos así porque pensamos que cuando el monómero es la principal especie reguladora, tiene sentido que estos parámetros sean equivalentes . . . . . 31
Tabla 5	Tasas de asociación y disociación . . . . . 34
Tabla 6	Estadístico D y valores- $\rho$ entre mecanismos de unión (Véanse Figuras S18-S24). . . . . 65
Tabla 7	Estadístico D y valores $-\rho$ al minuto 1440 para cada proceso de unión. . . . . 65
Tabla 8	Resumen de los resultados . . . . . 70

Parte I

## INTRODUCCIÓN

Donde se da un panorama general de la estructura de la tesis.



---

## INTRODUCCIÓN

---



EN este capítulo damos un breve panorama sobre la retroacción y sus implicaciones funcionales en la regulación transcripcional. Seguidamente, damos una explicación sobre la estructura y contenidos de esta tesis.

La regulación transcripcional es un proceso que permite modular la expresión génica en todos los organismos. La presente tesis busca evaluar si dentro del proceso de regulación transcripcional hay mecanismos de unión al ADN que faciliten un cambio en el funcionamiento de un TF, el cual se considera dependiente de su número de moléculas, en presencia de sitios a regular río abajo. Esto con el fin de entender qué mecanismos suelen promover un cambio en la regulación, o mantenerla, dependiendo de los sitios a regular río abajo.

La retroacción se refiere a los efectos y señales que surgen de la interconexión de sistemas (véase [51] para una revisión del concepto de retroacción y [21] para una definición preliminar). A estos efectos también se les conoce como efectos de las cargas o titulación molecular. Se sabe que estos efectos intervienen en la dinámica temporal [33] y el estado estacionario [21] de un sistema. Además, recientemente se mostró mediante un modelo su posible papel en la robustez a parámetros de un sistema [48].

Anteriormente, se han explorado aspectos de la retroacción relacionados con la funcionalidad de la regulación transcripcional en sistemas biológicos. Por ejemplo en [13] se analizaron los efectos de titulación en la regulación transcripcional como causantes de respuestas ultrasensibles, en [15] se propuso que el papel de diversos sitios de unión que no funcionan como secuencias reguladoras en el genoma, podría ser proteger a las moléculas de TF de la degradación y ser un reservorio de estas moléculas, entre otros.

En sistemas sintéticos, por lo general no se desea tener efectos de retroacción, ya que pueden volver lento el funcionamiento del sistema río arriba de la conexión (véase [21], [33]). Del Vecchio, Ninfa, y Sontag propusieron una estrategia para disminuir los efectos de la retroacción en [20], que consiste en introducir una gran ganancia (lo cual quiere decir, aumentar la producción de la señal de salida) y una retroalimentación negativa igualmente grande como un aislador dinámico.

Como ya mencionamos, el proceso de transcripción —donde los TFs se unen a sitios específicos río abajo para promover o reprimir la transcripción

de un gen— es uno de los procesos que pueden verse afectados por la retroacción. Los TFs se unen a sitios río abajo por diferentes mecanismos, estos mecanismos son los pasos necesarios para formar un complejo entre el TF y sus sitios de unión.

Hay algunos mecanismos muy bien conocidos para la unión de TF (también llamados vías o regímenes cinéticos), muchos de los cuales son muy complejos como [7], [23], entre otros). Dentro de los mecanismos simples encontramos la vía del monómero y del dímero, mismas que han sido descritas a detalle (vea [39], [47], [10]).

Sin importar la vía o mecanismo involucrado, la unión de TF tienen lugar por medio de un proceso de asociación y disociación del sitio de unión río abajo. Dependiendo del valor de la constante de disociación (KD), un sitio de unión –también conocido como operador– puede ser débil o fuerte. KD es el producto de la tasa de disociación  $k_{off}$  del TF con su sitio cognado en el ADN y el inverso de su tasa de asociación  $\frac{1}{k_{on}}$ , ( $KD = k_{off}/k_{on}$ ), a mayor KD, más débil es el sitio de unión.

En redes de regulación transcripcional, la retroacción modifica la tasa de cambio de la concentración de TF porque la disponibilidad de TF libre y funcional disminuye al unirse éste a sitios río abajo.

En sistemas biológicos naturales, la comparación entre TF conectado y desconectado puede parecer extraña, ya que la entrada de nuevos sitios de unión a un sistema biológico sólo sucede bajo condiciones particulares como una infección viral, entrada de plásmidos, y podría suceder en factores transcripcionales con cargas grandes (*i.e.* muchos sitios a regular río abajo) y que cambian dinámicamente gracias a fenómenos como la regulación epigenética que los vuelve inaccesibles a TFs.

Si hay un exceso de moléculas de TF en comparación con el número de sitios de unión río abajo, entonces la señal de retroacción será tan pequeña (*i.e.* el cambio en la concentración de TF libre será similar a cero) que no afectará el sistema. Sin embargo, cuando la concentración de TF es limitante para la regulación río abajo, todas las actividades reguladas por el TF podrían disminuir su velocidad o incluso perderse (véase [21], [34], [9] y [32]).

La existencia de cantidades límite donde las concentraciones de TF no son suficientes para llevar a cabo la regulación río abajo siguen siendo un tema de debate. En principio, en [59], se discute que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las proteínas están expresadas a niveles mucho más altos que los necesarios para la supervivencia. Considerando esta idea, la concentración no debería ser un problema. Sin embargo, en [36] se afirma que hay casos en *Drosophila melanogaster* en los que un control fino de los niveles de proteínas se requiere para que un proceso sea funcional. En este caso particular, previniendo neurodegeneración.

La retroacción puede ser problemática para mantener una concentración estable de TFs que se una a grandes cantidades de sitios río abajo. Este tipo de TFs son llamados concentradores (conocidos como *hubs* en inglés [6]), y pueden compartir sus sitios de unión con otros TFs o unirse por medio de

un patrón de interacción conocido como *single input motif* (SIM), donde un solo TF regula la transcripción de varios genes.

En el caso de estos TFs que regulan un gran número de sitios río abajo, se esperaría encontrar seleccionados de manera positiva mecanismos que minimicen la retroacción. Por otro lado, hay evidencia de concentradores participando como reguladores maestros, en ellos se esperaría observar la existencia de procesos y tomas de decisiones (relativas a la diferenciación) acompañados de respuestas biestables. Esto nos hace esperar que para dichos reguladores maestros se favorezca la presencia de un mecanismo de unión que permita respuestas ultrasensibles o biestables.

La retroacción, tal como se muestra en [13], puede tener un papel en promover respuestas ultrasensibles (*i.e.*, sigmoides) dependiendo de la concentración. Así que, tanto en procesos de diferenciación como en respuestas ambientales, un cambio drástico inducido por la retroacción podría tener implicaciones funcionales.

A la fecha sólo en pocos estudios se han caracterizado circuitos biomoleculares funcionales y dinámicos que aumentan o minimizan la retroacción (véase [64], [21], [27] entre otros). Una caracterización más completa de estas propiedades, permitirá entender mejor cómo los componentes naturales se integran en redes regulatorias complejas.

El hacer esta caracterización a una escala todavía más fina —la escala de los mecanismos de unión de TF a sitios río abajo,— ayudará a tener una idea sobre si estos mecanismos pueden tener un papel en los efectos de la retroacción independientemente de si incrementan o reducen los efectos de retroacción. Aún más, hasta donde sabemos, no se ha descrito el papel de un nivel de regulación básico como la unión de TF relacionado a la retroacción en sistemas naturales biomoleculares.

Nuestro objetivo es comparar los efectos de retroacción en un sistema donde un TF hipotético regula sus sitios cognados de unión a través de cuatro mecanismos al contrastar los cambios en la cantidad de moléculas de TF libre y funcional (FFTF) tras la interconexión a sitios río abajo.

Nos interesa encontrar qué mecanismos de unión de factor transcripcional son capaces de mantener o disminuir el número de moléculas de FFTF y en cuáles mecanismos los efectos de retroacción están implicados en el nivel de ruido del FFTF.

Con proceso de unión de factor transcripcional (TFBP), nos referimos al proceso que involucra un mecanismo de unión (BM), un número determinado de sitios de unión (BSs), dependiendo del mecanismo seleccionado, y un régimen que puede ser unión débil o fuerte. Los mecanismos que seleccionamos son: unión de monómero simple (SMB por sus siglas en inglés), dimerización previa a la unión (DB), unión secuencial cooperativa de dos monómeros (CSB por sus siglas en inglés) y unión secuencial cooperativa de dos monómeros junto con dimerización previa la unión (SMB por sus siglas en inglés).

Para completar el TFBP, simulamos cada uno de los cuatro mecanismos seleccionados en dos regímenes: una unión débil y una fuerte con paráme-

tros biológicamente plausibles. Ambos regímenes fueron analizados en el caso conectado y desconectado (véanse sección 7 y la Figura 5).

La degradación podría estar jugando un papel decisivo en los efectos de retroacción ya que modifica la concentración de TF y por tanto la de TF funcional libre (FFTF). En este trabajo nos interesa en particular el papel de la degradación del complejo formado por el TF y su sitio de unión en el ADN. Aunque en [15] se menciona que los sitios de unión en el ADN podrían funcionar como reservorios protectores de las moléculas de TF impidiendo que estas se degraden, en [33] se observó lo opuesto al analizar los efectos de conexión en un sistema sintético. Por lo anterior, decidimos analizar también los cambios causados por la degradación asimétrica entre las diferentes especies moleculares que incluyen el TF, al cambiar la degradación del complejo entre el TF y el ADN.

La tesis se divide de la siguiente forma: el Capítulo 1 consiste en la presente introducción; en el Capítulo 2 exponemos el planteamiento del problema considerando algunos de los antecedentes. Seguidamente, en el Capítulo 3, damos a conocer el objetivo general y los objetivos particulares de esta tesis. Posteriormente, incluimos un breve apartado (Capítulo 4) donde se habla de la relevancia de esta investigación. En el Capítulo 5 abundamos sobre los antecedentes y relevancia del tema, procurando plantear un contexto que permita que el resto de la exposición sea clara. En el Capítulo 6 describimos los modelos empleados en este trabajo. Después, en el Capítulo 7 describimos los métodos utilizados en esta investigación, de los cuales se puede encontrar detalles en: [https://github.com/LiberPH/Retroactivity\\_mechanisms\\_transcription\\_secret](https://github.com/LiberPH/Retroactivity_mechanisms_transcription_secret). Tras explicar los métodos, exponemos nuestros resultados junto con una breve discusión al respecto en el Capítulo 8. Posteriormente en el Capítulo 9 se enuncian las conclusiones y perspectivas de este trabajo. Al final incluimos un anexo con algunos datos que pueden ser de utilidad para complementar las ideas aquí expuestas.

Esta tesis se encuentra dividida a su vez en cinco partes. La primera parte, denominada Introducción, engloba la introducción *per se*, el planteamiento del problema y los objetivos. La parte II (Antecedentes) incluye los antecedentes e información previa que permitieron contextualizar y plantear la dinámica a resolver. La parte III (Desarrollo) incluye los modelos y métodos, así como los resultados a los que se llegaron gracias a estos. La cuarta parte (Conclusión) incluye las conclusiones generales del trabajo y, finalmente, la parte V, comprende los apéndices del trabajo.

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---



PESAR de que actualmente el modelado de sistemas biológicos moleculares es una práctica común para comprender su funcionamiento dentro del contexto de los seres vivos, por lo general dichos modelos simplifican una buena parte de los detalles de la dinámica que se da cuando dos o más partes de un sistema interactúan.

Uno de los detalles ignorados son los llamados “efectos de retroacción”, mismos que se refieren a la carga que ejercen los sitios de unión río abajo de un factor transcripcional sobre el funcionamiento de éste.

A últimas fechas se ha retomado el interés en evaluar los posibles efectos de la retroacción tanto en sistemas naturales como sintéticos bajo distintas condiciones. Por ejemplo, en un artículo por publicarse de Del Vecchio y Mou [48], se señala cómo la robustez a cambios en parámetros disminuye en forma directamente proporcional al tamaño de la red cuando se consideran los efectos de retroacción en cada paso donde está involucrado un TF, con respecto a los casos en que estos no se consideran.

A pesar de este interés reciente, a la fecha nadie ha estudiado cómo los mecanismos finos de unión de un TF pueden afectar los efectos de la retroacción.

En un análisis preliminar, observamos cómo en distintos circuitos de regulación con resultados dinámicos similares variaban los efectos de la retroacción al elegir diferentes supuestos sobre la unión del TF. Esto, además de trabajos como [37] donde se modela a detalle el proceso de regulación transcripcional, nos llevaron a pensar en la posible implicación de los mecanismos de unión al ADN en los efectos de la retroacción.

Considerando que en sistemas biológicos podría tanto buscarse aprovechar la señal de retroacción para generar respuestas tipo conmutador (denominada tipo *switch* en inglés), como preferirse reducir al mínimo estas señales para mantener la integridad funcional de los TF's, nos pareció necesario evaluar en distintos mecanismos de pegado, cuál de estos dos papeles era mejor ejercido en cada uno de ellos.

Nuestro planteamiento se puede resumir en el siguiente enunciado:

*Los sistemas biológicos utilizan distintos mecanismos de pegado para aprovechar o disminuir –según lo requieran– el efecto de las cargas en redes de regulación transcripcional.*





---

## OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GENERAL



ETERMINAR cuáles mecanismos de unión de factores transcripcionales a sitios operadores pueden cambiar o mantener el comportamiento dinámico observado en sistemas desconectados.

#### 3.1.1 *Objetivos específicos*

- Simular, con Ecuaciones Diferenciales Ordinarias, los cuatro mecanismos elegidos para determinar y comparar el comportamiento cualitativo de cada uno de ellos.
- Hacer uso de simulaciones estocásticas para determinar si la elección de un mecanismo tiene incidencia en los cambios de variabilidad de la salida del sistema (número de moléculas de TF funcional) causados por una conexión a sitios río abajo.
- Evaluar el papel de la degradación en el efecto de los mecanismos en la retroacción.



---

## RELEVANCIA

---



ACTUALMENTE el sistema de producción científica se enfoca en proyectos donde la aplicación es evidente. No es el caso de este trabajo donde se busca responder una pregunta fundamental o, dicho de otro modo, de ciencia básica: ¿qué tienen que ver los mecanismos de transcripción con la retroacción? Con la pregunta se intenta entender qué hay detrás de lo que se decide investigar. Dado lo anterior, cualquier pregunta de investigación original es válida y relevante por el simple hecho de contribuir a incrementar el acervo humano de conocimientos.

Hasta donde sabemos, éste es el primer trabajo donde se analiza el papel de los mecanismos explícitos de unión de TFs al ADN en los efectos de retroacción.

Dicho papel se analiza tomando en cuenta cómo podría estar involucrado cada mecanismo en la red de regulación natural de un organismo. Para nosotros son de especial interés los mecanismos que por sí mismos podrían minimizar los cambios en la concentración de TF originados por la retroacción, ya que protegen la integridad del funcionamiento del TF. Por otro lado, es importante considerar también qué mecanismos pueden estar ocasionando respuestas tipo interruptor que permitan a un organismo o sistema reaccionar rápido ante un estímulo.

A pesar de que existen TF que regulan pocos sitios río abajo, lo cual permite que haya una mayor concentración de TF que de sitios de pegado y por tanto que los efectos de retroacción sean pequeños, hay diversos escenarios en los cuales el TF podría tener una concentración menor o equiparable a la de los sitios de unión. Una lista de ejemplos donde la retroacción podría tener consecuencias importantes se da en [12] e incluye: casos que involucran ADN viral altamente replicado, genes expresados en plásmidos, genes con múltiples copias a lo largo del cromosoma y genes controlados por TFs sobrecargados con muchos sitios blanco disponibles (como en el caso de los nodos concentradores). En este documento nos concentramos en estos últimos.



## Parte II

### ANTECEDENTES

Donde se explican los conceptos y trabajo previo relativos al tema de la retroacción.



---

## ANTECEDENTES

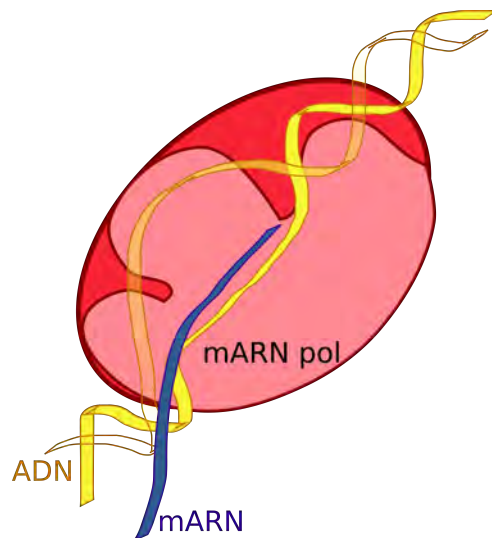
---

**E**N sistemas biológicos, el término retroacción (véase [56], [20]), proviene de la noción de impedancia o carga en circuitos electrónicos. Se refiere a una señal molecular “contra-responsiva” que surge de la conexión de módulos biológicos funcionales.

En este trabajo nos interesa estudiar la retroacción en el contexto de la regulación transcripcional.

### 5.1 TRANSCRIPCIÓN Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Para que se puedan producir proteínas, es necesario leer la información contenida en el genoma y copiarla en el RNA mensajero (mRNA). Al proceso de realizar esta copia de mRNA se le conoce como transcripción.



**Figura 1.** Representación del proceso de transcripción donde, a partir del ADN, la RNA polimerasa (mARN pol) genera una copia (mRNA) que permitirá la posterior síntesis de proteínas

La transcripción, al ser un proceso decisivo en la regulación celular, requiere de estar finamente regulada. Hay distintas estrategias que la maqui-



naría molecular utiliza para regular el inicio, la progresión y el final de la producción de una molécula de mRNA.

En este trabajo nos interesa en particular el impacto de los mecanismos usados para regular el inicio de la transcripción cuando ésta es iniciada o reprimida gracias a factores transcripcionales.

### 5.1.1 Factores transcripcionales

Los factores transcripcionales son proteínas que promueven, en el caso de los activadores, o reprimen, en el caso de los represores, el inicio del proceso de transcripción. De ellos depende, en parte, la velocidad con la que se da el proceso de transcripción y su frecuencia. Los factores transcripcionales se diferencian de la mRNA pol en que esta última lleva a cabo activamente el proceso de transcripción, mientras que los factores transcripcionales facilitan o dificultan que se lleve a cabo este proceso. Los factores transcripcionales son proteínas que se distinguen por contar con un dominio de unión a ADN que les permite unirse a secuencias específicas en el genoma ([2], [5]). Como también se menciona en la referencia previa, los factores transcripcionales influyen en que la expresión de un gen sea única en un determinado tipo celular, condición de crecimiento o estrés o estadio del desarrollo. En este sentido, podríamos decir que cada TF es parte de un conjunto de genes y moléculas especializadas en una labor común, ya sea concertando los mismos al regularlos o concertando una pequeña parte de un proceso mayor. Podemos entender estos conjuntos de moléculas como módulos especializados en una labor particular.

## 5.2 MÓDULOS BIOLÓGICOS FUNCIONALES

De acuerdo con Hartwell en [29], llamamos módulo funcional a aquel compuesto por diversos tipos de moléculas que interactúan entre sí y, a consecuencia de esta interacción, dan lugar a funciones específicas.

Para facilitar el estudio de la retroacción y ser congruentes con el marco conceptual utilizado por Sontag y Del Vecchio en trabajos previos ([20]), consideraremos que un módulo biológico funcional tiene al menos una entrada (denominada *input* en inglés), que lo comunica con un módulo previo o una acción global del sistema biológico donde está embebido y una salida (denominada *output* en inglés), que refleja su función particular. Dicha salida puede ser la concentración de alguna molécula, la intensidad luminosa de alguna molécula que usamos para notar la actividad de una proteína o enzima, entre otras.

Así mismo, la definición anterior se complementa con las ideas de Wagner ([63]) donde se dice que un módulo es un conjunto de “elementos que actúan juntos realizando alguna función fisiológica discreta y son semi-autónomos en relación a otros módulos funcionales”. Desde el punto de vista de una red completa, podemos decir que los módulos son elementos cuyas funciones son separables de las de otros módulos ([29, 44]).

Sin embargo, en sistemas biológicos la interconexión constante entre partes heterogéneas nos dificulta establecer los límites estructurales y funcionales que delimitan un módulo. Esto es porque en sistemas biológicos, a diferencia de los diseñados por el hombre, la discretización en módulos es “incompleta”. Esto quiere decir que los sistemas biológicos no tienen módulos estrictos con una delimitación clara que se mantenga todo el tiempo. Además de que hay maquinarias muy generales que se comparten y de que algunos de los elementos de los módulos se reciclan para utilizarlos en más de una función. Por lo tanto, para este trabajo consideramos que estos módulos o subsistemas tienen una función que no está perfectamente aislada del resto (véase Figura 2-A). Es importante señalar que los módulos son una abstracción que nos ayuda a entender mejor cómo se da el comportamiento de distintos componentes de la célula en momentos y condiciones específicas.

### 5.2.1 Modularidad y transcripción

La regulación transcripcional es un proceso que permite graduar la expresión de los genes. Como ya mencionamos, una parte importante de esta regulación es ejercida por los factores de transcripción (TFs). Estos son proteínas que regulan el inicio de la transcripción activando o reprimiendo la expresión de los genes ([5]).

Las relaciones entre módulos de regulación transcripcional, cada uno de los cuales depende de un TF diferente que regula un conjunto de genes particular, están determinadas por interacciones físicas entre moléculas. Estas interacciones pueden expresarse mediante parámetros numéricos. Dichos parámetros pueden representar: tasas o constantes de disociación, tasas de producción o degradación, tasas de asociación, velocidades de modificaciones covalentes, entre otras.

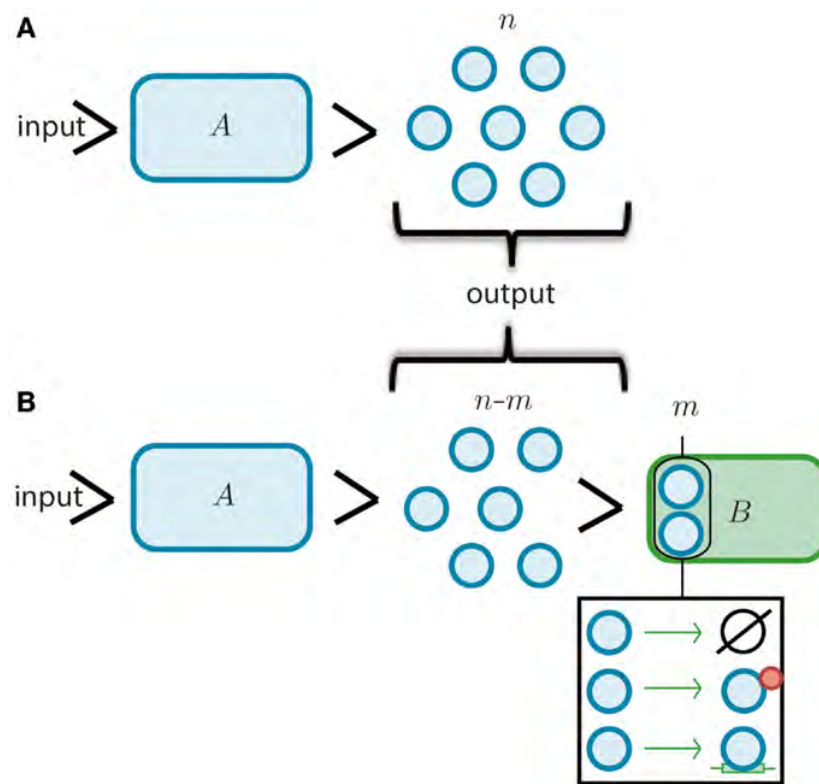
Por lo general, a nivel de la transcripción, los “módulos” requieren una maquinaria transcripcional compartida.

Si en el proceso de transcripción, los participantes se conectaran formando redes del todo modulares, al tener nodos de interconexión delimitados (*i.e.* los nodos etiquetados como entradas y salidas), podrían propiciar que señales de otros módulos o del exterior se introduzcan a la red regulatoria, interfiriendo con su funcionalidad en ausencia de mecanismos que resguarden las entradas y salidas ([4]). Con esto queremos decir que si las estructuras modulares dominaran la estructura de las redes, la “invasión” por estímulos externos sería muy común. Dicha “invasión” podría venir de virus, transferencia horizontal, conjugación e incluso fluctuaciones en concentraciones moleculares, así como regulación inespecífica. La presencia de algunos fenómenos de invasión en la naturaleza, como en caso de la formación de las llamadas “manzanas de roble” que surgen cuando una avispa secuestra la maquinaria del desarrollo de un roble ([55]), podría indicar que, a pesar de no ser del todo modulares, las redes biológicas tienen un cierto grado de fragilidad a invasión.

## 5.3 LA RETROACCIÓN Y SUS EFECTOS

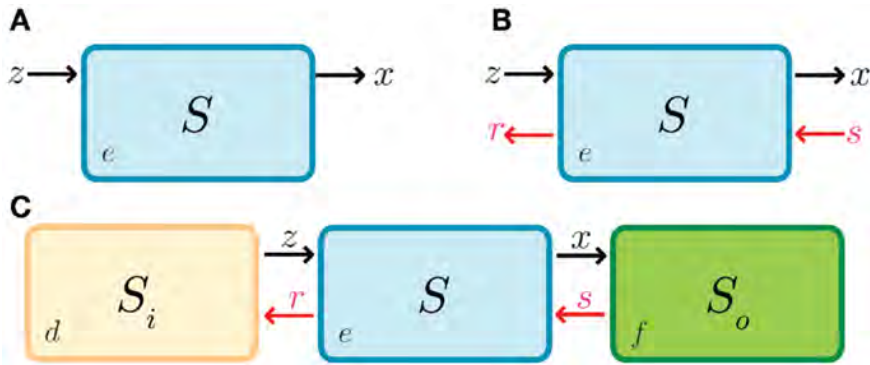
La retroacción y sus efectos han sido estudiados en la literatura desde hace ya bastante tiempo bajo distintos nombres como son efecto de cargas, silenciamiento (denominado *squelching* en inglés) y titulación, entre otros. Tal como comentan el capítulo [19] Del Vecchio, Ninfa y Sontag, en un sentido amplio llamamos retroacción al fenómeno por el cual el comportamiento de un sistema río arriba se modifica al conectarse a un sistema río abajo de la conexión a través de una *salida*. En el mismo capítulo (y en otros textos como [21]) se menciona que la magnitud de dicha retroacción depende de las características de la conexión y del sistema río abajo.

En sistemas biológicos, la retroacción consiste en un “secuestro” de moléculas al utilizar la salida de un sistema como entrada de otro, tal como se muestra en la Figura B1-B.



**Figura 2.** Un módulo biomolecular  $A$ , cuya función es producir un conjunto finito de  $n$  moléculas dado un estímulo. (B) La *salida* de  $A$  está conectada al canal de entrada del segundo módulo que denominamos  $B$ . Esta conexión puede causar un decremento en la señal de salida de  $A$ , sustrayendo  $m$  moléculas de ésta. En el rectángulo negro, incluimos las opciones de degradación, modificación covalente y simple secuestro por asociación. Si el módulo  $B$  cambia considerablemente la señal que proviene del módulo  $A$ , la funcionalidad de  $A$  puede cambiar o incluso perderse.

Podemos pensar el secuestro de moléculas como una señal que viene del módulo río abajo. Esto se puede apreciar en la Figura 3.



**Figura 3.** (A) Representación simbólica del sistema entrada-salida como se muestra en [21] donde no se toma en cuenta la retroacción.  $S$  denota el sistema,  $e$  es el estado interno del sistema,  $z$  es la señal de entrada recibida por el módulo  $S$ , y  $x$  es la señal de salida emitida por  $S$  (la cual en este caso coincide con el estado interno del sistema, *i.e.*,  $e$ ). Las flechas indican la dirección de la señal como en la Figura 2 (la función de  $S$  en aislamiento, consiste en procesar la señal  $z$  para obtener la señal  $x$ ). Esta figura es equiparable a la Figura 2-A donde,  $z$  sería la entrada y  $x$  la salida. (B) Representación de las diferentes señales que puede estar involucradas en  $S$  como resultado de la interconexión; las señales  $r$  y  $s$  corresponden a la retroacción de entrada y de salida, respectivamente. (C) Representación del sistema embebido mostrando en forma explícita los módulos río abajo y río arriba, así como las señales de interconexión ( $d$  y  $f$  denotan el estado interno del sistema  $S_i$  y  $S_o$ , respectivamente). En esta figura,  $S$  sería análogo a A en la Figura 2 con respecto a  $S_o$  y  $S_o$  sería equiparable a B en la Figura 2-B.

### 5.3.1 Posibles funciones de la retroacción

Como ya mencionamos, en [13] se muestra que la retroacción puede tener un papel en promover respuestas ultrasensibles (*i.e.*, sigmoidal) dependiendo de la concentración. Así que, tanto en procesos de diferenciación como en respuestas ambientales, un cambio drástico inducido por la retroacción podría tener implicaciones funcionales tales que permitan o promuevan ese cambio de estado al modificarse el patrón con el cual están siendo regulados los sitios de unión de un TF y cuáles de ellos están disponibles para regularse. El modo en que los sitios podían reducir su disponibilidad es por competencia con otros TFs o proteínas de unión a ADN y por cambios en la estructura de la cromatina en tales sitios. Aunque estas aseveraciones tienen aún un carácter hasta cierto punto especulativo, hay ejemplos biológicos que indican que estas ideas son plausibles, como el caso de MGA1 y PHD1 en el crecimiento de pseudohifas en *Saccharomyces cerevisiae* [11], Id2 y EBF1 que son tanto concentradores como reguladores maestros de la dife-

renciación de células B [49], entre otros ejemplos de reguladores maestros que a su vez son concentradores.

### 5.3.2 *La retroacción en el contexto de la transcripción*

En regulación transcripcional la unión y despegado de un factor transcripcional del promotor o la región operadora en un sistema río abajo compete con otras actividades (mismas que el factor transcripcional libre y capaz de unirse a ADN realiza en la célula en ocasiones incluso dentro de su propio módulo) tal como se ejemplifica con el sistema llamado *Represilador* en [19].

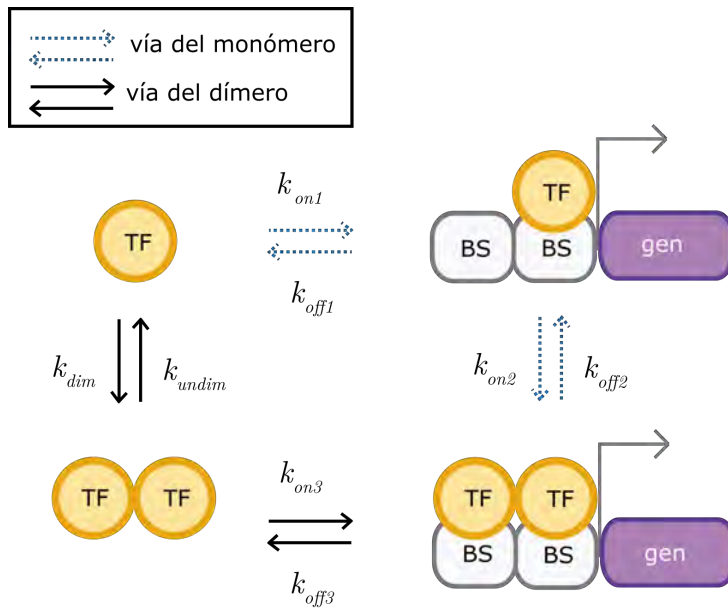
En redes de regulación transcripcional la retroacción, desde la perspectiva del estudio de sistemas dinámicos, es una modificación en la tasa de cambio de la concentración de un factor transcripcional causada por su unión a promotores río abajo. Esta modificación en ocasiones puede percibirse como un decremento en el desempeño del sistema, como en [33]. Ahí, los autores observaron que la presencia de cargas río abajo alenta la respuesta del sistema, lo cual se traduce en que a un determinado tiempo, el sistema con cargas no alcanza el mismo nivel de actividad que el que no tiene cargas río abajo (*i.e* el que está desconectado).

En un trabajo reciente, Del Vecchio y Mou [48] observaron mediante simulaciones y un método analítico que las cargas pueden cambiar la robustez a perturbaciones de parámetros en redes de regulación transcripcional estables. En dicho trabajo analizaron un conmutador (llamado en inglés *toggle switch*), un detector de eventos y un clasificador. Una de sus observaciones más notables es que conforme aumenta el tamaño de un circuito regulatorio, disminuye la robustez a cambios de parámetros ya que hay más pasos con TF involucrados, donde cada uno implica efectos de retroacción.

### 5.3.3 *Mecanismos o vías de transcripción*

Los factores de transcripción se unen a sus blancos a través de diferentes mecanismos. Tales mecanismos (o vías de unión) son los pasos necesarios para formar un complejo entre el factor transcripcional y su sitio de unión para guiar o reprimir el proceso de transcripción río abajo. En algunos trabajos como [10] se aceptan dos mecanismos: La vía del dímero y la del monómero (vea Figura 4). La vía del monómero consiste en la unión secuencial de monómeros al ADN, mientras que la del dímero implica la dimerización del TF antes de su pegado al ADN.

En este trabajo analizamos cuatro mecanismos o vías de unión de factor transcripcional a sus sitios operadores, de los cuales tres están relacionados con dimerización. Estos son dimerización simple, pegado secuencial de monómeros cooperativos y pegado secuencial con dimerización. El otro caso consiste en la unión de un monómero sencillo como se observa en las Figuras 4 y 5.



**Figura 4.** Mecanismos de pegado de un factor transcripcional (también conocidos como vías de pegado). En color amarillo presentamos los factores transcripcionales, en blanco el sitio de pegado u operador y en morado el gen a regular. Las tasas de asociación ( $k_{on}$ ) y disociación ( $k_{off}$ ) se muestran acompañadas de flechas.



### Parte III

## DESARROLLO

Donde se explica y discute el proceso por el que se llevó a cabo este trabajo y sus resultados.





---

 MODELOS
 

---

*En aquel Imperio, el Arte de la Cartografía logró tal Perfección que el Mapa de una sola Provincia ocupaba toda una Ciudad, y el Mapa del Imperio, toda una Provincia. Con el tiempo, estos Mapas Desmesurados no satisficieron y los Colegios de Cartógrafos levantaron un Mapa del Imperio, que tenía el Tamaño del Imperio y coincidía puntualmente con él. Menos Adictas al Estudio de la Cartografía, las Generaciones Siguientes entendieron que ese dilatado Mapa era Inútil y no sin Impiedad lo entregaron a las Inclemencias del Sol y los Inviernos. En los Desiertos del Oeste perduran despedazadas Ruinas del Mapa, habitadas por Animales y por Mendigos; en todo el País no hay otra reliquia de las Disciplinas Geográficas.*

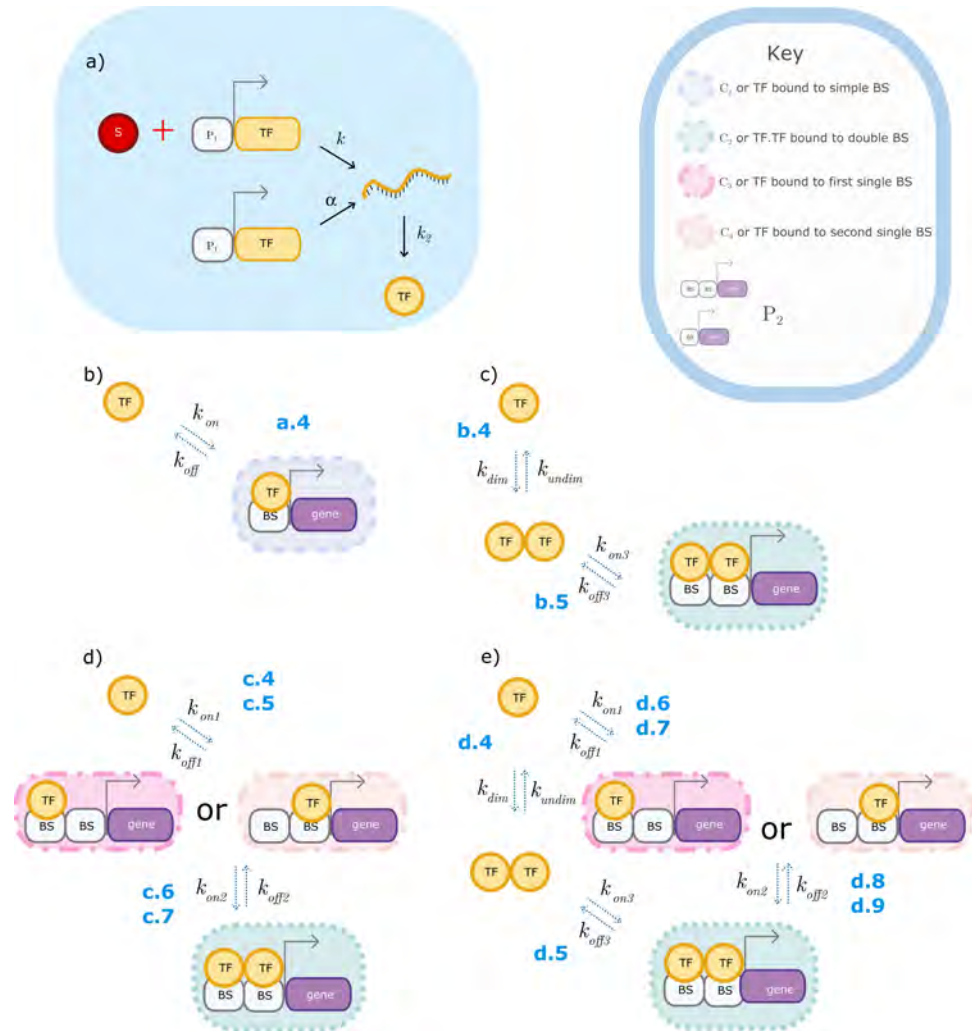
— Suárez Miranda  
 "Viajes de varones prudentes",  
 libro cuarto, cap. XLV, Lérida, 1658.  
 "Del rigor en la ciencia",  
 Jorge Luis Borges



Si nos basamos en cómo operan los sistemas biológicos reales, veremos que la transcripción es un proceso muy complejo donde un gran número de elementos e interacciones están involucrados. Por simplicidad nosotros procuramos elegir aquellos mecanismos de pegado que fueran suficientemente sencillos para que fuera fácil simularlos y suficientemente cercanos a la biología tal que al interrogarlos podamos relacionar nuestros resultados con procesos biológicos conocidos.

En este capítulo describimos los modelos de unión que construimos con base en los mecanismos que podrían ser usados en la naturaleza. Comenzaremos por definir qué es el proceso de unión de factor transcripcional (TFBP) y qué es lo que implica. Después explicaremos las suposiciones generales que comparten todos los modelos que utilizamos y finalmente describiremos a detalle los cuatro diferentes mecanismos utilizados en este trabajo y los parámetros involucrados en ellos (véase Figura 5).

El TFBP involucra un mecanismo de unión (BM), un determinado número de sitios de unión (BS), dependiendo del mecanismo elegido, y un régimen que puede ser débil o fuerte. En las siguientes secciones, nos enfocaremos en las particularidades de cada modelo de BM.



**Figura 5. Mecanismos.** a) Muestra algunos de los supuestos generales compartidos por los cuatro modelos.  $\alpha$  representa la velocidad con la que ocurre la primer reacción en todos los mecanismos,  $k$  es la velocidad de la segunda reacción (transcripción activa) y  $k_2$  la traducción b)-e) Muestran de manera explícita los modelos de los mecanismos a partir de la tercera reacción. Algunas de las reacciones involucradas se indican como en la Subsección 6.3. Las reacciones de degradación fueron excluidas por simplicidad. Nótese que e) es equivalente a Fig. B1.

A continuación damos una explicación detallada de los supuestos para crear los modelos y cómo procedimos a simularlos y analizarlos.

## 6.1 SUPUESTOS GENERALES

En esta sección explicamos a detalle los supuestos compartidos por los cuatro modelos usados para este trabajo. Tales supuestos engloban principalmente la producción de TF y la degradación de múltiples especies moleculares involucradas en estos modelos. Los parámetros que participan en estos supuestos se encuentran en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Modelamos los cuatro mecanismos teniendo los siguientes eventos y supuestos asociados:

1. **Transcripción basal.** Consideramos que hay un nivel basal de transcripción (producción de mRNA, en los modelos mRNA) muy bajo. Tan bajo que prácticamente no puede ser considerado funcional. Este nivel es independiente de cualquier tipo de señal. se da con una tasa  $\alpha$  y sólo requiere de la secuencia que regula el TF (llamada  $P_1$  en los modelos).
2. **Activación de la producción de TF.** Para que la vía de regulación pueda funcionar tiene que estar activa por encima del nivel basal. Nosotros supusimos que hay una señal  $S$  capaz de encender el proceso de transcripción. Siguiendo con la idea de mantener este proceso lo más sencillo posible, decidimos suponer que la transcripción del TF depende linealmente de dicha señal  $S$  y de un parámetro constante  $k$  (la tasa de transcripción guiada por  $S$ , véase Tabla 2). Supusimos que la transcripción del TF depende linealmente de esta señal y de  $P_1$ . Sin embargo, dado que siempre hay una molécula de  $P_1$ , no mostramos  $P_1$  de forma explícita en las ecuaciones diferenciales.
3. **Traducción.** En nuestros modelos, suponemos que la traducción depende linealmente de la concentración de mRNA. El parámetro  $k_2$  es el que guía la transcripción.
4. **Sitios regulatorios río abajo.** En los casos conectados, la unión del TF se logra por medio de cualquiera de los cuatro mecanismos elegidos e involucra la asociación y disociación del FFTF a 300 sitios de unión (BS por sus siglas en inglés) río abajo. Este número se eligió arbitrariamente con base en el número de sitios que regulan TFs concentradores (conocidos como *hubs* en inglés) como CRP y FNR, véase [65] y [46]. En los modelos representamos los sitios río abajo como  $p_{tot2}$ . Para el mecanismo de unión de monómero sencillo (SMB por sus siglas en inglés) esos sitios son sencillos (*i.e.* cada uno involucra un sólo sitio de unión donde solo una molécula de TF se puede unir), mientras que para los otros mecanismos cada sitio involucra dos secuencias. Sin embargo, DB tiene un número de sitios de pegado a SMB, dado que para cada sitio doble sólo se une una sola molécula de FFTF (en

el caso de este mecanismo TF.TF). Para los casos desconectados,  $p_{tot2}$  es igual a 0.

5. **Fuerza de los BS.** Para los casos conectados consideramos dos fuerzas de operadores: una débil, comparable a la de GCN<sub>4</sub>, y una fuerte donde la tasa  $k_{on}$  es dos órdenes de magnitud mayor que para el régimen débil. GCN<sub>4</sub> es un TF de levadura muy bien descrito ([17]). Tiene una velocidad de asociación similar a la atribuida a la difusión. Recientemente, en [28] se determinó que para el represor de lac, un operador fuerte resulta de una tasa de disociación lenta, pero una tasa de asociación similar a la de los casos débiles. Por esta razón decidimos introducir una segunda versión del régimen de pegado fuerte, donde  $k_{off}$  es pequeña.
6. **Degradación.** En este trabajo suponemos que la degradación es lineal e igual para las especies que involucran TF.  $\delta_1$  es la tasa de degradación del FFTF (y otras especies moleculares que contienen TF libre) y  $\delta_3$  es la degradación del FFTF unido al ADN (y otras especies moleculares que contienen TF unido al ADN).
7. **Degradación del mRNA.** En estos modelos, la degradación del mRNA es lineal y más rápida que la de FFTF. La tasa de esta reacción está representada con  $\delta_2$ .

## 6.2 SELECCIÓN DE MECANISMOS

Seleccionamos los mecanismos de pegado con base en su simplicidad y en la evidencia biológica de su existencia en la literatura. Por ejemplo, se sabe que la unión de dímeros ocurre en algunos factores transcripcionales con dominios bZIP (acrónimo de cremallera de Leucina, con sus siglas en inglés que corresponden a *Basic Leucine Zipper*), los cuales están presentes en todos los eucariotes ([45]). Particularmente en *Arabidopsis thaliana*, se ha predicho que los bZIPs tienden a formar sobre todo homodímeros <sup>1</sup>. Otro ejemplo son las proteínas TCP, las cuales requieren la formación de un dímero antes de poder unirse al ADN ([41]). En la Tabla 3, pueden verse algunos ejemplos de procesos biológicos en los que participan distintos mecanismos de pegado.

## 6.3 SUPUESTOS PARTICULARES

Las Figuras 5 y B1 muestran los cuatro mecanismos considerados en este trabajo: SMB, DB, CSB y CSB\_D. El número total de sitios río abajo está dado por el parámetro  $p_{tot2}$ .  $P_2$  es el sitio de unión a FFTF en el ADN compuesto por una secuencia simple (en el mecanismo SMB) o doble (en los mecanismos DB,CSB y CSB\_D) de unión idealmente seguida de una

✦—————✦

<sup>1</sup> Los homodímeros, son complejos formados por la unión de dos proteínas iguales

Parámetro	Descripción	Valor	Fuentes
$\alpha$	Tasa basal de transcripción	0.01 moléculas/min	Menor que la tasa de transcripción del 90 % de los genes según: §.
S	Concentración fija de S	dependiendo del mecanismo	Obtenida por ensayo y error.
k	Tasa de transcripción guiada por S	$\frac{0.09}{50 * \text{moléculas} * \text{min}}$	Tasa máxima para el 90 % de los genes de levadura que producen entre 2.33 y 29.7 mRNAs/hora. §
k <sub>2</sub>	Tasa de traducción	0.8 mRNAs/min	Calculada para un gen arbitrario de cerca de 1000 aa de acuerdo con *.
p <sub>tot2</sub>	Sitios de unión río abajo	0 o 300*	
$\delta$	Tasa de degradación de proteína	0.02 moléculas/min	Considerando una vida media (vm) de 50 min (en levadura la vm de proteína es de 43 min) ‡.
$\delta_2$	Tasa de degradación de mRNA	0.06 moléculas/min	Con base en la (vm) de un mRNA de acuerdo con $\infty$ .
$\delta_3$	Tasa de degradación de especie molecular unida a ADN	0.02 moléculas/min	

Tabla 1: Parámetros involucrados en las suposiciones generales de los modelos.

‡ [8]

$\infty$  [67]

§ [54]

\* [25]

\*En contraste con los otros mecanismos, los 300 BS de SMB son simples (*i.e.* solo involucran una secuencia de unión) mientras que para los otros mecanismos son dobles.

Mecanismo	Valor de S
SMB	11.43
DB	76.3
CSB	11.43
CSBD	13.1

Tabla 2: Valor de entrada (S) para cada mecanismo. El valor de S se calculó por ensayo y error y corresponde a número de moléculas.

Mecanismo	Ejemplo	Ref.
SMB	Sox10 se une al ADN como dímero y como monómero. Hay 719 proteínas que son monómeros funcionales en <i>E.coli</i> .	[53] [61]
DB	Proteínas TCP bZIPs de <i>A.thaliana</i>	[41] [45]
CSB	Sox10 se une al ADN como dímero y como monómero y no ha sido encontrado como dímero en solución. Cabe aclarar que los sitios donde se une como dímero y como monómero son distintos entre sí.	[53]
CSB_D	GCN4 parece ser capaz de unirse tanto como dímero como monómero a los mismos sitios.	[17]

Tabla 3: Mecanismos utilizados en este trabajo y algunos procesos biológicos asociados a ellos.

Parámetro	Valor	Descripción	SMB	DB	CSB	CSB_D
$k_{off}$	$30 * 60 \text{min}^{-1}$	Tasa de disociación	X*			
$k_{on}$	$\frac{(3 * 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 * (10^{23}) * (42 * (10^{-15})))}$	Tasa de asociación	X*			
$k_{dim}$	$\frac{((1.6 * (10.0^7)) * 60.0) \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{((6.022 * (10.0^{23})) * (42.0 * (10.0^{-15})))}$	Tasa de asociación de dímero	X			X
$k_{undim}$	$0.05 * 60 \text{min}^{-1}$	Tasa de disociación de dímero	X			X
$k_{on1}$	$\frac{(5 * 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 * (10^{23}) * (42 * (10^{-15})))}$	Tasa de asociación del primer monómero sencillo		X		X
$k_{off1}$	$50 * 60 \text{min}^{-1}$	Tasa de disociación del primer monómero sencillo		X		X
$k_{on2}$	$\frac{(5 * 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 * (10^{23}) * (42 * (10^{-15})))}$	Tasa de asociación del segundo monómero sencillo		X		X
$k_{off2}$	$0.03 * 60 \text{min}^{-1}$	Tasa de disociación del segundo monómero sencillo		X		X
$k_{on3}$	$\frac{(3 * 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 * (10^{23}) * (42 * (10^{-15})))}$	Tasa de asociación de dímero con ADN	X			X
$k_{off3}$	$30 * 60 \text{min}^{-1}$	Tasa de disociación del dímero del ADN	X			X
$k_{on3_2}$	10	Tasa de activación de dímero unido a ADN	X			X
$k_{off3_2}$	0.1	Tasa de inactivación de dímero unido a ADN	X			X

Tabla 4: Parámetros particulares involucrados en los modelos de mecanismos.

Todos estos parámetros se obtuvieron de: [17]

\*Para SMB consideramos que las tasas de asociación y disociación son las mismas que para el dímero en DB y CSB\_D. Lo hicimos así porque pensamos que cuando el monómero es la principal especie regulatoria, tiene sentido que estos parámetros sean equivalentes



secuencia codificante. El valor total del número de sitios río abajo es  $p_{tot2} = 0$  para los casos desconectados y  $p_{tot2} = 300$  para los conectados, a menos que se especifique de otro modo (en la Subsección 8.1.1 evaluamos varios valores de  $p_{tot2}$ ).  $C_1$  es el complejo formado por la asociación de TF a un BS río abajo para el mecanismo SMB.  $C_2$  es el complejo formado por el dímero de TF (TF.TF) y un BS doble en el mecanismo DB.  $C_3$  y  $C_4$  son los complejos formados por la unión a la primera o segunda (respectivamente) secuencia de unión de un BS doble de un monómero de TF cooperativo tanto en CSB como en CSB\_D (véase Fig. B1).

Así mismo, consideramos que ambas secuencias de unión en cada BS libre ( $p_2$ ) son indistinguibles la una de la otra y las tasas de unión para cualquiera de ellas son las mismas.

Consideramos tres regímenes: uno débil y dos fuertes. Para régimen de unión débil usamos los valores de tasas de asociación y disociación en la Tabla 4. Para los regímenes de unión fuerte, primero exploramos un régimen donde las tasas de asociación de los dímeros fueran dos órdenes de magnitud mayores que en el régimen débil y la tasa de asociación de los monómeros en los casos secuenciales (tanto el primer como el segundo monómero en unirse en los mecanismos CSB y CSB\_D) fueran un orden de magnitud mayor que sus contrapartes en el régimen débil. La excepción es SMB, donde se aumentó dos órdenes de magnitud  $k_{on}$  y, a este régimen, lo llamamos strong 100kon. El segundo régimen fuerte involucra modificar las tasas de disociación, con lo que consideramos que las tasas de disociación del ADN para dímeros en este régimen es dos órdenes de magnitud más pequeña que en el régimen débil y que la tasa de disociación de monómeros (sin importar si fue el primero segundo en unirse al sitio) son un orden de magnitud más pequeñas que para el régimen débil. De nuevo SMB es la excepción, en la cual la tasa de disociación se considera dos órdenes de magnitud menor que en el régimen débil. A este régimen fuerte lo llamamos strong koff/100.

Analizamos cada uno de estos mecanismos usando simulaciones deterministas y estocásticas. Antes de simular los mecanismos, construimos modelos basados en reglas de BioNetGen y ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs).

### 6.3.1 Primer mecanismo: pegado de monómero sencillo o SMB (Simple monomer binding)

En SMB, el de pegado simple de un monómero, consideramos que sólo se requiere de la unión de una molécula de TF a cada uno de los BSs para promover o reprimir la transcripción (véase Figura 5-b).

En SMB un TF monomérico, usando las tasas de asociación y disociación de GCN4 es capaz de unirse a un sitio coognado hipotético en el ADN ([17]).

Utilizamos los parámetros del factor transcripcional GCN4, por estar muy bien estudiado y caracterizado. Sus parámetros pueden observarse en la

Tabla 5 y en la Tabla 4. Es similar al modelo descrito por Keller en [37] utilizando autorregulación. Escogimos los parámetros de este TF debido a que ha sido muy estudiado.

Dado que los parámetros originales para la asociación de dímero y monómeros de GCN4 son muy similares, y dados los rangos naturales que existen para estos parámetros (véase Tabla 5), decidimos incluir distintos valores de asociación y disociación para establecer regímenes equivalentes a promotores fuertes.

En algunos casos, como práctica estándar, se modela la unión de un TF como una reacción tipo Michaelis-Menten o como un proceso de Hill. La primera se parece en comportamiento a nuestro modelo de pegado de monómero sencillo. Incluir este mecanismo (pegado de monómero sencillo) puede ayudarnos a entender como el suponer un comportamiento como una cinética de Michaelis-Menten puede afectar dinámicamente el resultado cuando el proceso de unión es más complejo en realidad. Tampoco hay que perder de vista que sí hay sistemas naturales donde el TF puede actuar como monómero (Véase Tabla 3).

Las reacciones que involucra este mecanismo son:



Esta reacción representa el primer supuesto en la sección 6.1, denotando la transcripción basal guiada por el parámetro  $\alpha$ .



La reacción a.2 muestra el segundo supuesto en la sección 6.1, que involucra la transcripción guiada por una señal externa  $S$ .



Esta reacción corresponde al tercer supuesto en la sección 6.1, donde establecimos que para estos modelos, la traducción del mRNA de los TF's mRNA depende linealmente de la concentración de mRNA. La tasa con la que se da esta reacción es denotada por el parámetro  $k_2$ .



El supuesto (a.4) es exclusivo del mecanismo SMB. En esta reacción denotamos la unión de un sólo monómero a los BS's libres ( $P_2$ ). Como ya se mencionó, el número total de esos sitios es 300. Para este mecanismo dichos BS tienen sólo una secuencia de unión cada uno.



TF	Asociación	Disociación	Comentarios	Fuente
GCN4	$\frac{(5 \cdot 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	3000min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del primer monómero de GCN4	[17]
GCN4	$\frac{(5 \cdot 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	1.8min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del segundo monómero de GCN4	[17]
GCN4	$\frac{(3 \cdot 10^8) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	1800min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del dímero de GCN4	[17]
CI	$\frac{(3 \cdot 10^6) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	2.454min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del dímero de CI a secuencias de 78nt	[66]
CI	$\frac{(2 \cdot 10^5) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	0.24min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del dímero de CI a secuencias de 500nt	[66]
LexA	$\frac{(25 \cdot 10^6) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	3.48min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del dímero LexA al promotor de recA	[43]
LexA	$\frac{(25 \cdot 10^6) 60 \text{moléculas}^{-1} \text{min}^{-1}}{(6.022 \cdot (10^{23}) \cdot (42 \cdot (10^{-15})))}$	11.4min <sup>-1</sup>	Asociación y disociación del dímero LexA al promotor de yebG	[43]

Tabla 5: Tasas de asociación y disociación

El supuesto (a.5) se refiere al 7<sup>mo</sup> supuesto de la sección 6.1, donde establecimos que para estos modelos la degradación de mRNA es lineal y más rápida que la de proteínas.



La reacción a.6, se basa en el sexto supuesto de la subsección 6.1, donde supusimos que la degradación es lineal e igual para todas las especies moleculares que tienen TF. La tasa de degradación, que sólo depende de la concentración de TF, es  $\delta\text{TF}$ .



a.7, tal como a.6 se basa en el sexto supuesto de la subsección 6.1.

$$p_{\text{tot}2} = \text{P}_2 + \text{C}_1 \quad (\text{a.8})$$

En a.8 incluimos una igualdad que implica la conservación de los sitios de unión ( $p_{\text{tot}2}$ ), que están compuestos de libres ( $\text{P}_2$ ) y de complejos (formados entre especies moleculares de TF y ADN, en este mecanismo denominados  $\text{C}_1$ ). Mostramos dicha igualdad para denotar que la usaremos para simplificar nuestras EDOs derivadas de las ecuaciones químicas.

Las EDOs derivadas de las ecuaciones químicas son::

$$\frac{d\text{TF}}{dt} = k_2\text{mRNA} + k_{\text{off}}\text{C}_1 - k_{\text{on}}(p_{\text{tot}2} - \text{C}_1)\text{TF} - \delta\text{TF} \quad (1)$$

$$\frac{d\text{mRNA}}{dt} = \alpha + k\text{S} - \delta_2\text{mRNA} \quad (2)$$

$$\frac{d\text{C}_1}{dt} = k_{\text{on}}(p_{\text{tot}2} - \text{C}_1)\text{TF} - k_{\text{off}}\text{C}_1 - \delta_3\text{C}_1 \quad (3)$$

### 6.3.2 Segundo mecanismo: pegado de dímero (DB)

Se ha reportado que para diversos TFs, se requiere que estos formen un oligómero antes de afectar activamente la transcripción, como en [62]. Tal oligomerización puede implicar la formación de diferentes oligómeros como un homodímero, tetrámero, etc. En nuestro modelo usamos la versión más sencilla posible suponiendo que la homodimerización es requerida antes de unirse al ADN. Entre nuestros supuestos para este modelo están:

- El dímero y el complejo de ADN con dímero se degradan a la misma tasa que el TF libre.
- La dimerización debe darse antes de la unión al ADN con las tasas propuestas en [17] (véase el apéndice para una descripción completa de los parámetros usados en este trabajo).

- Una vez que se formó el dímero, este se une y disocia del ADN como un proceso simple de asociación/disociación.
- El complejo formado for TF.TF y el ADN sufre una estabilización posterior a la asociación del dímero con el ADN. Esto quiere decir que su proceso de asociación y disociación se vuelve menos frecuente y tiende a permanecer unido.
- El complejo formado for TF.TF y el ADN es llamado  $C_{2_2}$  cuando aún no es estable y  $C_2$  cuando se ha vuelto estable.

Las reacciones involucradas en este mecanismo se derivan de los mismos supuestos que el modelo de SMB a menos que aclaremos alguna diferencia. Las reacciones involucradas son:



La reacción [b.3](#) corresponde al tercer supuesto en la sección [6.1](#), donde establecimos que la traducción del mRNA del TF es lineal y depende de la concentración de mRNA. La velocidad de esta reacción es  $k_2 \text{mRNA}$ .



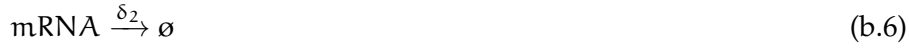
La reacción [b.4](#) corresponde a una particularidad de este mecanismo que implica tener que formar dímeros antes de asociarse al ADN.



La reacción [b.5](#) involucra el proceso reversible de unión del dímero de TF (TF.TF) al DNA para formar el complejo  $C_2$  con una tasa de asociación  $k_{\text{on3}}$  y su subsecuente disociación con la tasa  $k_{\text{off3}}$ . Aquí también consideramos 300 BS cada una con dos sitios, lo cual permita que un dímero se una o separe al ADN.



La reacción [b.6](#) involucra la estabilización del complejo  $C_{2_2}$  en el ADN a través de la tasa  $k_{\text{on3}_2}$  y su desestabilización con la tasa  $k_{\text{off3}_2}$  como un proceso reversible.



En la reacción [b.10](#), incluimos a  $\text{C}_2$  como parte de  $\text{ptot}_2$  que en este caso es el complejo formado por el dímero  $\text{TF.TF}$  y el sitio de unión.

Las EDOs derivadas de las ecuaciones químicas son:

$$\frac{d\text{TF}}{dt} = k_2\text{mRNA} - 2k_{\text{dim}}\text{TF}^2 + 2k_{\text{undim}}\text{TF.TF} - \delta\text{TF} \quad (4)$$

$$\frac{d\text{mRNA}}{dt} = \alpha + k_S - \delta_2\text{mRNA} \quad (5)$$

$$\frac{d\text{TF.TF}}{dt} = k_{\text{dim}}\text{TF}^2 - k_{\text{undim}}\text{TF.TF} + k_{\text{off3}}\text{C}_2 - k_{\text{on3}}\text{TF.TF}(\text{ptot}_2 - \text{C}_2) - \delta\text{TF.TF} \quad (6)$$

$$\frac{d\text{C}_2}{dt} = k_{\text{on3}}\text{TF.TF}(\text{ptot}_2 - \text{C}_2) - k_{\text{off3}}\text{C}_2 - \delta_3\text{C}_2 \quad (7)$$

Queremos hacer énfasis en que no incluimos de manera explícita  $\text{P}_1$ , ya que estamos suponiendo que sólo hay un sitio en el genoma donde se puede producir TF.

### 6.3.3 Tercer caso: Pegado secuencial cooperativo (CSB).

En este mecanismo supusimos que dos monómeros deben unirse al ADN y que lo hacen en pasos separados y secuenciales. Una vez que se une el primero, es mucho más fácil que se una el segundo (*i.e.* la  $k_d$  del segundo TF en unirse es más pequeña que la del que se unió primero). Esto quiere decir que, de acuerdo a nuestros supuestos, el primer monómero en unirse, sin importar el sitio, lo hace con una tasa de disociación fija que es mucho mayor a la usada por el segundo monómero cooperativo (véanse [Tabla 4](#) y [Figura 5](#)).

Para este mecanismo, el FFTF corresponde al monómero de TF. CSB tiene tres posibilidades para que el TF se una a los sitios río abajo. La primera consiste en unirse al primer BS en un sitio determinados. Al complejo ADN-TF que se forma cuando esto pasa lo llamaremos  $C_3$ . La segunda posibilidad es unir el TF al segundo BS del sitio. Cuando esto suceda, llamaremos al complejo  $C_4$ . Tanto  $C_3$  como  $C_4$  se unen y disocian con las mismas tasas. Al tercer complejo lo llamamos  $C_2$  y sólo se forma cuando, una vez que el primer monómero se unió al BS — sin importar si el complejo formado es  $C_3$  o  $C_4$ — un segundo monómero se une en el BS libre de este sitio.

Las reacciones involucradas en este mecanismo son:



Aquí también consideramos 300 BS, cada uno de los cuales tiene dos subsitios o secuencias lo cual permite que un total de dos moléculas puedan unirse por cada sitio.



$C_3$  y  $C_4$  representan el TF unido a una de las dos secuencias posibles que hay en cada BS. Por simplicidad, consideramos que la unión a cualquiera de las dos secuencias sucede de la misma forma y con los mismos parámetros.



Tal como en las reacciones de unión del primer monómero (c.4 y c.5), consideramos que sin importar cuál de los sitios está libre, el segundo monómero siempre se asocia y disocia con las mismas tasas ( $k_{\text{on}2}$  y  $k_{\text{off}2}$ , respectivamente). Sin embargo, la tasa de unión del primer monómero es

diferente de la del segundo. Asimismo, sus tasas de disociación son diferentes entre sí.



$$\text{ptot}_2 = \text{P}_2 + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4 \quad (\text{c.13})$$

$$\text{P}_2 = \text{ptot}_2 - (\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4) \quad (\text{c.14})$$

Las EDOs obtenidas a partir de las ecuaciones químicas son:

$$\begin{aligned} \frac{d\text{TF}}{dt} = & k_2 \text{mRNA} - 2k_{\text{on}1} \text{TF}(\text{ptot}_2 - (\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4)) \\ & + k_{\text{off}1} (\text{C}_3 + \text{C}_4) - k_{\text{on}2} \text{TF}(\text{C}_3 + \text{C}_4) + 2k_{\text{off}2} \text{C}_2 - \delta \text{TF} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\frac{d\text{mRNA}}{dt} = \alpha + k\text{S} - \delta_2 \text{mRNA} \quad (9)$$

$$\frac{d\text{C}_2}{dt} = k_{\text{on}2} \text{TF}(\text{C}_3 + \text{C}_4) - 2k_{\text{off}2} \text{C}_2 - \delta_3 \text{C}_2 \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\text{C}_3}{dt} = & k_{\text{on}1} \text{TF}(\text{ptot}_2 - (\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4)) - k_{\text{off}1} \text{C}_3 - k_{\text{on}2} \text{TF} \text{C}_3 + \\ & k_{\text{off}2} \text{C}_2 - \delta_3 \text{C}_3 \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\text{C}_4}{dt} = & k_{\text{on}1} \text{TF}(\text{ptot}_2 - (\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4)) - k_{\text{off}1} \text{C}_4 - k_{\text{on}2} \text{TF} \text{C}_4 + \\ & k_{\text{off}2} \text{C}_2 - \delta_3 \text{C}_4 \end{aligned} \quad (12)$$



6.3.4 *Cuarto caso: Pegado secuencial de monómeros cooperativos y dimerización (CSBD).*

Hasta este punto hemos supuesto que tanto el dímero como el monómero se unen con los mismos parámetros. Sin embargo, los supuestos en [38] para dimerización con unión de monómeros incluye pegado heterogéneo del dímero y el monómero, donde los dímeros tienden a unirse más rápido que los monómeros. En este trabajo supusimos que el primer monómero en unirse, al igual que para el caso CSB, lo hace con una tasa de disociación fija que es diferente a la usada por el segundo monómero cooperativo y a la usada por el dímero. Usamos las tasas propuestas en [17] para el régimen que involucra pegado débil de monómero y dímero.

Dado que el regimen de pegado débil provee un ejemplo donde el dímero y el monómero se unen a su operador con una fuerza muy similar, exploremos qué sucedería al suponer que el dímero debiera unirse más rápido que el monómero para el régimen de asociación fuerte. En este régimen, la tasa de pegado para para dímeros es dos órdenes de magnitud mayor que en el caso débil y la tasa de asociación para monómeros es un orden de magnitud mayor.

Las reacciones que participan en este mecanismo son:



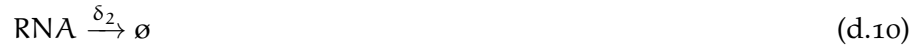
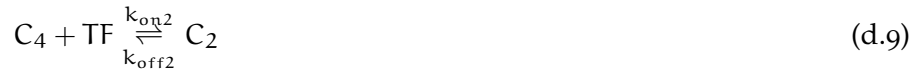
En la reacción [d.5](#) también consideramos 300 BS. Cada una tiene dos subsitios o secuencias, así un total de dos monómeros o un dímero pueden estar unidos en cada sitio.



$C_{22}$  es estabilizado en forma reversible en la reacción [b.6](#) así como en el mecanismo DB.



En la reacción d.7 tal como en CSB, ambas formas en las que se puede unir el primer monómero a un sitios de unión se consideran equivalentes.



$$p_{tot2} = P_2 + C_2 + C_3 + C_4 \quad (d.16)$$

$$P_2 = p_{tot2} - (C_2 + C_3 + C_4) \quad (d.17)$$

Las EDOs derivadas de las ecuaciones químicas son:

$$\begin{aligned} \frac{dTF}{dt} = & k_2 \text{mRNA} - 2k_{\text{dim}} TF^2 + 2k_{\text{undim}} TF.TF - 2k_{\text{on1}} TF(\text{ptot}_2 - \\ & (C_2 + C_3 + C_4)) + k_{\text{off1}}(C_3 + C_4) - k_{\text{on2}} TF(C_3 + C_4) + \\ & 2k_{\text{off2}} C_2 - \delta TF \end{aligned} \quad (13)$$

$$\frac{d\text{mRNA}}{dt} = \alpha + kS - \delta_2 \text{mRNA} \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \frac{dTF.TF}{dt} = & k_{\text{dim}} TF^2 - k_{\text{undim}} TF.TF + k_{\text{off3}} C_2 - k_{\text{on3}}(\text{ptot}_2 - (C_2 + C_3 \\ & + C_4))TF.TF - \delta TF.TF \end{aligned} \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_2}{dt} = & k_{\text{on2}} TF(C_3 + C_4) - 2k_{\text{off2}} C_2 - k_{\text{off3}} C_2 + k_{\text{on3}}(\text{ptot}_2 - \\ & (C_2 + C_3 + C_4))TF.TF - \delta_3 C_2 \end{aligned} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_3}{dt} = & k_{\text{on1}} TF(\text{ptot}_2 - (C_2 + C_3 + C_4)) - k_{\text{off1}} C_3 - k_{\text{on2}} TFC_3 \\ & + k_{\text{off2}} C_2 - \delta_3 C_3 \end{aligned} \quad (17)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_4}{dt} = & k_{\text{on1}} TF(\text{ptot}_2 - (C_2 + C_3 + C_4)) - k_{\text{off1}} C_4 - k_{\text{on2}} TFC_4 \\ & + k_{\text{off2}} C_2 - \delta_3 C_4 \end{aligned} \quad (18)$$

## MÉTODOS

*We have seen that computer programming is an art, because it applies accumulated knowledge to the world, because it requires skill and ingenuity, and especially because it produces objects of beauty.*<sup>1</sup>

— Donald E. Knuth [40]

*Dente lupus, cornu taurus petit.*<sup>2</sup>

— Dominio Popular



SIEMPRE que modelamos tenemos que simplificar para lograr captar un pequeño grano en la playa de arena que es la complejidad del mundo. Aquí, con el fin de analizar los mecanismos de regulación que mencionamos en el marco teórico y que explicamos exhaustivamente en el Capítulo 6, utilizamos modelos de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDOs) y modelos basados en reglas.

Describimos brevemente cómo evaluamos y comparamos el impacto de la retroacción entre el caso conectado y desconectado para cada mecanismo en cada régimen. Primero, explicamos cómo derivamos el valor de entrada  $S$  para cada mecanismo. Después damos una descripción general de cómo hicimos las simulaciones deterministas y estocásticas, donde estudiamos los efectos de la retroacción al simular el cambio en las moléculas de FFTF en el tiempo en cada TFBP.

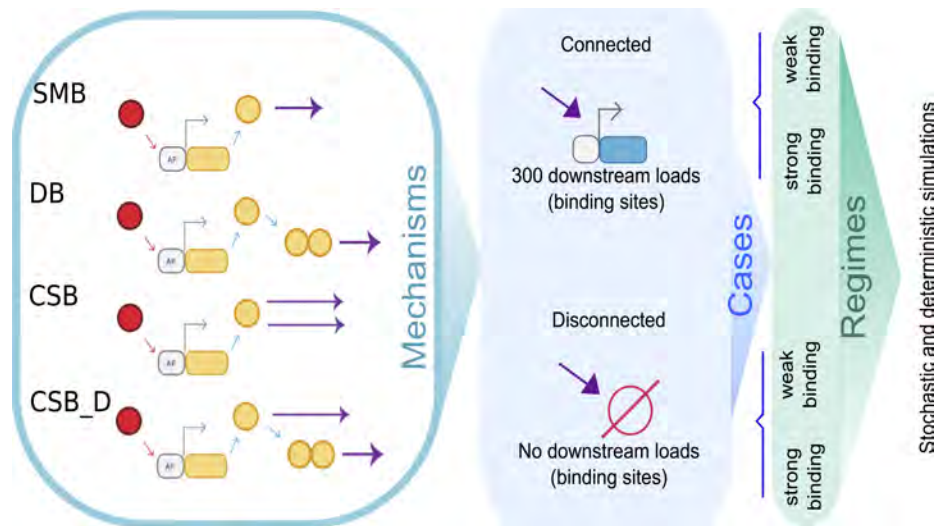
A continuación damos una explicación detallada de los supuestos para crear los modelos y cómo procedimos a simularlos y analizarlos.

7.1 CÁLCULO DE  $S$ 

Calculamos la señal de entrada  $S$  necesaria para alcanzar un  $SS$  (estado estacionario por sus siglas en inglés) de 20.38 moléculas de FFTF para cada



- <sup>1</sup> La programación es un arte, porque aplica todo el cúmulo de conocimientos del mundo, porque requiere habilidad e ingenuidad y, especialmente, porque aquello que produce es bello (traducción de la autora de esta tesis).
- <sup>2</sup> El lobo ataca con los dientes y el toro con los cuernos. Probablemente la frase más cercana en la lengua española sea: Cada quien se rasca como puede.



**Figura 6.** Procesos y mecanismos analizados en este trabajo.

mecanismo por ensayo y error usando el paquete ‘rootSolve’ de R ([58],[57]) para calcular el SS. El hecho de haber usado un número no discreto de moléculas obedece a que el primer acercamiento a este problema estuvo basado en trabajos de Ajo- Franklin [3] donde se utilizaban cantidades continuas.

## 7.2 SIMULACIONES DETERMINISTAS

Simulamos los modelos de ecuaciones diferenciales (EDO’s) utilizando el módulo odeint de Python, el cual a su vez usa LSODA de la librería de FORTRAN ODEPACK. LSODA es un solucionador (conocido en inglés como *solver*) de ecuaciones diferenciales de coeficientes variables y valores reales. Provee un cambio automático de método entre el método implícito de Adams (para problemas no rígidos o no Stiff) y un método basado en fórmulas de diferenciación hacia atrás para problemas rígidos (conocidas en inglés como *backward differentiation formulas for stiff problems*). <http://www.netlib.org/odepack>.

Antes de proceder a simularlos, rectificamos los modelos utilizando las simulaciones de sus contrapartes basadas en reglas modeladas con BioNetGen ([22]), el cual implementa el solucionador c-vode. En ambos casos utilizamos un tiempo de simulación de 1440 minutos. En Python usamos un intervalo de tiempo de 0.01 minutos y en BioNetGen de un minuto. A pesar de la diferencia en el intervalo, no se observó diferencia entre ambas simulaciones cuando los modelos eran equivalentes. Nuestros modelos de BioNetGen pueden observarse en el apéndice.

### 7.2.1 Cálculo del Estado estacionario (SS)

Usamos el paquete de R ‘rootsolve’ ([58], [57]) para calcular el SS del FFTF en cada modelo de ODEs bajo el método de Newton-Raphson o bien

corriendo la simulación hasta alcanzar el SS. Una vez que obtuvimos los valores de SS para los casos conectado y desconectado usamos la distancia de Canberra para medir la diferencia entre ambos casos. Dado que sólo medimos la distancia entre dos puntos (los SS), la medida va de 0 a 1. La distancia de Canberra se calculó de la siguiente forma:  $d(p, q) = \frac{|p-q|}{|p|+|q|}$ . Entre más similares son los SS, más cercana es la medida a 0, entre más diferentes, más cercana es a 1.

Usamos la función ‘Solve’ de Mathematica para calcular el SS de DB y SMB usando diferentes valores de parámetros para evaluar los efectos de los parámetros de manera independiente a los efectos de retroacción.

### 7.2.2 Degradación no lineal

Usamos simulaciones deterministas para analizar casos donde la degradación de especies moleculares con TF unido a ADN sea mucho menor que la de las especies que incluyen TF libre. Simulamos cada uno de los mecanismos suponiendo distintas tasas de degradación de la especie de TF unida al ADN en un rango que va de 0 a dos veces la tasa de degradación del TF libre en incrementos de 0.25 en 0.25.

## 7.3 SIMULACIONES ESTOCÁSTICAS

Utilizamos el algoritmo de simulación estocástica (SSA por sus siglas en inglés) de BioNetGen<sup>3</sup> para simular la versión estocástica de nuestro sistema. Para esto, tomamos una muestra del número de moléculas de FFTF cada medio minuto durante 1440 minutos, usando los mismos modelos basados en reglas que en las simulaciones deterministas (véase Apéndice). Decidimos usar 0.5 minutos como intervalo de muestreo por practicidad, ya que las simulaciones se volvían considerablemente lentas al usar 0.1 min como tiempo de muestreo. Es importante notar que, sin importar el tiempo de muestreo que hayamos elegido, el tamaño del intervalo de tiempo se escoge estocásticamente para SSA en cada iteración ([26]). Simulamos cada mecanismo (SMB, DB, CSB y CSB\_D) en cada caso (conectado con 300 sitios río abajo y desconectado) mil veces para producir ensambles.

Las secuencias de comandos (en inglés *scripts*) para generar los gráficos están en el apéndice y en esta liga de github<sup>4</sup>: [https://github.com/LiberPH/Retroactivity\\_mechanisms\\_transcription\\_secret](https://github.com/LiberPH/Retroactivity_mechanisms_transcription_secret).

Calculamos el estadístico D (desviación vertical máxima) usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov (referida en [35]) para dar soporte estadístico a las diferencias observadas entre las distribuciones de los ensambles de simulaciones estocásticas. El estadístico D es usado como una medida de

<sup>3</sup> BioNetGen es un lenguaje que permite programar modelos moleculares basados en reglas, lo cual involucra la representación de moléculas como objetos estructurados y la de las interacciones entre ellas como reglas para transformar los atributos de tales objetos [22].

<sup>4</sup> Github es una plataforma basada en internet para crear y compartir código con control de versiones. Permite trabajar en colaboración en un mismo proyecto [1].

disimilitud al calcular la diferencia máxima entre dos distribuciones comparadas. Los gráficos correspondientes a este estadístico se encuentran en el apéndice.

Los coeficientes de variación en cada tiempo fueron calculados de la siguiente forma:  $CV_t = \frac{\sigma_t}{\mu_t}$ . Donde  $CV_t$  representa el coeficiente de variación al tiempo  $t$ ,  $\mu_t$  es la media del ensamble de simulaciones al tiempo  $t$ , y  $\sigma_t$  es la desviación estándar de las simulaciones al tiempo  $t$ . Se calculó el área bajo cada curva de cada CV del FFTF (conectada y desconectada) para enfatizar la diferencia entre el caso conectado y desconectado (Fig. 18).

---

## RESULTADOS

---

**E**N esta sección se enlistan y discuten los resultados obtenidos con la metodología previamente descrita. Primero se comentan los resultados para las simulaciones deterministas (Sección 8.1) y después para las simulaciones estocásticas 8.2.

Utilizamos simulaciones deterministas para analizar cómo el FFTF cambia ante la interconexión dependiendo del mecanismo utilizado. Después usamos simulaciones estocásticas para analizar cómo la variación de FFTF cambia ante la interconexión de elementos río abajo dependiendo del mecanismo de pegado usando como medida el coeficiente de variación (CV).

En la Subsección 8.1.1 de la parte determinista estudiamos cómo distintos parámetros influyen en los efectos de retroacción para cada mecanismo de pegado en el estado estacionario.

Consideramos que si las diferencias entre el SS (estado estacionario) del FFTF del caso conectado y desconectado son muy cercanas a cero (y por tanto el cociente entre ellas muy cercano a uno), entonces los efectos de retroacción son muy pequeños (prácticamente despreciables) con lo cual la dinámica del caso conectado se comporta prácticamente igual que el caso desconectado. De igual modo, si las diferencias son grandes (mucho mayores a cero y por lo tanto los cocientes del caso desconectado entre el conectado lejanos a uno), entonces los efectos de la retroacción también lo serán, modificando apreciablemente la dinámica del sistema conectado con respecto a la del desconectado.

En la subsección 8.1.2 analizamos el impacto de la degradación de los complejos TF-DNA a través de todas las simulaciones deterministas de cada uno de los mecanismos. Decidimos hacer este análisis debido a la fuerte discusión que existe en la literatura sobre el papel de los BS como sitios protectores de TF, lo cual minimizaría los efectos de retroacción.

Después de eso, en la Subsección 8.1.3.1, con un subconjunto de parámetros, hicimos simulaciones deterministas de cada uno de los mecanismos en cada uno de los regímenes de pegado para mostrar cómo el número de moléculas de FFTF no sólo cambia en el SS, sino que también a través de toda la simulación.

Comparamos los cocientes entre FFTF conectado y desconectado en el régimen débil. Después, en la Subsección 8.1.3.2 comparamos el cociente



de las simulaciones deterministas desconectadas entre las conectadas en dos regímenes de unión fuerte:  $100k_{on}$  y  $k_{off}/100$ .

Aún si agregar dos órdenes de magnitud a  $k_{on}$  para hacer la  $k_d$  más pequeña (y por tanto el operador más fuerte) puede parecer intuitivo, un trabajo reciente ([28]), indica que los operadores fuertes tienden a tener una  $k_{off}$  más lenta en lugar de una  $k_{on}$  más rápida. Esto parece confirmarse por un estudio donde dos formas de complejo entre el TF Sox10 y su sitio cognado en el DNA (uno donde el TF es monomérico y otro donde es dimérico) no mostró diferencia en la  $k_{on}$ . Sin embargo, Sox10 tiene una menor tasa de disociación para los sitios donde se une cooperativamente como dímero con respecto a los sitios donde se une como monómero [53].

Dadas las razones anteriores, incluimos un segundo régimen fuerte donde  $k_{off}$  es dos órdenes de magnitud más pequeña que el parámetro para GCN4.

En las Subsecciones 8.2.2 y 8.2.2, con el objetivo de establecer una relación entre el cambio en el número de moléculas de FFTF y el cambio en su variabilidad tras la interconexión, analizamos la contraparte estocástica de las simulaciones deterministas (Subsecciones 8.1.3.1 y 8.1.3.2).

## 8.1 APROXIMACIONES DETERMINISTAS

Seguimos una aproximación determinista para encontrar cómo cambia el número de FFTF con la conexión dependiendo del mecanismo de unión. Para detectar un cambio general e importante, evaluamos la diferencia entre los SS del caso conectado y el desconectado (Subsección 8.1.1). Para evaluar un cambio en la dinámica (retardos, ultrasensibilidad, etc) usamos simulaciones de EDOs (Subsecciones 8.1.2, 8.1.3.1, 8.1.3.2)

### 8.1.1 Comparaciones en el estado estacionario (SS) con distintos parámetros

Para encontrar la relevancia de distintos parámetros en los efectos de retroacción dependiendo del mecanismo, evaluamos la diferencia entre los SS de las moléculas de FFTF en el caso conectado y desconectado para cada mecanismo.

Evaluamos la influencia de las tasas de asociación y disociación ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ , respectivamente), la degradación de TF ( $\delta$ ), la degradación de mRNA ( $\delta_2$ ), cargas río abajo o sitios de unión ( $p_{tot2}$ ), y la señal de entrada  $S$  para los cuatro mecanismos.

En este análisis quisimos explorar si un parámetro determinado tiene más influencia que otros en los efectos de retroacción en un mecanismo particular en el SS y si hay alguna tendencia global entre mecanismos. Con lo anterior queremos decir que un mecanismo siempre sea sensible o resistente a los efectos de retroacción sin importar los efectos en los cambios de parámetros.

Hicimos cinco comparaciones principales de parámetros:  $k_{on}$  vs  $k_{off}$  (Figura. 7),  $\delta_1$  vs  $\delta_2$  (Figura.8),  $p_{tot2}$  vs  $\delta_1$  (Figura.9),  $p_{tot2}$  vs  $\delta_2$  (Figura.10), y  $p_{tot2}$  vs  $S$  (Figura.12).

Usamos la distancia de Canberra para medir las diferencias entre los casos conectados y desconectados, entre más cercano es a cero su valor, más similares son los SS. Entre más cercano a uno, mayores son sus diferencias (véase el Capítulo 7).

Evaluamos la interacción entre los parámetros  $k_{on}$  y  $k_{off}$  (Figura 7), que se sabe tienen influencia en los efectos de retroacción, para hallar si en alguno de los mecanismos el SS de FFTF exhibía diferencias en la tendencia de cambio causadas por la interconexión.

DB es el mecanismo donde los parámetros hicieron una gran diferencia, seguido de CSB\_D. SMB fue el mecanismo para el cual el cambio del valor de SS de FFTF fue menos recurrente (se mantuvo para un mayor conjunto de parámetros). Sólo un pequeño grupo de  $k_{on}$ s grandes y  $k_{off}$ s pequeñas tuvieron un cambio importante en SMB.

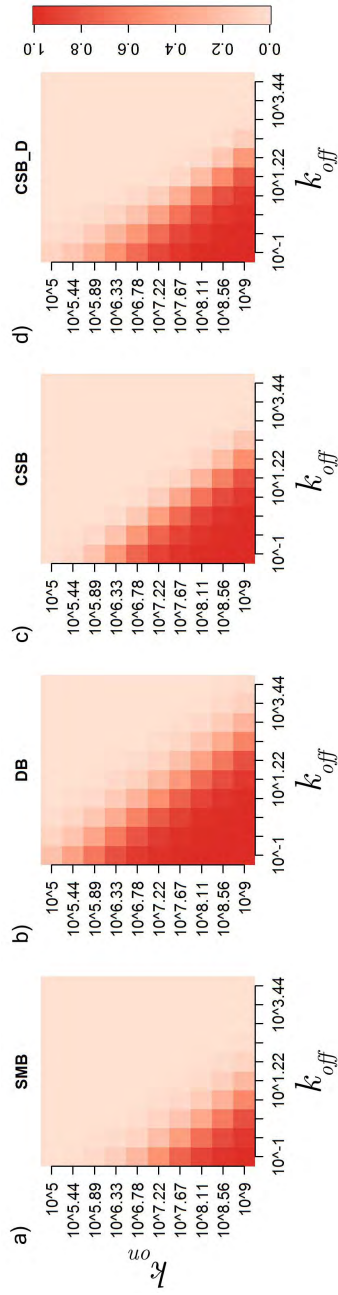
Evaluamos la influencia conjunta de los parámetros  $\delta_1$  y  $\delta_2$ , ya que se sabe que la degradación de TF influye en la susceptibilidad de un sistema a los efectos de retroacción ([15]). De igual forma, en trabajos previos parece ser que el proceso de transcripción del TF no es relevante para los efectos de retroacción en la dinámica. Quisimos explorar si esto es cierto para todos los mecanismos y si la degradación de mRNA puede influenciar indirectamente los efectos de retroacción en alguno de ellos.

En los mapas de calor (en inglés *heatmaps*) de la Figura 8, podemos ver que casi todos los valores de  $\delta_1$  y  $\delta_2$  implicaron una diferencia grande entre el SS del FFTF para todos los mecanismos en los regímenes de unión fuerte. En el régimen débil tales diferencias fueron pequeñas para todos los mecanismos con la excepción del mecanismo DB. Los cambios del SS de FFTF en CSB y CSB\_D son mayores entre mayor son  $\delta_1$  y  $\delta_2$ . Sin embargo, dicha interacción entre estos dos parámetros no es clara para DB y SMB, ya que no hay ninguna tendencia que pueda notarse en el cambio de los valores dentro del rango considerado para estos parámetros.

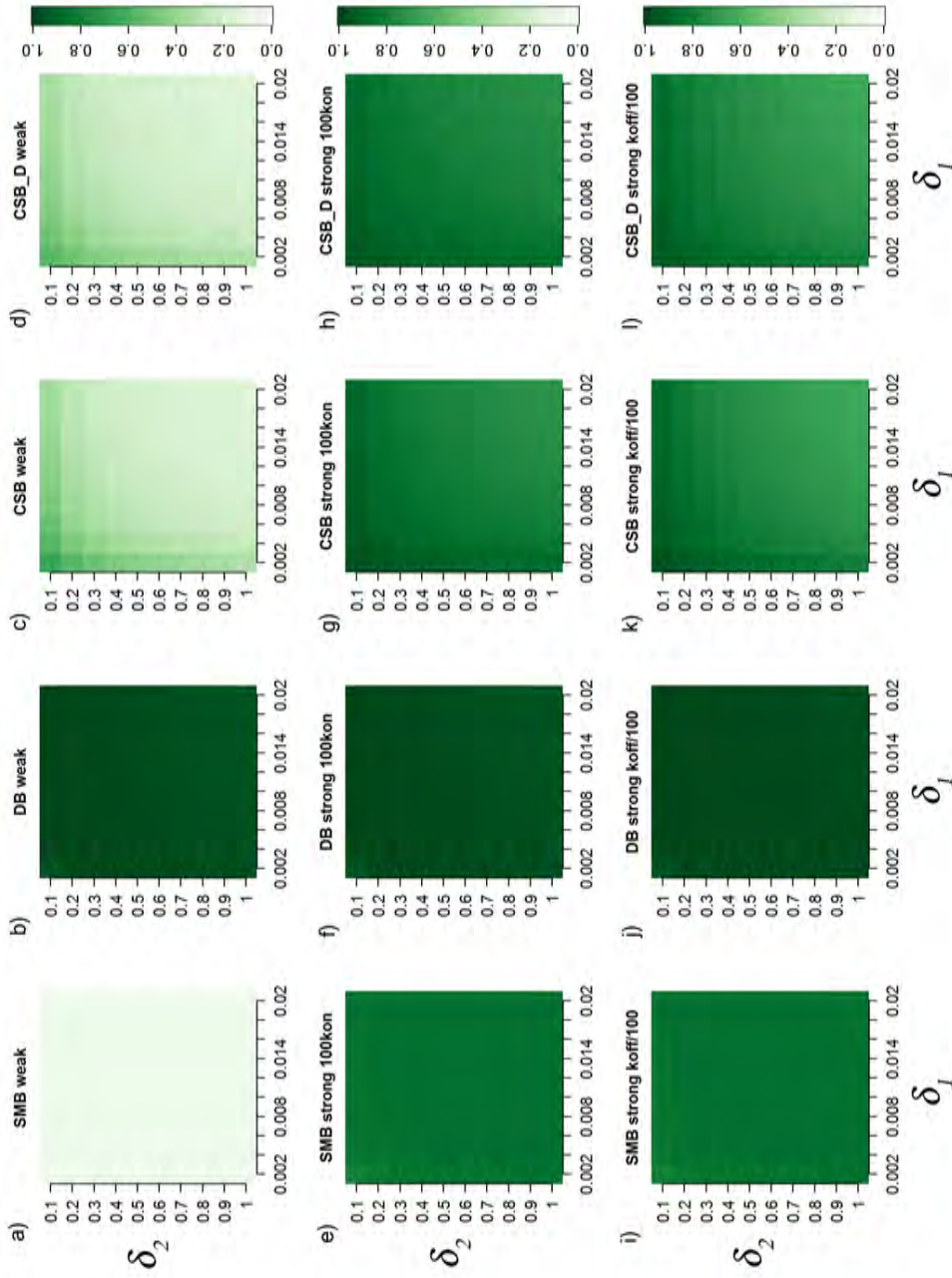
Analizamos cómo la interacción entre  $p_{tot2}$  y  $\delta_1$ , dos parámetros que se sabe que tienen influencia en los efectos de retroacción cambia la relación entre los SS conectado y desconectado para cada uno de los mecanismos.

En la Figura 9, la tendencia general es que la distancia entre FFTF en los casos conectado y desconectado depende de la relación entre  $p_{tot2}$  y  $\delta_1$ . Entre más sitios hay río abajo y menor es  $\delta_1$ , mayor es la distancia. El mecanismo DB en los regímenes fuertes es la única excepción. En él, cuando  $p_{tot2} = 30$ , la distancia entre el caso conectado y desconectado es cercana a 0.5, mientras que para valores de  $p_{tot}$  mayores que 30, las distancias son cercanas a uno. En todos los mecanismos  $p_{tot2}$  parece ser un poco más relevante para el cambio en el SS que  $\delta_1$ .

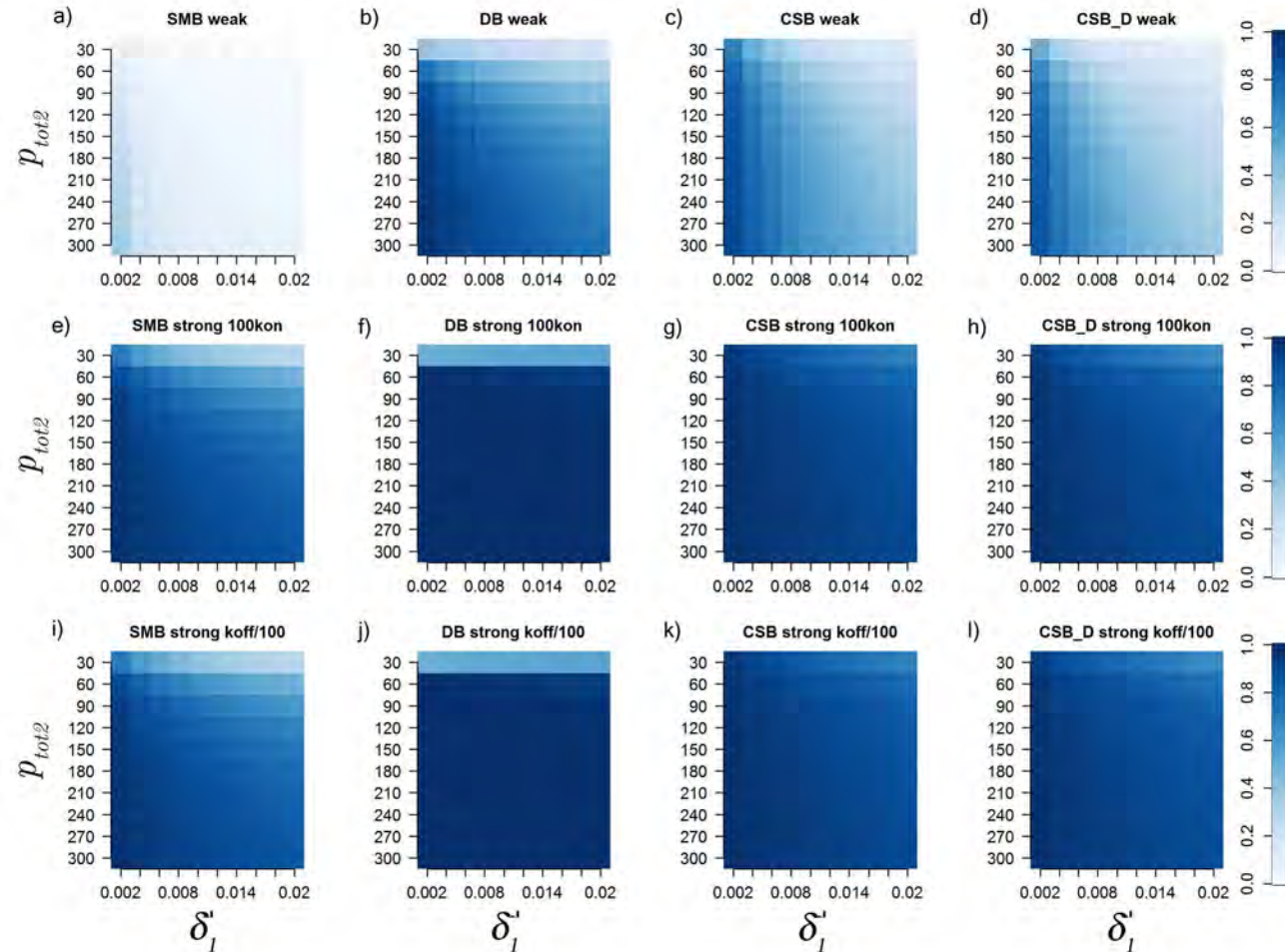
Comparamos los efectos combinados de  $p_{tot2}$  and  $\delta_2$  para averiguar cómo influyen en los efectos de retroacción en cada uno de los mecanismos. La tendencia general es la misma que para la relación entre  $p_{tot2}$  y  $\delta_1$



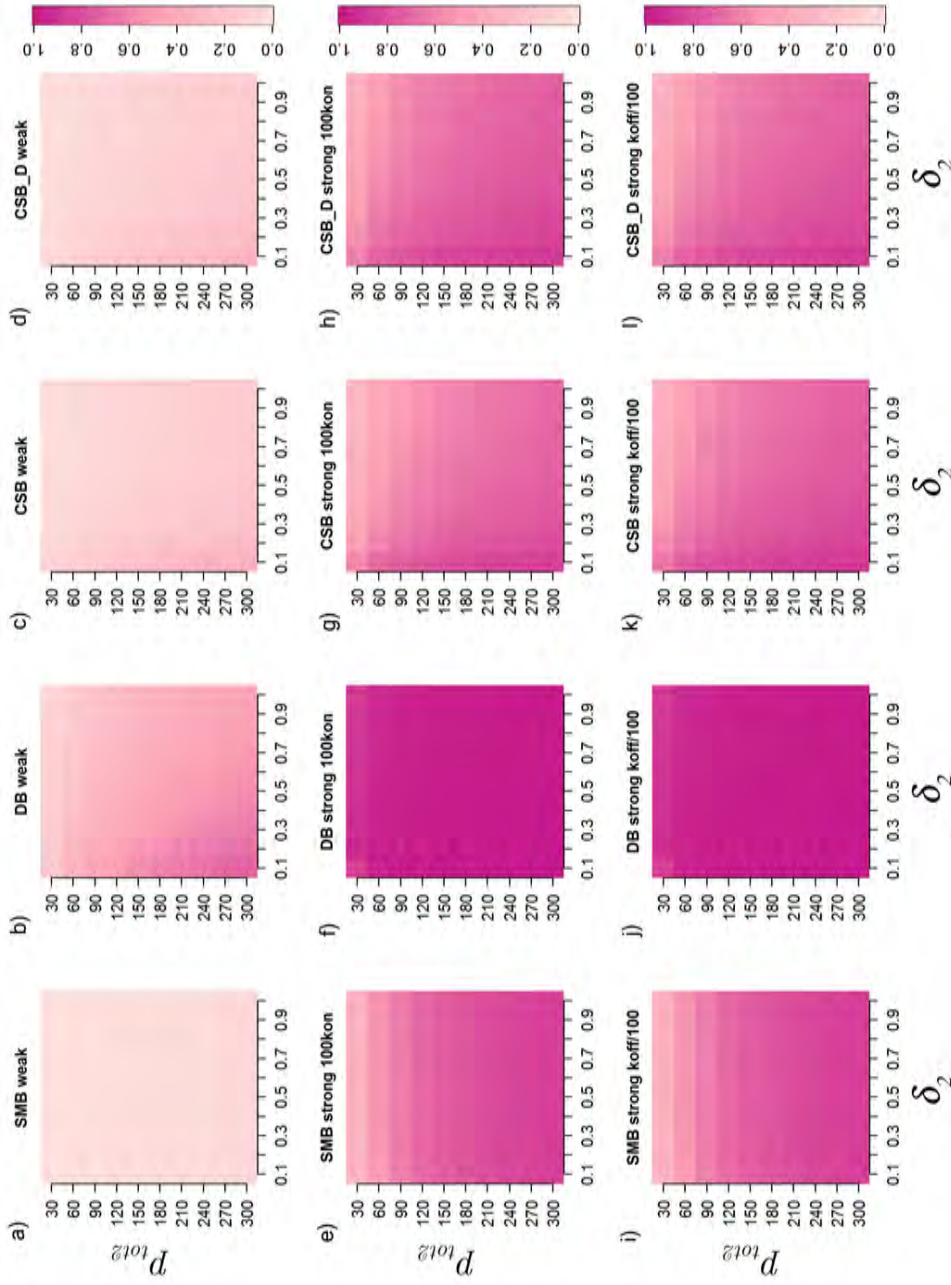
**Figura. 7.**  $k_{on}$  y  $k_{off}$ . La distancia de Canberra para los SS del caso conectado contra el desconectado se calculó para cada mecanismo en el rango de valores de  $k_{off}$  desde  $10^{-1}M^{-1}s^{-1}$  a  $10^{-1}M^{-1}s^{-1}$  y  $k_{on}$  desde  $10^5M^{-1}s^{-1}$  a  $10^{-1}M^{-1}s^{-1}$  y se representaron en mapas de calor. a)-d) mapas de calor correspondientes a SMB, DB, CSB y CSB\_D respectivamente. Los valores considerados para los parámetros están en la Tabla 1. Todas las tasas de asociación se consideraron iguales al valor elegido de  $k_{on}$  ya que su orden de magnitud se conserva en los modelos (véase Tabla 4). Todos los parámetros de disociación, excepto  $k_{off2}$  se usaron con el valor escogido de  $k_{off}$ .  $k_{off2}$  se usó como  $k_{off}/10000$  para mantener la relación observada en GCN4.



**Figura. 8.**  $\delta_1$  and  $\delta_2$ . La distancia de Canberra para los SS del caso conectado contra el desconectado se calculó para cada mecanismo en el rango de valores de  $\delta$  de 0.002 a 0.02 hasta 1 y se representaron en mapas de calor. a)-d) mapas de calor correspondientes a SMB, DB, CSB y CSB\_D respectivamente en el régimen débil mientras que e)-h) corresponden al régimen fuerte strong 100kon e i)- l) al régimen fuerte strong koff/100. Los valores de los parámetros son los descritos en la Tabla 1 y la Tabla 4 con la excepción de  $\delta_2$  y  $\delta_1$ .



**Figura. 9.**  $p_{tot2}$  y  $\delta_1$ . La distancia de Canberra para el estado estacionario del caso conectado contra el caso desconectada fue calculado para cada mecanismo con los valores de  $p_{tot2}$  desde 30 hasta 300 y  $\delta_1$  de 0.002 a 0.02 y representados en mapas de calor. a)-d) mapas de calor que corresponden al régimen de unión débil, mientras que e)-h) corresponden al régimen de unión fuerte strong 100kon e i)-l) al régimen de unión fuerte strong koff/100. CSB es el mecanismo donde el SS cambió más ante la interconexión en los tres regímenes. Los valores de los parámetros, con excepción de  $p_{tot2}$  y  $\delta_1$  fueron tomados de la Tabla 1 y la Tabla 4.



**Figura. 10.**  $p_{tot2}$  y  $\delta_2$ . La distancia de Canberra para el estado estacionario del caso conectado contra el caso desconectado fue calculado para cada mecanismo con los valores de  $p_{tot2}$  de 30 a 300 y  $\delta_2$  de 0.1 a 1 y representados en mapas de calor. a)-d) mapas de calor que corresponden al régimen de unión débil, mientras que e)-h) corresponden al régimen de unión fuerte 100kon e i)-l) al régimen de unión fuerte koffi/100. DB es el mecanismo donde el SS fue menos afectado por la interconexión. en todos los mecanismos,  $p_{tot2}$  parece ser más importante que  $\delta_2$  para el cambio en el SS de FFTF. Los valores de los parámetros, con excepción de  $p_{tot2}$  y  $\delta_2$  fueron tomados de la Tabla 1 y la Tabla 4.

(Figura. 10). DB siguió siendo el mecanismo donde el SS de FFTF cambió más con la interconexión y no mostró, al menos para los regímenes fuertes, ninguna tendencia notable que obedeciera a la relación entre  $p_{tot2}$  y  $\delta_2$ .

La relación entre  $p_{tot2}$  y  $\delta_3$  (Figura. 11) influye en la distancia entre el SS del FFTF del caso conectado y desconectado de todos los mecanismos en los regímenes fuertes. A mayor  $\delta_3$  y  $p_{tot2}$ , mayor la distancia entre el caso conectado y desconectado. Esto es particularmente notorio en DB. En términos generales, DB es el mecanismo donde la distancia cambia para un mayor rango con la interconexión y SMB es el mecanismo donde se mantiene con mayor similitud a lo largo del rango.

Para encontrar cómo la señal de entrada externa, en conjunto con el número de cargas, influyen en los efectos de retroacción en cada uno de los mecanismos, analizamos el efecto conjunto de  $p_{tot2}$  y  $S$ .

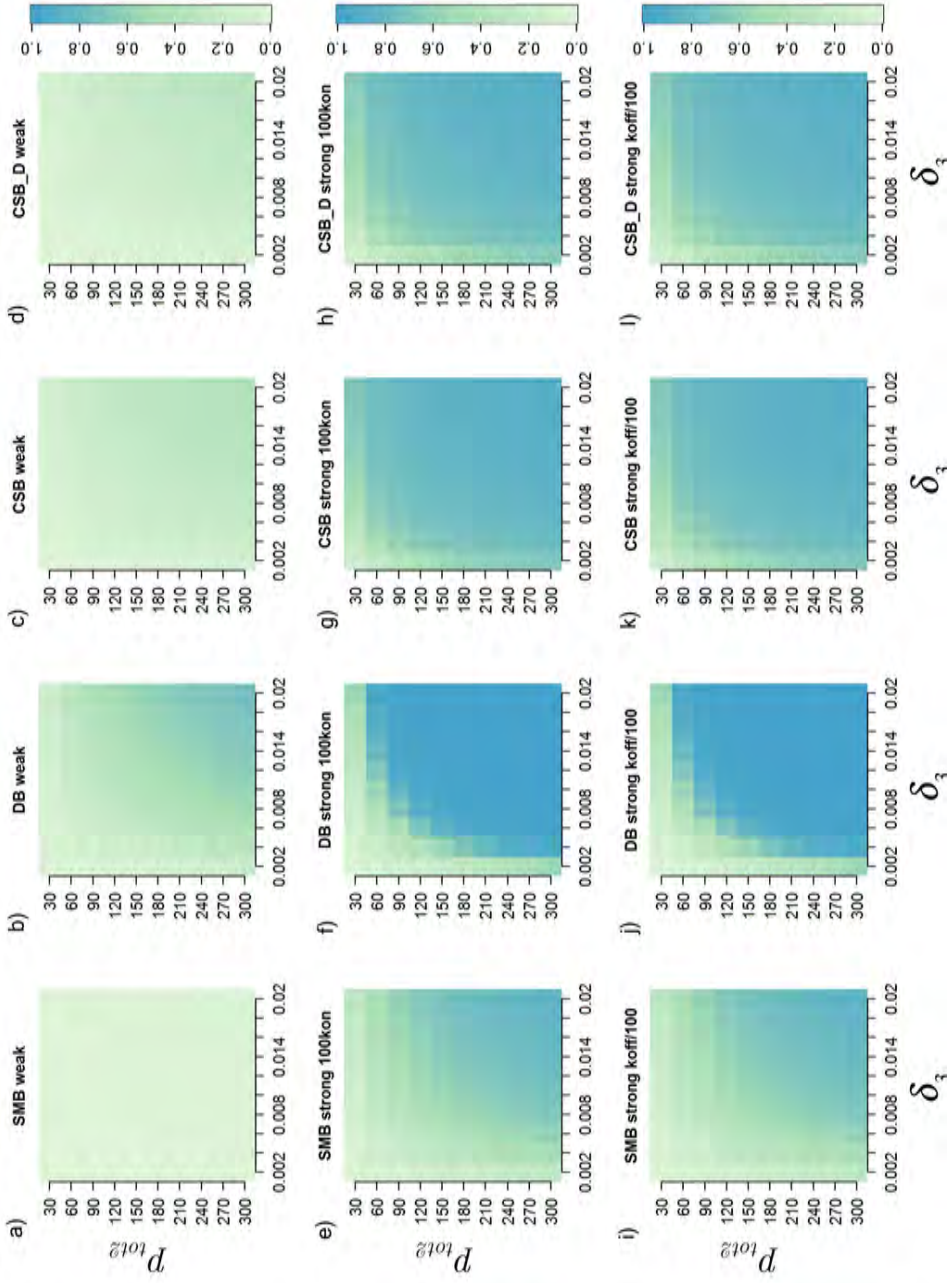
En las seis comparaciones, DB es el mecanismo más cambiado por la interconexión, mientras que CSB parece estar ligeramente más cambiado que CSB\_D. El mecanismo donde la distancia entre el caso conectado y desconectado del SS de FFTF cambia menos es, consistentemente con los resultados anteriores, SMB. Para los regímenes fuertes, la tendencia general es que a mayor  $p_{tot2}$  y menor  $S$ , mayor será la distancia entre los casos conectado y desconectado. Por el contrario, en el régimen débil, conforme crece  $S$  también crece la distancia entre el caso conectado y el desconectado.

En general, aunque un parámetro pueda tener sus particularidades sobre cada uno de los mecanismos, DB se mantuvo como el mecanismo donde el SS cambió más a causa de la interconexión, lo cual lo hace el caso para el cual la retroacción es más fuerte. SMB persistió como el mecanismo con el rango de parámetros más amplio sin diferencias entre el caso conectado y desconectado.

### 8.1.2 Efectos de la degradación no lineal

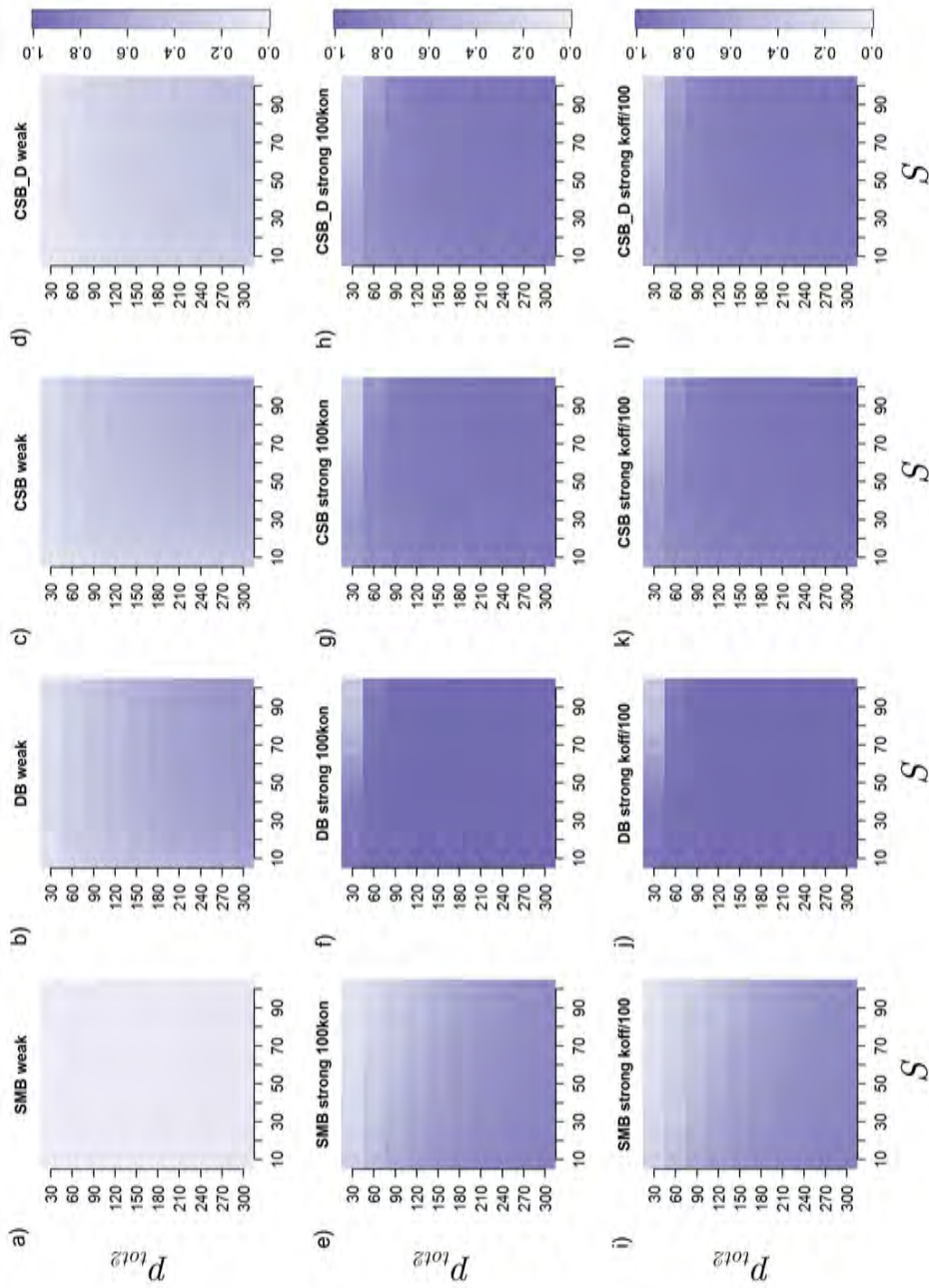
En esta sección evaluamos diferentes tasas de degradación de moléculas de FFTF unidas en complejo a los BS para cada mecanismo (Figura. 13). Para ello, evaluamos valores de  $\delta_3$  desde 0 a dos veces  $\delta_1$ . Hicimos esto con el objetivo de explorar los posibles efectos de protección de sitios río apues sibajo en caso de que los complejos TF-DNA no se degraden y para evaluar directamente el impacto en la relación de FFTF entre el caso conectado y desconectado de hacer más rápida la degradación de estos complejos.

En estas simulaciones (Figura. 13), se puede observar un conjunto de diferentes comportamientos para el cociente de FFTF (caso conectado vs desconectado) causados por los cambios en la degradación. Primero que nada, el cambio en FFTF causado por la interconexión en SMB es claramente afectado por  $\delta_3$  tanto en el régimen débil como en los fuertes. Por otro lado, la dependencia "lineal" del cambio de FFTF tras la conexión en DB sólo se observa para el régimen débil (y en mayor medida que para SMB), mientras que los regímenes fuertes son altamente afectados por cualquier valor de  $\delta_3$  mayor que cero.



**Figura. 11.**  $p_{tot2}$  y  $\delta_3$ . La distancia de Canberra para el estado estacionario del caso conectado contra el caso desconectado fue calculado para cada mecanismo con los valores de  $p_{tot2}$  desde 30 hasta 300 y  $\delta_3$  de 0.002 a 0.02 y representados en mapas de calor. a)-d) mapas de calor que corresponden al régimen de unión débil, mientras que e)-h) corresponden al régimen de unión fuerte 100kon e i)-l) al régimen de unión fuerte koffi/100. DB es el mecanismo donde el SS cambió más ante la interconexión en los tres regímenes. En todos los mecanismos, ambos parámetros parecen ser relevantes para el cambio en el SS de FFTF trans la interconexión. Los valores de los parámetros, con excepción de  $p_{tot2}$  y  $\delta_1$  fueron tomados de la Tabla 1 y la Tabla 4.





**Figura. 12.**  $p_{tot2}$  y  $S$ . La distancia de Canberra para el estado estacionario del caso conectado contra el caso desconectado fue calculado para cada mecanismo con los valores de  $p_{tot2}$  de 30 a 300 y  $S$  desde 10 hasta 100 y representados en mapas de calor. a)-d) mapas de calor que corresponden al régimen de unión débil, mientras que e)-h) corresponden al régimen de unión fuerte 100kon e i)-l) al régimen de unión fuerte koff/100. DB es el mecanismo donde el SS fue menos afectado por la interconexión. en todos los mecanismos,  $p_{tot2}$  parece ser más importante que  $S$  para el cambio en el SS de FFTF. Los valores de los parámetros, con excepción de  $p_{tot2}$  y  $S$  fueron tomados de la Tabla 1 y la Tabla 4.

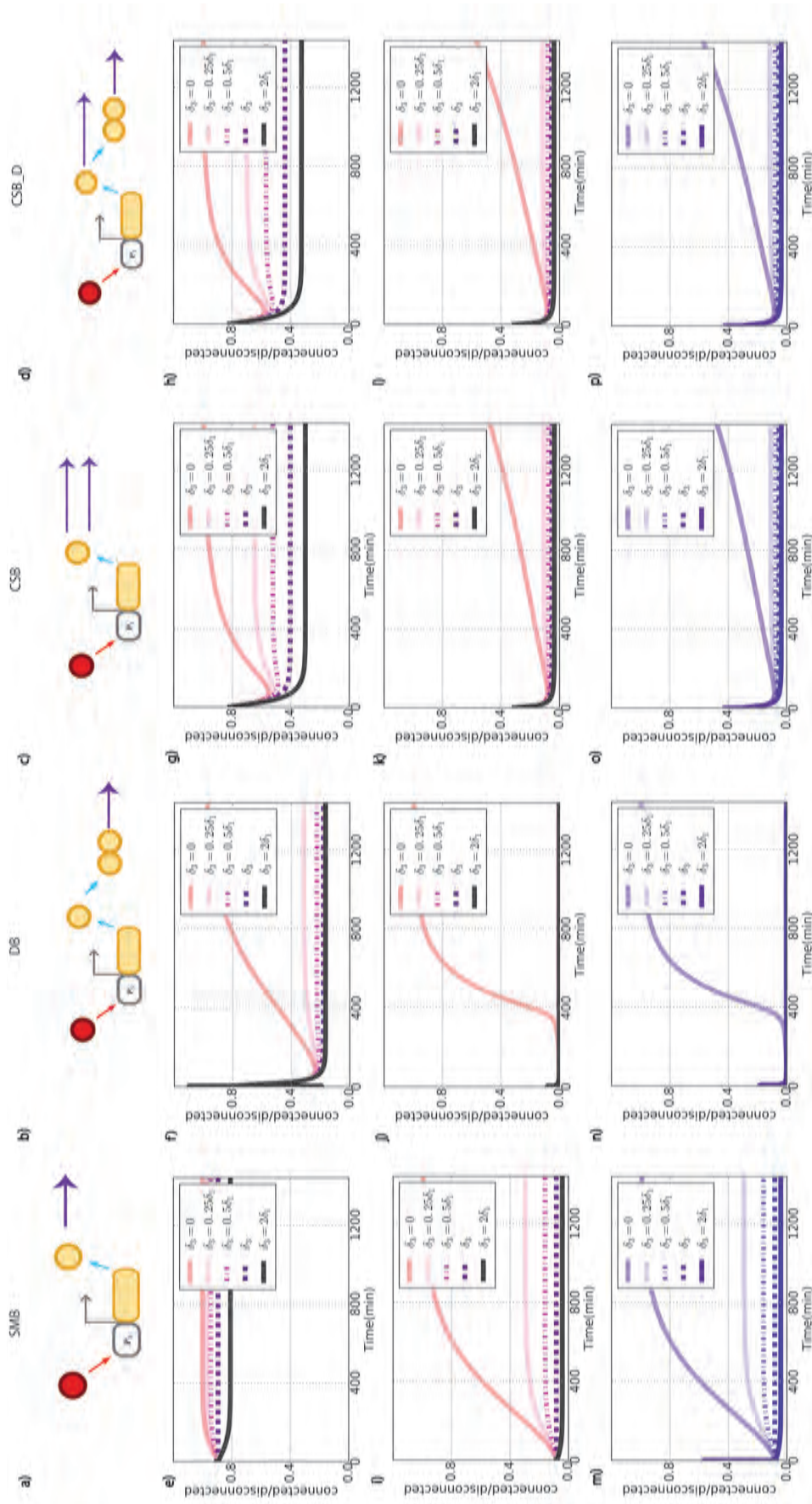


Figura. 13. Efectos de la degradación en FFTF. Las figuras de la parte superior muestran el cociente de las simulaciones en el régimen débil para cada mecanismo, mientras que los de la parte de abajo muestran los cocientes correspondientes a los regímenes fuertes.

En el caso de CSB, el cambio en FFTF tras la interconexión es afectado por la tasa de la degradación en menor medida que DB y en mayor medida que SMB. Tal como se observó en DB, todo los valores que evaluamos de  $\delta_3$  en los regímenes fuertes, a excepción de cero, tuvieron un comportamiento muy similar (el cociente entre el caso conectado y desconectado fue cercano a cero). En el régimen débil, cada valor de  $\delta_3$  nos llevó a un valor diferente en el cociente entre el caso conectado y desconectado. Los cocientes tuvieron un rango más amplio que en SMB —donde todos los cociente fueron cercanos a 1— y DB —donde todos los cocientes fueron cercanos a 0.2—.

Los comportamientos de CSB\_D tienen las mismas tendencias que para CSB. Sin embargo, al menos para  $\delta_3 = 0$  en los regímenes fuertes, el retraso para alcanzar similitud entre el caso conectado y desconectado en CSB\_D parece ser menor que en CSB.

Los resultados previos parecen indicar que, si bien todos los mecanismos parecen ser susceptibles a ser regulados por proteasas específicas para los complejos TF-DNA, SMB en los regímenes fuertes y CSB y CSB\_D en el régimen débil, podrían implicar una regulación más suave con estados intermedios de cocientes entre FFTF conectado y desconectado. Por otro lado, DB, CSB y CSB\_D en los regímenes de unión fuerte implicarían un comportamiento tipo interruptor (o conmutador, denominado *switch* en inglés) donde pequeños cambios en  $\delta_3 = 0$  podrían llevar a grandes cambios en los cocientes del FFTF entre los casos conectado y desconectado. Finalmente, SMB en el régimen de unión débil es el TFBP donde la similitud entre el FFTF conectado y desconectado sería más robusta a cambios en  $\delta_3 = 0$ .

### 8.1.3 Simulaciones deterministas

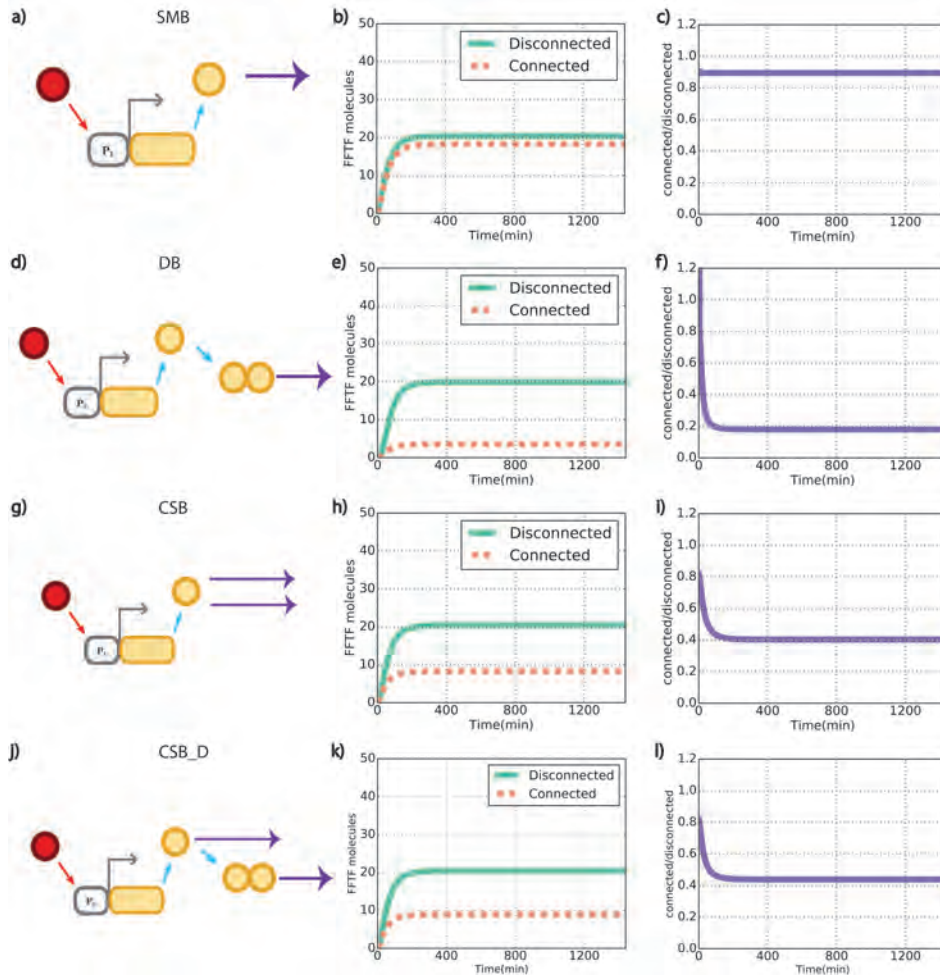
Hicimos una simulación particular de cada mecanismo para evaluar cómo la retroacción afecta cada mecanismo dinámicamente cuando todos ellos alcanzan el mismo SS para cada uno de los regímenes de unión.

#### 8.1.3.1 Simulaciones deterministas desde el punto de vista del FFTF: sitios de unión débiles

En esta sección, analizamos los efectos de retroacción en el número de moléculas de FFTF usando simulaciones deterministas y los parámetros que se encuentran en las Tablas 1, 2 y 4. Aquí, pretendemos observar tales efectos en la simulación de toda la dinámica y no sólo en el SS.

En este grupo de simulaciones, el mecanismo para el cual el número de FFTF cambió más fue DB, mientras que SMB es en el que se observó un menor cambio en el número de moléculas de FFTF (véase Figura. 14). CSB\_D y CSB representan casos intermedios donde hay un decremento considerable en el número de moléculas de FFTF en los casos conectados en comparación con SMB.

Puede haber varias razones por las cuales DB es más susceptible (*i.e.*, la interconexión cambia radicalmente el número de moléculas de FFTF) a las conexiones río abajo que otros mecanismos. Por ejemplo, la necesidad de



**Figura. 14. Comparaciones deterministas FTFF para el régimen de pegado débil.** Simulaciones deterministas para cada mecanismo. a), d), g) y j) son representaciones de los mecanismos, donde a) es pegado de monómero sencillo, d) es dimerización previa a la unión, g) es CSB y j) es CSBD. b), e), h) y k) son las simulaciones deterministas. Las líneas continuas representan los sistemas desconectados y las rayadas los casos conectados con 300 sitios río abajo. El eje Y es el X es el tiempo en minutos. c), f), i) y l) representan el cociente entre las moléculas de FTFF del caso conectado y del desconectado en el tiempo.

pasos extra para la formación del dímero (formación y estabilización del dímero).

Estos pasos extra representan un retardo y un cuello de botella en la disponibilidad de FFTF para unirse, mismos que no están presentes en SMB y CSB. Esto podría tener efectos variables dependiendo de la concentración de FFTF alcanzada. CSB\_D, que también cuenta con estos pasos intermedios, parece estar compensando el retardo con los monómeros de unión rápida involucrados en su dinámica.

Por otro lado, SMB tiene la mayor resistencia a cargas río abajo. Con resistencia nos referimos a que el número de moléculas de FFTF sólo cambió un poco entre el caso conectado y desconectado. Por lo tanto, el cociente entre ellos permaneció cercano a 1.

El hecho de que DB sea el mecanismo más sensible a efectos de la retroacción podría implicar su participación en respuesta plásticas. SMB, gracias a su resistencia al cambio, parece tener la capacidad de preservar funcionalidades en ambientes cambiantes cuando hay cargas en el orden de cientos de sitios a regular.

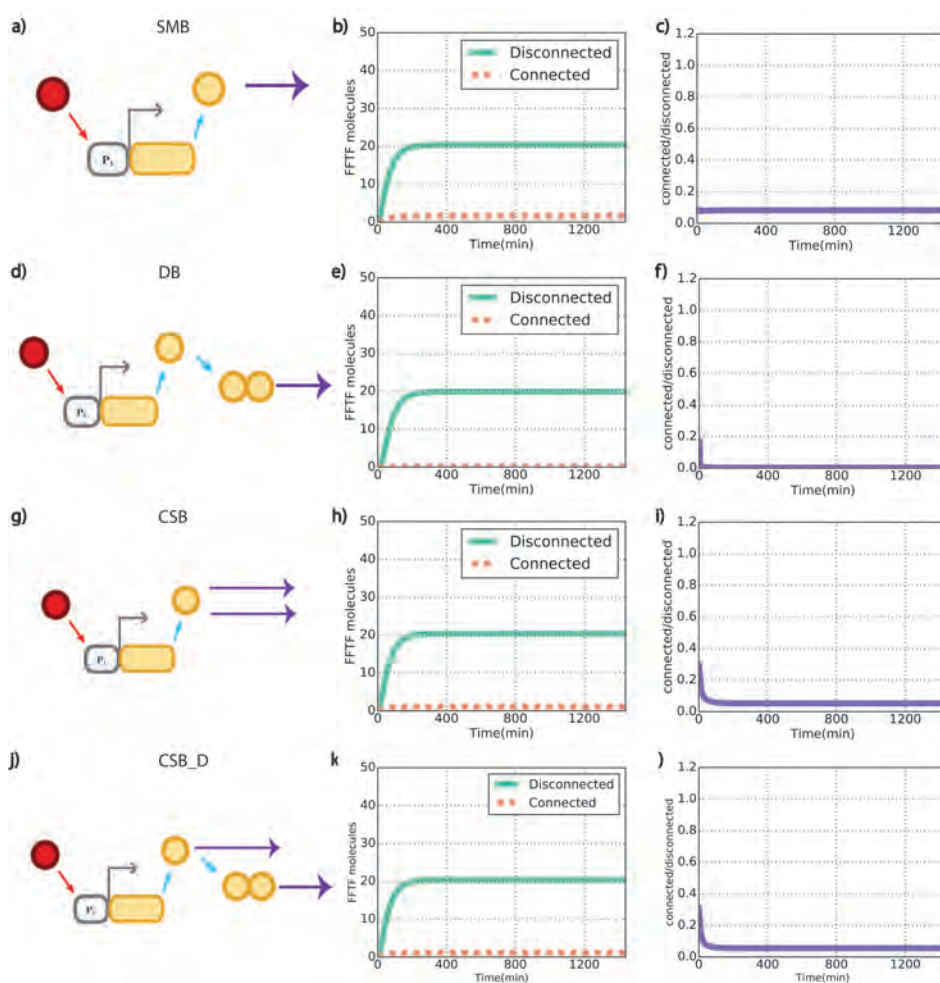
#### 8.1.3.2 *Simulaciones deterministas desde el punto de vista del FFTF: sitios de unión fuertes*

En esta sección mostramos los resultados obtenidos al realizar simulaciones deterministas de los mecanismos suponiendo que los sitios de unión son fuertes. Como ya mencionamos, entre mayor es la tasa de asociación, menor es el cociente entre las simulaciones de los casos conectados contra los desconectados. Esto quiere decir que cuando el pegado es fuerte, la funcionalidad del TF es más sensible a la presencia de cargas río abajo ya que las moléculas de TF tienden a unirse a esos sitios con facilidad. Esto coincide con las observaciones previas en [21].

Queremos hacer visible que en esta sección, la precedencia de resistencia y susceptibilidad a sitios río abajo se mantuvo entre los mecanismos a pesar de que cambiamos la velocidad de asociación. Como se mencionó anteriormente, resistencia significa que el número de FFTF cambió poco (o nada) y la susceptibilidad es la habilidad de cambiar el número de las moléculas de FFTF a causa de la interconexión.

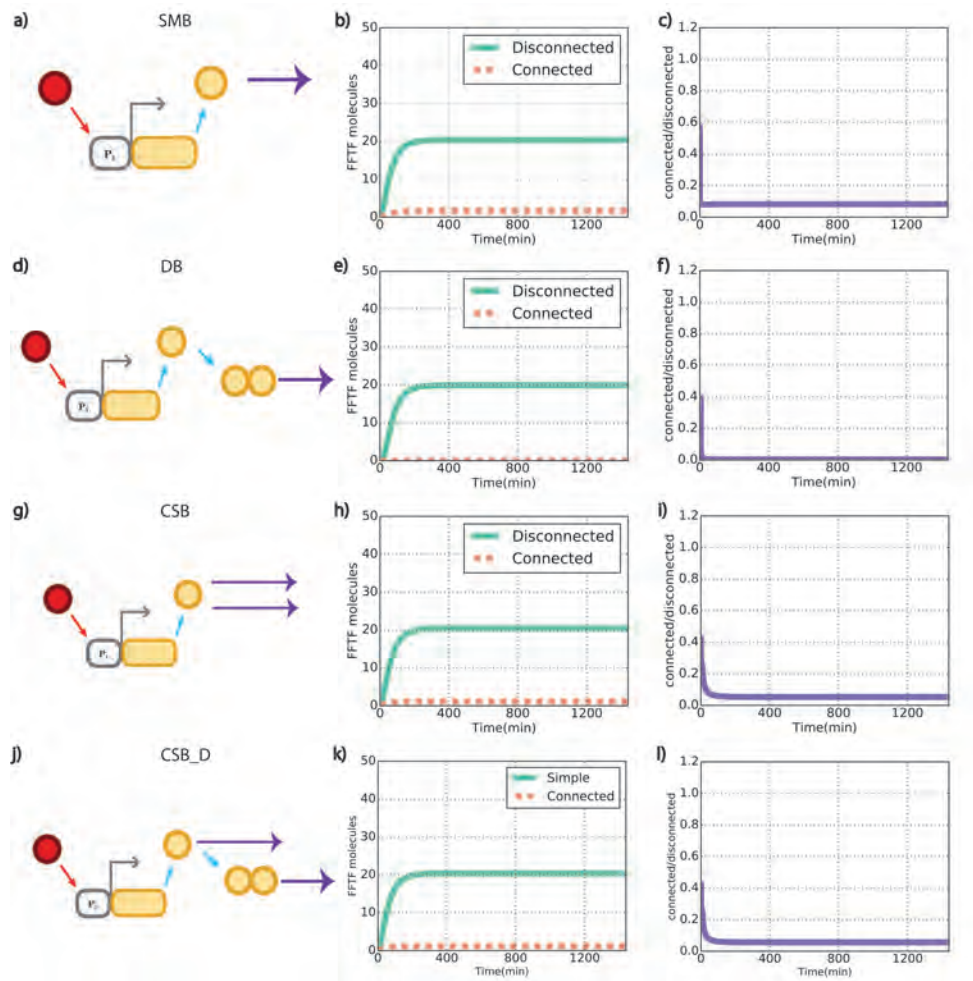
En general, para el conjunto de parámetros utilizado (Tabla 1), SMB es el mecanismo para el cual las moléculas de FFTF permanecieron con el menor cambio, a pesar de haber cambiado bastante. DB fue el mecanismo donde el número de FFTF cambió más tras la interconexión.

El hecho de que esta tendencia –SMB como el mecanismo con menos cambios y DB como el mecanismo con más cambios– se conserve no sólo en las simulaciones, sino también en los cálculos de SS, lleva a preguntarnos si tal estabilidad en SMB tras la interconexión y el cambio en DB también vienen acompañados de una variabilidad pequeña y grande, respectivamente. En la siguiente sección analizamos la variabilidad de cada mecanismo bajo los mismos parámetros evaluados en esta sección para averiguar si hay una



**Figura. 15. Comparaciones deterministas FFTF para el régimen de pegado fuerte cuando  $100k_{on}$ .** Simulaciones deterministas para cada mecanismo. a), d), g) y j) son representaciones de los mecanismos, donde a) es pegado de monómero sencillo, d) es dimerización previa a la unión, g) es CSB y j) es CSBD. b), e), h) y k) son las simulaciones deterministas. Las líneas continuas representan los sistemas desconectados y las rayadas los casos conectados con 300 sitios río abajo. El eje X es el tiempo en minutos y el Y número de moléculas o cociente de moléculas del caso desconectado entre el conectado. c), f), i) y l) representan el cociente entre las moléculas de FFTF del caso conectado y del desconectado en el tiempo.

relación entre mayor diferencia de FFTF y cambio en la variabilidad del mismo tras la interconexión.



**Figura. 16. Comparaciones deterministas FFTF para el régimen de pegado fuerte cuando  $k_{off}/100$ .** Simulaciones deterministas para cada mecanismo. a), d), g) y j) son representaciones de los mecanismos, donde a) es pegado de monómero sencillo, d) es dimerización previa a la unión, g) es CSB y j) es CSBD. b), e), h) y k) son las simulaciones deterministas. Las líneas continuas representan los sistemas desconectados y las rayadas los casos conectados con 300 sitios río abajo. El eje X es el tiempo en minutos. El eje Y es el número de moléculas o cociente de moléculas del caso desconectado entre el conectado. c), f), i) y l) representan el cociente entre las moléculas de FFTF del caso conectado y del desconectado en el tiempo.

## 8.2 APROXIMACIONES ESTOCÁSTICAS

Esta sección comienza con la comparación de las medias del FFTF en los ensambles de simulaciones estocásticas con el comportamiento en las

simulaciones deterministas en la subsección 8.2.1. Después, en la misma subsección, evaluamos el coeficiente de variación (CV) de los casos desconectados para cada mecanismo en cada régimen para poder contrastar las diferencias intrínsecas en la variabilidad sin la necesidad de conexiones río abajo. Ahí mismo, también se analizaron las diferencias entre las distribuciones de las moléculas de FFTF usando el estadístico D en la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Simulamos las contrapartes estocásticas de las secciones 8.1.3.1 y 8.1.3.2 en las secciones 8.2.2 y 8.2.2, respectivamente, para determinar la relación de las diferencias en variabilidad con las diferencias determinísticas en términos de cociente de FFTF y variabilidad. Así mismo, obtuvimos estas simulaciones para tener una medida más poderosa de qué tan similares son el caso conectado y desconectado. Usando simulaciones estocásticas podemos comparar distribuciones completas de FFTF en cada tiempo usando el estadístico D. El uso de este estadístico es relevante, ya que las comparaciones usadas entre los casos conectados y desconectados para las simulaciones deterministas no tienen una medida de significancia.

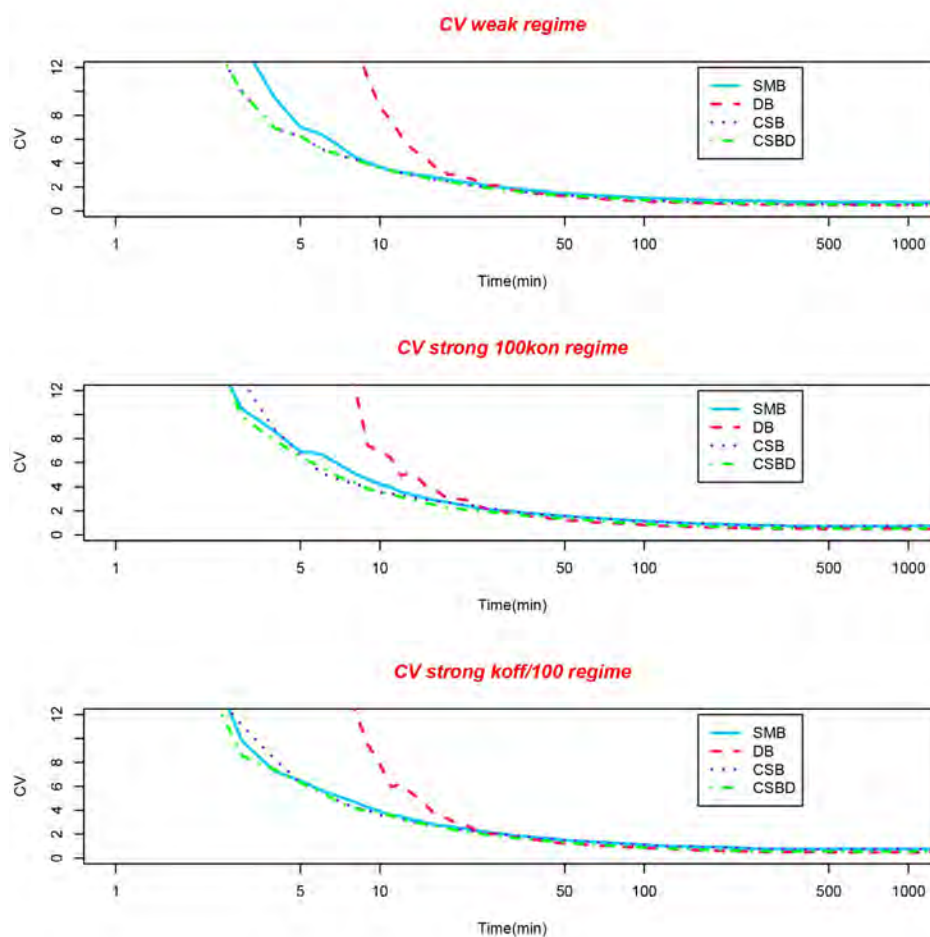
### 8.2.1 CV y las diferencias entre las distribuciones de los casos desconectados

Con el fin de cotejar los resultados obtenidos de las simulaciones estocásticas con los obtenidos de las simulaciones deterministas, graficamos la media de los ensambles de simulaciones estocásticas de FFTF para compararlos con su contraparte determinista. Como se puede ver en las Figuras A1 a A3, la media del FFTF coincide con las simulaciones estocásticas.

Con respecto a los CV's de los mecanismos desconectados en la Figura 17, es fácil notar que, sin importar el régimen, DB es el mecanismo donde el número de FFTF varía más. Incluso en los regímenes de unión fuerte, hay una falta de diferencia en variabilidad para SMB, CSB y CSB\_D para tiempos largos. Para tiempos anteriores a los primeros 10 min, el mecanismo SMB, aparenta ser más variable que CSB y CSB\_D. Comparamos las distribuciones porque, aunque todos los mecanismos comparten el mismo comportamiento en promedio, los CV's nos permiten darnos cuenta de cambios en la variabilidad sin importar el comportamiento promedio.

Al comparar las distribuciones de todos los casos desconectados usando el estadístico D (véase Tabla 6) encontramos que las diferencias tienden a ser pequeñas ( $D < 0.2$ ). Los valores- $\rho$  más significativos ( $\rho$  - values en inglés) fueron para los pares SMB vs DB, DB vs CSB y CSB vs CSB\_D. Esto parece indicar que, a pesar de que el número de moléculas de FFTF es notablemente más variable para DB que para cualquier otro mecanismo, los mecanismos con dimerización (DB y CSB\_D) son más similares entre ellos que con respecto a SMB o CSB. La pareja con las distribuciones más similares fue SMB vs CSB, donde la diferencia es pequeña y no hay forma de discriminar entre las dos distribuciones (la distancia D es pequeña y el valor- $\rho$  es grande).





**Figura. 17.** Coeficientes de variación para los casos desconectados de cada mecanismo en cada régimen. Cada mecanismo está indicado con un tipo de línea y color particular. SMB se refiere al mecanismo de unión de monómero simple, DB representa la unión de dímero, CSB representa el pegado secuencial de monómeros sin dimerización y CSB\_D son las siglas para el pegado secuencial con dimerización. Como puede observarse, DB es el mecanismo más variable para todos los regímenes.

Mecanismos			D		Valor- $\rho$		
SMB	vs	DB	0.162	$\pm$ 0.02	$3.6e-09$	$> \rho >$	$5.9e-15$
SMB	vs	CSB	0.038	$\pm$ 0.02	0.98	$> \rho >$	0.021
SMB	vs	CSB_D	0.124	$\pm$ 0.05	0.0054	$> \rho >$	$2.1e-13$
DB	vs	CSB	0.168	$\pm$ 0.03	$2.7e-9$	$> \rho >$	$1.1e-16$
DB	vs	CSB_D	0.093	$\pm$ 0.09	1	$> \rho >$	$1.3e-15$
CSB	vs	CSB_D	0.140	$\pm$ 0.05	0.00087	$> \rho >$	$1.1e-16$

Tabla 6: Estadístico D y valores- $\rho$  entre mecanismos de unión (Véanse Figuras S18-S24).

### 8.2.2 Simulaciones de FFTF

Para comparar las contrapartes estocásticas de los casos conectados vs desconectados en las subsecciones 8.1.3.1 y 8.1.3.2, en esta sección comparamos los CV's y las distribuciones de ensambles en las Subsecciones 8.2.2 y 8.2.2, respectivamente.

**SIMULACIONES ESTOCÁSTICAS DEL FFTF EN EL RÉGIMEN DÉBIL** Corrimos simulaciones estocásticas del número de moléculas de FFTF para cada mecanismo, considerando el régimen donde el FFTF se une a un promotor débil. Para cada mecanismo calculamos tanto la diferencia en distribuciones entre el caso conectado y desconectado usando el estadístico D como sus diferencias en variación usando el coeficiente de variación (CV).

El único mecanismo para el cual no se observaron grandes diferencias entre el caso conectado y el desconectado para el régimen débil fue SMB. En dicho régimen, D siempre fue menor que 0.09, lo cual implica una diferencia de tan sólo el 9% de la distribución. El nivel de significancia fue  $> 0.001$ . Para otros mecanismos D fue consistentemente mayor que 0.3 y el valor- $\rho$  ( $\rho - \text{value}$ ) fue siempre menor que 0.001 (véase Tabla 7).

Mechanism	Unión débil		Unión fuerte (strong 100kon)		Unión fuerte (strong koff/100)	
	D	valor - $\rho$	D	valor - $\rho$	D	valor - $\rho$
SMB	0.0825	0.0022	0.809	0	0.811	0
DB	0.8	0	0.997	0	0.997	0
CSB	0.514	0	0.88	0	0.893	0
CBS_D	0.484	0	0.877	0	0.908	0

Tabla 7: Estadístico D y valores -  $\rho$  al minuto 1440 para cada proceso de unión.

Aunque las medias de las moléculas de FFTF coinciden con el número de FFTF en las simulaciones estocásticas, quisimos averiguar qué relación existía entre la retroacción, para cada mecanismo correspondiente, y la variabilidad de moléculas de FFTF en el sistema. Nos dimos cuenta que la distribución de FFTF es más amplia (y por ello aparentemente más variable) para los casos desconectados en contraste con conectados en el tercer y cuarto mecanismo (CSB y CSB\_D véanse en el apéndice B Figuras B2-B5). Dada la diferencia en medias, para clarificar si la variabilidad realmente es distinta entre el caso conectado y desconectado calculamos el CV en cada paso de tiempo.

Como se puede ver en la Figura 18, DB es el mecanismo para el cual el número de moléculas de FFTF varió más tras la interconexión. Esto podría explicarse por las fluctuaciones en la concentración de dímero dadas por el proceso de asociación y disociación durante la formación del dímero en contraste con los otros mecanismos donde hay monómeros disponibles para unirse.

En este régimen no parece haber alguna diferencia particular entre la variación de los casos conectado y desconectado. Incluso las áreas bajo la curva son similares. A pesar de dichas similitudes, CSB y DB fueron los mecanismos donde el área bajo la curva cambió más (Figura 18).

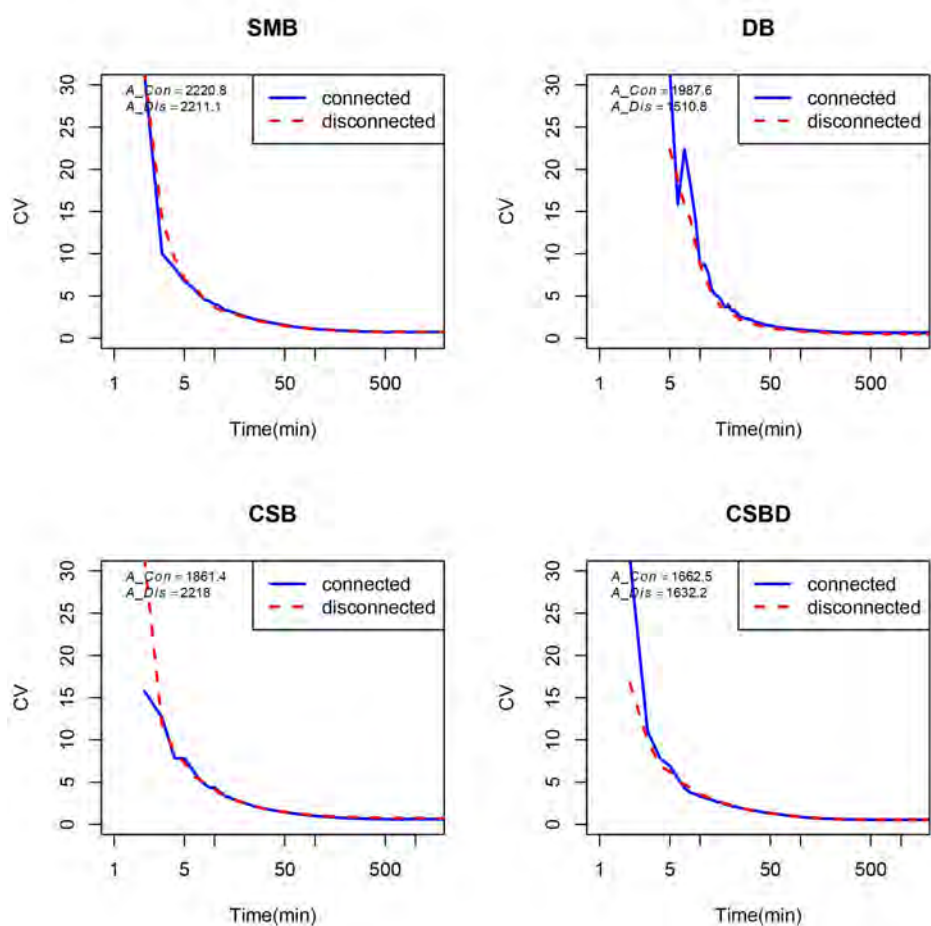
En los sistemas que analizamos, el mecanismo DB fue el que tuvo mayor respuesta (el más sensible) a efectos de cargas, también es el mecanismo con más ruido cuando lidiamos con BS's débiles. Estas propiedades podrían limitar la participación de DB en respuestas puntuales finamente controladas en sistemas naturales donde se requiera una concentración fija y constante de moléculas de FFTF.

**REGÍMENES FUERTES DE SIMULACIONES ESTOCÁSTICAS DE MOLÉCULAS DE FFTF** Al analizar la varianza, podemos notar que la variabilidad de las moléculas de FFTF cambia drásticamente para los casos conectados de los regímenes fuertes tanto en  $k_{off}/100$  como en  $100k_{on}$ .

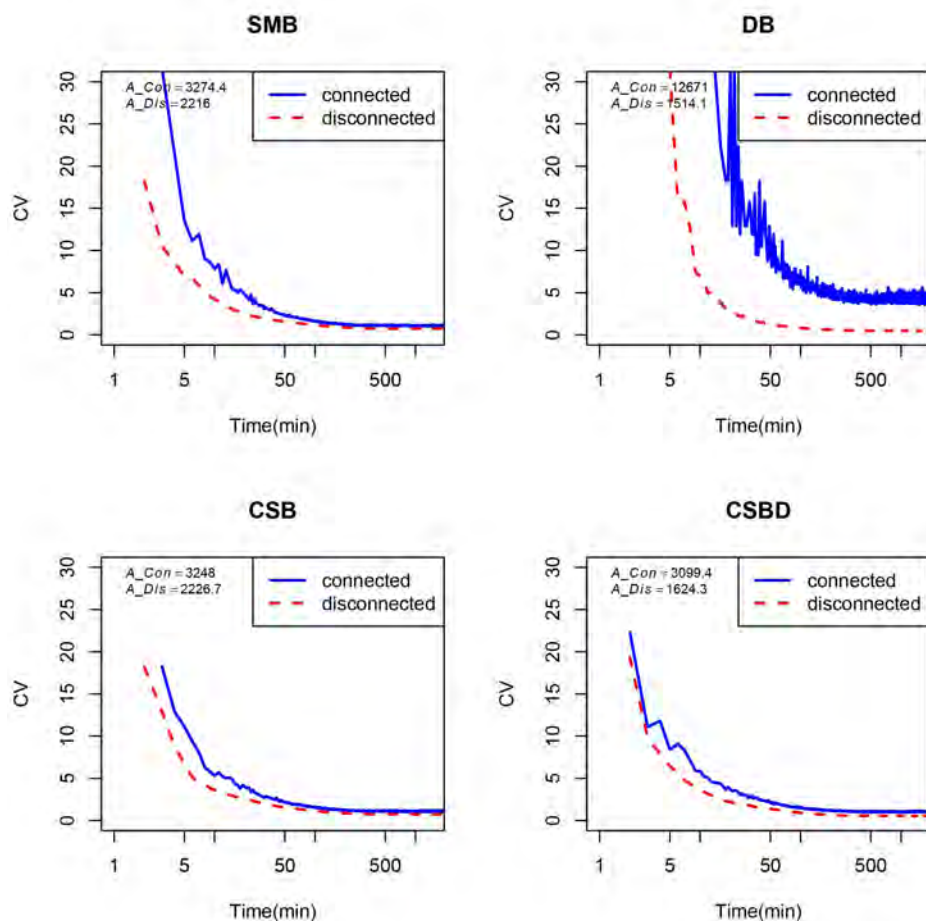
Consistentemente con el régimen débil, la dimerización es el mecanismo más variable cuando se usan sitios fuertes (Figura 19 y Figura 20). Un cambio importante con respecto al régimen débil, es que para todos los mecanismos en el caso conectado de los regímenes fuertes, el número de moléculas de FFTF es más variable que para los casos desconectados. El segundo mecanismo en tener el mayor cambio en variabilidad fue SMB. Sin embargo, después de los primeros 50 minutos, los CV's de los casos conectados de SMB, CSB, y CSB\_D alcanzan los CV's de los desconectados.

DB, al ser el único mecanismo donde el CV del caso conectado no se vuelve el mismo que el del caso desconectado con el tiempo, parece ser el más adecuado para modificar la variabilidad de un sistema, tanto a lo largo de la dinámica como en el SS, tras la interconexión.

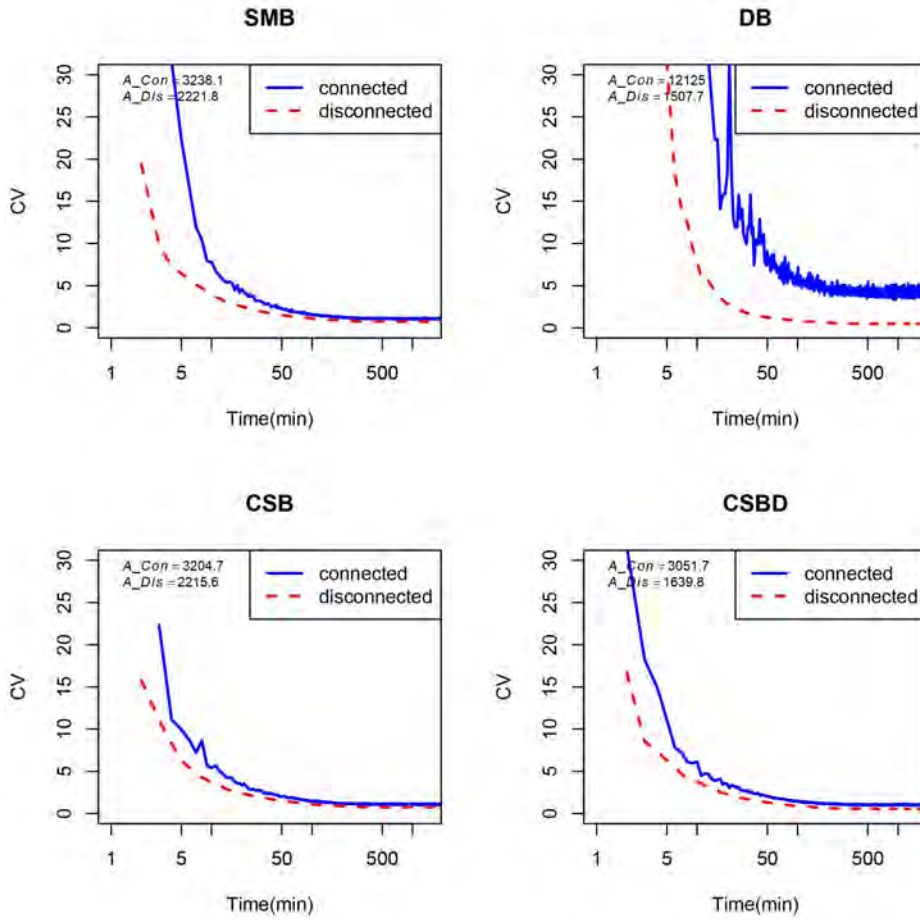
Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.



**Figura. 18.** Coeficientes de variación de moléculas de FFTF para el régimen de operadores débiles. Contraste entre CV's del caso conectado y desconectado para cada mecanismo. Los valores de las áreas bajo la curva se incluyen como  $A_{Dis}$  para el caso desconectado y  $A_{Con}$  para el caso conectado. Los valores de los parámetros se usaron como se describe en la Tabla 1 y la Tabla 4.



**Figura. 19.** Coeficientes de variación de moléculas de FFTF para el régimen de operadores fuertes 100kon. Contraste entre CV's del caso conectado y desconectado para cada mecanismo. Los valores de las áreas bajo la curva se incluyen como  $A_{Dis}$  para el caso desconectado y  $A_{Con}$  para el caso conectado. Los valores de los parámetros se usaron como se describe en la Tabla 1 y la Tabla 4 excepto por las tasas de asociación. En el caso de las tasas de asociación, se usaron como se menciona a continuación:  $k_{on}$  fue sustituida por  $100 * k_{on}$ ,  $k_{on3}$  fue sustituida por  $100 * k_{on3}$ ,  $k_{on1}$  se sustituyó por  $10 * k_{on1}$  y  $k_{on2}$  se sustituyó por  $10 * k_{on2}$ .



**Figura. 20. Coeficientes de variación de moléculas de FFTF para el régimen de operadores fuertes  $k_{off}/100$ .** Contraste entre CV's del caso conectado y desconectado para cada mecanismo. Los valores de las áreas bajo la curva se incluyen como  $A\_Dis$  para el caso desconectado y  $A\_Con$  para el caso conectado. Los valores de los parámetros se usaron como se describe en la Tabla 1 y la Tabla 4 excepto por las tasas de disociación. En el caso de las tasas de disociación se usaron como se menciona a continuación:  $k_{off}$  se sustituyó por  $\frac{k_{off}}{100}$ ,  $k_{off3}$  fue sustituido por  $\frac{k_{off3}}{100}$ ,  $k_{off1}$  se sustituyó por  $\frac{k_{off1}}{10}$ , y  $k_{off2}$  se cambió por  $\frac{k_{off2}}{10}$ .

Tabla 8: Resumen de los resultados

Aproximación	Análisis	Resultados generales
Determinista	SS	<p>DB fue el mecanismo donde el número de moléculas de FFTF cambió más en el caso conectado con respecto al desconectado.</p> <p>SMB fue el mecanismo con el rango de parámetros más amplio sin diferencias entre el caso conectado y desconectado.</p>
	Degradación	<p>El cambio en FFTF causado por la interconexión en SMB es claramente afectado por <math>\delta_3</math> tanto en el régimen débil como en los fuertes.</p> <p>La dependencia "lineal" del cambio de FFTF tras la conexión en DB sólo se observa para el régimen débil (y en mayor medida que para SMB), mientras que los regímenes fuertes son altamente afectados por cualquier valor de <math>\delta_3</math> mayor que cero.</p> <p>En el caso de CSB y CSB_D, el cambio en FFTF tras la interconexión es afectado por la tasa de la degradación en menor medida que DB y en mayor medida que SMB.</p>
	Simulaciones	<p>DB fue el mecanismo donde el número de moléculas de FFTF cambió más con la interconexión, mientras que el número de moléculas permaneció más similar al estado desconectado en SMB.</p>
Estocástica	CVs mecanismo vs mecanismo	<p>Los valores-<math>\rho</math> más significativos fueron para los pares SMB vs DB, DB vs CSB y CSB vs CSB_D. Esto parece indicar que los mecanismos con dimerización (DB y CSB_D) son más similares entre ellos que con respecto a SMB o CSB.</p> <p>La pareja con las distribuciones más similares fue SMB vs CSB, donde la diferencia es pequeña y no hay forma de discriminar entre las dos distribuciones (la distancia D es pequeña y el valor-<math>\rho</math> es grande).</p>
	CVs conectado vs desconectado	<p>DB es el mecanismo para el cual el número de moléculas de FFTF cambió más tras la interconexión. Esto podría explicarse por las fluctuaciones causadas por la formación del dímero.</p> <p>Para todos los mecanismos en el caso conectado de los regímenes fuertes, el número de moléculas de FFTF es más variable que para los casos desconectados. El segundo mecanismo en tener el mayor cambio en variabilidad fue SMB.</p> <p>Después de los primeros 50 minutos, los CV's de los casos conectados de SMB, CSB, y CSB_D adquieren el mismo valor que los CV's de los desconectados.</p>

## Parte IV

### CONCLUSIÓN

En esta parte incluimos las conclusiones y perspectivas a las que nos permitió llegar este trabajo.





---

 CONCLUSIONES
 

---

*I go on working at science, and in fact I am turned into a sort of machine for observing facts and grinding out conclusions<sup>1</sup>*

— Charles Darwin

**E**N este proyecto analizamos el papel potencial de distintos mecanismos de unión al ADN para promover o restringir los efectos de la retroacción. Todos los mecanismos mostraron diferentes niveles de cambio en el número de moléculas de FFTF (factor transcripcional funcional, por sus siglas en inglés) tras la interconexión.

DB fue el mecanismo donde la cantidad de moléculas de FFTF cambió más, tanto dinámicamente (a lo largo de la simulación) como en el SS; mientras que SMB fue el mecanismo que mostró el menor nivel de cambio en el número de moléculas de FFTF tras la interconexión. Si ordenamos los mecanismos por tendencia general del más resistente al más susceptible a las cargas río abajo tendremos: SMB, tanto CSB como CSB\_D (con precedencia dependiendo del régimen) y DB. Esto muestra que los mecanismos de pegado presentan tendencias heterogéneas de efectos de retroacción. Tales tendencias parecieran depender de retardos, ya que el mecanismo más afectado es DB (en el cual se usan pasos intermediarios de dimerización previos a unirse), seguido de CSB (donde dos pasos de unión de monómeros podría estar alentando la reinsertión de moléculas de TF a la reserva de FFTF) y CSB\_D.

En cuanto a los parámetros, DB es el mecanismo para el cual cambiar la relación entre las tasas de asociación y disociación altera más y para un mayor rango de parámetros (aproximadamente la mitad de ellos), la distancia entre los casos conectado y desconectado. Sólo para los mecanismos CSB y CSB\_D, la relación entre las moléculas de FFTF en el caso conectado y desconectado es afectada particularmente por la relación entre  $\delta_1$  y  $\delta_2$ . La relación entre  $p_{tot2}$  y los parámetros de degradación que afectó de manera más clara la distancia entre la cantidad de moléculas conectadas y desconectadas de FFTF fue con  $\delta_3$ . En el caso de el análisis de la interacción entre  $p_{tot2}$  y  $S$ , para regímenes fuertes, a mayor  $p_{tot2}$  y menor  $S$ , mayor es

✦ ————— ✦

<sup>1</sup> Continuo trabajando en la ciencia y me convierto en una suerte de máquina para observar hechos y producir conclusiones (traducción de la autora de esta tesis).

la distancia entre el caso conectado y desconectado. Aún si los resultados parecen intuitivos, la tendencia no es la misma para el régimen débil, donde entre más grandes son los valores de  $S$  y  $p_{tot2}$ , mayor es la diferencia en el número de moléculas de FFTF entre el caso conectado y el desconectado. Estas observaciones fueron confirmadas por el análisis individual de cada uno de los parámetros en la Figura A.2. Ahí, los detalles de las diferencias entre los casos conectados y desconectados fueron descritos más a fondo.

En cuanto a variabilidad, DB fue el mecanismo donde el número de moléculas de FFTF se mostró más variable. Su distribución fue más parecida a la de CSB\_D que a cualquiera de los otros mecanismos. Las distribuciones de SMB y CSB fueron prácticamente indistinguibles una de la otra. La mayor diferencia fue la exhibida por la comparación entre SMB y DB. Estos hechos apuntan a diferencias intrínsecas (no relacionadas a la conexión río abajo) entre los mecanismos, sin importar que la media de su FFTF sea la misma.

Aun cuando en todos los mecanismos los CVs permanecieron iguales tras la interconexión en el régimen débil, en los regímenes fuertes, DB mostró que podría ser el mecanismo más adecuado para cambiar las propiedades de variabilidad de un sistema tras la interconexión. Lo anterior se debe a que DB es el único mecanismo para el cual el CV del caso conectado no se vuelve igual al del desconectado con el tiempo, sino que tiene un valor de variabilidad distinta aún tras tiempos largos.

Nuestros resultados nos permiten proponer posibles funciones para diferentes procesos de unión de factores transcripcionales en sistemas tanto naturales como sintéticos. Sin embargo, sugerimos revisar las particularidades y el contexto de cada sistema ya que las simulaciones aquí hechas, están fuera de su contexto natural. En este trabajo nos interesó explorar el papel de los elementos regulatorios, sin considerar interacciones que podrían ocurrir en el sistema real como son: regulación por uno o más TFs extra, modificaciones covalentes, participación de complejos que ayuden o dificulten la unión del TF al ADN, entre otras.

Nuestros resultados podrían ayudar a esclarecer qué mecanismo se podría esperar encontrar en una red particular de acuerdo con la función regulatoria que un TF lleve a cabo (regulador maestro, concentrador (en inglés *hub*), TF de respuesta al medio ambiente, entre otros) y las necesidades dinámicas (estabilidad, ultrasensibilidad, biestabilidad, etcétera) de cada respuesta. Por ejemplo, al haber cambios en la degradación, DB podría actuar como un mecanismo que promueva la ultrasensibilidad, reaccionando a algún estrés ambiental como el calor (el cual promueve la acción de proteasas). En forma similar, SMB podría tomar el lugar de un regulador maestro de programas de desarrollo muy estables. DB, para ciertos valores de degradación, dada su resistencia al cambio del cociente entre el caso conectado y desconectado ante la degradación, podría formar parte de vías donde la respuesta deba de asegurarse sin importar la presencia de proteasas en el medio.

Nuestros resultados podrían ser evaluados en sistemas donde más de un mecanismo de pegado tenga lugar, como en el caso de Sox10 y GCN4. Para ello tendría que utilizarse un gen reportero y contrastar los casos conectado y desconectado en contextos de los diferentes mecanismos que puede usar cada TF. Dado que, hasta donde sabemos, el mecanismo exacto de unión de un TF en su sitio cognado en el ADN ha sido descrito sólo para pocos TFs, para probar experimentalmente nuestros resultados podría usarse un TF arbitrario y “forzarlo” a actuar con un mecanismo diferente al que suele usar (*e.g.*, usando repeticiones de glutamina en un TF que normalmente funciona como monómero para forzarlo a oligomerizarse, como en [60]). Algunos inconvenientes al respecto serían que no podemos estar seguros de que un TF podrá guiar la transcripción cuando es forzado a seguir vías de unión alternativas. Más aún, probablemente se necesitaría modificar también los sitios de unión en el genoma para hacer el TF modificado posible o incluso funcional.

En redes de regulación naturales, el conjunto de mecanismos de unión que se presentan aquí pueden no ser tan sencillos ya que hay otros procesos auxiliares y modificaciones que podrían llevarse a cabo como son la unión de ligandos pequeños, modificaciones post-traduccionales e interacciones con proteínas heterólogas (véase [7] para una revisión detallada del tema). En este trabajo, nuestra exposición se limita a los mecanismos de unión de TF sin tales modificaciones porque quisimos explorar el papel de los componentes intrínsecos a la transcripción antes de obtener detalles de otros jugadores en el proceso.

En trabajos anteriores se ha discutido la relevancia de diferentes motivos de regulación teniendo en cuenta propiedades dinámicas que podrían hacer a un motivo funcionalmente relevante en sistemas biológicos. Sin embargo, dada la limitada cantidad de información acerca del mecanismo cinético exacto usado para lograr la unión de cada TF, la mayor parte de estas aproximaciones no consideran detalles tan finos como los usados en este trabajo. Queremos hacer énfasis en la relevancia de esos detalles en cada mecanismo como un modo de lograr una regulación fina por medio de plasticidad o restricción. Con la primera nos referimos a un mecanismo que sea capaz de promover variabilidad controlada en un sistema, mientras que el segundo estaría restringiendo los estados dinámicos que pueden alcanzarse, promoviendo aislamiento de la retroacción y evitando respuestas ultrasensibles. Una pregunta interesante que este trabajo deja abierta es cuáles son los mecanismos más usados en sistemas biológicos reales.

Una exploración más amplia, utilizando datos masivos, podría ayudar a asegurar que las conexiones río abajo son una fuente de variación suficiente para causar un cambio de estado como la diferenciación y que por ende, el proponer que la retroacción puede ser usada para promover un cambio de estado mostraría tener sentido. Además de esta posible prueba, hay antecedentes biológicos que parecen demostrar que el ruido tiene un papel esencial en el cambio de estado. Otro detalle a explorar es si los reguladores maestros involucrados en los motivos de entrada sencilla (SIMs por sus

siglas en inglés) suelen tener un operador fuerte con  $k_{off}$  pequeña. Si estos SIMs estuvieran involucrados en la diferenciación, esto coincidiría con la indicación de nuestros resultados de que la retroacción hace que el estado final cambie en presencia de sitios de unión. Dichos sitios podrían hacerse presentes de manera dinámica gracias a modificaciones epigenéticas o a la separación de proteínas unidas al ADN que estén bloqueando los sitios de unión del TF en cuestión. El uso de herramientas de análisis de datos masivos podría ayudar en la evaluación de estos resultados como en [24].

Es importante considerar que los sistemas biológicos requieren de distintas acciones dependiendo del tiempo, espacio y subsistema en particular donde se esté dando la acción. Por ejemplo, un regulador maestro debe ser capaz de permitir un cambio de estado definitivo (como el causado en un sistema biestable) o transitorio (como el que se da en un sistema ultrasensible). Por otro lado, algunos sistemas pueden requerir mantener un nivel determinado de un componente, como en la red de micro RNA en [50], donde el ruido se reduce para tener una señal constante.

En la mayor parte de los experimentos de biología molecular es difícil saber si las especies moleculares observadas *in vitro* pueden funcionar *in vivo* o si sólo una fracción de ellas llevan a cabo funciones de pegado y regulatorias (como suponemos en este trabajo). No parece haber una regla para los TFs que han sido analizados exhaustivamente hasta ahora, pero pensamos que el tener información acerca del TF funcional nos permitiría entender mejor cómo los sistemas biológicos logran lidiar con las cargas en redes naturales; ya sea usando o suprimiendo el efecto de estas.

En [14], a diferencia de los resultados que nosotros obtuvimos, los autores propusieron a la dimerización como un mecanismo para reducir ruido. A pesar de que evaluar los monómeros, como lo hicieron ellos, ayuda a tener una especie molecular en común para contrastar el comportamiento de sistemas con dímeros contra el de monómeros, puede darnos la idea errónea si lo que nos interesa es evaluar cómo cambia la función regulatoria del TF. En este trabajo nos interesa la disponibilidad de especies funcionales y, en los casos que evaluamos, la dimerización aumenta la variabilidad. De cualquier forma, es importante considerar que la variabilidad que observamos podría deberse en parte a la pequeña cantidad de moléculas de dímero. Sería interesante evaluar en un trabajo futuro cómo la dimerización afecta la disponibilidad de factor transcripcional funcional libre usando distintos números de moléculas de TF.

Nuestros resultados refuerzan la idea, previamente expuesta en los Antecedentes, de la retroacción como una señal que retrasa la respuesta de un sistema. El papel del ruido como parte de los efectos de la retroacción ha sido previamente analizado en [31] y [30]. En el primero, los autores concluyeron que, para sistemas con alta frecuencia de oscilaciones en su salida, las cargas río abajo pueden afectar la calidad de la señal de salida. En el segundo, buscaron un balance entre incrementar el número de sitios a regular río abajo y el comportamiento íntegro del sistema que está río arriba. El incrementar el número de copias de un gen es importante porque entre

mayor número de moléculas de una especie produzca la célula, menor será el ruido interno relacionado con esta especie molecular.

Para concluir, nuestra investigación sugiere que la función biológica de los mecanismos que analizamos es modulada por la retroacción. Por lo tanto, este fenómeno que surge de la conectividad puede fungir como una primera representación para explorar la funcionalidad de los mecanismos de unión en redes biológicas.



Parte V

APÉNDICES





# A

---

## APÉNDICE A

---

### A.1 COMPARACIÓN DE SIMULACIONES DETERMINISTAS CONTRA ESTOCÁSTICAS

### A.2 INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS EN EL SS

Evaluamos parámetros por pares e individualmente para determinar los cambios internos que causa cada parámetro (o pareja de ellos) en la diferencia entre casos conectados y desconectados.

#### A.2.1 $\delta_1$

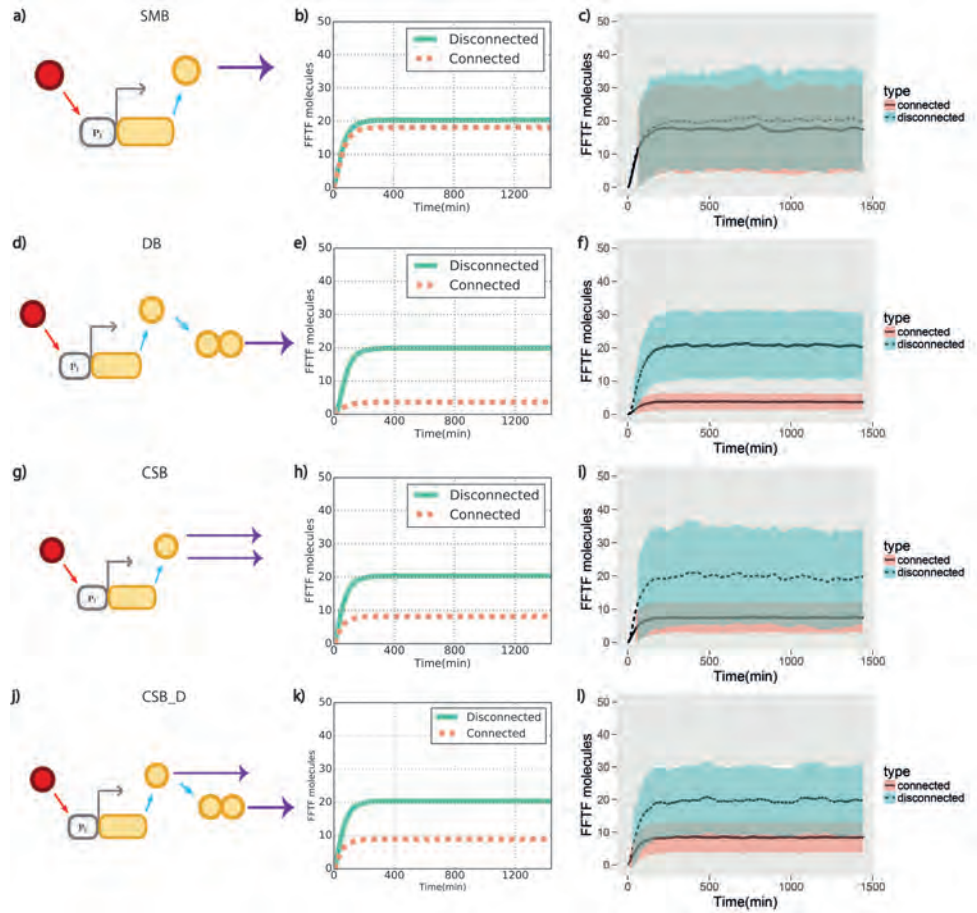
$\delta_1$  no parece afectar mayormente los efectos de retroacción en el régimen débil de SMB tal como se observa en la Figura A4, mientras que para DB,  $\delta_1$  cambio de manera importante el SS de las moléculas de FFTF. Estos grandes cambios también se observaron para ambos mecanismos conectados en régimen de unión fuerte (véanse Figuras A5 y A6).

#### A.2.2 $\delta_2$

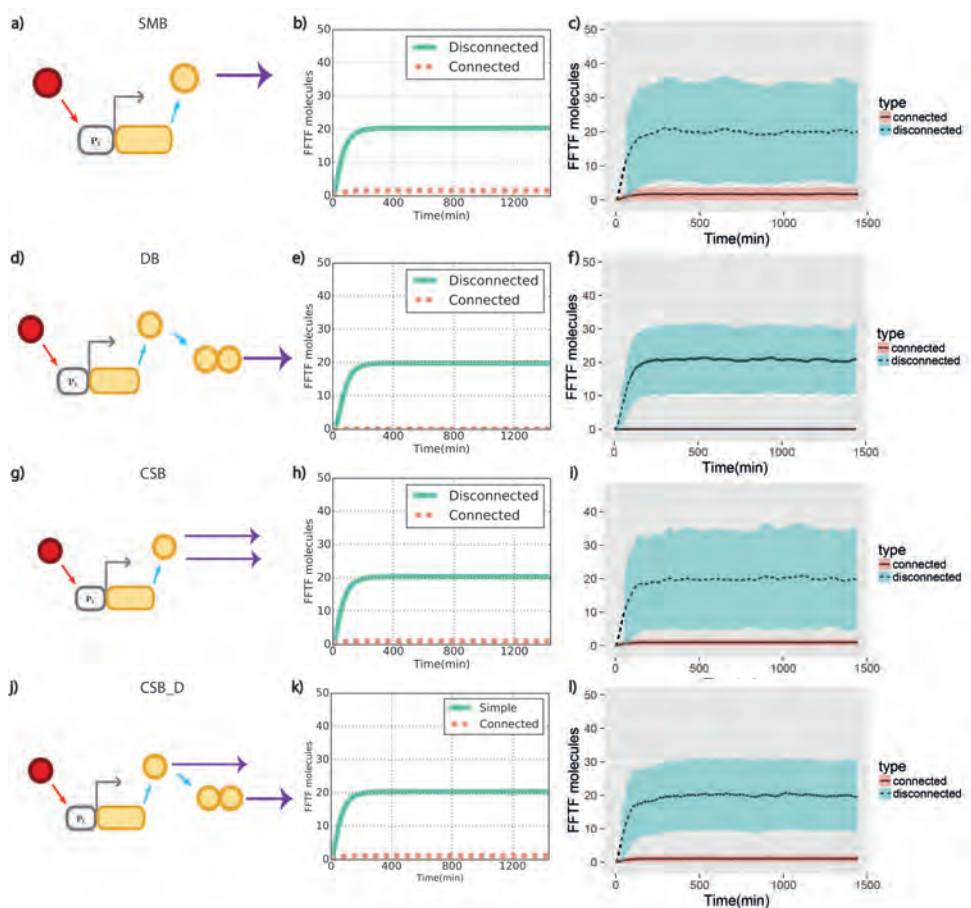
En el régimen débil, el cambio en  $\delta_2$  sólo modificó ligeramente el SS de FFTF en el mecanismo SMB (Figura A7) como se refleja en las Figuras 8 –donde la influencia de  $p_{tot2}$  sólo se observa para SMB– y 10.

#### A.2.3 $\delta_3$

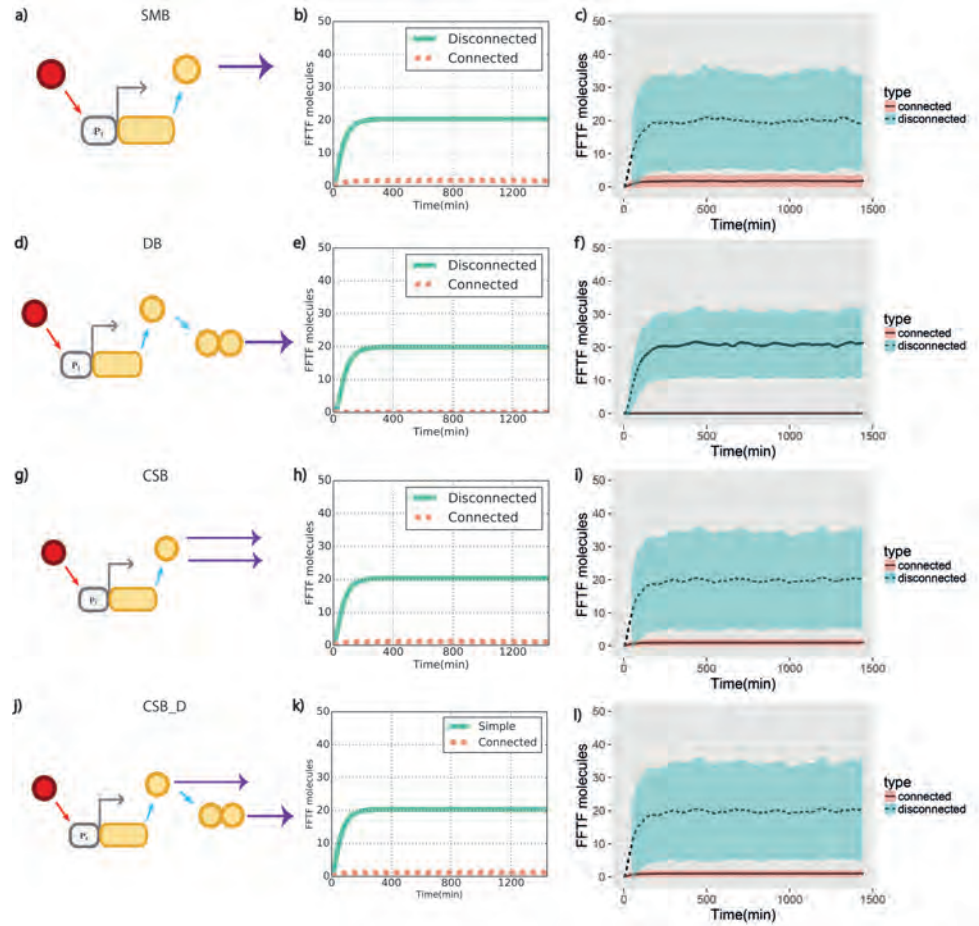
Como se puede apreciar en la Figura 8,  $\delta_3$  tiene una importante influencia en el FFTF para todos los mecanismos a través de un amplio rango de  $p_{tot2}$ . Los análisis de las Figuras A10, A11 y A12 son equivalentes a la última fila de la Figura 8 a) y b), e) y f), e i) y j), respectivamente. Como se puede ver tanto en la Figura 8 a) y la Figura A10, SMB en el régimen débil, fue el TFBP donde el número de moléculas de FFTF fue menos afectado por cambios en  $\delta_3$ , mientras que para el pegado fuerte de DB, todos los valores de  $\delta_3$ , con excepción de 0.002, dieron como resultado una gran distancia entre el número de moléculas de FFTF entre los casos conectado y desconectado.



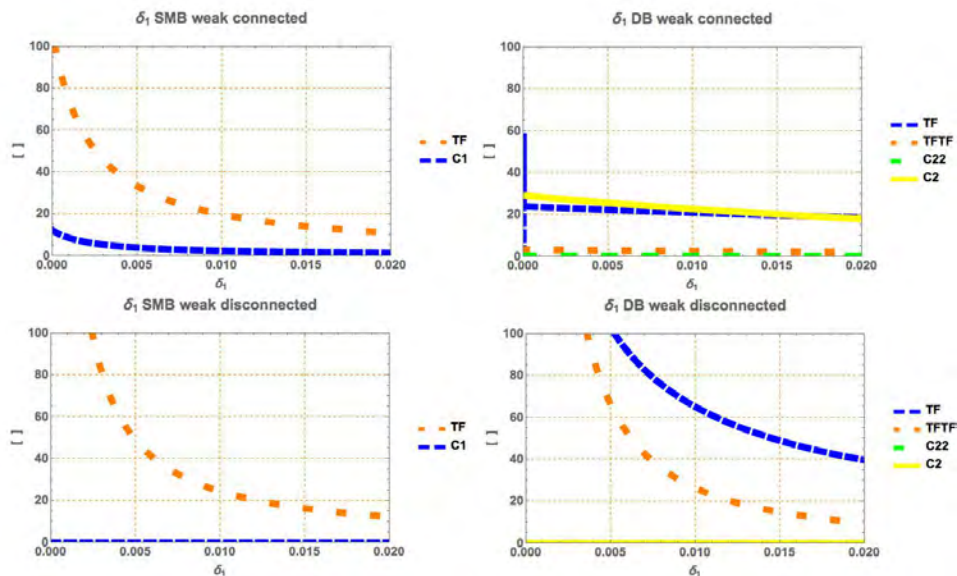
**Fig. A1. Simulaciones estocásticas vs deterministas de FFTF en el régimen débil** a), d), g) y j) son representaciones de los mecanismos, donde a) es SMB, d) es DB, g) es CSB y j) es CSB\_D. b), e), h) y k) son las gráficas de las simulaciones deterministas para 300 sitios de unión río abajo. La línea continua representa el sistema desconectado y la línea punteada el sistema conectado. El eje y representa el número de moléculas de FFTF, mientras que el eje x es el tiempo en minutos. c), f), i) y l) representan la media y desviaciones estándar del ensamble de simulaciones estocásticas en cada tiempo muestreado.



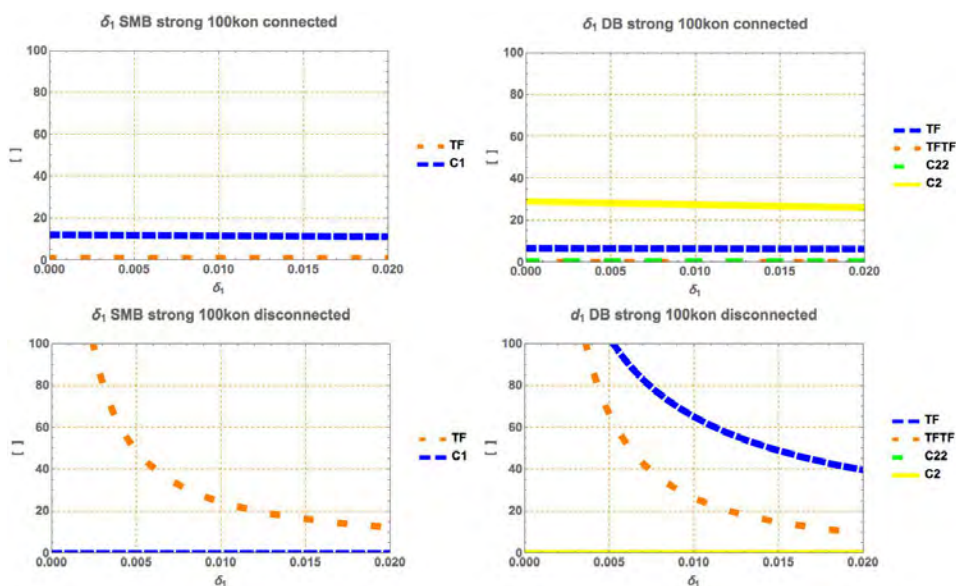
**Fig. A2. Simulaciones estocásticas vs deterministas de FFTF en el régimen fuerte strong 100kon.** a), d), g) y j) son representaciones de los mecanismos, donde a) es SMB, d) es DB, g) es CSB y j) es CSB\_D. b), e), h) y k) son las gráficas de las simulaciones deterministas 300 sitios de unión río abajo. La línea continua representa el sistema desconectado y la línea punteada el sistema conectado. El eje y representa el número de moléculas de FFTF, mientras que el eje x es el tiempo en minutos. c), f), i) y l) representan la media y desviaciones estándar del ensamble de simulaciones estocásticas en cada tiempo muestreado.



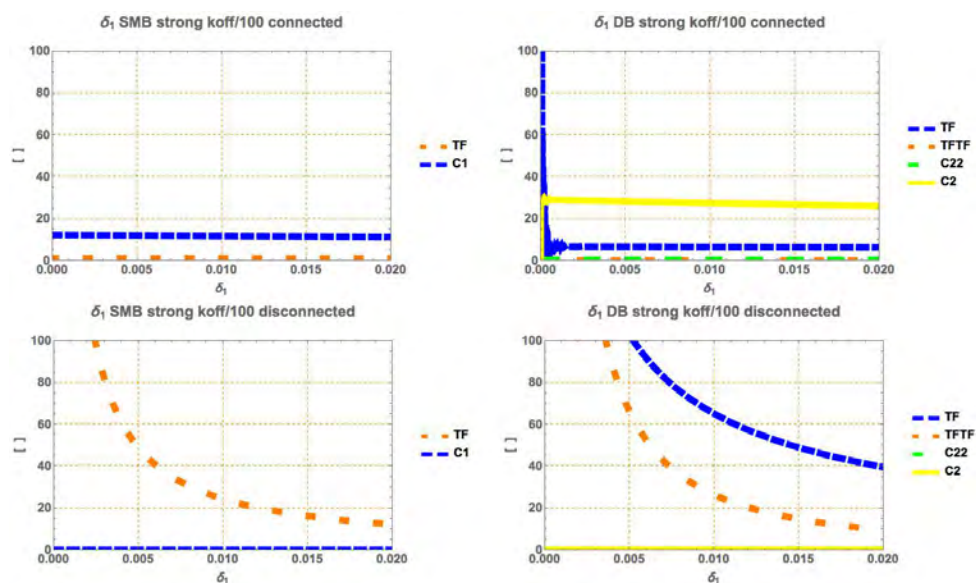
**Fig. A3. Simulaciones estocásticas vs deterministas de FTFF en el régimen fuerte  $\text{strong koff}/100$ .** a), d), g) y j) son representaciones de los mecanismos, donde a) es SMB, d) es DB, g) es CSB y j) es CSB\_D. b), e), h) y k) son las gráficas de las simulaciones deterministas 300 sitios de unión río abajo. La línea continua representa el sistema desconectado y la línea punteada el sistema conectado. El eje y representa el número de moléculas de FTFF, mientras que el eje x es el tiempo en minutos. c), f), i) y l) representan la media y desviaciones estándar del ensamble de simulaciones estocásticas en cada tiempo muestreado.



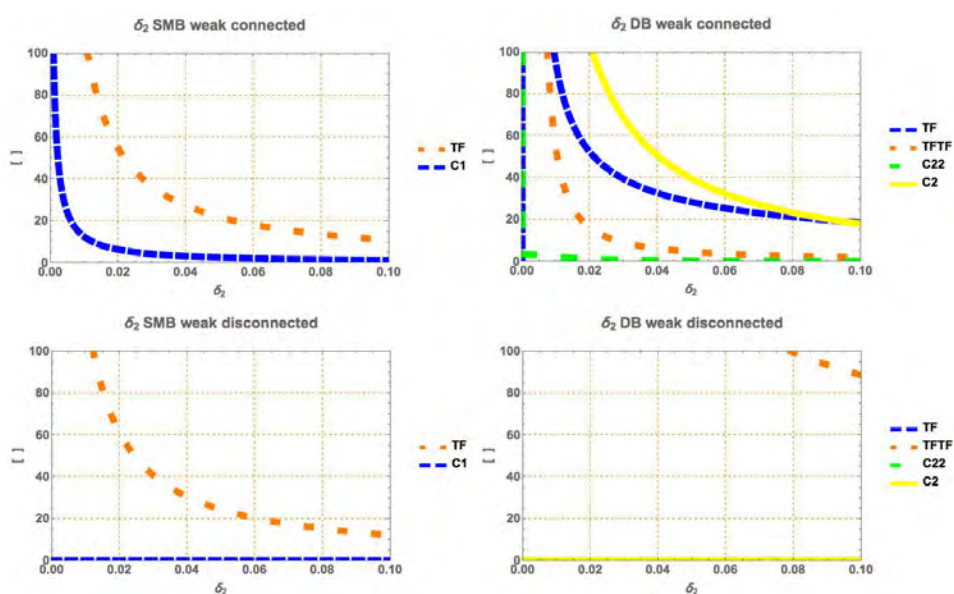
**Fig. A4.** Efectos de  $\delta_1$  en régimen débil en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $\delta_1$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



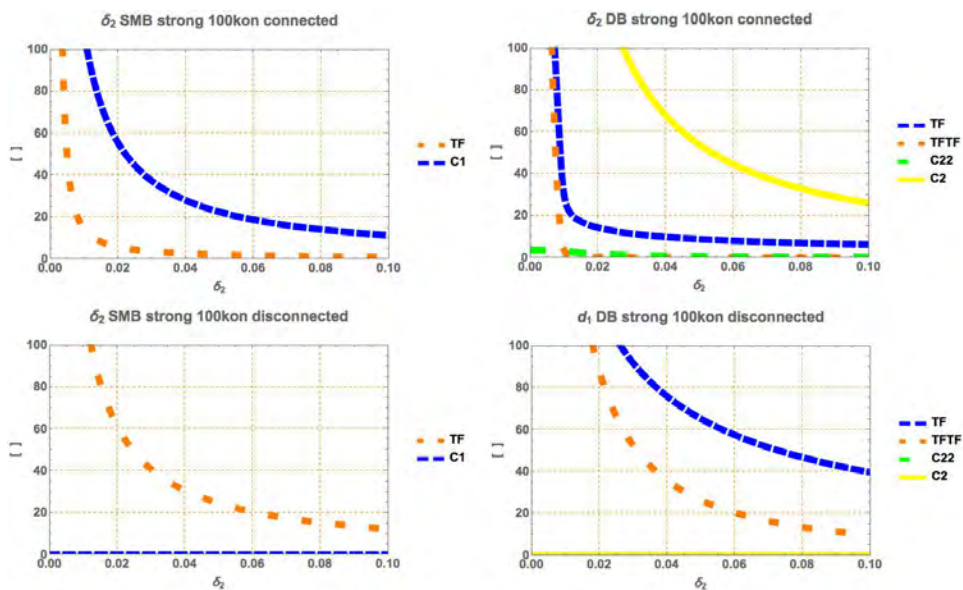
**Fig. A5.** Efectos de  $\delta_1$  en régimen de unión fuerte strong 100kon en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $\delta_1$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



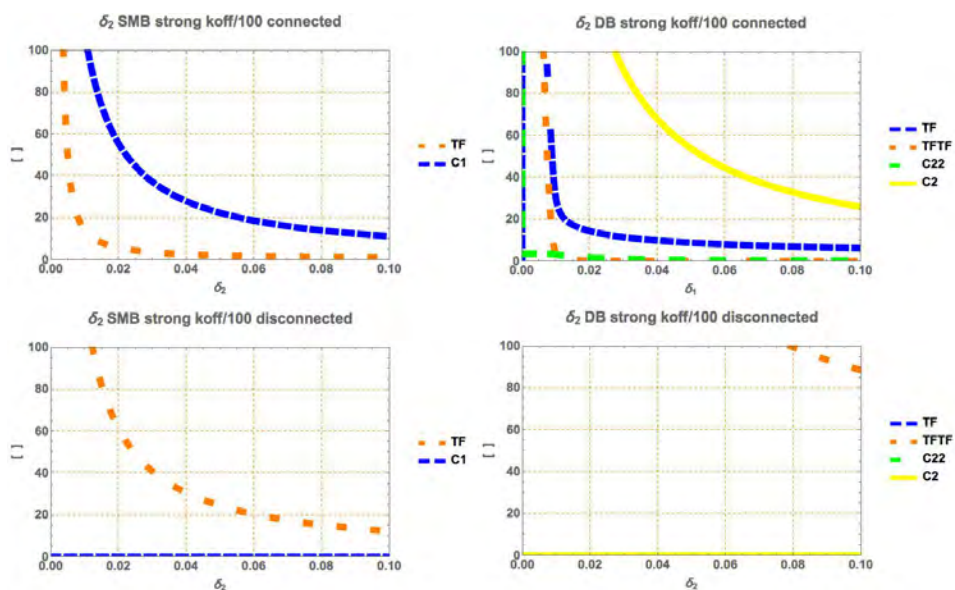
**Fig. A6. Efectos de  $\delta_1$  en régimen de unión fuerte strong koff/100 en el SS de SMB y DB.** Calculamos cómo la variación de  $\delta_1$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



**Fig. A7. Efectos de  $\delta_2$  en régimen débil en el SS de SMB y DB.** Calculamos cómo la variación de  $\delta_2$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.

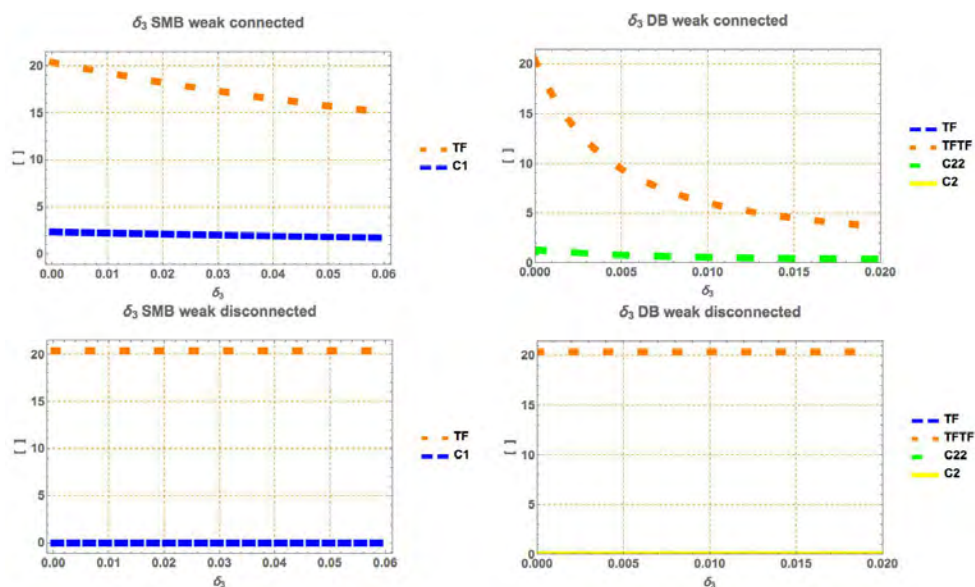


**Fig. A8. Efectos de  $\delta_2$  en régimen de unión fuerte strong 100kon en el SS de SMB y DB.** Calculamos cómo la variación de  $\delta_2$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.

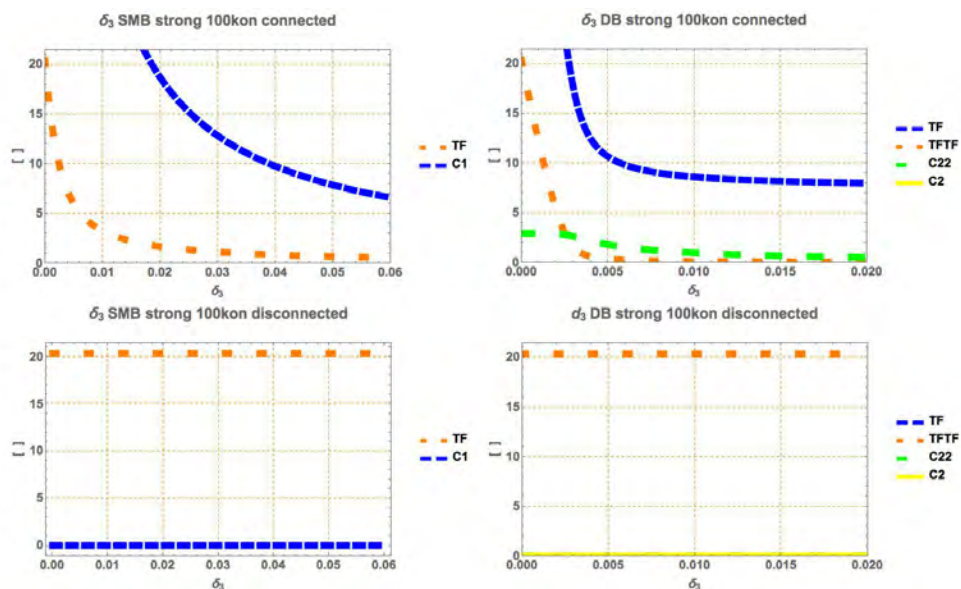


**Fig. A9. Efectos de  $\delta_2$  en régimen de unión fuerte strong koff/100 en el SS de SMB y DB.** Calculamos cómo la variación de  $\delta_2$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.

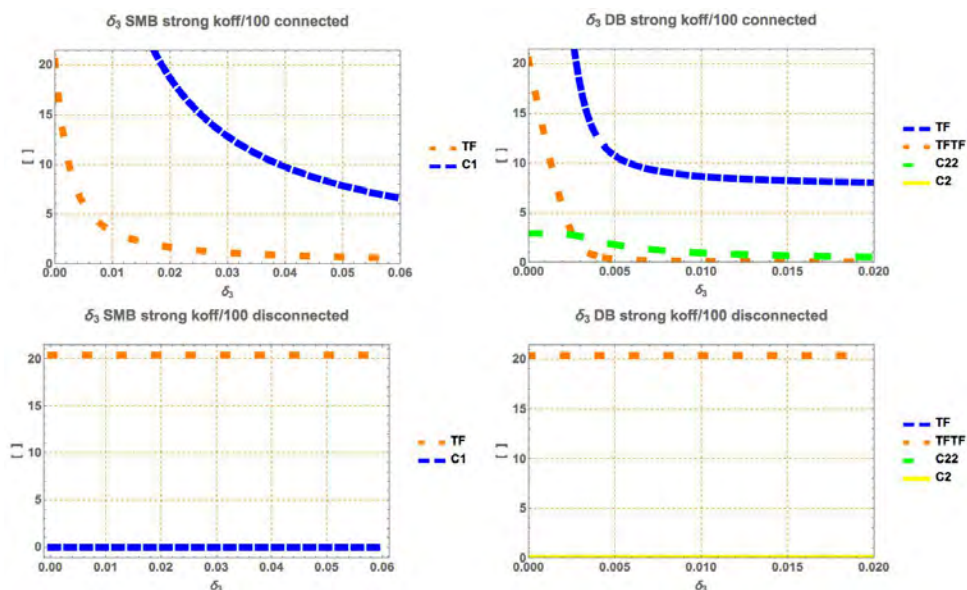




**Fig. A10.** Efectos de  $\delta_3$  en régimen débil en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $\delta_3$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



**Fig. A11.** Efectos de  $\delta_3$  en régimen de unión fuerte strong 100kon en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $\delta_3$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



**Fig. A12.** Efectos de  $\delta_3$  en régimen de unión fuerte strong koff/100 en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $\delta_3$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FTF se muestra como una línea punteada anaranjada.

#### A.2.4 $k_{on}$

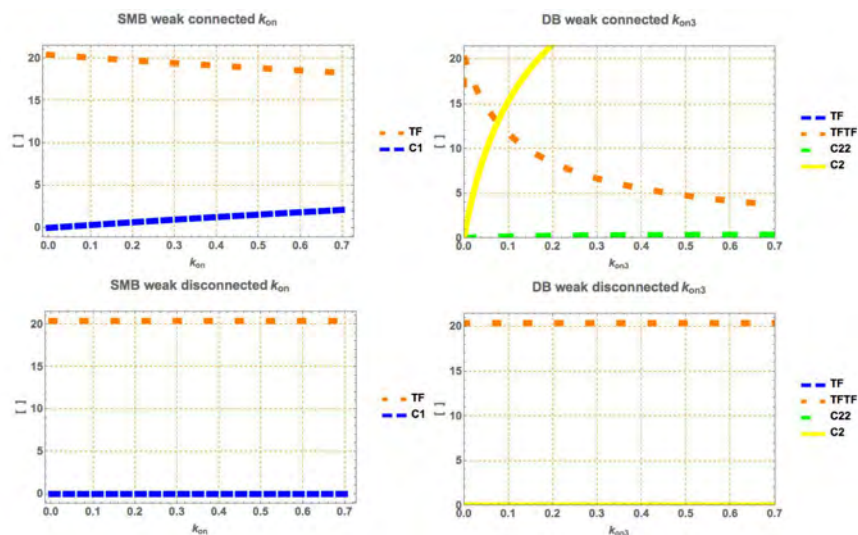
Los cambios en el SS de FTF para el mecanismo SMB fueron menores que en DB; sin embargo, los cambios entre el caso conectado y desconectado observados para  $k_{on}$  fueron menos abruptos que para  $\delta_3$ . Este tipo de cambios también se observaron, pero en menor medida, para DB. Esto es consistente con las observaciones realizadas en la Figura 7.

#### A.2.5 $k_{off}$

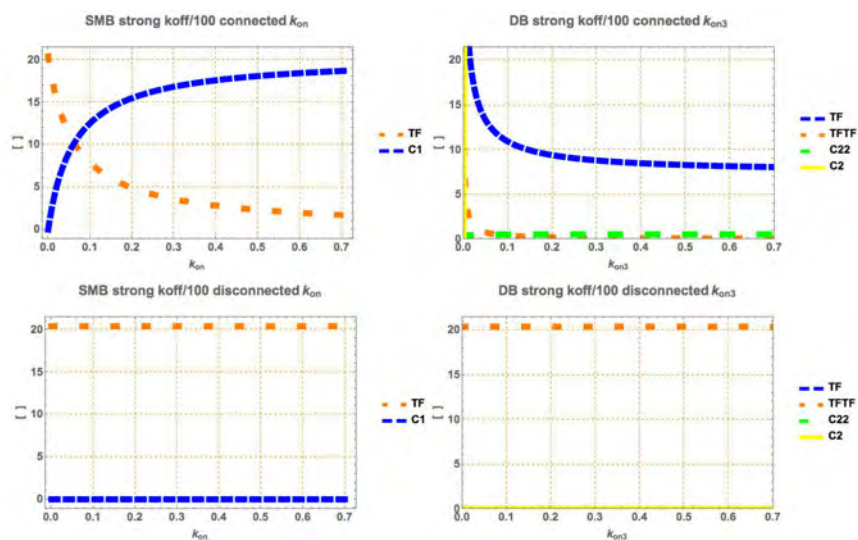
Como puede verse en la Figura 7, la tasa de disociación tienen el efecto opuesto a la de asociación, entre mayor sea, más similar el número de moléculas de FTF en el SS se vuelve al caso desconectado. El efecto de este parámetro es grande en SMB (Figura A15) en el régimen débil, mientras que este efecto se debilita en el régimen fuerte (Figura A16). DB no mostró ninguna diferencia en la fuerza de los efectos dependiendo del régimen.

#### A.2.6 $k_{on}$ vs $k_{off}$

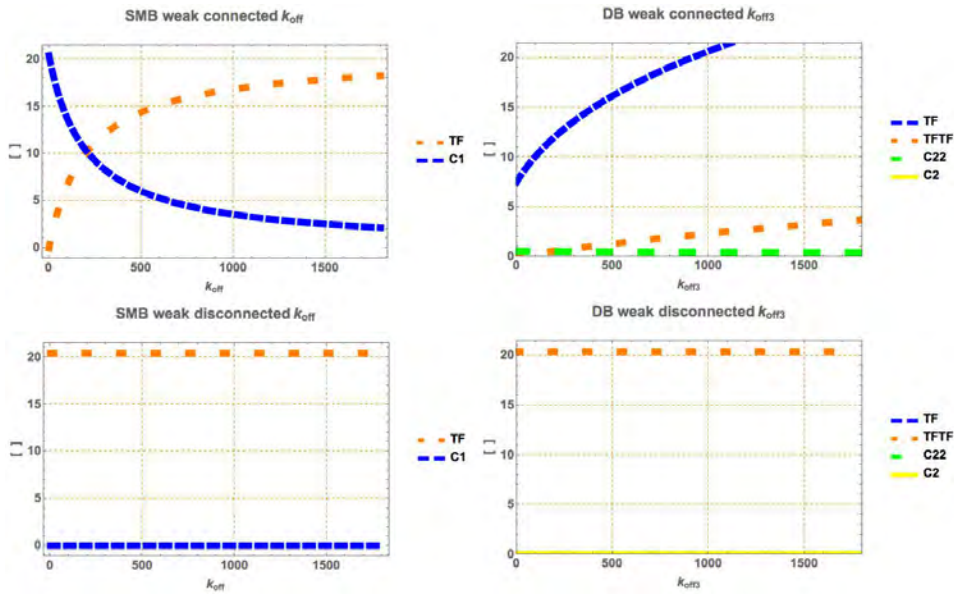
En los mapas de densidad en la Figura A17 puede observarse que el SS de FTF en SMB permaneció prácticamente sin cambios para la mayor parte de las parejas de tasa de asociación y disociación, mientras que DB cambió



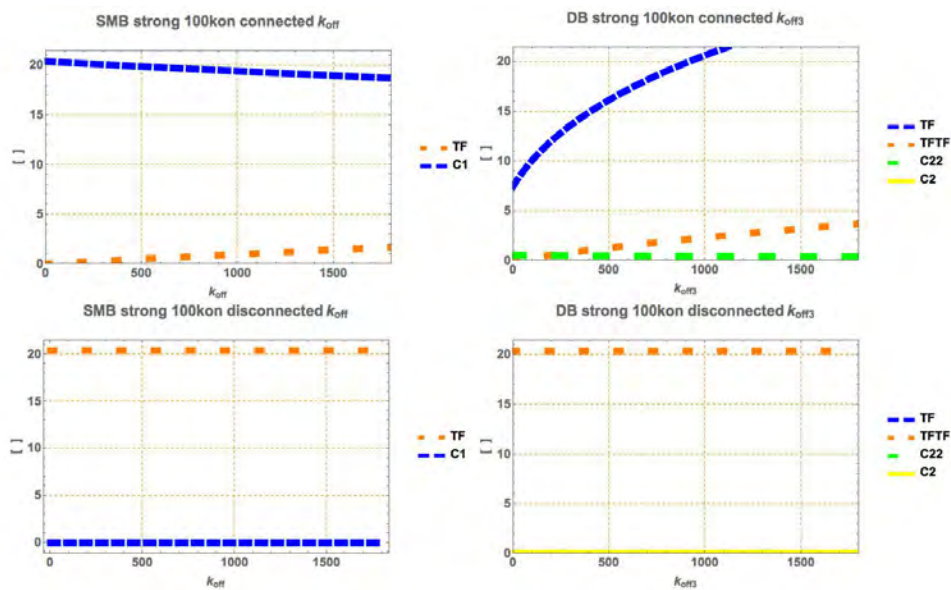
**Fig. A13.** Efectos de  $k_{on}$  en régimen de unión débil en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $k_{on}$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



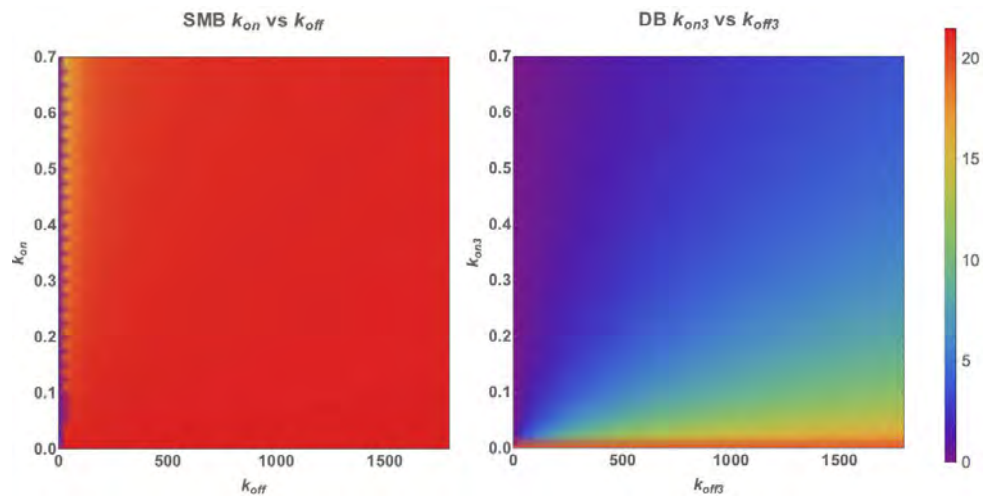
**Fig. A14.** Efectos de  $k_{on}$  en régimen de unión fuerte strong koff/100 en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $k_{on}$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



**Fig. A15.** Efectos de  $k_{off}$  en régimen de unión débil en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $k_{off}$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



**Fig. A16.** Efectos de  $k_{off}$  en régimen de unión fuerte strong 100kon en el SS de SMB y DB. Calculamos cómo la variación de  $k_{off}$  afecta los valores de SS tanto en el caso conectado (paneles superiores) como en el desconectado (paneles inferiores) para DB y SMB. Todas las especies moleculares que incluyen TF se muestran en la figura. El FFTF se muestra como una línea punteada anaranjada.



**Fig. A17.** Efectos de las tasas de asociación y disociación en el SS de SMB y DB. En este mapa de densidad es fácil notar que SMB permanece casi sin cambios para la mayor parte de los pares de tasas de asociación y disociación, mientras que DB cambió considerablemente.

de manera importante en la mayor parte de dichas parejas. Esto concuerda con las observaciones hechas para los parámetros individuales las Figuras A13 a A16 y en la Figura 7 donde la diferencia entre los casos conectado y desconectado se mide con la distancia de Canberra entre ellos.

# B

---

## APÉNDICE B

---

En este apéndice incluimos los modelos basados en reglas utilizados en este trabajo.

### B.1 MODELOS EN BIONETGEN

BioNetGen es un lenguaje que permite programar modelos moleculares basados en reglas, lo cual involucra la representación de moléculas como objetos estructurados y la de las interacciones entre ellas como reglas para transformar los atributos de tales objetos [22]. Su notación es muy similar a la de los modelos de ecuaciones químicas, lo cual facilita el capturar la dinámica molecular que se da en un sistema.

#### B.1.1 Caso 1: Unión de monómero sencillo (SMB)

```
# Retroactivity model made in BNGL
#Simple monomer binding

begin model

begin parameters

  # DNA binding rate
  kon ((3*10^8)*60.0)/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15))))))

  # DNA unbinding rate
  koff 30*60

  #External signal number of molecules
s 11.43

  #TF degradation rate
  d 0.02

  #mRNA degradation rate
  d2 0.06
```

```
#DNA-TF complex degradation rate
d3 0.02

#S dependent transcription rate
k 0.09/50

#translation rate
k2 0.8

#basal transcription rate
a 0.01

end parameters

begin molecule types

  # Output signal
  S(b)

  # Transcription factor
  TF(b)

  # TF Promoter
  P1(b)

  #Degradation
  Null()

  #mRNA
  mRNA()

  #TF binding sites
  P2(b)

end molecule types

begin seed species

#External signal
S(b) s

#TF
TF(b) 0

#TF promoter
```

```

P1(b) 1

#Trash
$Null() 1

#TF mRNA
mRNA() 0

#Downstream binding sites
P2(b) 300

end seed species

begin observables
Molecules TF TF(b)
end observables

begin reaction rules

# Basal transcription
P1(b) -> P1(b) + mRNA() a

# S dependent transcription
P1(b) + S(b) -> P1(b) + S(b) + mRNA() k

# Translation
mRNA() -> mRNA() + TF(b) k2

# DNA binding and unbinding
P2(b) + TF(b) <-> P2(b!1).TF(b!1) kon, koff

# TF degradation
TF(b) -> Null d

# mRNA degradation
mRNA() -> Null d2

# Complex degradation
P2(b!1).TF(b!1) -> P2(b) d3

end reaction rules
end model

#ACTIONS

```



```

generate_network({overwrite=>1});

#Any of the next two instructions that follow may be used
#to indicate how you want to simulate it

#simulate_ode({t_end=>2880,n_steps=>2880,verbose=>1});
simulate_ssa({t_end=>1440,n_steps=>2880});

writeLatex();

```

### B.1.1.2 Caso 2: Unión de dímero (DB)

```

begin model

begin parameters

    # TF.TF DNA binding rate
    kon3 ((3*10^8)*60.0)/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15))))))

    # TF.TF DNA unbinding rate
    koff3 30*60

    # TF.TF DNA stabilizing rate
    kon3_2 10

    # TF.TF DNA destabilizing rate
    koff3_2 0.1

    # TF.TF DNA unbinding rate
    koff3 30*60

    #External signal number of molecules
    s 76.3

    #TF and TF.TF degradation rate
    d 0.02

    #mRNA degradation rate
    d2 0.06

    #DNA/TF complex degradation rate
    d3 0.02

    #S dependent transcription rate

```

```

k 0.09/50

    #translation rate
k2 0.8

    #basal transcription rate
a 0.01

    # Dimerization rate
kdim 1.6*(10.0^7)*60.0/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15))))))

    #Dimer unbinding rate (decomposition to monomers)
kundim 0.05*60

end parameters

begin molecule types

    # Output signal
S(b)

    # Transcription Factor(TF)
TF(b)

    #TF promoter
P1(b)

    #Trash
Null()

    #TF's mRNA
mRNA()

    #Downstream binding sites
P2(b,c~u~s)

    #Dimer
TFTF(b)

end molecule types

begin seed species

S(b) s
TF(b) 0

```

```

P1(b) 1
$Null() 1
mRNA() 0
P2(b,c~u) 300
TFTF(b) 0

end seed species

begin observables
Molecules TF TF(b)
Molecules TFTF TFTF(b)
end observables

begin reaction rules

    # Basal transcription
P1(b) -> P1(b) + mRNA() a

    # S dependent transcription
P1(b) + S(b) -> P1(b) + S(b) + mRNA() k

#TF dimer binding/unbinding
    TF(b) + TF(b) <-> TFTF(b) kdim,kundim

# Translation
    mRNA() -> mRNA() + TF(b) k2

    #Dimer DNA binding/unbinding
P2(b,c~u) + TFTF(b) <-> P2(b!1,c~u).TFTF(b!1) kon3, koff3

    #Dimer DNA stabilization/destabilization
P2(b!1,c~u).TFTF(b!1) <-> P2(b!1,c~s).TFTF(b!1) kon3_2, koff3_2

#mRNA degradation
    mRNA() -> Null d2

#TF degradation
    TF(b) -> Null d

#TF dimer degradation
    TFTF(b) -> Null d

    # Dimer-DNA complex degradation
P2(b!1).TFTF(b!1) -> P2(b,c~u) d3
end reaction rules

```

```

end model

#ACTIONS

generate_network({overwrite=>1});

#Any of the next two instructions that follow may be used
#to indicate how you want to simulate it

#simulate_ode({t_end=>2880,n_steps=>2880,verbose=>1});

simulate_ssa({t_end=>1440,n_steps=>2880});

writeLatex();

```

### B.1.3 *Caso 3: Unión de dos monómeros cooperativos secuenciales sin dimerización (CSB)*

```

begin model

begin parameters

    # Second monomer binding rate
kon2 (5*10^8)*60.0/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15)))))

    # Second monomer unbinding rate
koff2 0.03*60

    # First monomer binding rate
kon1 (5*10^8)*60.0/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15)))))

    # First monomer unbinding rate
koff1 50*60

    # External signal number of molecules
s 11.43

    # TF degradation rate
d 0.02

    # mRNA degradation rate
d2 0.06

    # DNA/TF complex degradation rate
d3 0.02

```

```
    # S dependent transcription rate
k 0.09/50
```

```
    # translation rate
k2 0.8
```

```
    # basal transcription rate
a 0.01
```

```
end parameters
```

```
begin molecule types
```

```
#Isolated
```

```
    #Signaling component
    S(b)
```

```
    #TF
    TF(b)
```

```
    #TF promoter
    P1(b1,b2)
```

```
    #Trash
    Null()
```

```
    #mRNA
    mRNA()
```

```
    #Downstream binding sites
    P2(b1,b2)
```

```
    #Dimer
    TTF(b1,b2)
```

```
end molecule types
```

```
begin seed species
```

```
S(b) s
```

```
TF(b) 0
```

```
P1(b1,b2) 1
```

```
$Null() 1
```

```
mRNA() 0
```

```

P2(b1,b2) 300

end seed species

begin observables
Molecules TF TF(b)
end observables

begin reaction rules

    # Basal transcription
P1(b1,b2) -> P1(b1,b2) + mRNA() a

    # S dependent transcription
P1(b1,b2) + S(b) -> P1(b1,b2) + S(b) + mRNA() k

# Translation
mRNA() -> mRNA() + TF(b) k2

# mRNA degradation
mRNA() -> Null d2

# TF degradation
TF(b) -> Null d

    # First monomer binding in site one
P2(b1,b2) + TF(b) <-> P2(b1!0,b2).TF(b!0) kon1, koff1

    # First monomer binding in site two
P2(b1,b2) + TF(b) <-> P2(b1,b2!0).TF(b!0) kon1, koff1

    # Second monomer binding in site two
P2(b1!0,b2).TF(b!0) + TF(b) <-> P2(b1!0,b2!1).TFTF(b1!0,b2!1) kon2, koff2

    # Second monomer binding in site one
P2(b1,b2!0).TF(b!0) + TF(b) <-> P2(b1!0,b2!1).TFTF(b1!0,b2!1) kon2, koff2

    # Monomer-DNA complex degradation
P2(b1!0,b2).TF(b!0) -> P2(b1,b2) d3
P2(b1,b2!0).TF(b!0) -> P2(b1,b2) d3

    #Dimer-DNA complex degradation
P2(b1!0,b2!1).TFTF(b1!0,b2!1) -> P2(b1,b2) d3

end reaction rules
end model

```

```
#ACTIONS
```

```
generate_network({overwrite=>1});
```

```
#Any of the next two instructions that follow may be used
#to indicate how you want to simulate it
```

```
#simulate_ode({t_end=>2880,n_steps=>2880,verbose=>1});
```

```
simulate_ssa({t_end=>1440,n_steps=>2880});
```

```
writeLatex();
```

B.1.4 *Caso 4: Unión de dos monómeros cooperativos secuenciales con dimerización (CSB\_D)*

```
begin model
```

```
begin parameters
```

```
  # Dimer DNA binding rate
```

```
  kon3 ((3*10^8)*60.0)/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15)))))
```

```
  # Dimer DNA unbinding rate
```

```
koff3 30*60
```

```
  # TF.TF DNA stabilizing rate
```

```
  kon3_2 10
```

```
  # TF.TF DNA destabilizing rate
```

```
  koff3_2 0.1
```

```
  # Second monomer binding rate
```

```
kon2 (5*10^8)*60.0/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15)))))
```

```
  # Second monomer unbinding rate
```

```
koff2 0.03*60
```

```
  # First monomer binding rate
```

```
kon1 (5*10^8)*60.0/((6.022*(10.0^23)*(42.0*(10.0^(-15)))))
```

```
  # First monomer unbinding rate
```

```
koff1 50*60
```

```
  # External signal number of molecules
```

```

s 13.1

    # TF degradation rate
d 0.02

    # mRNA degradation rate
d2 0.06

    # DNA/TF complex degradation rate
d3 0.02

    # S dependent transcription rate
k 0.09/50

    # translation rate
k2 0.8

    # basal transcription rate
a 0.01

    # Dimerization rate
kdim  $1.6 \cdot (10.0^7) \cdot 60.0 / ((6.022 \cdot (10.0^{23})) \cdot (42.0 \cdot (10.0^{(-15))}))$ 

    # Dimer unbinding rate to monomers
kundim 0.05*60

end parameters

begin molecule types

#Isolated

    #Signaling component
    S(b)

    #TF
    TF(b)

    #TF promoter
    P1(b1,b2)

    #Trash
    Null()

    #mRNA

```



```

mRNA()

    #Downstream binding sites
P2(b1,b2,c~u~s)

    #Dimer
TFTF(b1,b2)

end molecule types

begin seed species
S(b) s
TF(b) 0
P1(b1,b2) 1
$Null() 1
mRNA() 0
P2(b1,b2,c~u) 300
TFTF(b1,b2) 0
end seed species

begin observables
Molecules TF TF(b)
Molecules TFTF TFTF(b1,b2)
end observables

begin reaction rules

    # Basal transcription
P1(b1,b2) -> P1(b1,b2) + mRNA() a

    # S dependent transcription
P1(b1,b2) + S(b) -> P1(b1,b2) + S(b) + mRNA() k

# Translation
mRNA() -> mRNA() + TF(b) k2

    # TF dimer binding and unbinding
TF(b) + TF(b) <-> TFTF(b1,b2) kdim,kundim

# mRNA degradation
mRNA() -> Null d2

# TF degradation
TF(b) -> Null d

# Dimer degradation

```

```

TFTF(b1,b2) -> Null d

# Dimer DNA binding
P2(b1,b2,c~u) + TFTF(b1,b2) <-> P2(b1!0,b2!1,c~u).TFTF(b1!0,b2!1) kon3, koff3

#Dimer DNA stabilization/destabilization
P2(b1!0,b2!1,c~u).TFTF(b1!0,b2!1) <-> P2(b1!0,b2!1,c~s).TFTF(b1!0,b2!1) kon3_2, koff3_2

# First monomer binding in site one
P2(b1,b2,c~u) + TF(b) <-> P2(b1!0,b2,c~u).TF(b!0) kon1, koff1

# First monomer binding in site two
P2(b1,b2,c~u) + TF(b) <-> P2(b1,b2!0,c~u).TF(b!0) kon1, koff1

# Second monomer binding in site two
P2(b1!0,b2,c~u).TF(b!0) + TF(b) <-> P2(b1!0,b2!1,c~s).TFTF(b1!0,b2!1) kon2, koff2

# Second monomer binding in site one
P2(b1,b2!0,c~u).TF(b!0) + TF(b) <-> P2(b1!0,b2!1,c~s).TFTF(b1!0,b2!1) kon2, koff2

# Dimer-DNA complex degradation
P2(b1!0,b2!1).TFTF(b1!0,b2!1) -> P2(b1,b2,c~u) d3

# Monomer-DNA complex degradation
P2(b1!0,b2).TF(b!0) -> P2(b1,b2,c~u) d3

#Monomer-DNA complex degradation
P2(b1,b2!0).TF(b!0) -> P2(b1,b2,c~u) d3

end reaction rules
end model

#ACTIONS

generate_network({overwrite=>1});

#Any of the next two instructions that follow may be used
#to indicate how you want to simulate it

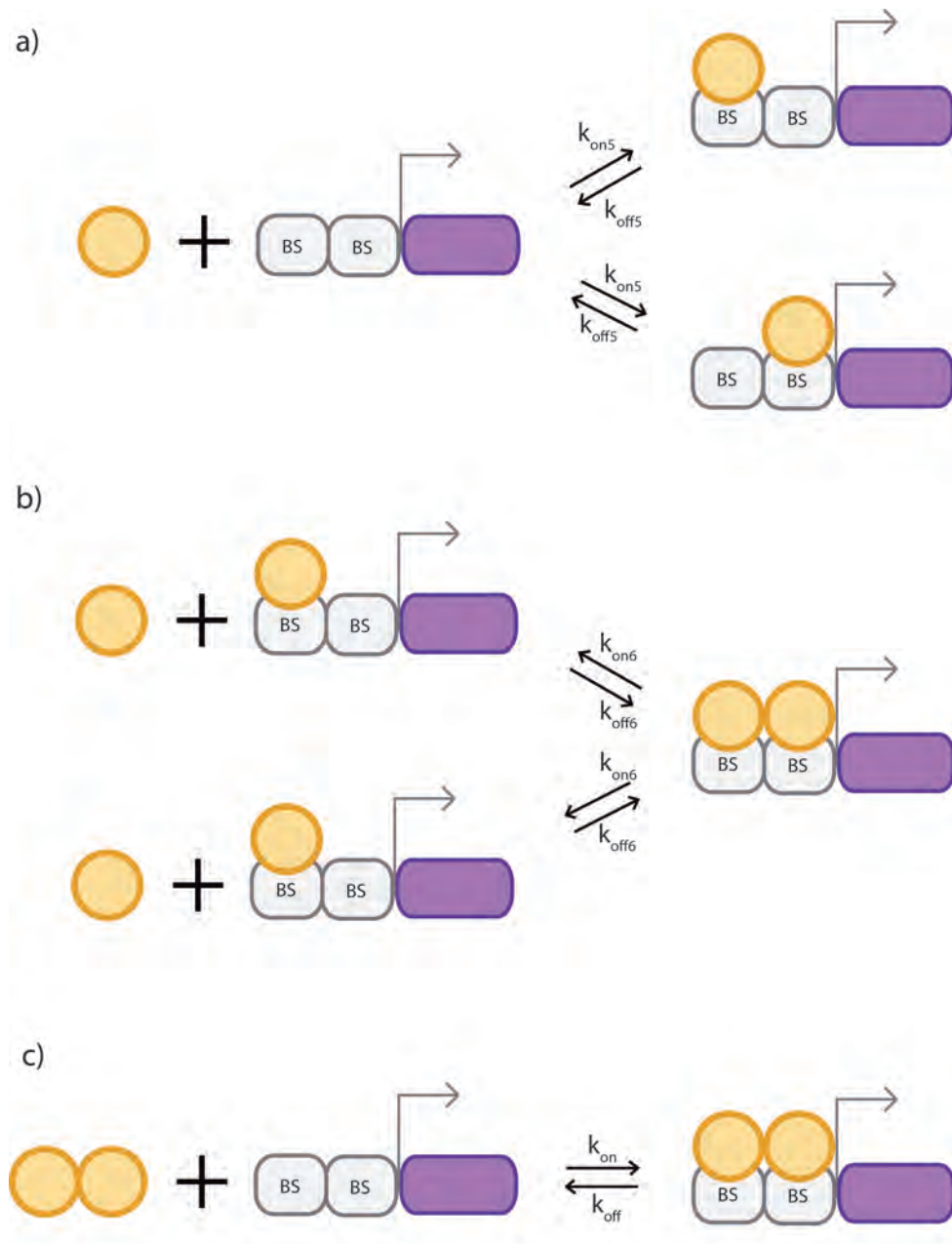
#simulate_ode({t_end=>2880,n_steps=>2880,verbose=>1});

simulate_ssa({t_end=>1440,n_steps=>2880});

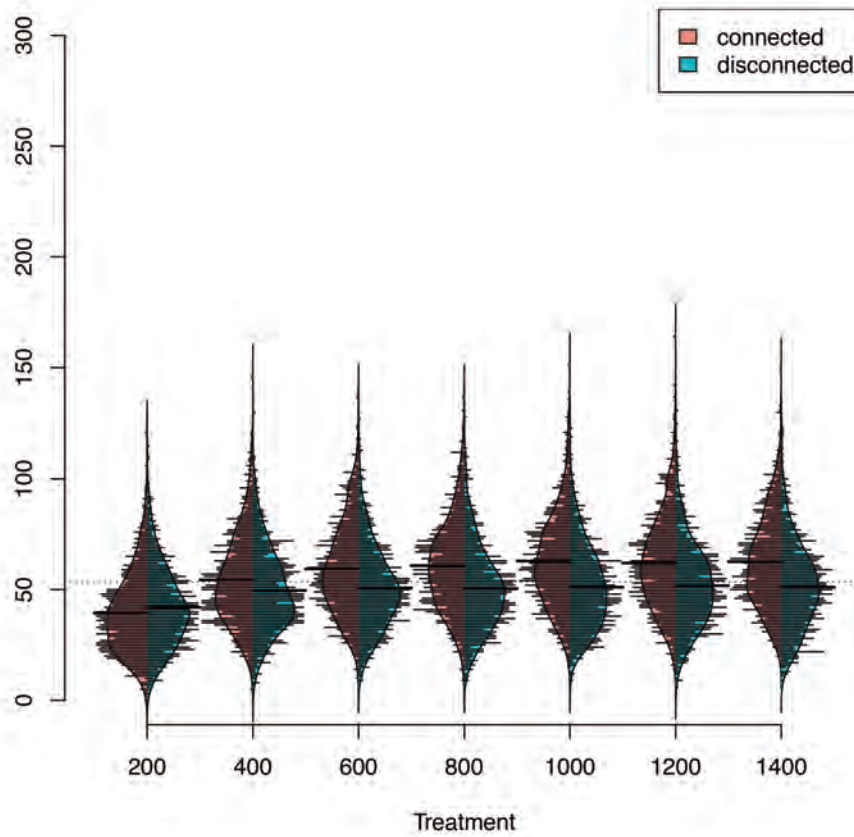
writeLatex();

```

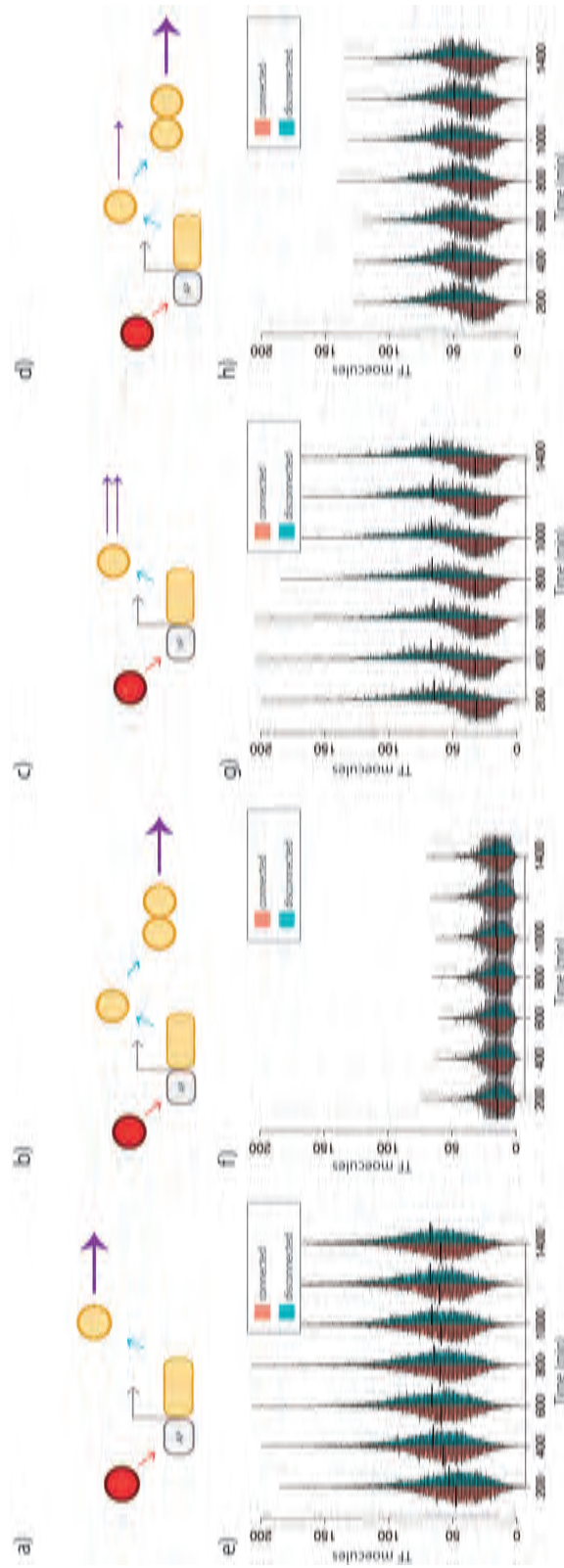
## B.2 FIGURAS SUPLEMENTARIAS



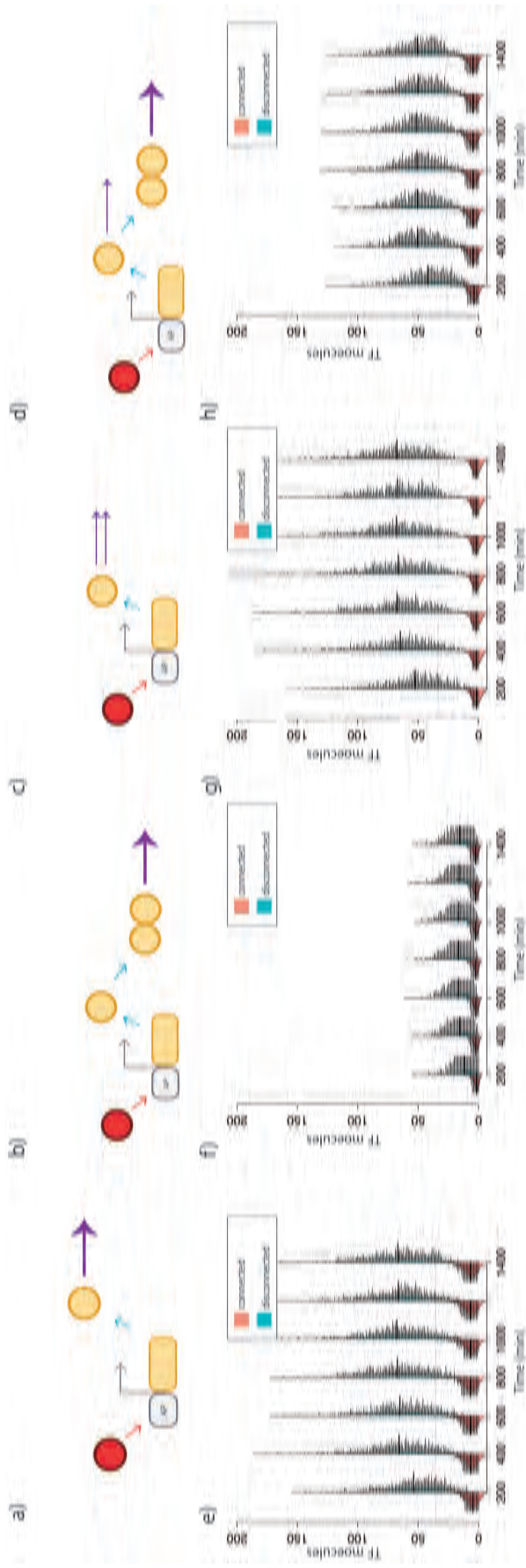
**Figura B1.** Pasos de CSB\_D. Aquí se muestran los pasos de asociación del TF al ADN. a) La unión del primer monómero puede ser a cualquiera de los dos sitios con la misma tasa de asociación, sin importar a cuál de los dos sea. b) La unión del segundo monómero tiene lugar con una tasa diferente a la usada para el primer monómero, pero no cambia de sitio a sitio. c) El dímero, una vez formado, usa diferentes tasas para asociarse o disociarse del ADN a las usadas por el monómero.



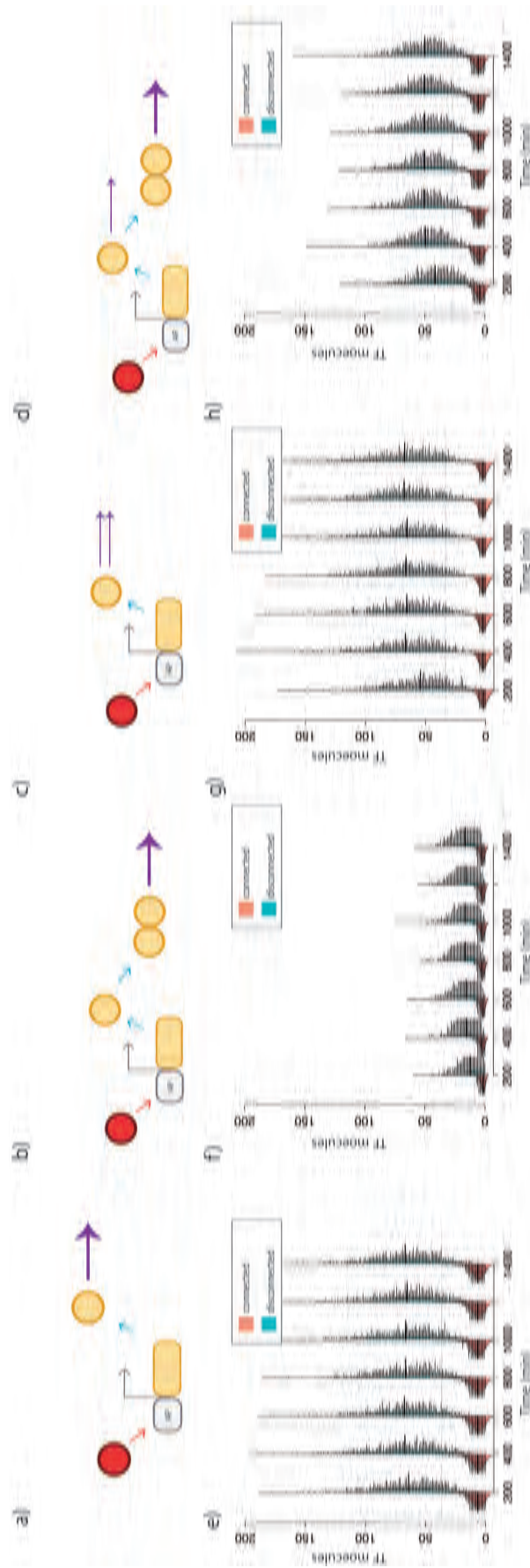
**Figura B2.** Clarificación de la distribución de simulaciones estocásticas en *beanplots*. Las simulaciones estocásticas en el apéndice están representadas por *beanplots* como este. Aquí el eje  $X$  se muestra como tratamiento. Con esto nos referimos al tiempo en el cual se hizo el gráfico ya que mostramos un ensamble de 1000 simulaciones. El eje  $x$  representa los tiempos elegidos para mostrar el comportamiento del sistema y el  $Y$  representa la cantidad de moléculas de TF. En cada uno de los siete tiempos elegidos, se muestran dos distribuciones. La de la izquierda representa la distribución de las moléculas de TF en las 1000 simulaciones del ensamble para el caso conectado (con 300 sitios de unión río abajo) en color salmón, donde las barras delgadas dentro de la distribución representan un histograma de la misma. En el caso de la distribución de la derecha, representa la distribución del número de moléculas de TF en el caso desconectado (sin sitios de unión río abajo).



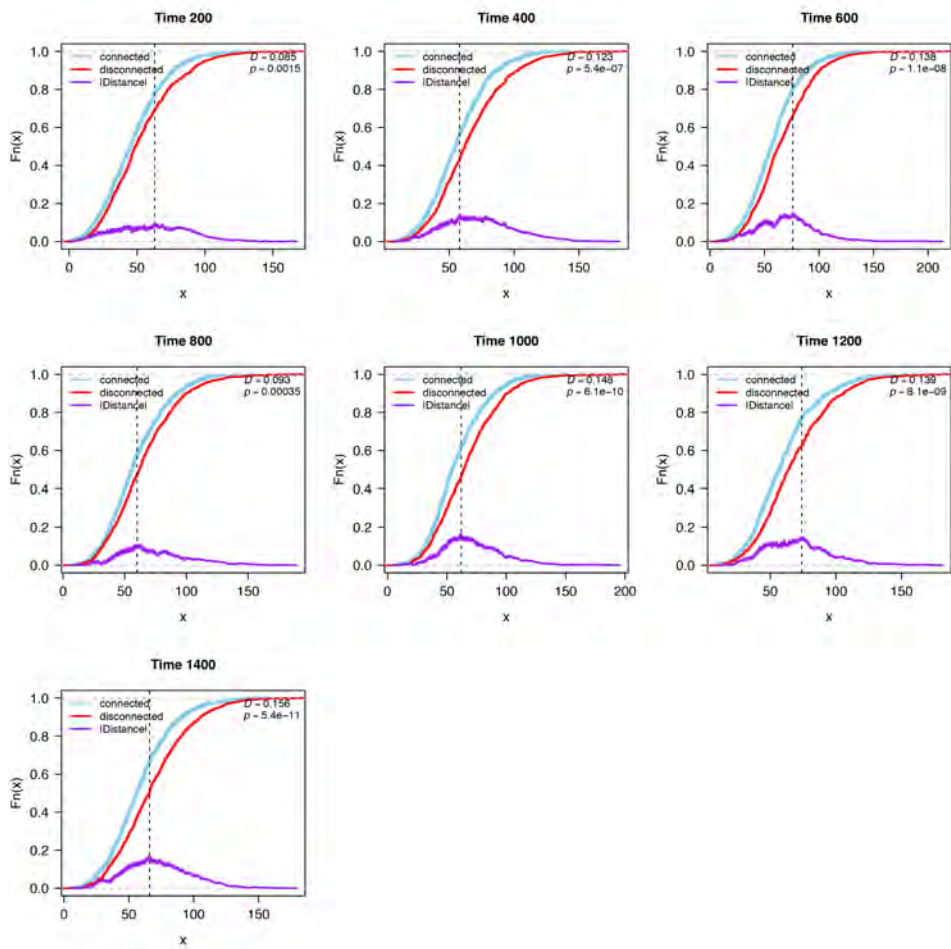
**Figura B3.** Comparaciones estocásticas en *beamplots* de las simulaciones estocásticas para el régimen débil. a), b), c) y d) son representaciones de los mecanismos, donde a) es SMB, b) es DB, c) CSB y d) es CSB\_D. e), f), g) y h) son los ensambles de las simulaciones estocásticas, donde la distribución del FFTF en el caso desconectado se muestra a la derecha en cian y la del conectado a la izquierda en salmón. Se puede apreciar que las diferencias son mayores para g) y h)



**Figura B4.** Comparaciones estocásticas en *beaplots* de las simulaciones estocásticas para el régimen fuerte strong coupling. a), b), c) y d) son representaciones de los mecanismos, donde a) es SMB, b) es DB, c) CSB y d) es CSB\_D. e), f), g) y h) son los ensambles de las simulaciones estocásticas, donde la distribución del FFTF en el caso desconectado se muestra a la derecha en cian y la del conectado a la izquierda en salmón. Las diferencias entre el caso conectado y desconectado son claramente observables para todos los mecanismos tanto en el comportamiento medio como en la variabilidad.

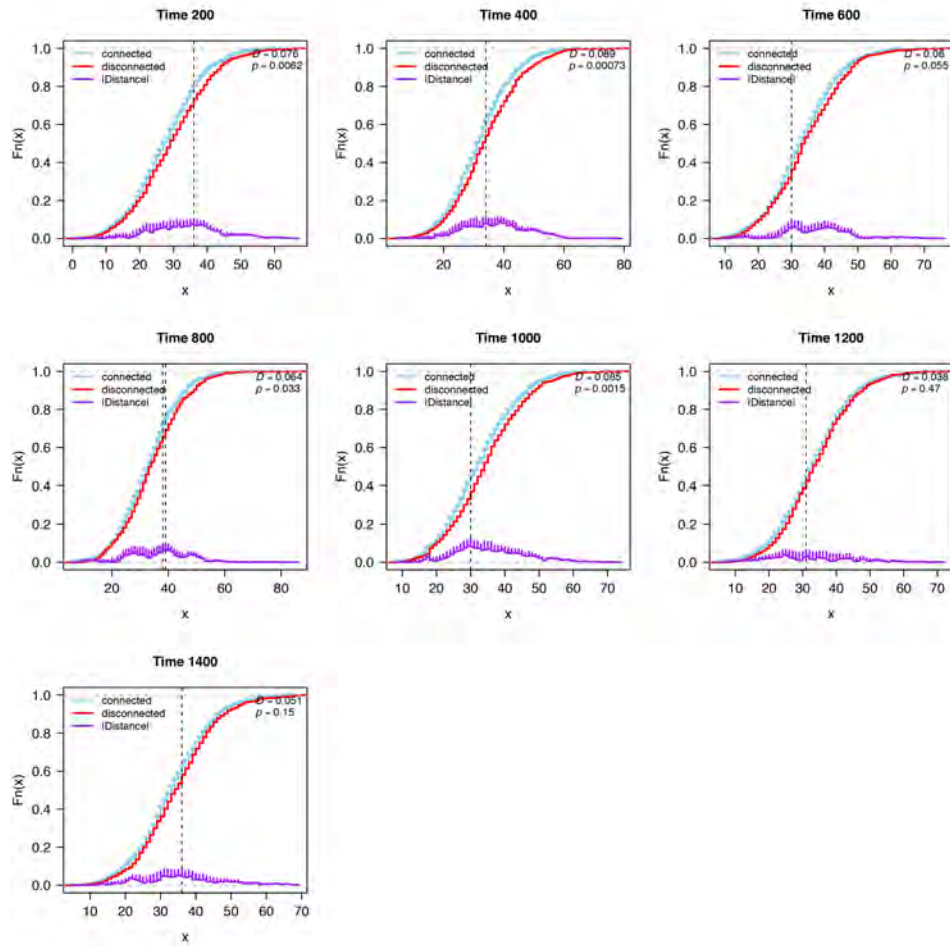


**Figura B5.** Comparaciones estocásticas en *bearplots* de las simulaciones estocásticas para el régimen fuerte  $\text{koff}/100$ . a), b), c) y d) son representaciones de los mecanismos, donde a) es SMB, b) es DB, c) CSB y d) es CSB\_D. e), f), g) y h) son los ensambles de las simulaciones estocásticas, donde la distribución del FFTF en el caso desconectado se muestra a la derecha en cian y la del conectado a la izquierda en salmón. Las diferencias entre el caso conectado y desconectado son claramente observables para todos los mecanismos tanto en el comportamiento medio como en la variabilidad.

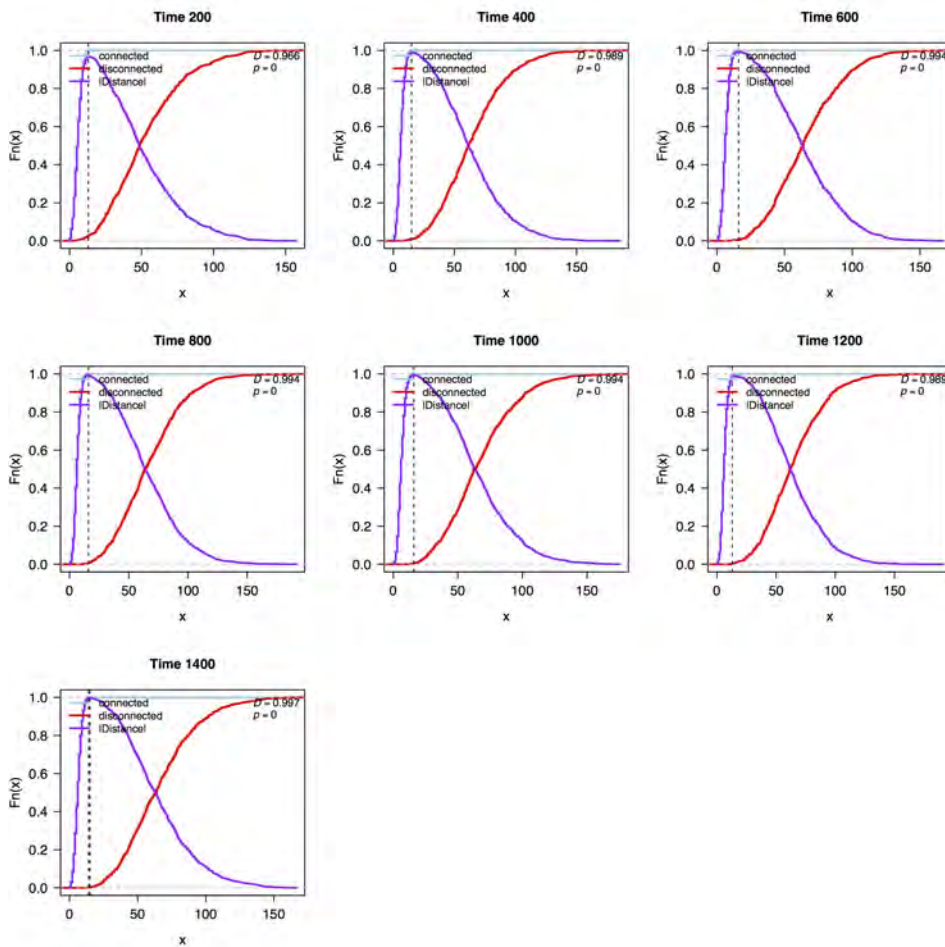


**Figura B6.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de SMB en diferentes tiempos en el régimen débil.

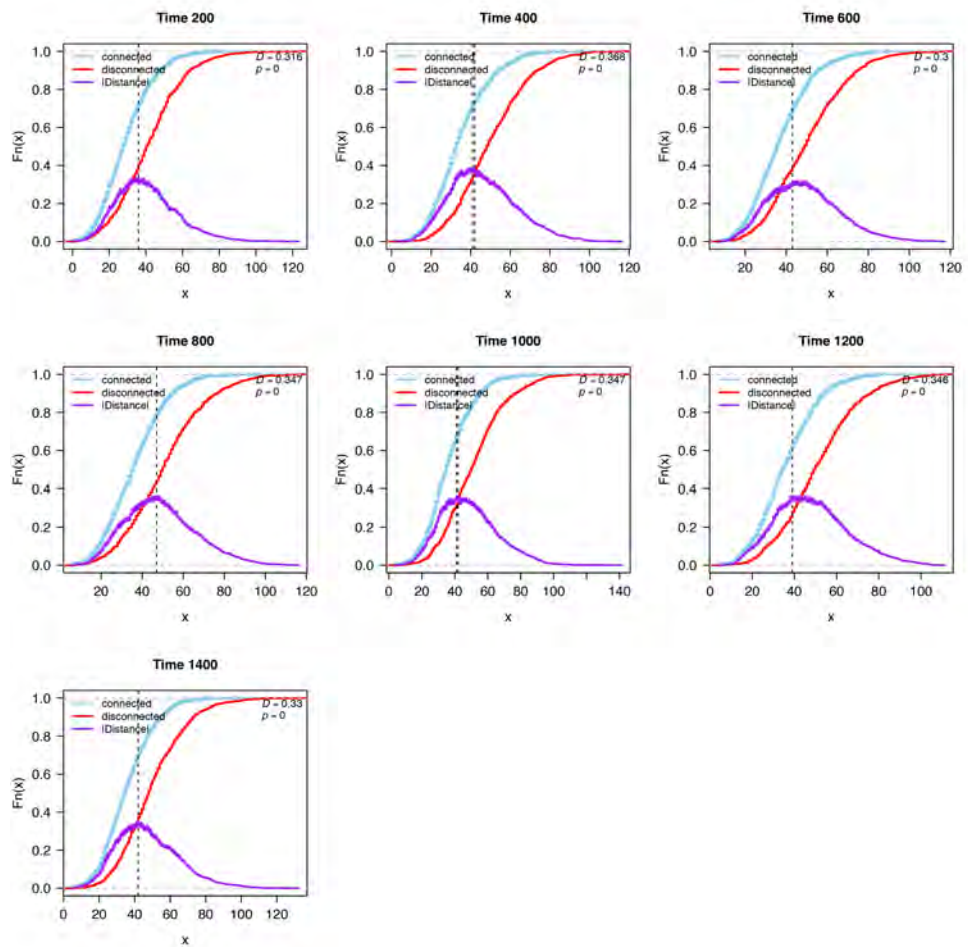




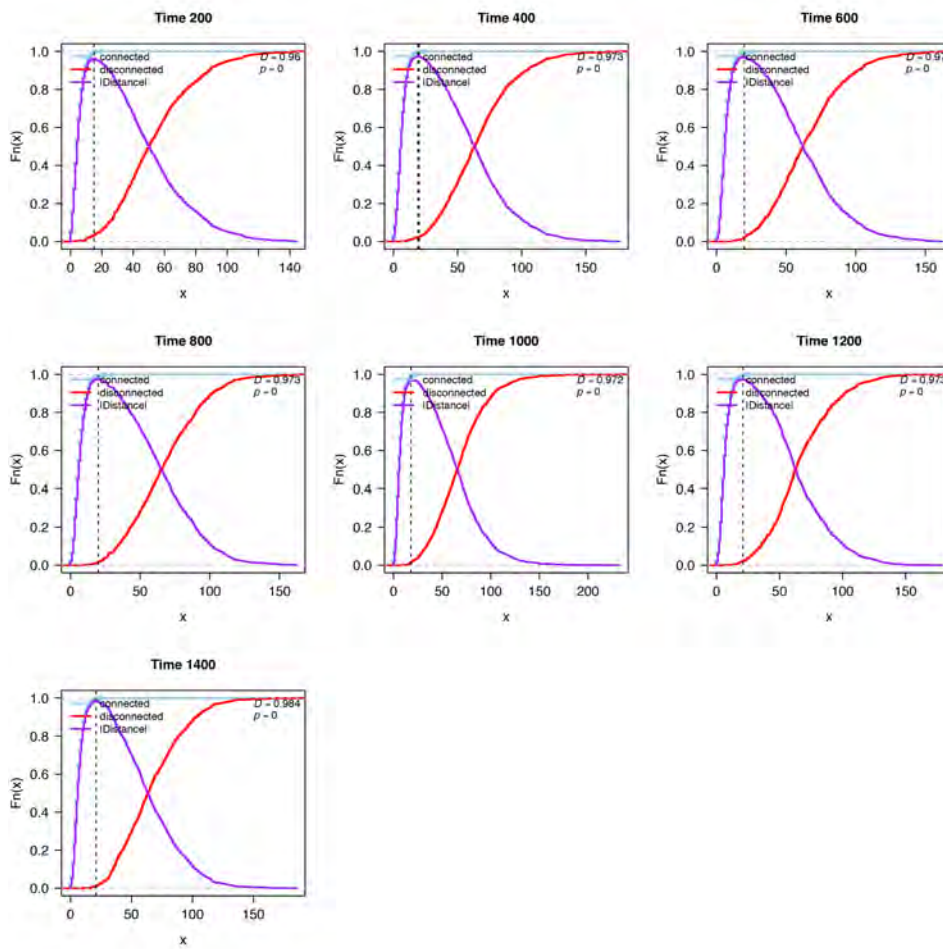
**Figura B7.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de DB en diferentes tiempos en el régimen débil.



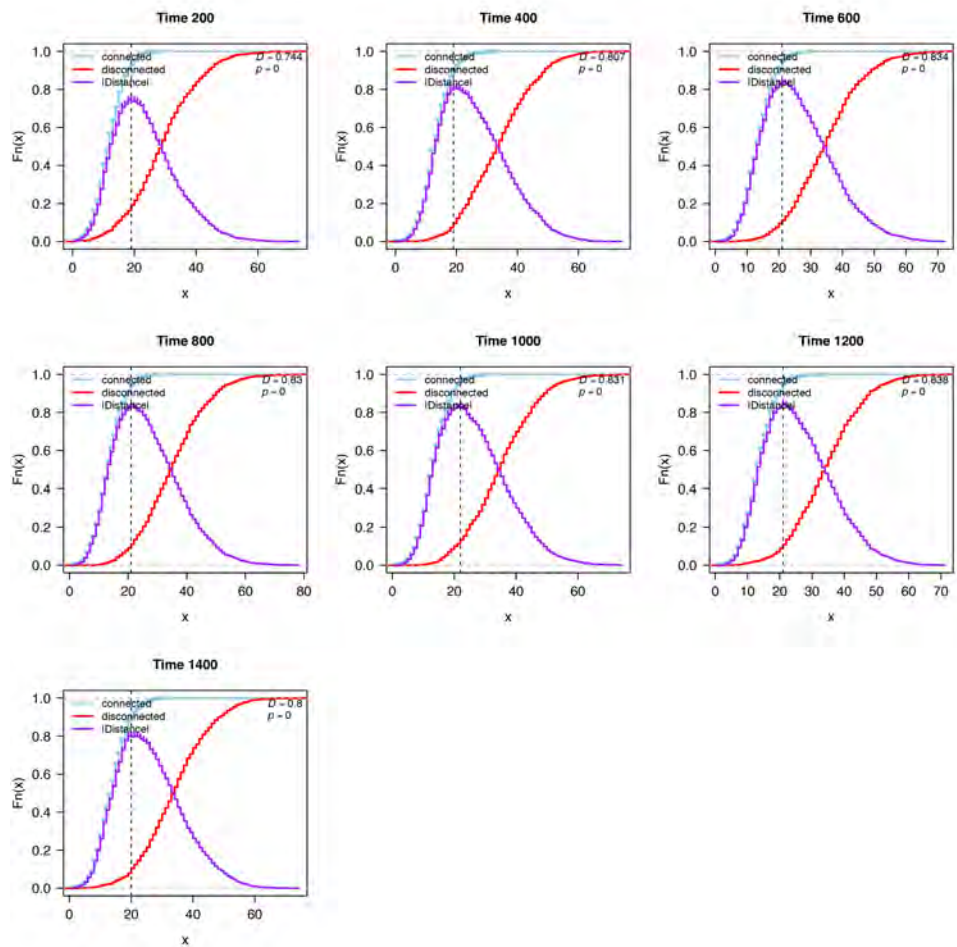
**Figura B8.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de CSB en diferentes tiempos en el régimen débil.



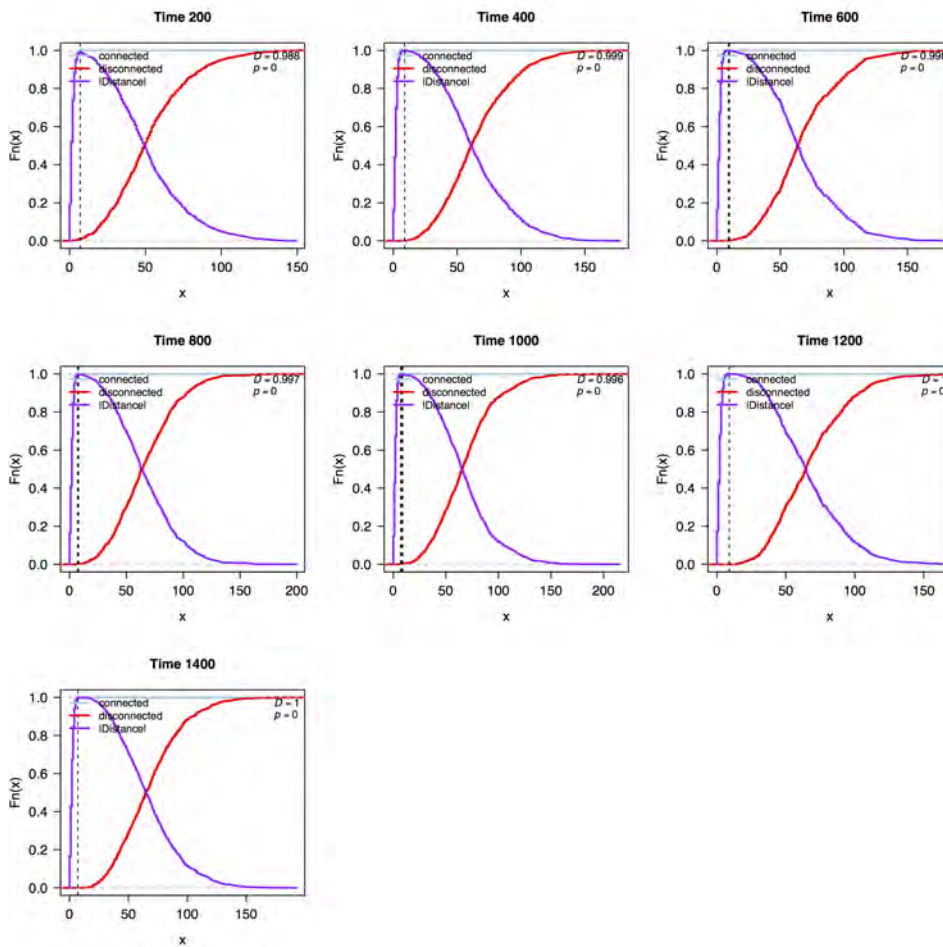
**Figura B9.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de CSB\_D en diferentes tiempos en el régimen débil.



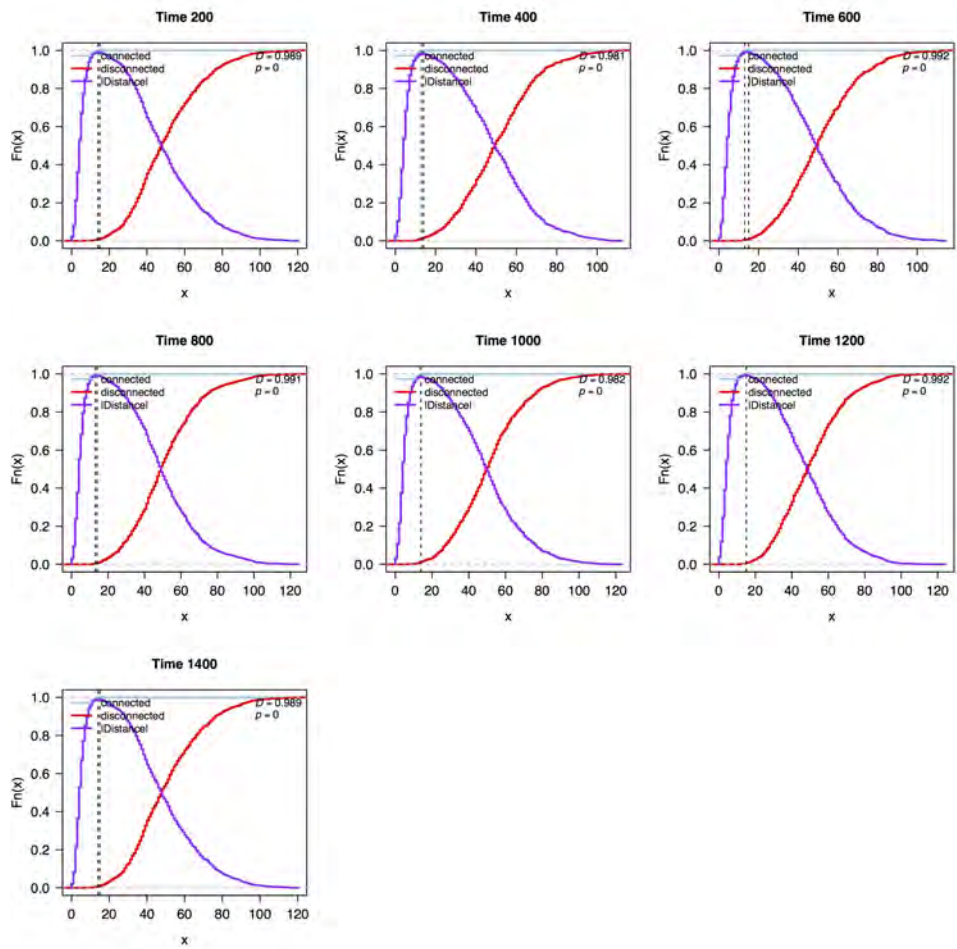
**Figura B10.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de SMB en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong 100kon.



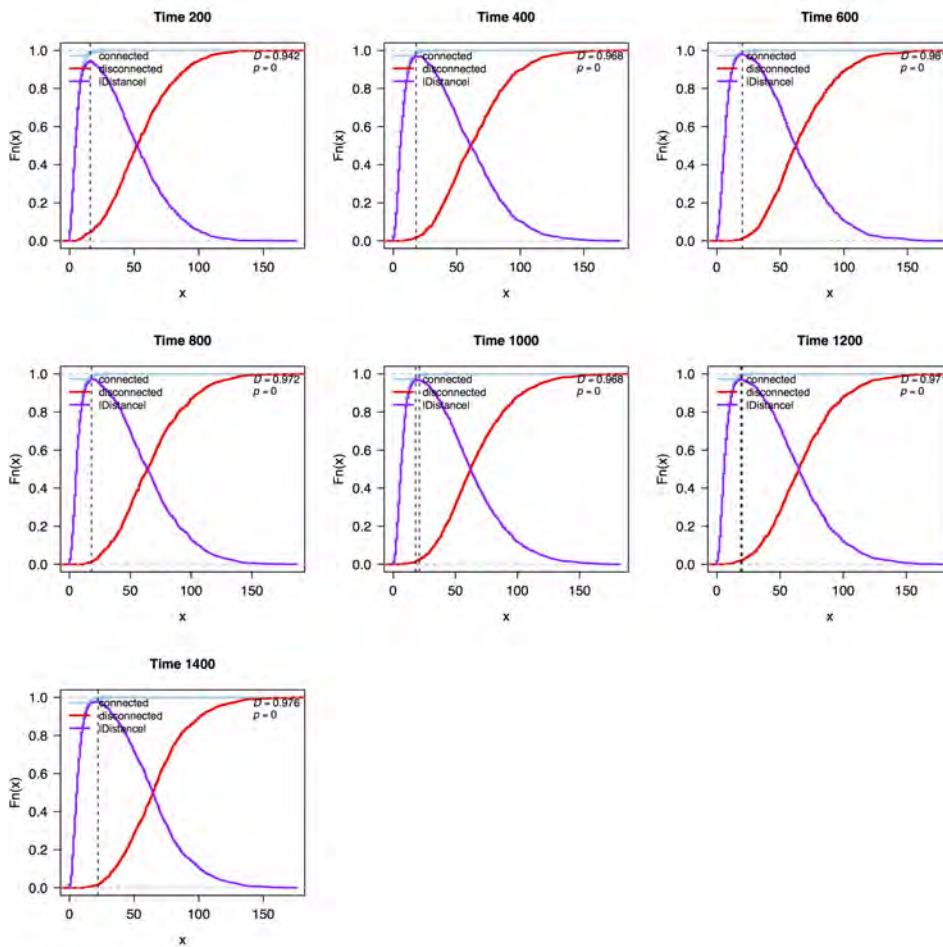
**Figura B11.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de DB en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong 100kon.



**Figura B12.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de CSB en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong 100kon.

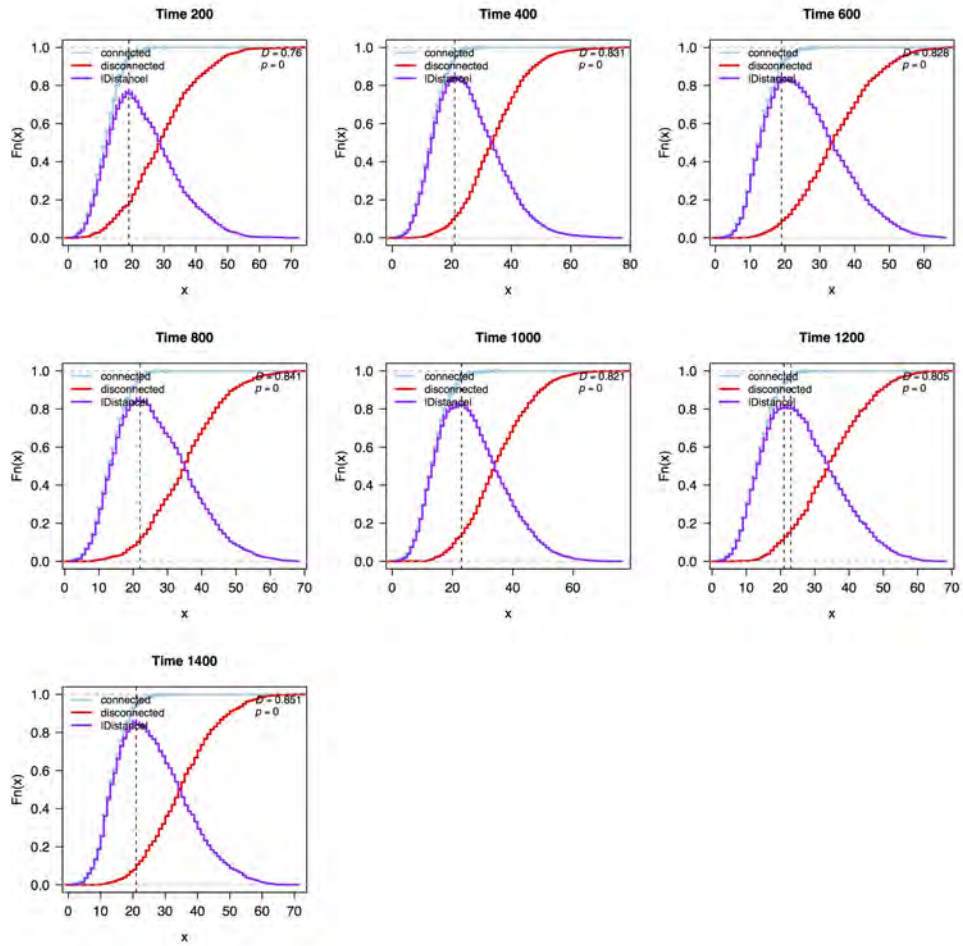


**Figura B13.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de CSB\_D en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong 100kon.

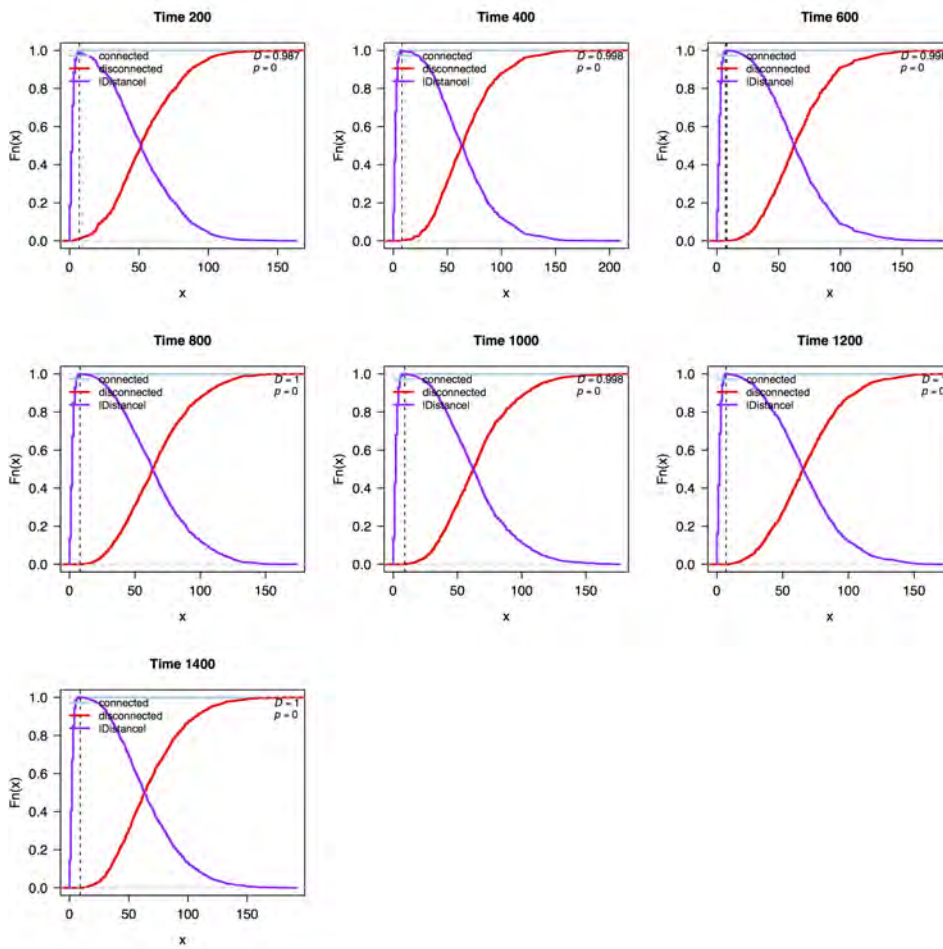


**Figura B14.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de SMB en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong koff/100.

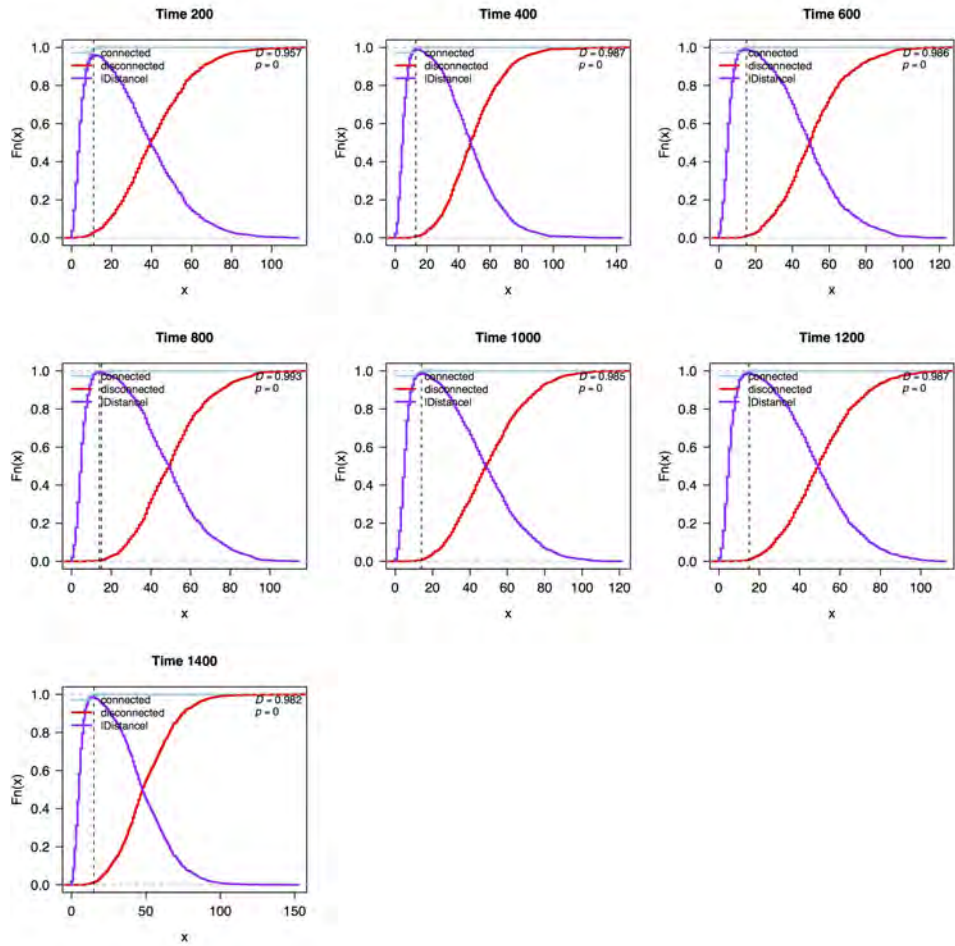




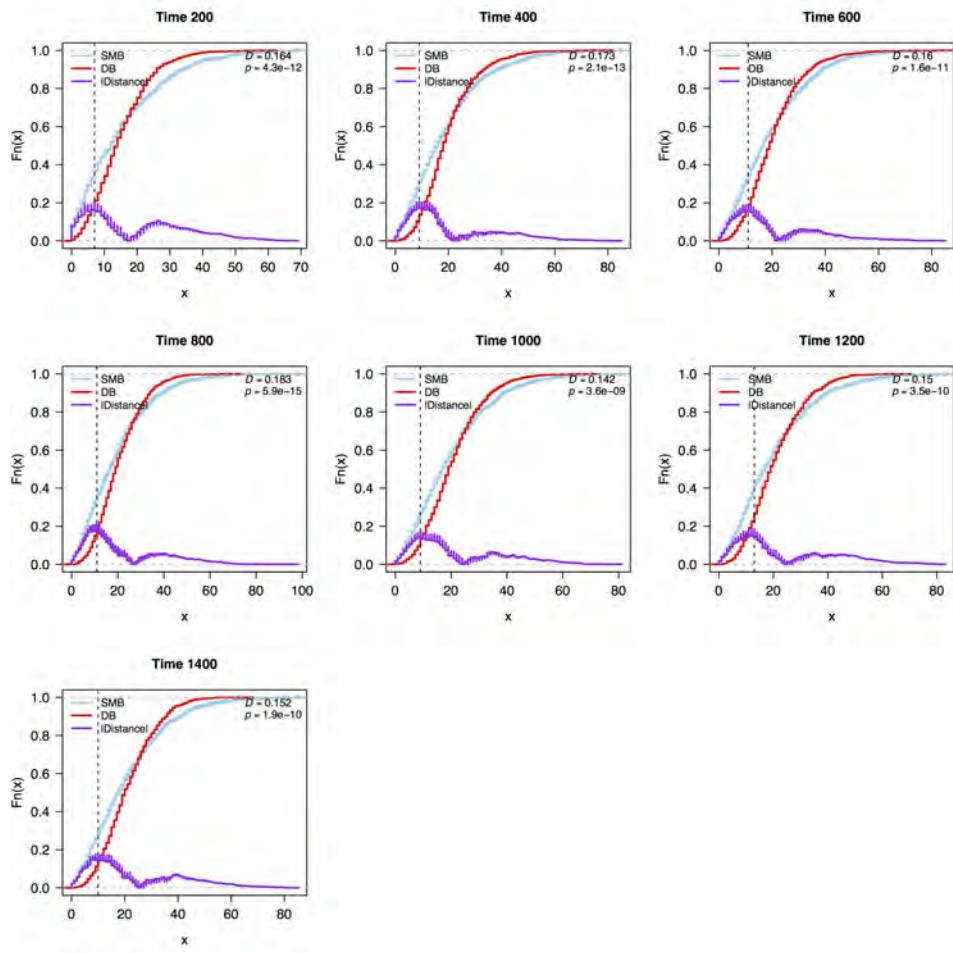
**Figura B15.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de DB en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong koff/100.



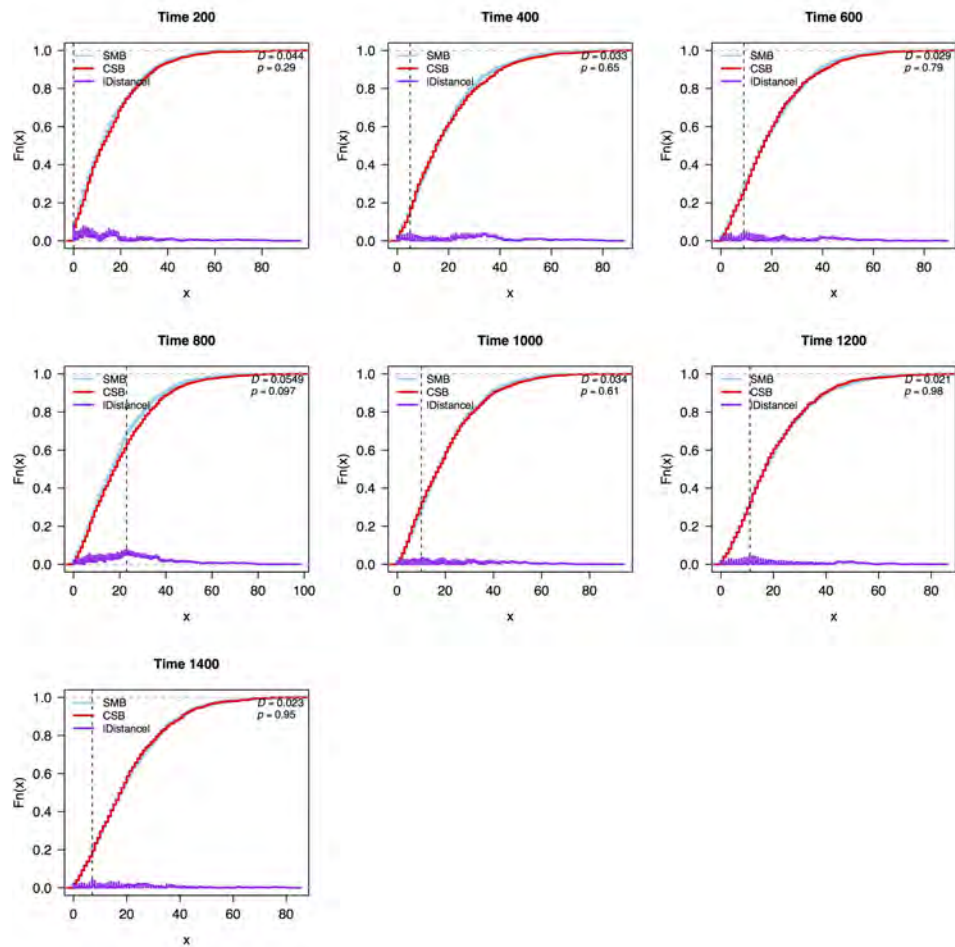
**Figura B16.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de CSB en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong koff/100.



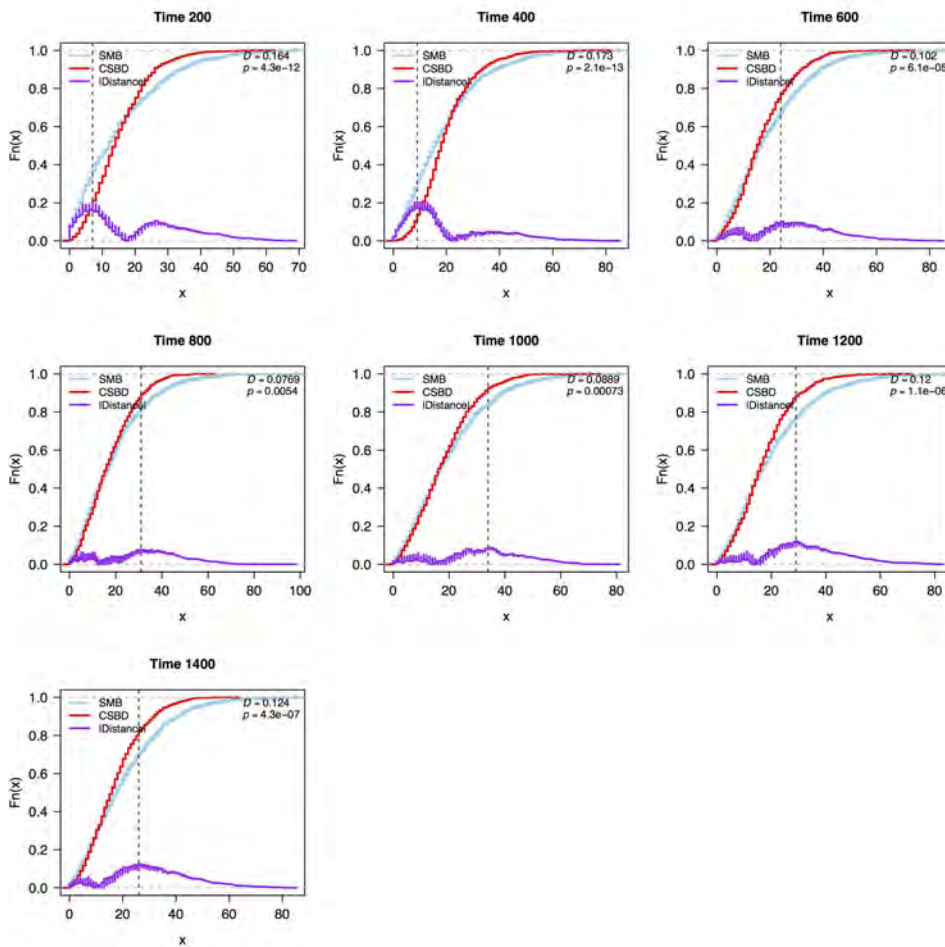
**Figura B17.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre las distribuciones de FFTF de los ensambles del caso conectado y desconectado de CSB\_D en diferentes tiempos en el régimen fuerte strong koff/100.



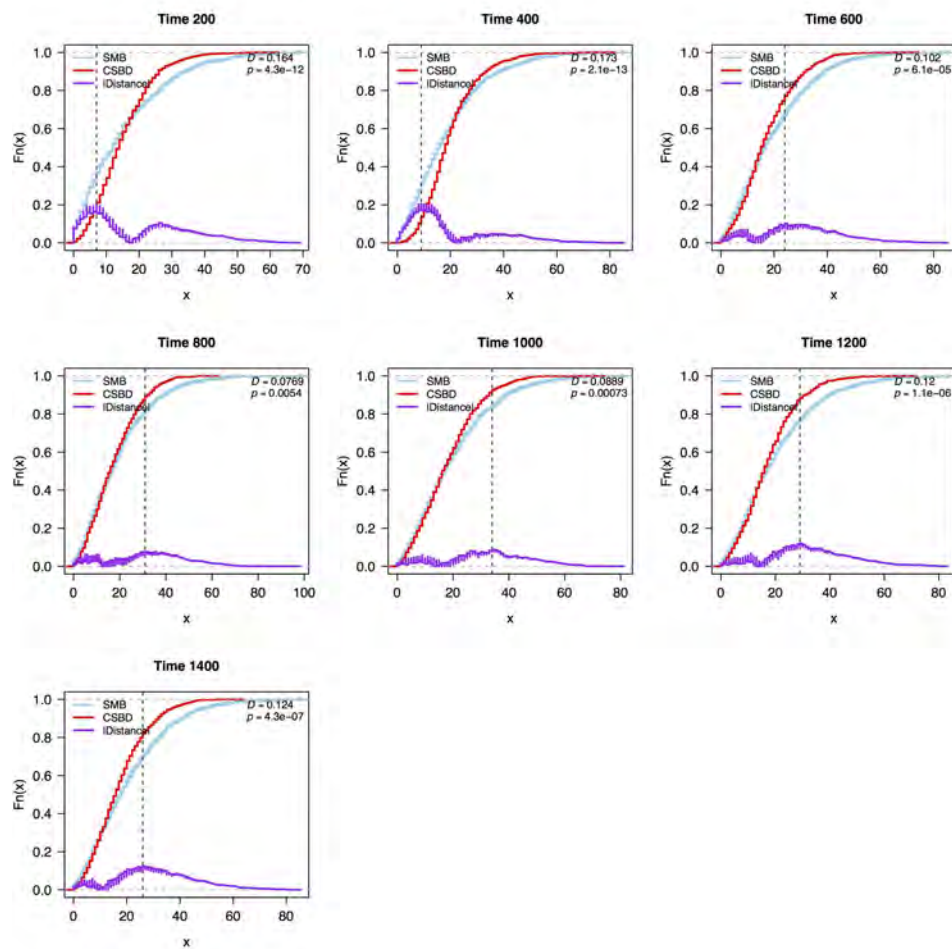
**Fig. B18.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre el FFTF de los ensambles de simulaciones estocásticas de los casos desconectados de SMB y DB en distintos tiempos.



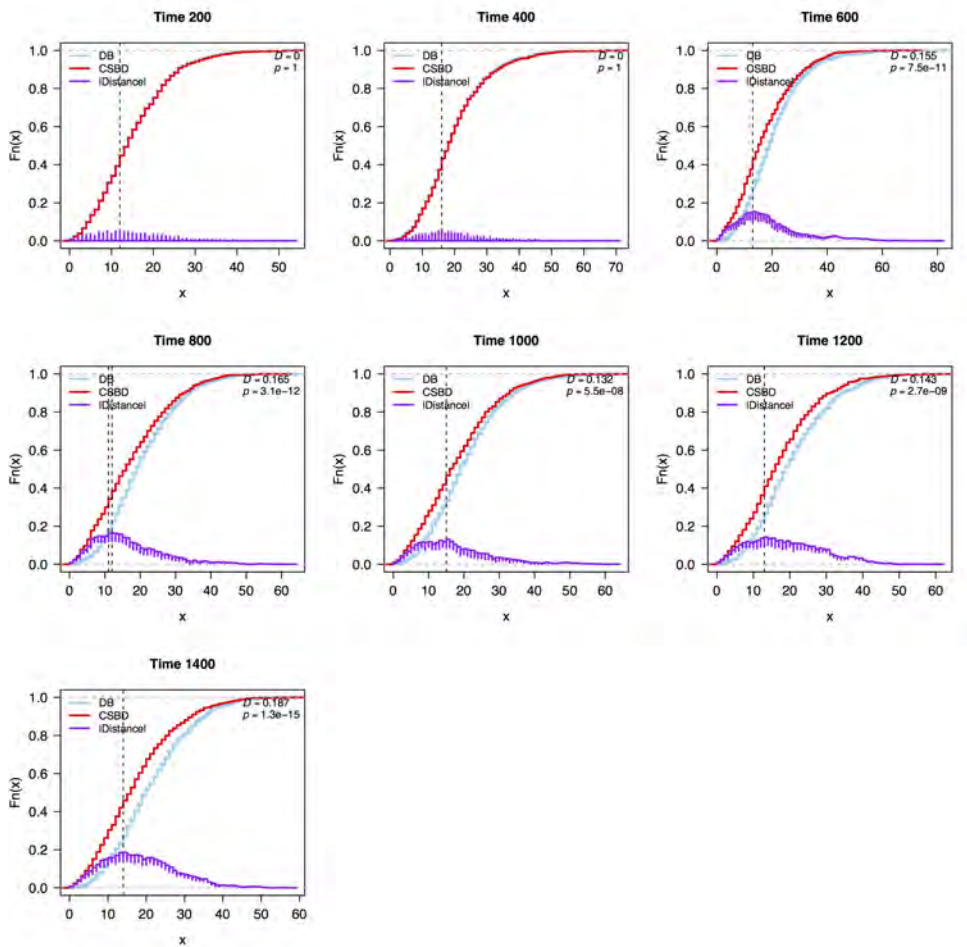
**Fig. B19.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre el FFTF de los ensambles de simulaciones estocásticas de los casos desconectados de SMB y CSB en distintos tiempos.



**Fig. B20.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre el FFTF de los ensambles de simulaciones estocásticas de los casos desconectados de SMB y CSB\_D en distintos tiempos.

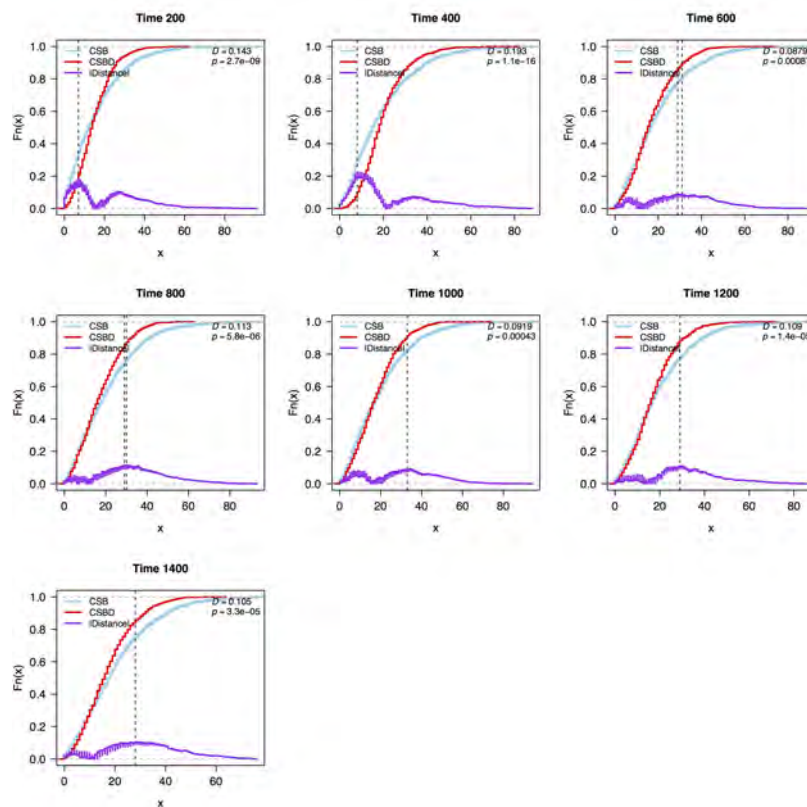


**Fig. B21.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre el FFTF de los ensambles de simulaciones estocásticas de los casos desconectados de DB y CSB en distintos tiempos.



**Fig. B22.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre el FFTF de los ensambles de simulaciones estocásticas de los casos desconectados de DB y CSB\_D en distintos tiempos.





**Fig. B23.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov entre el FFTF de los ensambles de simulaciones estocásticas de los casos desconectados de CSB y CSB\_D en distintos tiempos.

# C

---

## APÉNDICE C

---

# Retroactivity in the context of modularly structured biomolecular systems

Libertad Pantoja-Hernández<sup>1,2</sup> and Juan Carlos Martínez-García<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> Centro de Ciencias de Complejidad (C3), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup> Departamento de Control Automático, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

Synthetic biology has intensively promoted the technical implementation of modular strategies in the fabrication of biological devices. Modules are considered as networks of reactions. The behavior displayed by biomolecular systems results from the information processes carried out by the interconnection of the involved modules. However, in natural systems, module wiring is not a free-of-charge process; as a consequence of interconnection, a reactive phenomenon called *retroactivity* emerges. This phenomenon is characterized by signals that propagate from downstream modules (the modules that receive the incoming signals upon interconnection) to upstream ones (the modules that send the signals upon interconnection). Such retroactivity signals, depending of their strength, may change and sometimes even disrupt the behavior of modular biomolecular systems. Thus, analysis of retroactivity effects in natural biological and biosynthetic systems is crucial to achieve a deeper understanding of how this interconnection between functionally characterized modules takes place and how it impacts the overall behavior of the involved cell. By discussing the modules interconnection in natural and synthetic biomolecular systems, we propose that such systems should be considered as quasi-modular.

**Keywords:** retroactivity, modularity, regulatory biomolecular networks, signal transduction, synthetic biology, systems biology

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Artur Burzynski,  
Polish Academy of Sciences, Poland

### Reviewed by:

Mario Andrea Marchisio,  
Harbin Institute of Technology, China  
Taras P. Pasternak,  
University of Freiburg, Germany

### \*Correspondence:

Juan Carlos Martínez-García,  
Departamento de Control  
Automático, CINVESTAV-IPN, AP  
14-740, Mexico City 07350, Mexico  
juancarlos\_martinez-garcia@  
conciliencia.org

### Specialty section:

This article was submitted to  
Biomolecular Engineering, a section of  
the journal *Frontiers in Bioengineering  
and Biotechnology*

**Received:** 06 October 2014

**Accepted:** 24 May 2015

**Published:** 17 June 2015

### Citation:

Pantoja-Hernández L and  
Martínez-García JC (2015)  
*Retroactivity in the context of  
modularly structured biomolecular  
systems.*  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:85.  
doi: 10.3389/fbioe.2015.00085

## 1. Introduction

The reuse of existing biomolecular modules and the construction of new ones with prescribed functionalities constitute obvious goals in the design of cellular biomolecular synthetic systems (here on, synthetic systems). As such, modular structure is a crucial and desirable organizational characteristic for them. Indeed, when designing a synthetic system in a modular way, we expect it to preserve the behavior (i.e., the functionality) of its modules upon interconnection. Modularity, as an engineering design strategy, is intended to limit both structural and functional complexity. However, given that biodevices (i.e., synthetic systems) are commonly embedded in pre-existing natural organisms, modularity is constrained by the functional limits imposed by them. One of the main topics discussed in the Section “Modularity” is the pertinence of considering biomolecular systems as modularly structured. We argue that biological systems – independently of the involved level of design – may not satisfy the functional dissociation and independence conditions required for being modular and may not fulfill as well the requirements to be considered fully interconnected (i.e., non-modular). Thus, we claim that biological systems should be considered “quasi-modular.”



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Theoretical Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jtbi](http://www.elsevier.com/locate/jtbi)

## Retroactivity effects dependency on the transcription factors binding mechanisms



Libertad Pantoja-Hernández<sup>a,b,\*</sup>, Elena Álvarez-Buylla<sup>a,b</sup>, Carlos F. Aguilar-Ibáñez<sup>c</sup>,  
Adriana Garay-Arroyo<sup>a</sup>, Alberto Soria-López<sup>d</sup>, Juan Carlos Martínez-García<sup>d,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Ciencias de Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México (C3-UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Centro de investigación en Computación, Instituto Politécnico Nacional (CIC – IPN), Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Control Automático, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

### HIGHLIGHTS

- Our aim is to find out how binding mechanisms account for differential retroactivity effects.
- We examined changes in the FTF and its variability in presence of loads.
- We modeled the mechanisms assuming all the systems reach the same steady state. Simple monomer binding was the most resistant mechanism to retroactivity.
- DB is the mechanism where loads changed the most the SS and FTF number of molecules.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form

29 July 2016

Accepted 10 August 2016

Available online 11 August 2016

#### Keywords:

Regulation

Dimerization

Sequential binding

Binding processes

SSA

ODE simulations

### ABSTRACT

Downstream connection effects on transcription are caused by retroactivity. When biomolecular dynamical systems interconnect retroactivity is a property that becomes important. The biological functional meaning of these effects is increasingly becoming an area of interest. Downstream targets, which are operator binding sites in transcriptional networks, may induce behaviors such as ultrasensitive responses or even represent an undesired issue in regulation. To the best of our knowledge, the role of the binding mechanisms of transcription factors in relation to minimizing – or enhancing – retroactivity effects has not been previously addressed.

Our aim is to evaluate retroactivity effects considering how the binding mechanism impacts the number of free functional transcription factor (FTF) molecules using a simple model via deterministic and stochastic simulations. We study four transcription factor binding mechanisms (BM): simple monomer binding (SMB), dimer binding (DB), cooperative sequential binding (CSB) and cooperative sequential binding with dimerization (CSB\_D). We consider weak and strong binding regimes for each mechanism, where we contrast the cases when the FTF is bound or unbound to the downstream loads. Upon interconnection, the number of FTF molecules changed less for the SMB mechanism while for DB they changed the most.

Our results show that for the chosen mechanisms (in terms of the corresponding described dynamics), retroactivity effects depend on transcription binding mechanisms. This contributes to the understanding of how the transcription factor regulatory function—such as decision making—and its dynamic needs for the response, may determine the nature of the selected binding mechanism.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** FTF, Free functional transcription factor; BS, Binding site; TF, Transcription factor; TFBP, Transcription factor binding process; BM, Binding mechanism; SMB, Simple monomer binding; DB, Dimer Binding; CSB, Cooperative sequential binding; CSB\_D, Cooperative sequential binding along with dimerization

\* Corresponding author at: Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [lpantoja@lcm.unam.mx](mailto:lpantoja@lcm.unam.mx) (L. Pantoja-Hernández), [juancarlos\\_martinez-garcia@conciliencia.org](mailto:juancarlos_martinez-garcia@conciliencia.org) (J.C. Martínez-García).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.08.012>

0022-5193/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Biological systems' retroactivity (Saez-Rodríguez et al., 2005) refers to a counter-responsive or reactive molecular property that arises from the interconnection of functional biomolecular modules (see Pantoja-Hernández and Martínez-García (2015) for a conceptual review on retroactivity and Del Vecchio et al. (2008a) for a preliminary definition).

In synthetic systems the retroactivity effects are usually undesired since they may slow down (i.e., delay) the activity of the upstream system involved in the interconnection (see Del Vecchio et al. (2008a), Jayanthi et al. (2013)). Del Vecchio, Ninfa, and Sontag proposed a strategy to attenuate retroactivity (Del Vecchio et al., 2008b), which consists on introducing a large input gain and an equally large negative feedback as a dynamic insulator. They suggested two strategies for this: the first one depends on very strong binding sites and enhanced protein degradation, while the second one relies on phosphorylation and dephosphorylation as amplification and degradation strategies. In natural systems, the role of retroactivity is still far from clear, though multiple proposals regarding the potential function of downstream loads have been proposed (see Burger et al. (2010), Lee and Maheshri (2012), Jayanthi and Del Vecchio (2012), Jayanthi et al. (2013)). For example, Burger et al. (2010) sustained that downstream binding sites (BS's) could be protecting free binding molecules against degradation when the degradation of the complex between a transcription factor (TF) and its cognate site on the DNA (TF-DNA) is minimal.

Transcription is one of the processes that can be affected by retroactivity, where TFs bind downstream sites in order to promote or repress transcription of a particular gene. Transcription factors bind to their downstream sites by different mechanisms and these mechanisms are the steps needed to form the complex between the TF and its BSs. There are many well-known mechanisms for TF binding (also called kinetic regimes or pathways) and most of them are very complex (see Beckett (2001), Funnell and Crossley (2012), among others).

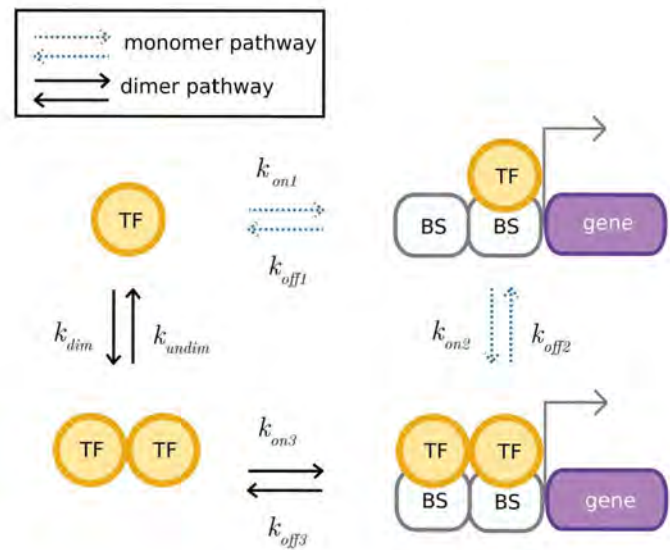
The monomer pathway was proposed after observations where the monomers bind to DNA (see Kim and Little (1992), Metallo and Schepartz (1994)). Authors like Berger et al. (1998), have thoroughly described simple mechanisms as the dimer and monomer pathways (see Fig. 1).

Other binding pathways include further complications such as: post-translation modifications prior to binding (or dimerization), heterodimers formation and protein escorts (see for instance Funnell and Crossley (2012), Chin et al. (1999), among others).

Regardless of the pathway or the mechanism of choice, TF binding takes place via association and dissociation from a downstream site. Depending on the value of  $k_d$ , a binding site, also known as operator, may be weak or strong.  $k_d$  is the product of the association rate  $k_{on}$  and the TF concentration between the dissociation rate  $k_{off}$  ( $k_d = k_{off}/k_{on}$ ), the larger the  $k_d$ , the weaker the binding site.

In transcriptional regulatory networks, retroactivity modifies TF's rate of change, because the availability of free functional (i.e., capable to binding) TF (FFTF) molecules is affected by TF association and dissociation to downstream sites.

In natural biological systems, the comparison between connected and disconnected TF may seem awkward, as in the sudden entry of new downstream binding sites is unlikely, unless an event such as genomic integration or duplication takes place. However, comparisons between different systems connected and disconnected to multiple BS's could indicate how a given connection mechanism affects retroactivity effects in the network. Moreover, it could be argued that changes in the chromatin arrangement,



**Fig. 1.** General binding mechanisms or pathways. Two of the generally accepted TF binding mechanisms are the dimer and the monomer pathway (also called sequential monomer binding). Here, BS denotes the binding sites for the TF.  $k_{dim}$  and  $k_{undim}$  denote the dimerization and dimer unbinding rates, whereas  $k_{on}$  and  $k_{off}$  denote DNA binding and unbinding rates in different steps. In the case of  $k_{on1}$  and  $k_{off1}$ , they represent the rates of binding and unbinding for the first monomer,  $k_{on2}$  and  $k_{off2}$  represent the rates of binding and unbinding for the second TF monomer.  $k_{on3}$  and  $k_{off3}$  stand for the DNA binding and unbinding of the complete dimer to DNA.

could further contribute to change in a dynamic way the number and strength of available downstream BS's.

Retroactivity effects in TF concentration are influenced by the amount of BS's where the individual molecules can bind and also depend on the parameters describing the binding dynamics. If TF molecules are in excess, compared with the number of downstream BS's, retroactivity may be so small that it does not affect the performance of the system. However, when the concentration of TF is limiting for downstream regulation, all the activities regulated by the TF could slow down or even disrupt (see Del Vecchio et al. (2008a), Jiang et al. (2011), Bennett et al. (2007), Jayanthi and Del Vecchio (2012)). The threshold where TF concentration limits downstream regulation are still a matter of debate. For instance, Springer et al. (2010) argue that yeast proteins are expressed at higher levels than necessary for survival. Considering the former idea, TF concentration should not be an issue for transcriptional regulation or any other functional activity related to proteins. However, Karres et al. (2007) claim that there are cases where a fine tuning of protein levels is needed.

Retroactivity may be troublesome to maintain a stable concentration of a TF that binds to a large amount of downstream sites. This kind of TF's are also called *hubs* (Barabasi and Oltvai, 2004), which are connected to their downstream sites in an interaction pattern known as single input motif, where a single TF drives the transcription of many downstream genes. Mechanisms that minimize retroactivity effects could be naturally selected for transcriptional hubs that regulate hundreds of downstream genes. On the other hand, there is evidence of hubs participating in differentiation processes as master regulators, where decision making and bistable responses are expected. Retroactivity, as shown by Buchler and Cross (2009), may have a concentration dependent role promoting dynamic sigmoidal behavior (i.e., ultrasensitive kinetics). So, in differentiation processes and environmental responses, an important change induced by retroactivity may be useful.

To date, only a few studies have characterized the functional and dynamical biomolecular circuits that enhance or minimize

retroactivity (see Wang et al. (2014a), Del Vecchio et al. (2008a), among others). A finer scale characterization, at the level of binding mechanisms, would provide further understanding on how natural components integrate in complex regulatory networks. This would also help to clarify if TF binding mechanisms could play a major role in promoting retroactivity effects. Furthermore, as far as we know, TF binding mechanisms related to minimizing (or enhancing) retroactivity have not been described in natural biomolecular systems.

Our aim is to compare the retroactivity effects of a system where a hypothetical transcription factor regulates its cognate BS's across four different mechanisms by comparing the changes in free functional transcription factor (FFTF) upon interconnection.

We are interested in finding which transcription factor binding processes (TFBP) are able to enhance or hamper FFTF number of molecules. By TFBP, we mean the process involving a binding mechanism (BM), a determined number of BS's depending on the chosen mechanism and a regime which can be weak or strong binding. The selected mechanisms are: simple monomer binding (SMB), dimerization prior to binding (DB), two monomers' cooperative sequential binding (CSB) and cooperative sequential binding along with dimerization prior to binding (CSB\_D). To complete the TFBP we simulated each of the four selected mechanisms in two regimes: a weak and a strong TF binding with biologically plausible parameters. Both regimes were further analyzed in the connected (where there are 300 downstream BS) and disconnected (where there are no downstream binding sites) cases (see Fig. 2).

Degradation may play a decisive role in retroactivity effects since it modifies the actual concentration of total TF and thus the FFTF one. We are particularly interested in the role of TF-operator (with operators we refer to the binding sequences where a TF binds specifically) complex degradation in retroactivity effects. Even if Burger et al. (2010) noted that BS's could protect TF molecules against degradation, the opposite was found by Jayanthi et al. (2013) where they analyzed the connection effects in a synthetic system; we decided to also analyze the changes caused by asymmetric degradation between the different molecular species bearing the TF, by changing the TF-operator complex degradation.

## 2. Binding mechanisms models

In this section we describe the binding models that we built based on the transcriptional mechanisms that may be used in nature. We start by defining what is the TFBP. Then, we proceed to explain the general steps that are shared between all our models. Finally, we elaborate on the four different binding mechanism models used in this work and the parameters involved in them.

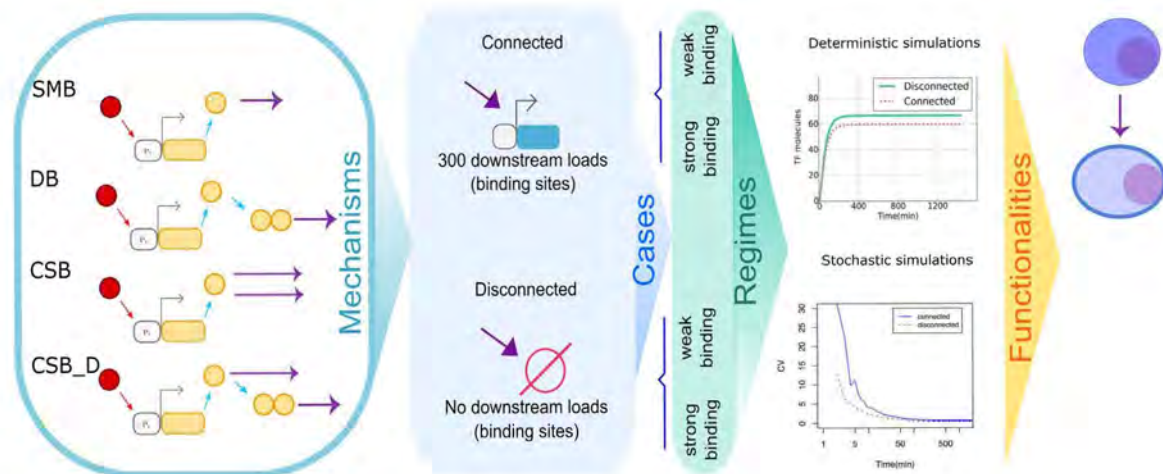
The TFBP involves a BM, a determined number of BS's depending on the chosen mechanism and a regime which can be weak or strong binding. In the next subsections we will focus on the particularities of our BM models. Along with this features, we explain in detail the different constituents of the TFBP, depending on the mechanism of choice.

### 2.1. General mechanisms models assumptions

In this subsection we explain in detail the assumptions that are shared between the four different binding mechanism models used in this work. Such assumptions involve mainly the production of TF and the degradation of the multiple molecular species involved in these models. The parameters involved in these models are given in Tables 1 and 2.

We modeled the four mechanisms considering the following steps and associated assumptions:

1. *Basal transcription.* There is a basal TF messenger RNA (stated as mRNA in the models) production which is very low and independent of any kind of signal. This basal production is driven by the parameter  $\alpha$  and only needs of the TF gene promoter (named  $P_1$  in the models).
2. *Activation of TF production.* We consider that this is caused by an exogenous constant signal  $S$  and a constant transcription parameter  $k$ . (the transcription rate guided by  $S$ , see Table 2). For  $S$ , we chose the parameter considering that all mechanisms should reach the same SS, which results in values of: 11.43 molecules for SMB, 76.3 molecules for DB, 11.43 molecules for CSB and 13.1 molecules for CSB\_D. We assumed that the TF's transcription depends linearly on this signal and  $P_1$ . However, as there is always only one molecule of  $P_1$ , this is not explicitly shown in the differential equations.
3. *Translation.* For this model, translation of TF's mRNA linearly depends on mRNA concentration. The parameter  $k_2$  is the one that drives translation.



**Fig. 2.** Procedure. To complete the TFBP we simulated each of the mechanisms in two regimes: a weak and a strong TF binding. Both regimes were analyzed in both connected and disconnected cases. The mechanism analyzed were: SMB (Simple monomer binding), DB (dimerization prior to binding), CSB (two monomers' cooperative sequential binding), and CSB\_D (cooperative sequential binding along with dimerization prior to binding).

**Table 1**  
General parameters involved in the mechanisms models.

Parameter	Description	Value	Source and notes
$\alpha$	Basal transcription rate	0.01 molecules/min	Smaller than the lower bound of transcription in 90% of the genes according to <sup>a</sup> :
$S$	Fixed $S$ concentration	Depending on mechanism	Got via trial and error
$k$	Transcription rate guided by $S$	$\frac{0.09}{50 * \text{molecules} * \text{min}}$	Maximum rate considered in the 90% of yeast genes that produce between 2.33 and 29.7 mRNAs/hour according to <sup>a</sup>
$k_2$	Translation rate	0.8 mRNAs/min	Calculated for an arbitrary gene of about 1000 aa according to <sup>b</sup>
$p_{tot2}$	Downstream binding sites	0 or 300 <sup>c</sup>	
$\delta_1$	Protein degradation rate	0.02 molecules/min	Considering a protein half life of 50 min (in yeast the mean protein half life is 43 min) <sup>d</sup>
$\delta_2$	mRNA degradation rate	0.06 molecules/min	Based in yeast mRNA half life according to <sup>e</sup>
$\delta_3$	DNA bound molecular specie degradation rate	0.02 molecules/min	

♣ Cranz et al. (2004); ○ Picotti et al. (2009).

<sup>a</sup> Pelechano et al. (2010).

<sup>b</sup> Gilchrist and Wagner (2006).

<sup>c</sup> In contrast to all other mechanisms, the 300 downstream mechanisms of SMB are simple (i.e. they only involve one binding site) while for the other mechanisms they are double.

<sup>d</sup> Belle et al. (2006).

<sup>e</sup> Wang et al. (2002).

**Table 2**

Input value ( $S$ ) for each mechanism.  $S$  value was calculated by trial and error.

Mechanism	$S$ value
SMB	11.43
DB	76.3
CSB	11.43
CSB_D	13.1

4. *Downstream binding sites.* In the connected cases, binding is achieved by any of the four chosen mechanisms and involves the association and dissociation of FFTF to 300 downstream BS. This number was chosen arbitrarily, based on the number of sites that hubs such as CRP and FNR have, see for instance Wang et al. (2014b) and Martínez-Antonio and Collado-Vides (2003). In the models we represent those downstream binding sites as  $p_{tot2}$ . For SMB those sites are simple (i.e. they involve only one binding site sequence and only one TF molecule can bind there), while in all other mechanisms each site involves two binding sequences. However, DB has an equivalent amount of sites to SMB given that for each double site a FFTF (TF:TF for this mechanism) molecule binds. For disconnected cases,  $p_{tot2}$  is equal to 0.

5. *BS's strength.* For the connected cases, we considered two main operator strengths: a weak one, comparable to the one of GCN4, and a strong one where the association rate  $k_{on}$  is two orders of magnitude larger than in the weak one. GCN4 is a very well described TF from yeast (Cranz et al., 2004), that has a binding velocity similar to the attributed to diffusion. Recently, Hammar et al. (2014) determined that for the lac repressor, a strong operator results in a slower dissociation rate, but an association rate that is similar to the weak ones. For this reason, we decided to introduce a second version of the strong binding regime where  $k_{off}$  is small.

6. *Degradation.* We assumed that degradation is linear and equal for all molecular species involving TF.  $\delta_1$  stands for the FFTF degradation rate (and other DNA unbound molecular species that contain TF) and  $\delta_3$  for the degradation of the DNA bound TF molecular species and other DNA bound molecular species that contain TF.

7. *mRNA degradation.* In these models, mRNA degradation is linear as faster than the TF one. We represent this degradation rate by  $\delta_2$ .

## 2.2. BM dependent assumptions and models

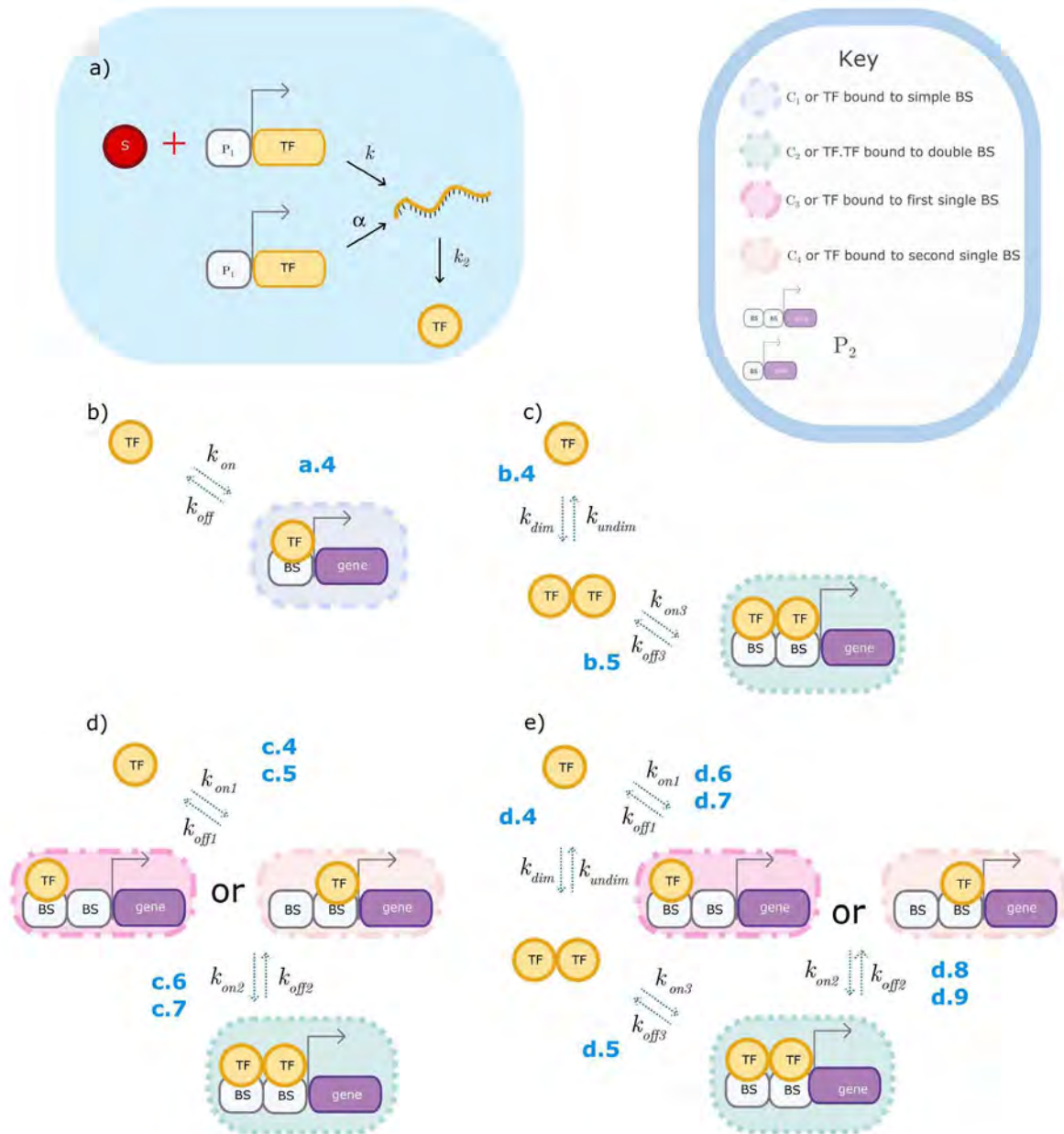
We selected TF binding mechanisms considering simplicity and biological evidence in the literature. For example, the dimer binding mechanism is well-known to occur for some Basic Leucine Zipper Domain (bZIP) TF's that are present in all eukaryotes as mentioned in Llorca et al. (2007). In that work they mentioned that particularly in *Arabidopsis thaliana*, bZIPs are predicted to form mostly homodimers. Another example are TCP proteins, which seem to require dimer formation to be able to achieve DNA binding as stated in Kosugi and Ohashi (2002). For the table enlisting in which biological processes these mechanisms participate see Table 3.

We must point out that the linearity assumptions in the TF production and degradation helped us to simplify the mechanism's models and focus on the kinetics involved in TF binding.

Figs. 1 and 2 show the four considered binding mechanisms: SMB, DB, CSB and CSB\_D. The total number of downstream binding sites is given by parameter  $p_{tot2}$ .  $P_2$  is the unbound DNA FFTF-binding site molecular species composed of a simple (in the SMB mechanism) or double (in the DB, CSB, CSB\_D mechanisms) binding sequence ideally followed by a coding sequence. The total number of downstream binding sites is  $p_{tot2} = 0$  for the disconnected cases and  $p_{tot2} = 300$  for the connected ones, unless stated otherwise (in Section 4.1.1 we assess several values of  $p_{tot2}$ ).

**Table 3**  
Mechanisms of binding used in this article and some references associated to them.

Mechanism	Example	Reference
SMB	Sox10 binds to DNA both as dimer and as monomer 719 proteins are functional in a monomeric form in E.coli	Peirano and Michael (2000), Taniguchi et al. (2010)
DB	TCP proteins Basic Leucine Zipper's from <i>A.thaliana</i>	Kosugi and Ohashi (2002), Llorca et al. (2007)
CSB	Sox10 binds to DNA both as dimer and as monomer and has not been found as dimer in solution.	Peirano and Michael (2000)
CSB_D	GCN4 seems to be able to bind both as dimer and monomer.	Cranz et al. (2004)



**Fig. 3.** Mechanisms. (a) Shows the general assumptions reactions shared by the four mechanisms.  $\alpha$  stands for the first reaction in all mechanisms,  $k$  for the second one and  $k_2$  third reaction in each model. (b–e) Show explicit depictions of the mechanisms' models from the third reaction forward used in this work. Some of the reactions involved are indicated as shown in the Section 2. Degradation reactions were excluded for simplicity. Note that (e) is equivalent to Fig. 1.

$C_1$  is the complex formed by the association of TF to a downstream BS in SMB mechanism.  $C_2$  is the complex formed by the TF dimer ( $TF:TF$ ) and a downstream double BS in DB mechanism.  $C_3$  and  $C_4$  are the complexes formed by binding to the first or second DNA binding sequence, respectively, in a double BS of a simple cooperative TF monomer in both CSB and CSB\_D (see Fig. 3).

We assume that both binding sequences in the unbound BS ( $P_2$ ) are indistinguishable from one another and that the rates of binding for any of them are the same.

We are considering three regimes: a weak one and two strong ones. For weak binding regime, we used the association and dissociation rates enlisted in Table 4. For the strong binding ones, we first explored a regime where the association rates of dimers are two orders of magnitude bigger than in the weak regimes and the monomers association rate in the sequential cases (both the second and first monomers to bind in CSB and CSB\_D mechanisms) were one order of magnitude larger than their counterparts in the

weak regime. The exception is SMB, where  $k_{on}$  was augmented by two orders of magnitude. We denote this regime as strong  $100k_{on}$ . The second strong regime involves changing dissociation rates, where the dissociation rates of dimers from DNA are two orders of magnitude smaller than in the weak regime and the monomers dissociation rates (regardless if it is the second or first bound) are one order of magnitude smaller than their counterparts in the weak regime. Once more SMB is the only exception where, as in DB, the dissociation rate is considered to be two orders of magnitude smaller than in the weak regime. We called this last regime strong  $k_{off}/100$ .

We analyzed each of this mechanisms using both deterministic and stochastic simulations. Before simulating them we built Ordinary Differential Equations models and BioNetGen rule based models.

2.2.1. First mechanism: simple monomer binding (SMB)

In SMB, we consider that only one TF molecule needs to bind to



**Table 4**  
Particular parameters involved in the mechanisms models.

Parameter	Value	Description	SMB	DB	CSB	CSB_D
$k_{off}$	$30 \cdot 60 \text{ min}^{-1}$	Unbinding rate	X <sup>a</sup>			
$k_{on}$	$\frac{(3 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	Binding rate	X <sup>a</sup>			
$k_{dim}$	$\frac{((1.6 \cdot 10^7) \cdot 60.0) \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{((6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42.0 \cdot 10^{-15}))}$	Dimer association rate		X		X
$k_{undim}$	$0.05 \cdot 60 \text{ min}^{-1}$	Dimer dissociation rate		X		X
$k_{on1}$	$\frac{(5 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	First simple monomer association rate			X	X
$k_{off1}$	$50 \cdot 60 \text{ min}^{-1}$	First simple monomer dissociation rate			X	X
$k_{on2}$	$\frac{(5 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	Second simple monomer association rate			X	X
$k_{off2}$	$0.03 \cdot 60 \text{ min}^{-1}$	Second simple monomer dissociation rate			X	X
$k_{on3}$	$\frac{(3 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	Dimer DNA binding association rate		X		X
$k_{off3}$	$30 \cdot 60 \text{ min}^{-1}$	Dimer DNA binding dissociation rate		X		X
$k_{on3_2}$	10	Dimer DNA binding activation rate		X		X
$k_{off3_2}$	0.1	Dimer DNA binding inactivation rate		X		X

All the parameters were obtained from Cranz et al. (2004).

<sup>a</sup> For SMB we consider that the binding and unbinding rate of the simple monomer is the same as the rate of binding of the dimer in DB and CSB\_D. We did this because we think it is plausible that when the monomer is the main regulatory molecular specie these parameters are equivalent.

the downstream site in order to promote or repress transcription see Fig. 3b.

In SMB TF binds to DNA as a monomer using the association rate of GCN4 dimer to DNA. It is similar to the model described in Keller (1994) using autorregulation. We chose the parameters from this TF because it has been thoroughly studied (Cranz et al., 2004). We want to emphasize that the original parameters for GCN4 dictate a association rates for dimer and monomer that are almost equal. For this reason, and because of the natural range where association and dissociation rates exist (see Table 5), we also included cases of strong binding that represent strong operators.

It is a common practice to model TF binding as a Michaelis-Menten reaction or as a Hill equation (similar to any process which involves cooperativity). The Michelis Menten kinetics has a behavior quite similar to our simple monomer binding case. The inclusion of this SMB in this work may shed light on how assumptions as a Michaelis-Menten kinetics could affect the dynamical results when the underlying BM is more complex. However, there

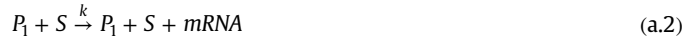
are also natural examples where TF can act as a monomer as can be seen in Table 3.

For this mechanism the FFTF molecular species would be the TF monomer, depicted as  $TF$  in the following equations, and its complex with DNA downstream BS is depicted as  $C_1$ .

The reactions involved in this mechanism are:



Which represents the first assumption in Section 2.2, denoting a basal transcription rate guided by the parameter  $\alpha$ .



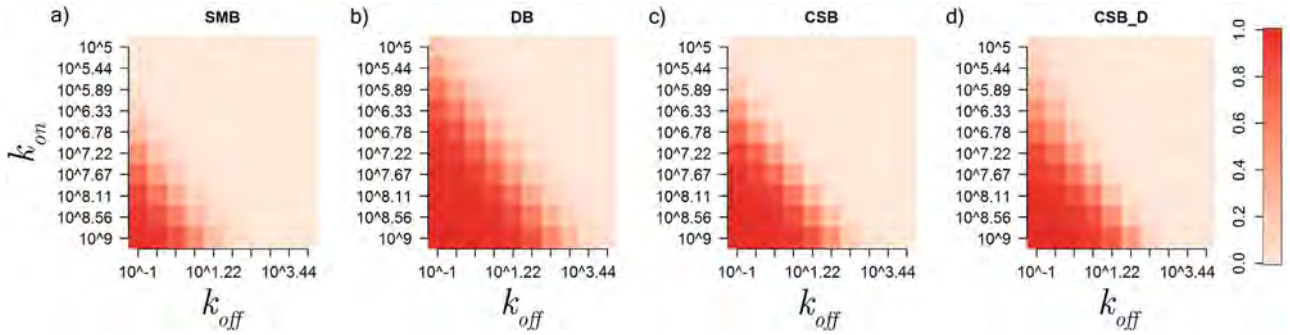
The previous reaction denotes the second assumption in Section 2.2, which involves transcription guided by an external signal  $S$ .



This reaction corresponds to the third assumption in 2.2, where we stated that translation of  $TF$ 's mRNA linearly depends on  $mRNA$

**Table 5**  
Association and dissociation rates.

TF	Association	Dissociation	Comments	Source
GCN4	$\frac{(5 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$3000 \text{ min}^{-1}$	First monomer association and dissociation of GCN4	Cranz et al. (2004)
GCN4	$\frac{(5 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$1.8 \text{ min}^{-1}$	Second monomer association and dissociation of GCN4	Cranz et al. (2004)
GCN4	$\frac{(3 \cdot 10^8)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$1800 \text{ min}^{-1}$	Dimer association and dissociation of GCN4	Cranz et al. (2004)
CI	$\frac{(3 \cdot 10^6)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$2.454 \text{ min}^{-1}$	Dimer association and dissociation of CI to 78nt sequences	Wang et al. (2009)
CI	$\frac{(2 \cdot 10^5)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$0.24 \text{ min}^{-1}$	Dimer association and dissociation of CI to 500nt sequences	Wang et al. (2009)
LexA	$\frac{(25 \cdot 10^6)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$3.48 \text{ min}^{-1}$	Dimer association and dissociation of LexA to recA promoter	Kühner et al. (2004)
LexA	$\frac{(25 \cdot 10^6)60 \text{ molecules}^{-1} \text{ min} - 1}{(6.022 \cdot 10^{23}) \cdot (42 \cdot 10^{-15})}$	$11.4 \text{ min}^{-1}$	Dimer association and dissociation of LexA to yebG promoter	Kühner et al. (2004)



**Fig. 4.**  $k_{on}$  and  $k_{off}$ . Canberra distance for the steady state of the connected vs the disconnected case was calculated for each mechanisms across the parameter values  $k_{off}$  from  $10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  to  $10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-4}$  and  $k_{on}$  from  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  to  $10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-9}$   $10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-9}$  and represented in heatmaps. (a)–(d) heatmaps correspond to SMB, DB, CSB and CSB\_D respectively. The parameters values used are in Table 1. All association rate parameters were equal to the chosen  $k_{on}$  value as its order of magnitude is maintained (see Table 4). All dissociation parameters except  $k_{off2}$  were used as the chosen value of  $k_{off}$ .  $k_{off2}$  was used as  $k_{off}/10000$  to maintain the relationship observed for GCN4.

concentration. The rate that drives this reaction is denoted here as  $k_2$ .



The (a.4) assumption is exclusive of SMB. In this reaction we denote the binding of a sole monomer to free downstream BS's ( $P_2$ ). As we stated before, the total number of those downstream binding sites will be 300. For this mechanism there will be only one binding sequence per each BS.



(a.5) refers to the seventh assumption from Section 2.2, where we stated that mRNA degradation is linear and faster than the protein one.



The previous chemical reaction, is based on the sixth assumption from the Section 2.2, where we stated that degradation is linear and equal for all molecular species involving  $TF$ . The degradation rate, which only depends on the actual  $TF$  concentration, is  $\delta_1$ .



a.7, as a.6 is based on the sixth assumption from the Section 2.2.



In a.8 we stated the conservation of the total amount of the downstream sites ( $ptot_2$ ), which is composed of the free ones ( $P_2$ ) plus the TF-DNA complex ( $C_1$ ) in order to be able to simplify the number of ODEs derived from these chemical equations.

The ODEs derived from such reactions are:

$$\frac{dTF}{dt} = k_2 mRNA + k_{off} C_1 - k_{on} (ptot_2 - C_1) TF - \delta_1 TF \quad (1)$$

$$\frac{dmRNA}{dt} = \alpha + kS - \delta_2 mRNA \quad (2)$$

$$\frac{dC_1}{dt} = k_{on} (ptot_2 - C_1) TF - k_{off} C_1 - \delta_3 C_1 \quad (3)$$

### 2.2.2. Second mechanism: dimer binding mechanism

There are several TF's that have been reported to need oligomerization prior to affecting transcription initiation such as in van Royen et al. (2012). Such oligomerization may imply just homodimerization (as in this work), tetramerization, heterodimerization,

etc. In our model we used the most simple version of this mechanism assuming that homodimerization of  $TF$  prior to DNA binding is needed. For this model we assumed that: dimer ( $TF:TF$ ) and DNA-dimer complex ( $C_2$ ) can be degraded at the same rate as free TF and dimerization must take place prior to binding with the rates proposed in Cranz et al. (2004) (see Table 4). Once the dimer is assembled it binds to DNA with a simple binding-unbinding process. This binding-unbinding process is further followed by a reversible stabilization in DNA. For this mechanism the FFTF is the TF dimer ( $TF:TF$ ) as it is the molecular specie able to bind DNA. The complex between  $TF:TF$  and the downstream binding sites is named  $C_{22}$  when it is not stable and  $C_2$  when it has been stabilized.

The reactions involved in this mechanism are derived from the same assumptions as in the previous model unless we state it differently. Those reactions are:



This reaction corresponds to the third assumption in 2.2, where we state that translation of  $TF$ 's mRNA linearly depends on  $mRNA$  concentration. The rate that drives this reaction is denoted here as  $k_2$ .



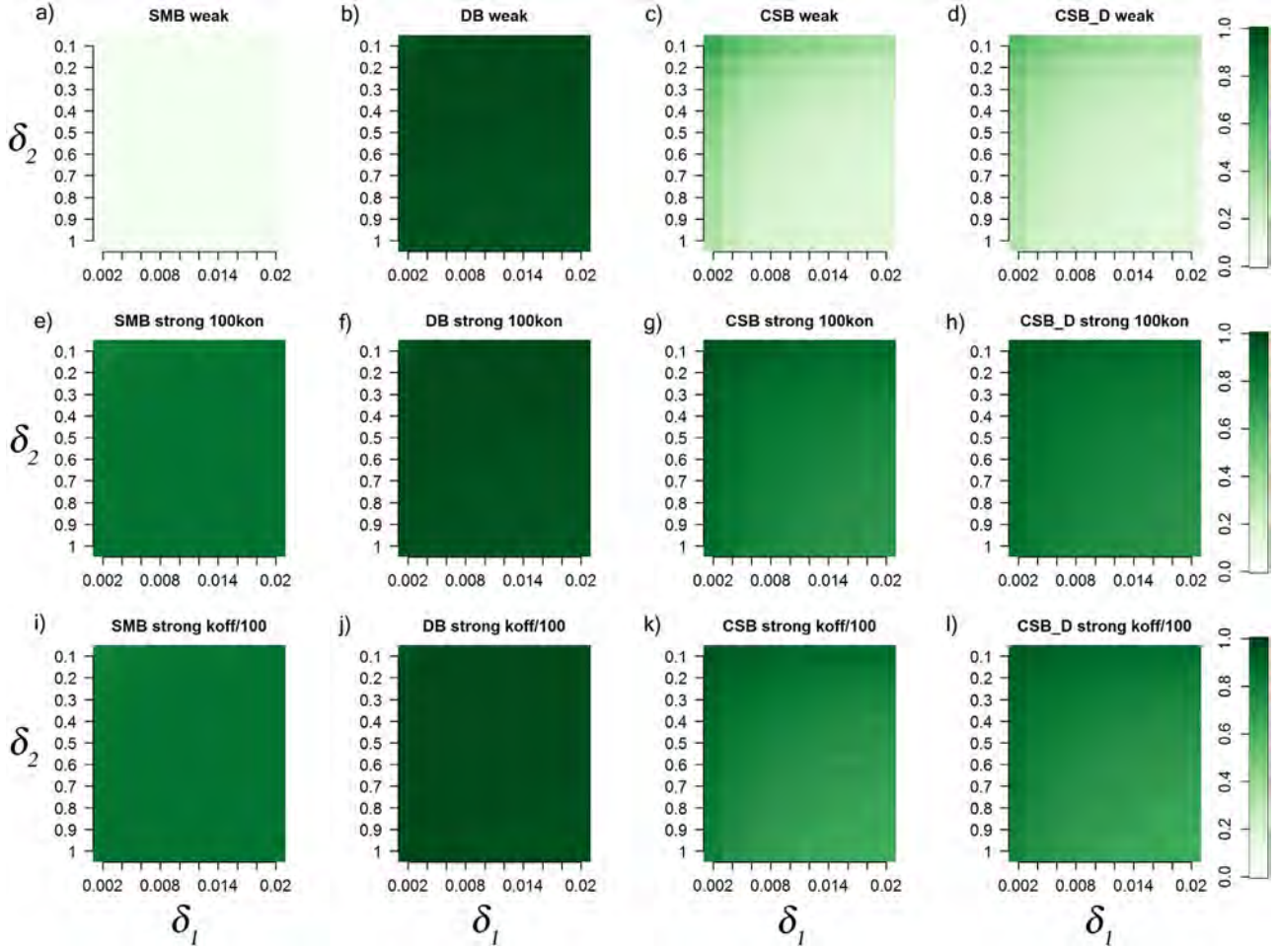
This reaction corresponds to the particularity of this mechanism of having the need to achieve dimer formation prior to DNA binding.



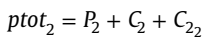
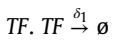
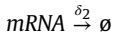
The reaction b.5 involves the TF dimer ( $TF:TF$ ) binding to DNA forming the complex  $C_{22}$  through the binding rate  $k_{on3}$  and its subsequent unbinding with the rate  $k_{off3}$  as a reversible process. Here, we also consider 300 downstream binding sequences each of which allow for a dimer binding with the same rates of binding and unbinding.



The reaction b.5.2 involves the complex  $C_{22}$  stabilization in DNA through the binding rate  $k_{on32}$  and its subsequent destabilization with rate  $k_{off32}$  as a reversible process.



**Fig. 5.**  $\delta_1$  and  $\delta_2$ . Canberra's distance for the steady state of the connected vs the disconnected case was calculated for each mechanisms across the parameter values  $\delta_1$  from 0.002 to 0.02 and  $\delta_2$  from 0.02 to 1 and represented in a heatmap. (a)–(d) heatmaps correspond to the weak binding regime, while (e)–(h) correspond to strong 100kon binding regime and (i) to (l) to strong  $k_{off}/100$  binding regime. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 with the exceptions of  $\delta_2$  and  $\delta_1$ .



In b.11, we include  $C_2$  and  $C_{2_2}$  as part of  $ptot_2$  which in this case is the complex formed by the  $TF \cdot TF$  dimer and the DNA binding site.

And the ODEs derived from them are:

$$\frac{dTF}{dt} = k_2 mRNA - 0.5 \cdot 2k_{dim} TF(TF - 1) + 2k_{undim} TF \cdot TF - \delta_1 TF \quad (4)$$

$$\frac{dmRNA}{dt} = \alpha + kS - \delta_2 mRNA \quad (5)$$

$$\frac{dTF \cdot TF}{dt} = 0.5k_{dim} TF(TF - 1) - k_{undim} TF \cdot TF + k_{off_3} C_{2_2} - k_{on_3} TF \cdot TF(p_{tot_2} - (C_2 + C_{2_2})) - \delta_1 TF \cdot TF \quad (6)$$

$$\frac{dC_{2_2}}{dt} = k_{on_3}(p_{tot_2} - (C_2 + C_{2_2}))TF \cdot TF - k_{off_3} C_{2_2} - k_{on_3_2} C_{2_2} + k_{off_3_2} C_2 - \delta_3 C_{2_2} \quad (7)$$

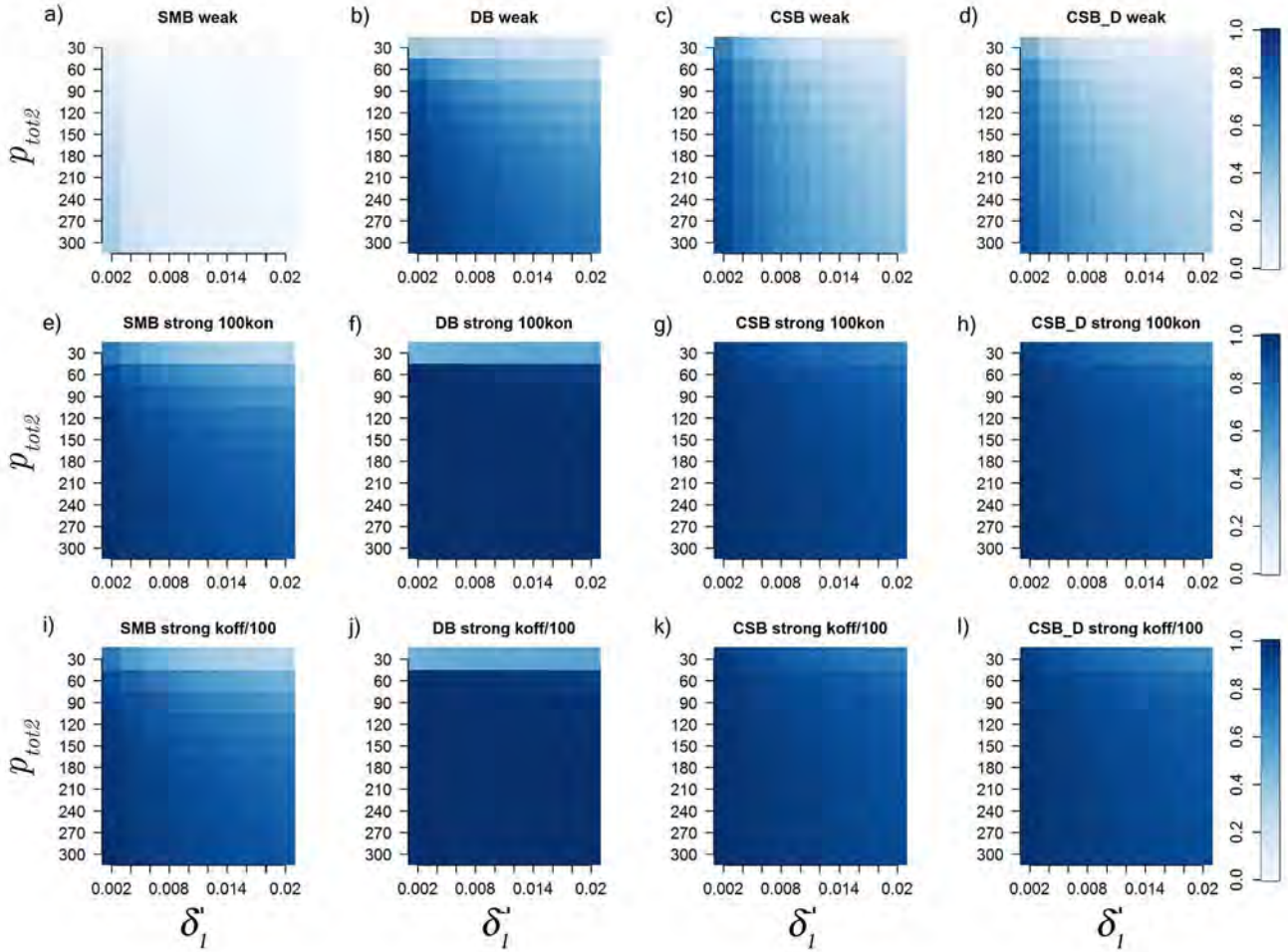
$$\frac{dC_2}{dt} = k_{on_3_2} C_{2_2} - k_{off_3_2} C_2 - \delta_3 C_2 \quad (8)$$

We want stress that we did not explicitly included  $P_1$ , as we are assuming that there is only one site in the genome where  $TF$  can be produced.

### 2.2.3. Third case: cooperative monomers sequential binding (CSB)

In this mechanism, we assumed that two monomers must be bound to DNA and they bind in separate sequential steps. Once one of them is bound, it makes much easier for the second one to bind (i.e. the  $k_d$  of the second  $TF$  to bind is smaller than the one that bound first). This means that, according to our assumptions, the first monomer to bind, regardless of the site, binds with a fixed dissociation rate which is much bigger than the one of the second cooperative monomer (see Table 4 and Fig. 3).

For this mechanism the FFTF species corresponds to  $TF$  monomer.



**Fig. 6.**  $p_{tot2}$  and  $\delta_1$ . Canberra distance for the steady state of the connected vs the disconnected case was calculated for each mechanisms across the parameter values  $p_{tot2}$  from 30 to 300 and  $\delta_1$  from 0.002 to 0.02 and represented in a heatmap. (a)–(d) Heatmaps correspond to the weak binding regime, while (e)–(h) correspond to strong 100kon binding regime and (i) to (l) strong  $k_{off}/100$  binding regime. DB is the mechanism where the SS changed the most upon interconnection in the three regimes. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 with the exceptions of  $p_{tot2}$  and  $\delta_1$ .

CSB has three possibilities for *TF* to bind downstream sites. The first one is to bind the first BS in a given site. The complex formed when this happens is called  $C_3$ . The second one is to bind the second BS in each site. When this happens, the complex is called  $C_4$ . Both  $C_3$  and  $C_4$  bind and unbind with the same rates. The third complex is called  $C_2$  and is only formed when, once the first monomer is already bound to a BS—regardless if the complex formed is  $C_3$  or  $C_4$ —a second monomer binds in the free BS of this site.

The reactions involved in this mechanism are:



here we also consider 300 downstream binding sequences. Each one has two sub-sites. Two monomers can be bound per site.



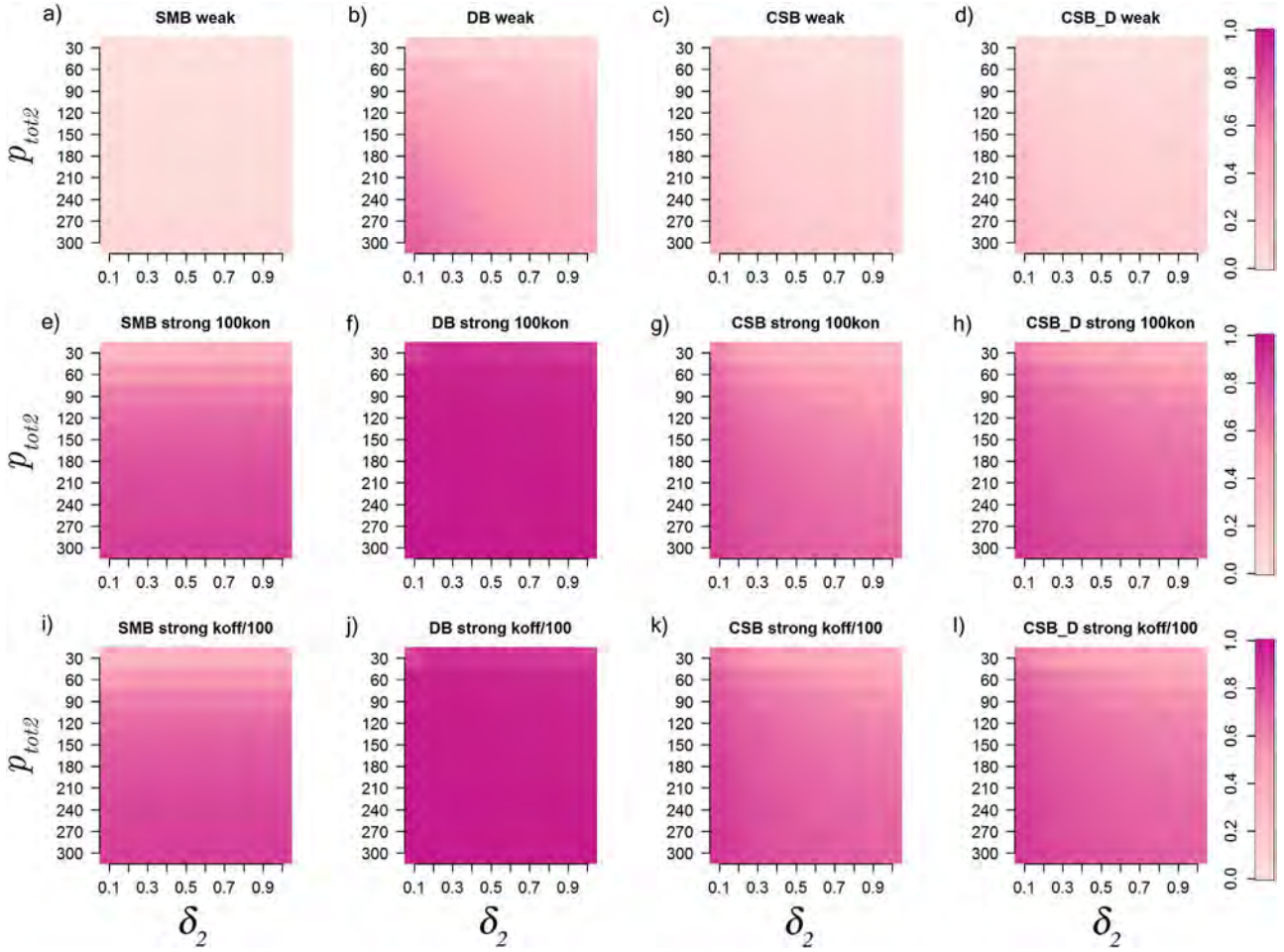
$C_3$  and  $C_4$  represent *TF* binding to one of the two possible downstream binding sites. For simplicity, we consider that the

binding and unbinding (association and dissociation, respectively) rates to either the first or the second site are the same.



As in the first monomer binding reactions (c.4) and (c.5), we consider that regardless of which of the sites is free, the second monomer always binds and unbinds using the same rates ( $k_{on2}$  and  $k_{off2}$ , respectively). However, the first monomer unbinding rates are different from the second monomer rates.





**Fig. 7.**  $p_{tot2}$  and  $\delta_2$ . Canberra distance for the steady state of the connected vs the disconnected case was calculated for each mechanisms across the parameter values  $p_{tot2}$  from 30 to 300 and  $\delta_2$  from 0.1 to 1 and represented in a heatmap. (a)–(d) Heatmaps correspond to the weak binding regime, while (e)–(h) correspond to strong 100 kon binding regime and (i) to (l) strong  $k_{off}/100$  binding regime. DB is the most changed mechanism by interconnection. In all mechanisms,  $p_{tot2}$  seems slightly more relevant for the SS change than  $\delta_2$ . The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 with the exceptions of  $p_{tot2}$  and  $\delta_2$ .

$$P_2 = p_{tot2} - (C_2 + C_3 + C_4) \quad (c.14)$$

And the ODEs derived from them are:

$$\frac{dTF}{dt} = k_2 mRNA - 2k_{on1} TF(p_{tot2} - (C_2 + C_3 + C_4)) + k_{off1}(C_3 + C_4) - k_{on2} TF(C_3 + C_4) + 2k_{off2} C_2 - \delta_1 TF \quad (9)$$

$$\frac{dmRNA}{dt} = \alpha + kS - \delta_2 mRNA \quad (10)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k_{on2} TF(C_3 + C_4) - 2k_{off2} C_2 - \delta_3 C_2 \quad (11)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = k_{on1} TF(p_{tot2} - (C_2 + C_3 + C_4)) - k_{off1} C_3 - k_{on2} TF C_3 + k_{off2} C_2 - \delta_3 C_3 \quad (12)$$

$$\frac{dC_4}{dt} = k_{on1} TF(p_{tot2} - (C_2 + C_3 + C_4)) - k_{off1} C_4 - k_{on2} TF C_4 + k_{off2} C_2 - \delta_3 C_4 \quad (13)$$

#### 2.2.4. Fourth case: cooperative monomers sequential binding and dimerization (CSB\_D)

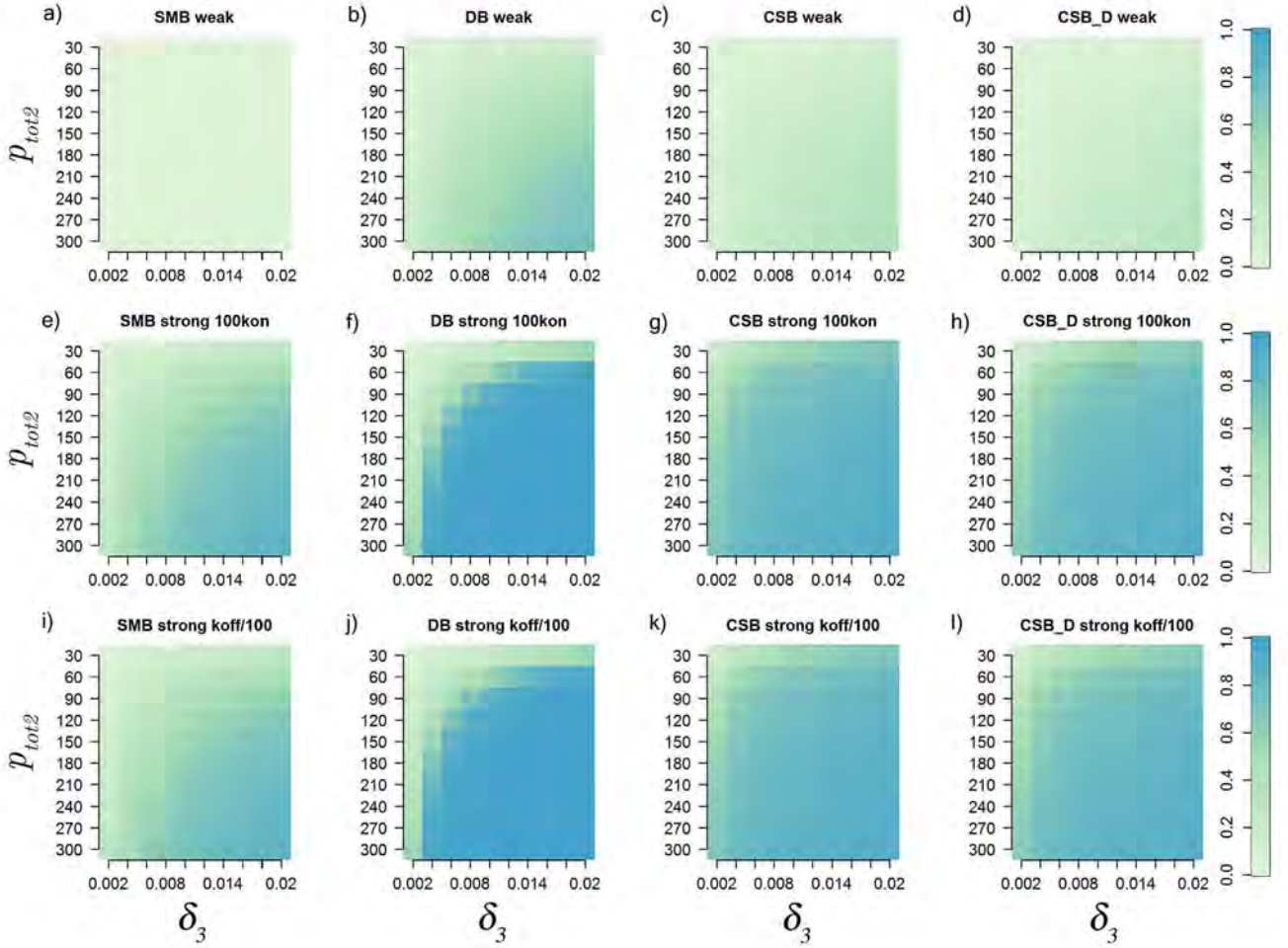
Up to this point, we assumed that both monomer and dimer

have the same DNA binding parameters. However, the assumptions in Keller (1994) for dimerization with monomer binding include heterogeneous binding of dimer and monomer, where dimers tend to bind faster than monomers. In this work, we assumed that the first monomer to bind, as in the CSB case, binds with the same association rate, but with a different dissociation one to the second one or the complete dimer (see Fig. 3 and Table 4). We used the rates proposed in Cranz et al. (2004) for the regime involving monomer and dimer weak binding.

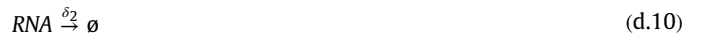
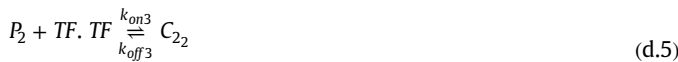
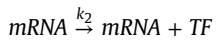
As the weak binding regime of this mechanism provides an example where dimer and the first monomer bind their operator with a similar strength, we explored what would happen when the dimer is supposed to bind faster than the monomer for the strong binding regime. In that regime, our binding rate for dimers is two orders of magnitude bigger than in the weak case and the binding (association) rate for the monomer is one order of magnitude larger. This was chosen arbitrarily to be congruent qualitatively with the information in Keller (1994). In CSB\_D both TF monomer and dimer are considered as FTF species as both can bind DNA.

The reactions involved in this mechanism are:





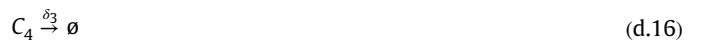
**Fig. 8.**  $p_{tot2}$  and  $\delta_3$ . Canberra distance for the steady state of the connected vs the disconnected case was calculated for each mechanisms across the parameter values  $p_{tot2}$  from 30 to 300 and  $\delta_3$  from 0.1 to 1 and represented in a heatmap. (a)–(d) Heatmaps correspond to the weak binding regime, while (e)–(h) correspond to strong 100kon binding regime and (i) to (l) strong koff/100 binding regime. DB is the most changed mechanism by interconnection. In all mechanisms, both parameters seem to be relevant for the FFTF SS change upon interconnection. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 with the exceptions of  $p_{tot2}$  and  $\delta_3$ .



here we also consider 300 downstream binding sequences. Each one has two sub-sites, so a total of two monomers or a single dimer can be bound per site. We have an inactivated intermediate FFTF-DNA complex called  $C_{22}$  which needs further stabilization.



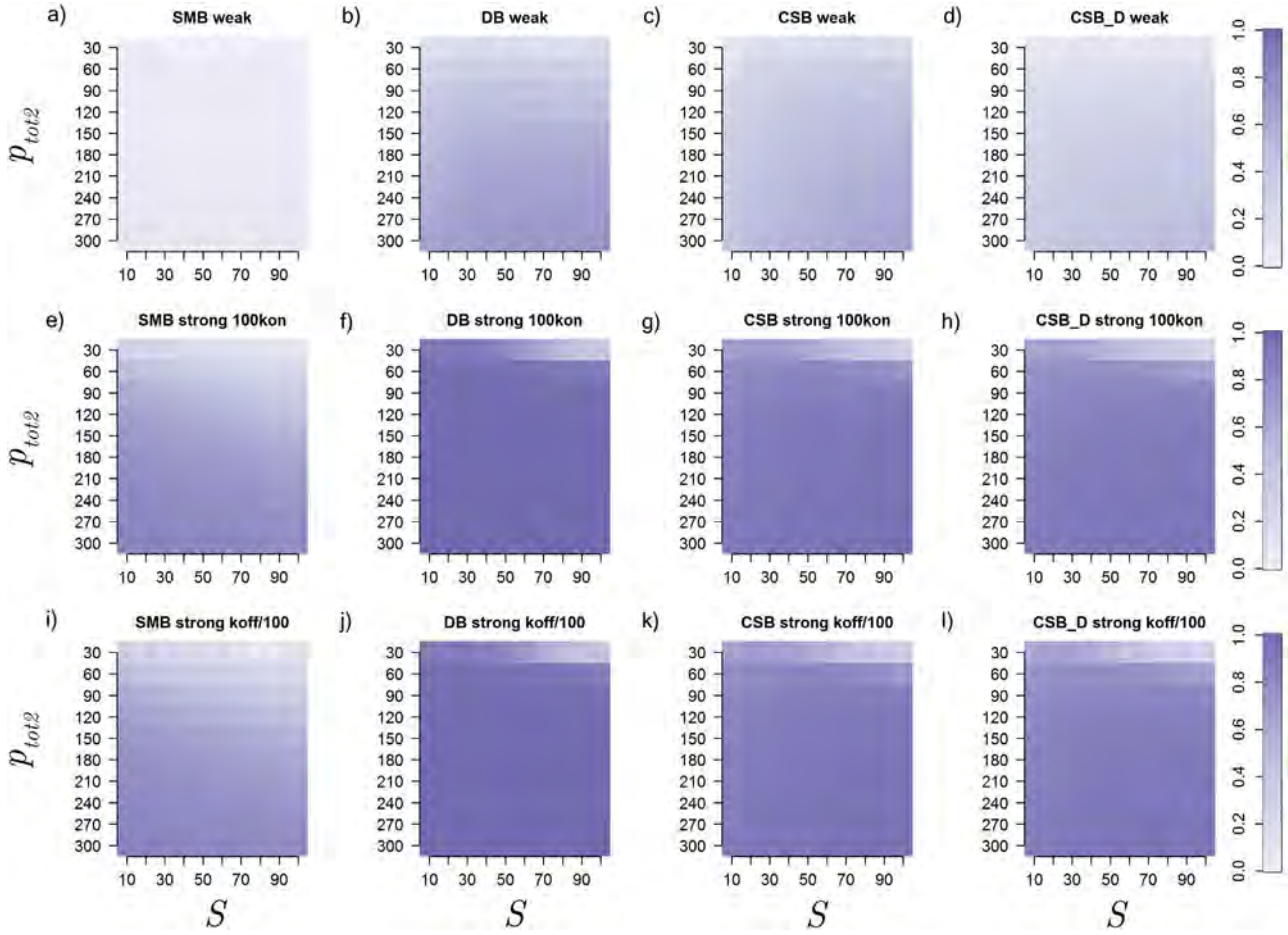
$C_{22}$  is reversibly stabilized in reaction (d.5.2) as in DB.



$$p_{tot2} = P_2 + C_2 + C_{22} + C_3 + C_4 \quad (d.17)$$

As in CSB, both forms in which the first monomer can bind to any of the two sites are considered equivalent as can be seen in the reactions (d.6) and (d.7).

$$P_2 = p_{tot2} - (C_2 + C_{22} + C_3 + C_4) \quad (d.18)$$



**Fig. 9.**  $p_{tot2}$  and  $S$  Canberraâs distance for the steady state of the connected vs the disconnected case was calculated for each mechanisms across the parameter values  $p_{tot2}$  from 30 to 300 and  $S$  from 10 to 100 and represented in a heatmap. (a)–(d) Heatmaps correspond to the weak binding regime, while (e)–(h) correspond to strong 100kon binding regime and (i) to (l) strong  $k_{off}/100$  binding regime. DB is the less changed mechanism by interconnection. In all mechanisms,  $p_{tot2}$  seems to be more relevant for the SS change than  $S$ . The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 with the exceptions of  $p_{tot2}$  and  $S$ .

And the ODEs derived from them are:

$$\begin{aligned} \frac{dTF}{dt} = & k_2mRNA - 0.5*2k_{dim}TF(TF - 1) + 2k_{undim}TF \cdot TF \\ & - 2k_{on1}TF(ptot_2 - (C_2 + C_{2_2} + C_3 + C_4)) + k_{off1}(C_3 + C_4) \\ & - k_{on2}TF(C_3 + C_4) + 2k_{off2}C_2 - \delta_1TF \end{aligned} \quad (14)$$

$$\frac{dmRNA}{dt} = \alpha + kS - \delta_2mRNA \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \frac{dTF \cdot TF}{dt} = & 0.5k_{dim}TF(TF - 1) - k_{undim}TF \cdot TF + k_{off3}C_{2_2} \\ & - k_{on3}(ptot_2 - (C_2 + C_{2_2} + C_3 + C_4))TF \cdot TF - \delta_1TF \cdot TF \end{aligned} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{2_2}}{dt} = & -k_{off3}C_{2_2} + k_{on3}(ptot_2 - (C_2 + C_{2_2} + C_3 + C_4))TF \cdot TF \\ & - k_{on3_2}C_{2_2} + k_{off3_2}C_2 - \delta_3C_{2_2} \end{aligned} \quad (17)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k_{on2}TF(C_3 + C_4) - 2k_{off2}C_2 - k_{off3_2}C_2 + k_{on3_2}C_{2_2} - \delta_3C_2 \quad (18)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_3}{dt} = & k_{on1}TF(ptot_2 - (C_2 + C_{2_2}C_3 + C_4)) - k_{off1}C_3 - k_{on2}TFC_3 \\ & + k_{off2}C_2 - \delta_3C_3 \end{aligned} \quad (19)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_4}{dt} = & k_{on1}TF(ptot_2 - (C_2 + C_{2_2} + C_3 + C_4)) - k_{off1}C_4 - k_{on2}TFC_4 \\ & + k_{off2}C_2 - \delta_3C_4 \end{aligned} \quad (20)$$

### 3. Materials and methods

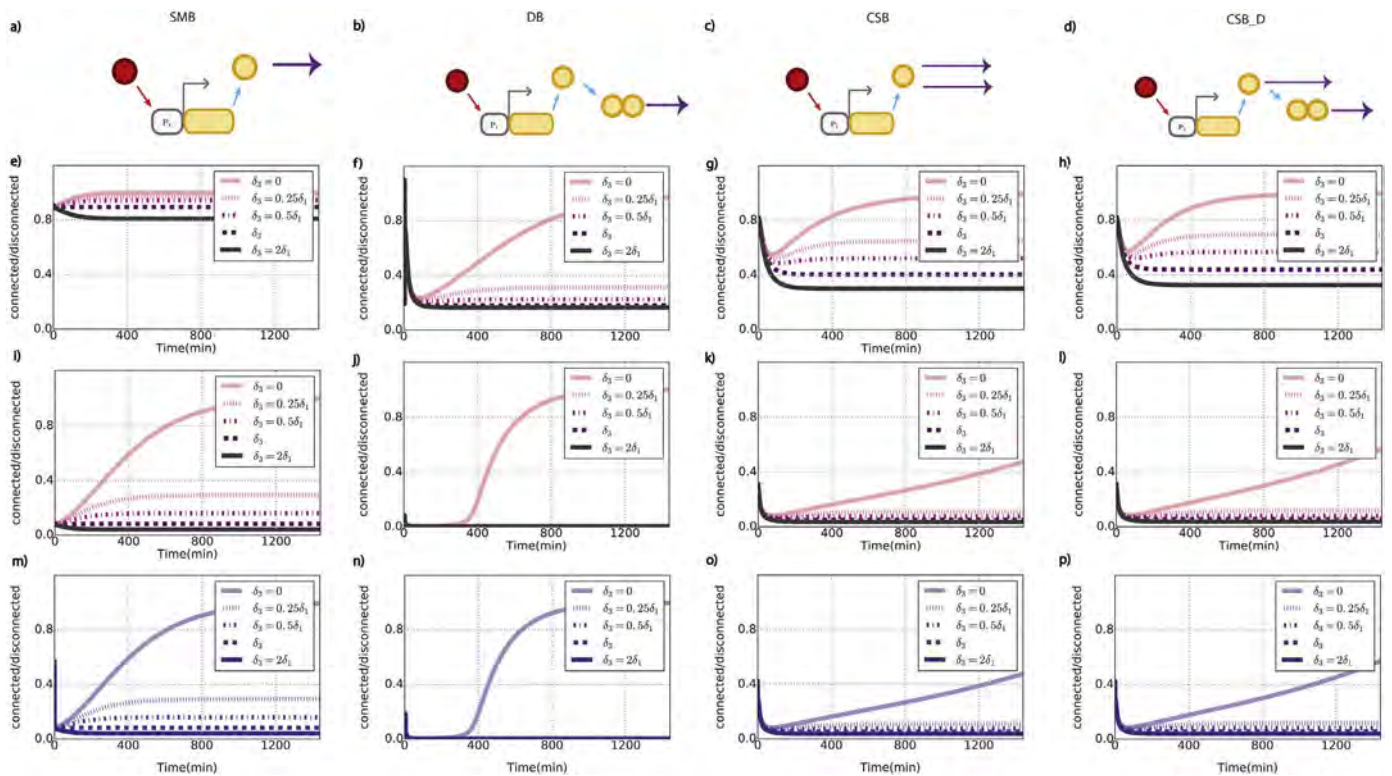
In this section we briefly describe how we assessed and compared the impact of retroactivity between connected and disconnected cases for each mechanism in each regime. First, we explain how we derived the input  $S$  for each mechanism. Then, we give a general description of how we did the deterministic and stochastic simulations where the effects of retroactivity are studied by simulating the change of FTF molecules over time under each TFBP.

#### 3.1. $S$ calculation

We calculated the input  $S$  needed to reach a steady state (SS) of 20.38 FTF molecules for each mechanism by trial and error using the R package 'rootsolve' (Soetaert and Herman, 2009; Soetaert, 2009) to calculate the steady state (SS).

#### 3.2. Deterministic simulations

We simulated the ordinary differential equations (ODEs) models in Python with odeint module solver, which uses LSODA



**Fig. 10.** Degradation effects on FFTF. (a)–(d) are symbolic representations of the mechanisms: SMB, DB, CSB, and CSB\_D, respectively. (e)–(h) Show the FFTF simulations ratio behavior under weak regime for each mechanism, (i)–(l) show the ratio of FFTF between connected and disconnected cases when the regime is with  $100 k_{off}$  and (m)–(p) show the ratio of FFTF between connected and disconnected cases when the regime is strong with  $k_{off}/100$ . The parameters values were used as described in Tables 1 and 4. The used  $\delta_2$  values are stated in the legend. When only written as  $\delta_2$ , the value is the same as stated in 1.

from the FORTRAN library ODEPACK. LSODA is a Real-valued variable-coefficient Ordinary Differential Equation solver, with fixed-leading-coefficient implementation. It provides automatic method switching between implicit Adams method (for non-stiff problems) and a method based on backward differentiation formulas (BDF) (for stiff problems) <http://www.netlib.org/odepack>. We further rectified such models with BioNetGen (Faeder et al., 2009) simulations results, which implements the c-vode solver. c-vode is large non-stiff (or stiff depending on the selected option) ordinary differential equation initial-value problem solver (<http://www.netlib.org/odepack>). We ran our models simulations, both in Python and Bionetgen, using a total time of 1440 min. In the python simulation we used a time step of 0.01 min. In the BioNetGen simulation we used a time step of one minute. Regardless of the time step difference, no appreciable difference between the two methods was observed (data not shown). Our BioNetGen models are included in Supplementary data.

### 3.2.1. Steady state calculation

We used the R package ‘rootsolve’ (Soetaert and Herman, 2009; Soetaert, 2009) to calculate the steady state (SS) of each ODEs model FFTF under different parameters values with the Newton-Raphson method or running the simulation until reaching the steady state. Once we got the SS values for the connected and disconnected cases we used Canberra’s distance to measure the difference between them. As we only assess the distance between two points (connected and disconnected SS), this guarantees a measure that goes from zero to one. Canberra’s distance is calculated as follows:  $d(p, q) = \frac{|p - q|}{|p| + |q|}$ . The more similar both measurements are, the closer it is to 0, the more dissimilar, the closer it is to 1.

We also used Mathematica ‘Solve’ function to calculate DB and SMB SS under different parameters values in order to evaluate the

effects of parameters separately from the retroactivity effects.

### 3.2.2. Non-linear degradation

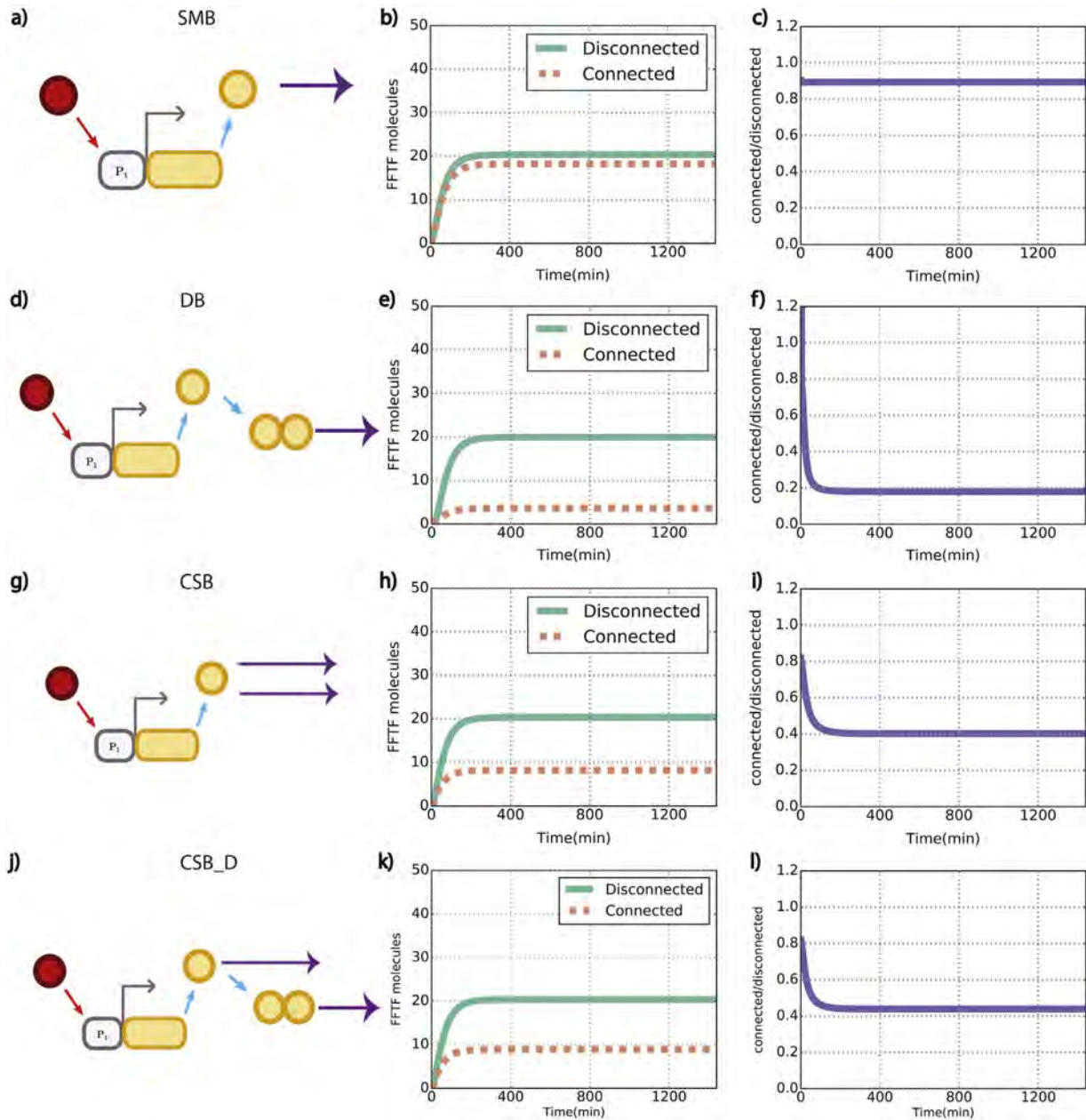
To test the downstream sites protection role proposed by Burger et al. (2010), we simulated cases where the degradation of TF molecular species bound to DNA would be much smaller than the species that include free TF. We did deterministic simulations of each TFBP using a degradation range from 0 to the double of the free TF degradation rate in 0.25 increments.

### 3.3. Stochastic simulations

We used BioNetGen’s stochastic simulation algorithm (SSA) tool to simulate the stochastic version of our system. With this tool we sampled the FFTF concentration each 0.5 min for 1440 min using the same rule based models as in the deterministic simulations. It is important to note that, regardless of the time of sampling, the actual size of the time step interval is chosen stochastically for SSA in each iteration (Gillespie, 1977). We simulated 1000 times each of the mechanisms: SMB, DB, CSB, and CSB\_D in both connected and disconnected case, for each regime to produce ensembles. We plotted each ensemble data comparing connected with disconnected cases mean and SD using ggplot2 (Wickham, 2009) R package. The complete scripts to generate the plots can be found in this Github link ([https://github.com/LiberPH/Retroactivity\\_mechanisms\\_transcription\\_secret](https://github.com/LiberPH/Retroactivity_mechanisms_transcription_secret)).

We calculated the D statistic (maximum vertical deviation) using Kolmogorov-Smirnov test to give statistical support to the differences observed between the distributions of the stochastic simulations ensembles. D statistic is used as a dissimilarity measurement providing the maximal difference between two compared distributions. The graphs related to this statistic are included in the second section of Supplementary data (Figs. 6–17).





**Fig. 11.** Weak BS regime FFTF continuous deterministic comparisons. Deterministic simulations for each mechanism. (a), (d), (g) and (j) are representations of the mechanisms, where (a) is simple monomer binding, (d) is dimerization prior binding, (g) CSB and (j) is CSBD. (b), (e), (h) and (k) are the deterministic simulations. Continuous lines represent the simple or disconnected system and the dashed ones the connected (300 downstream BS). y axis is the FFTF molecules, whereas x is time in minutes. (c), (f), (i) and (l) represent the ratio of FFTF molecules between the connected and the disconnected cases across time. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4.

The coefficients of variation at each time point were calculated as  $CV_t = \frac{\sigma_t}{\mu_t}$ . Where  $CV_t$  represents the coefficient of variation at time  $t$ ,  $\mu_t$  stands for the mean value of the simulations ensemble at time  $t$ , and  $\sigma_t$  is the standard deviation of the simulations ensemble at time  $t$ . We calculated the area under each FFTF CV curve (connected and disconnected) to emphasize the difference between connected and disconnected cases (Fig. 15).

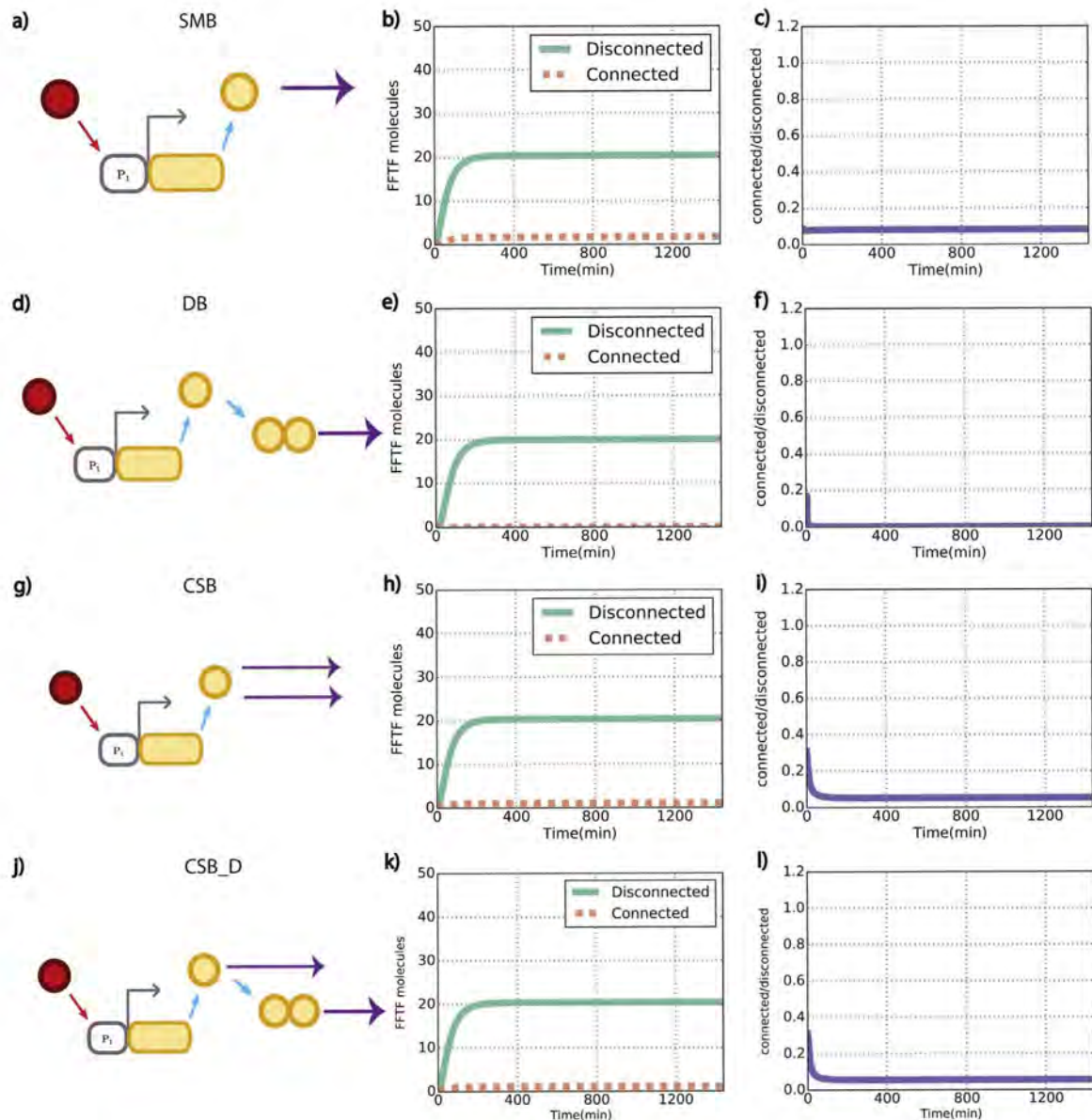
#### 4. Results and discussion

In this section we present the results obtained from the comparison of the mechanism performance in connected and disconnected cases. We begin with the presentation of the deterministic results in Section 4.1.

After that, we analyze the variability and differences in

connected and disconnected distributions of the four mechanisms in Section 4.2, calculating the coefficient of variation (CV) and the D statistic (see Section 3). A stochastic counterpart of Section 4.1.2 was not included because the authors consider that such issue is matter of out of the general scope of this article.

In Section 4.1.1 we study how different parameters influence retroactivity effects for each of the binding mechanisms on the FFTF SS. If there are small differences between the connected and disconnected FFTF SS, then retroactivity effects are small. On the other hand if there are large differences then the retroactivity effects are large. In Section 4.1.2 we analyze the impact of TF-DNA complexes degradation across all the deterministic simulations of each of the mechanisms. We decided to make this analysis given the strong discussion about how binding sites could be serving a TF protective role, which would minimize retroactivity effects (Burger et al., 2010).



**Fig. 12.** Strong binding 100  $k_{on}$  regime FFTF continuous deterministic comparisons. Here we show the deterministic simulations for our models. (a), (d), (g) and (j) are representations of the mechanisms, where (a) is simple monomer binding, (d) is dimerization prior binding, (g) is monomer sequential binding and (j) is dimerization with monomer sequential binding. (b), (e), (h) and (k) are the deterministic simulations plots for  $S=50$  and 300 downstream binding sites. The continuous line represents the simple or disconnected system and the dashed one the connected. y axis is the monomeric TF molecules present, whereas x axis is time in minutes. (c), (f), (i) and (l) represent the ratio between the connected and the disconnected cases across time. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 except for the association rates they were used as follows:  $k_{on}$  was substituted for  $100*k_{on}$ ,  $k_{on3}$  was substituted for  $100*k_{on3}$ ,  $k_{on1}$  was substituted for  $10*k_{on1}$  and  $k_{on2}$  was substituted for  $10*k_{on2}$ .

In Section 4.1.3, with the subset of values of parameters in Tables 1 and 3, we did deterministic simulations of each of the mechanisms in each of the binding regimes to show how FFTF number of molecules changes not only at SS, but also across the simulation.

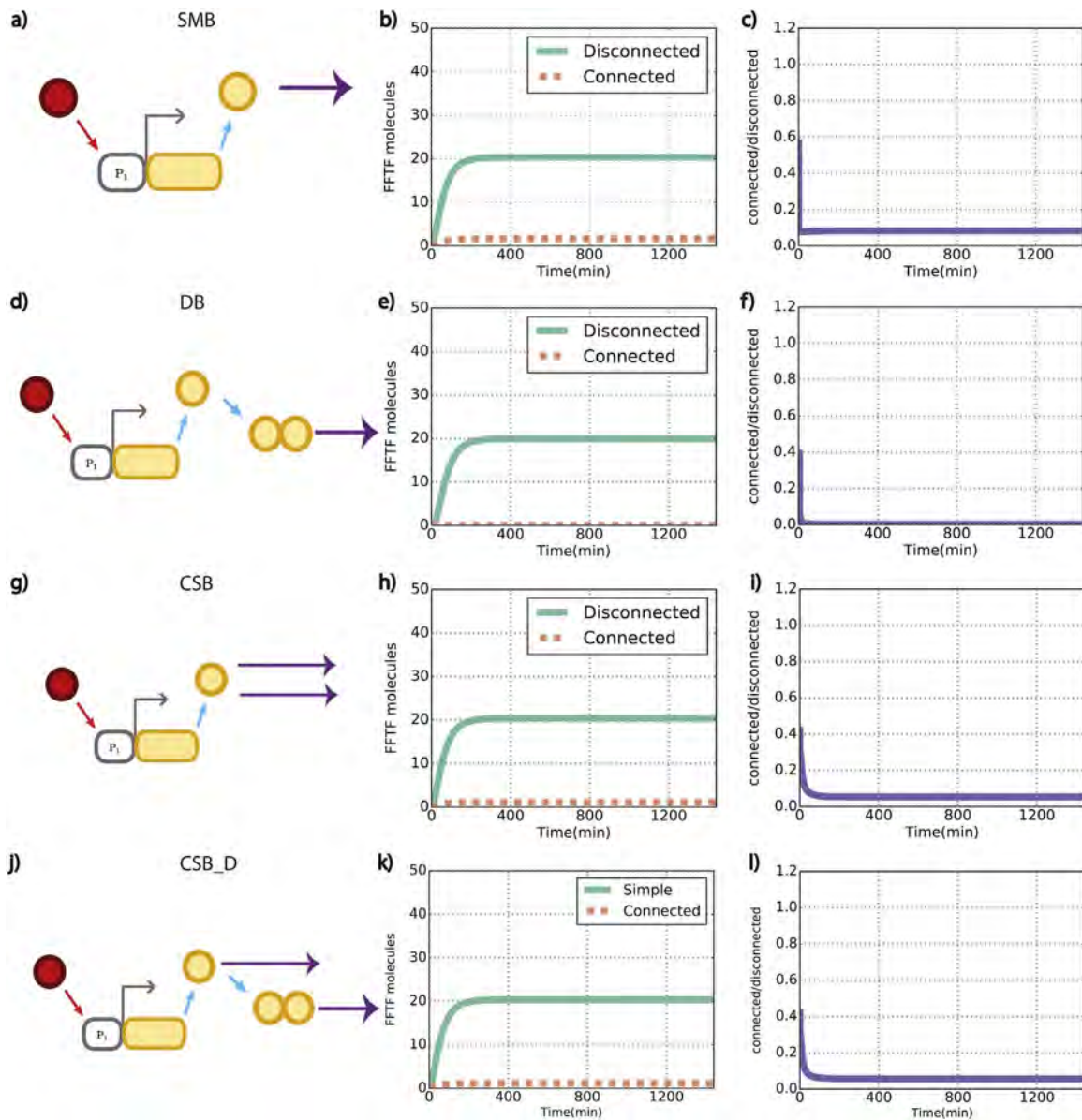
In Section 4.1.3.1, we compared the disconnected/connected ratios of FFTF in the deterministic simulations results for each mechanism under a weak binding regime.

Then, in Section 4.1.3.2 we compared the disconnected/connected ratios of FFTF in the deterministic simulations results in two strong binding operators regime varying  $k_{on}$  and  $k_{off}$  values: 100  $k_{on}$  and  $k_{off}/100$ . Even if adding two orders of magnitude to  $k_{on}$  to make our  $k_d$  smaller (and thus our operator stronger) may seem intuitive, a recent work by Hammar et al. (2014), indicates that stronger operators tend to have a slower  $k_{off}$  rather than a faster  $k_{on}$ . This seems to be further confirmed by a previous study where the complexes between DNA and two TF variants (one monomeric and

one dimeric) showed no difference in the  $k_{on}$ . However, Sox10 showed a lower off-rate for sites where it binds cooperatively as a dimer than for its monomeric sites (Peirano and Michael, 2000). Because of the former reasons, we included another strong regime where  $k_{off}$  is two orders of magnitude smaller than the GCN4's  $k_{off}$ .

In Section 4.2.1 we show that the mean behavior of FFTF molecules is the same in stochastic and deterministic simulations. We also observed the intrinsic variability of the mechanisms by determining the D-statistic between pairs of mechanisms and calculating the CV of each one.

In Sections 4.2.2.1 and 4.2.2.2, with the aim to establish a relationship between the change in FFTF molecules and change in variability upon interconnection, we analyzed the stochastic counterpart of the deterministic simulations (Sections 4.1.3.1 and 4.1.3.2). We also calculated the difference between connected and disconnected cases by calculating their distance with a Kolmogorov–Smirnov test.



**Fig. 13.** Strong BS  $k_{off}/100$  regime FFTF continuous deterministic comparisons. Here we show the deterministic simulations for our models. (a), (d), (g) and (j) are representations of the mechanisms, where (a) is simple monomer binding, (d) is dimerization prior binding, (g) is monomer sequential binding and (j) is dimerization with monomer sequential binding. (b), (e), (h) and (k) are the deterministic simulations plots for  $S=50$  and 300 downstream binding sites. The continuous line represents the simple or disconnected system and the dashed one the connected. y axis is the functional TF molecules present, whereas x axis is time in minutes. (c), (f), (i) and (l) represent the ratio between the connected and the disconnected cases across time. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 except for the dissociation rates. In the case of association rates they were used as follows:  $k_{off}$  was substituted for  $\frac{k_{off}}{100}$ ,  $k_{off3}$  was substituted for  $\frac{k_{off3}}{100}$ ,  $k_{off1}$  was substituted for  $\frac{k_{off1}}{10}$ , and  $k_{off2}$  was substituted for  $\frac{k_{off2}}{10}$ .

#### 4.1. Deterministic

We used a deterministic approach to find out how number of molecules of FFTF changes upon interconnection depending of the BM. To assess an overall important change we evaluated the difference between connected and disconnected steady states (SS) of FFTF (Section 4.1.1). To assess a change in the dynamics (delays, ultrasensitivity, etc) we used ODEs simulations (Sections 4.1.2, 4.1.3.1 and 4.1.3.2).

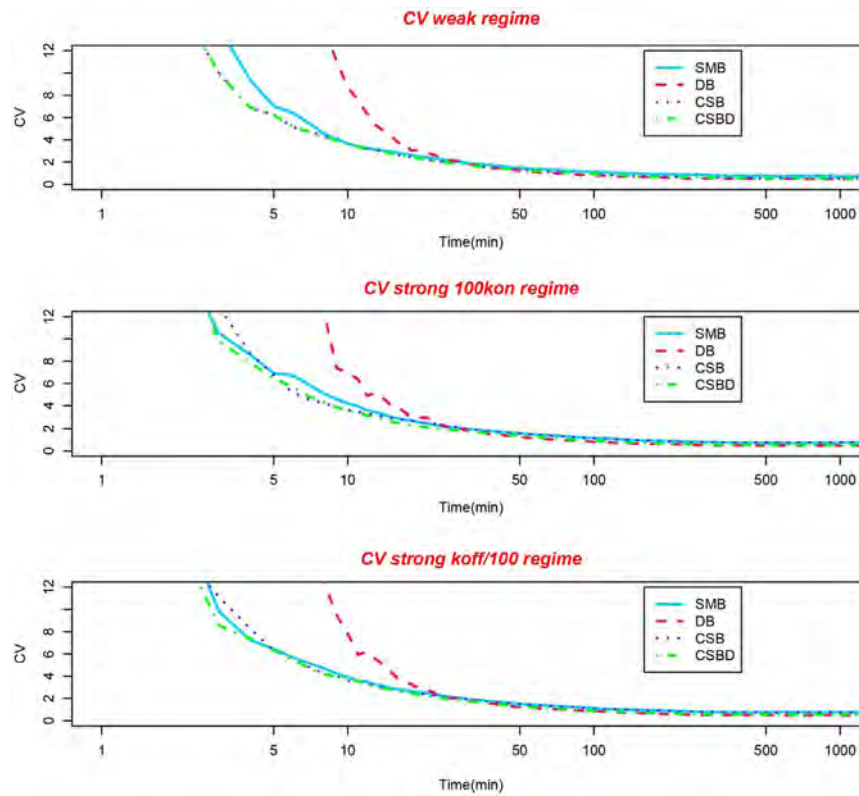
##### 4.1.1. Steady states comparisons across different parameters

In order to find out the relevance of different parameters in the retroactivity effects depending of the mechanism, we assessed the difference between the connected and disconnected SS of FFTF molecules for each mechanism. We evaluated the influence of the association and dissociation rates ( $k_{on}$  and  $k_{off}$ , respectively), TF

degradation ( $\delta_1$ ), mRNA degradation ( $\delta_2$ ), downstream loads ( $p_{tot2}$ ), and the input signal  $S$  across the four different mechanisms. In this analysis we wanted to explore if a determined parameter is more likely to influence the retroactivity effects in a particular mechanism at the SS and if there is any "global" trend, where a mechanism is always more sensitive or resistant to retroactivity effects regardless of the parameter changes. We did five main parameters comparisons:  $k_{on}$  vs  $k_{off}$  (Fig. 4),  $\delta_1$  vs  $\delta_2$  (Fig. 5),  $p_{tot2}$  vs  $\delta_1$  (Fig. 6),  $p_{tot2}$  vs  $\delta_2$  (Fig. 7), and  $p_{tot2}$  vs  $S$  (Fig. 9).

Canberra's distance was implemented to measure the difference between connected and disconnected cases, the more similar the value is to zero, the more similar are the steady states from each other. The closer to one, the bigger the difference between steady states (see Section 3).

We assessed the interplay between  $k_{on}$  and  $k_{off}$  (Fig. 4), which is known to influence the retroactivity effects, to find out if any



**Fig. 14.** Coefficients of variation for the disconnected cases of each mechanism under each regime. Each mechanism is denoted with a different color and line type. SMB refers to simple monomer binding mechanism, DB states dimer binding, CSB stands for sequential monomer binding without dimerization and CSB\_D means sequential binding with dimerization. As can be observed, DB is the most variable case for all regimes.

**Table 6**  
D statistic and  $\rho$ -values between binding mechanisms (see Supplementary data Figs. S18–S24).

Mechanisms	D	$\rho$ -Value
SMB vs DB	0.162 ± 0.02	$3.6e - 09 > \rho > 5.9e^{-15}$
SMB vs CSB	0.038 ± 0.02	$0.98 > \rho > 0.021$
SMB vs CSB_D	0.124 ± 0.05	$0.0054 > \rho > 2.1e^{-13}$
DB vs CSB	0.168 ± 0.03	$2.7e^{-9} > \rho > 1.1e^{-16}$
DB vs CSB_D	0.093 ± 0.09	$1 > \rho > 1.3e^{-15}$
CSB vs CSB_D	0.140 ± 0.05	$0.00087 > \rho > 1.1e^{-16}$

**Table 7**  
D statistic and  $\rho$ -values at minute 1440 for each binding process.

Mechanism	Weak binding		Strong binding (100k <sub>on</sub> )		Strong binding (k <sub>off</sub> /100)	
	D	$\rho$ -Value	D	$\rho$ -Value	D	$\rho$ -Value
SMB	0.0825	0.0022	0.809	0	0.811	0
DB	0.8	0	0.997	0	0.997	0
CSB	0.514	0	0.88	0	0.893	0
CBS_D	0.484	0	0.877	0	0.908	0

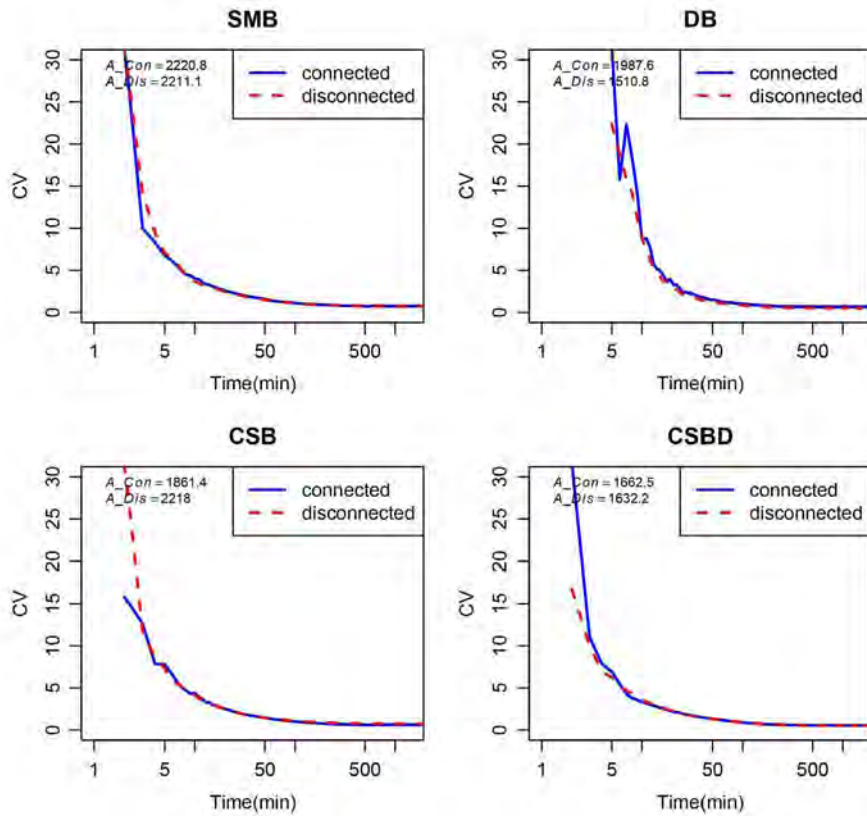
mechanisms' FFTF SS exhibits differences in the trend of change caused by the interconnection. DB is the mechanism where large differences between connected and disconnected cases were found for a larger set of parameters, followed by CSB\_D. SMB was the mechanism where the change in FFTF SS was less recurrent (i.e. the range of parameters where SS changed was smaller). Only a small set of large  $k_{on}$ s and small  $k_{off}$ s accounted for large differences in SMB.

We assessed the interplay between  $\delta_1$  and  $\delta_2$  (Fig. 5). Almost all values  $\delta_1$  and  $\delta_2$  accounted for a large difference between connected and disconnected cases FFTF SS in all mechanisms in the strong regimes. In the weak regime the differences were small for all the mechanisms with the exception of DB. The FFTF SS changes in DB and CSB are larger the smaller  $\delta_2$  and  $\delta_1$  are. However in DB and SMB the interaction of these parameters does not seem to be affecting the retroactive effects as there is not any noticeable trend regarding their changes across their range.

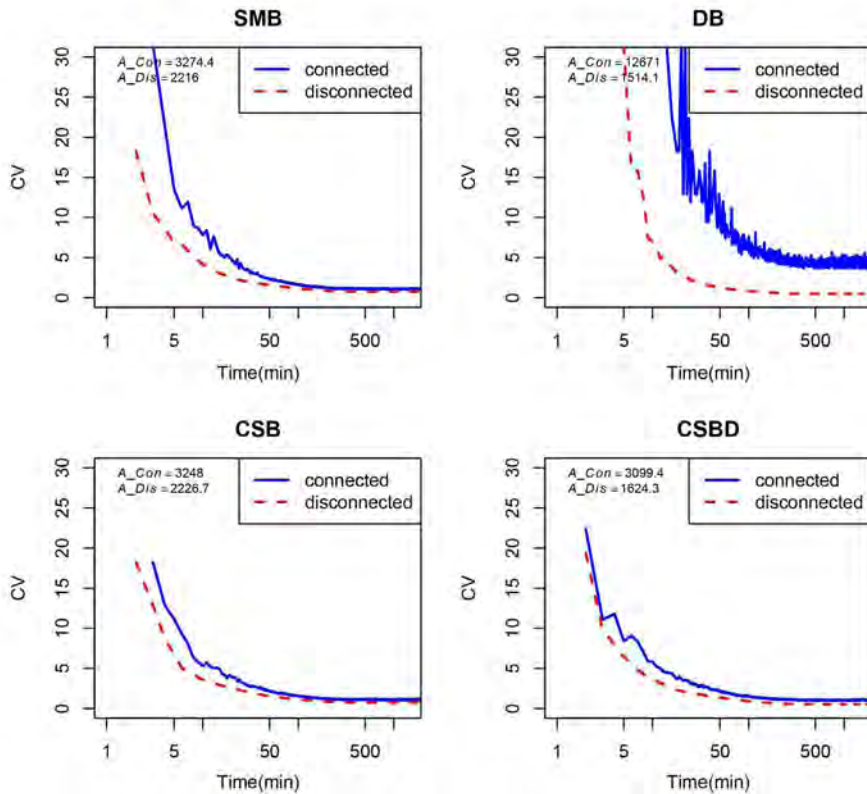
We assessed the interplay between  $p_{tot2}$  and  $\delta_1$  (Fig. 6). The general trend is that the distance between connected and disconnected FFTF molecules depends on the relationship between  $p_{tot2}$  and  $\delta_1$ . The more downstream sites and the smaller the FFTF degradation, the larger the distance for a wider range of parameters. DB in strong binding regimes is the exception. There, when  $p_{tot2} = 30$ , the distance between connected and disconnected case is around 0.5, whereas  $p_{tot2}$  values bigger than 30 account for distances close to 1. In all mechanisms,  $p_{tot2}$  seems slightly more relevant for the SS change than  $\delta_1$ .

We assessed the interplay between  $p_{tot2}$  and  $\delta_2$ . There the same general trends as in the interplay between  $p_{tot2}$  and  $\delta_1$  were observed (Fig. 7). DB remained as the mechanism where FFTF SS changed the most upon interconnection and in a wider parameter range and the distances for this mechanism did not show, at least for the strong regimes, any noticeable trend depending on the relation between  $p_{tot2}$  and  $\delta_2$ .

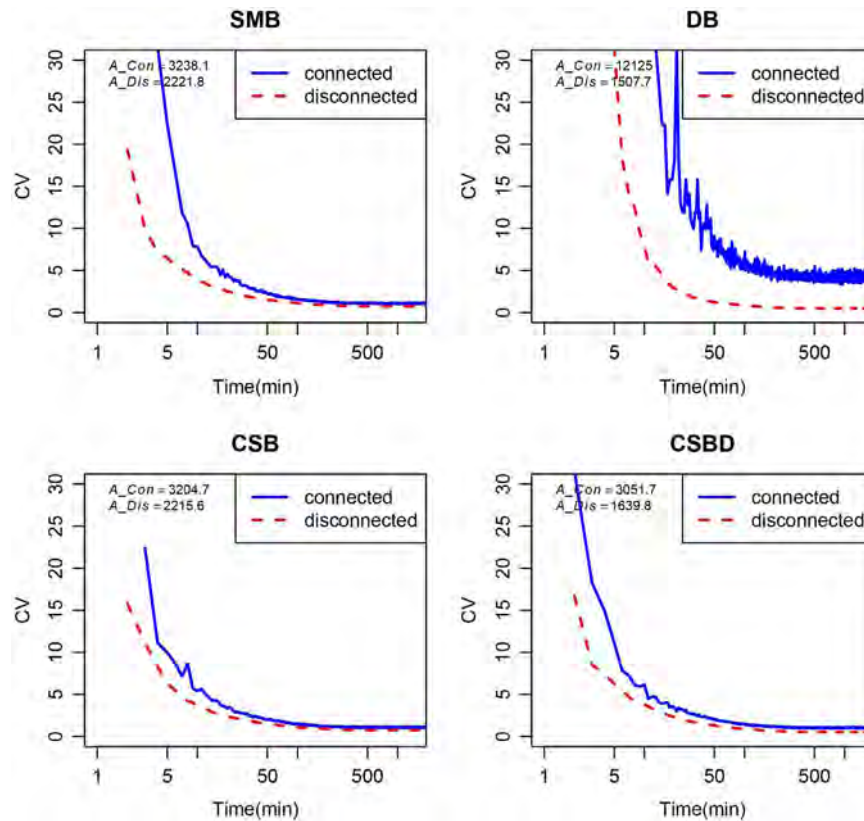
The relationship between  $p_{tot2}$  and  $\delta_3$  (Fig. 8) influences the distance between connected and disconnected SS of FFTF of all the mechanisms in strong binding regimes. The larger the values of  $\delta_3$  and  $p_{tot2}$  are, the larger the distance between connected and disconnected case gets, this is particularly remarkable in DB. In general terms, DB is the mechanism where the distance changes for a wider parameters range upon interconnection and SMB is the mechanism



**Fig. 15.** FFTF coefficients of variation for weak operators regime. Contrast between connected and disconnected cases CV's for each mechanism. The values of the areas under the curves are included as  $A_{Dis}$  for disconnected case and  $A_{con}$  for the connected case. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4.



**Fig. 16.** FFTF coefficients of variation for strong  $100k_{on}$  regime. CV's contrast between connected and disconnected cases. The values of the areas under the curves are included as  $A_{Dis}$  for disconnected case and  $A_{con}$  for the connected case. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 except for the association rates. In the case of association rates they were used as follows:  $k_{on}$  was substituted for  $100 \cdot k_{on}$ ,  $k_{on3}$  was substituted for  $100 \cdot k_{on3}$ ,  $k_{on1}$  was substituted for  $10 \cdot k_{on1}$  and  $k_{on2}$  was substituted for  $10 \cdot k_{on2}$ .



**Fig. 17.** FFTF coefficients of variation for strong  $k_{off}/100$  regime. Contrast between connected and disconnected cases CV's. The values of the areas under the curves are included as  $A_{Dis}$  for disconnected case and  $A_{con}$  for the connected case. The parameters values were used as described in Tables 1 and 4 except for the dissociation rates. In the case of dissociation rates they were used as follows:  $k_{off}$  was substituted for  $\frac{k_{off}}{100}$ ,  $k_{off3}$  was substituted for  $\frac{k_{off3}}{100}$ ,  $k_{off1}$  was substituted for  $\frac{k_{off1}}{10}$ , and  $k_{off2}$  was substituted for  $\frac{k_{off2}}{10}$ .

where FFTF SS remains the most similar along the parameter ranges.

To find out how the external input signal, along with the number of loads influence the retroactivity effects on each of the mechanisms, we assessed the joint effect of  $p_{tot2}$  and  $S$  (Fig. 9).

In the six SS comparisons, DB is the most changed mechanism by interconnection, while CSB seems to be slightly more changed than CSB\_D. The mechanism where the distance changed less for a wider parameter range, consistently with the previous results, is SMB in the weak regime. For the strong regimes the general trend seems to be that the larger  $p_{tot2}$  and the smaller  $S$ , the larger the distance between connected and disconnected cases. On the contrary, in the weak regime, as  $S$  grows also does the distance between the connected and disconnected FFTF SS.

In general, even if specific parameters may have their particularities in a given mechanism, DB was maintained as the mechanism where the distance between connected and disconnected SS was larger. This makes it the case where the retroactivity effects are stronger. SMB persisted as the mechanism with the largest set of close SS parameters range.

In Section Appendix B, most of the observations in the current section were further confirmed by a dissection of the effects of parameters. Even if the observations coincided with the trends observed in the heatmaps, some finer observations could not be observed in them, as the fact that the difference between connected and disconnected FFTF SS when changing dissociation rates is caused by the influence it has in disconnected systems where, contrary to the other parameters, the larger the dissociation rate, the larger FFTF molecules SS gets (see Section B.5). Another interesting observation was that  $\delta_2$  and  $\delta_1$  changes may not seem that important because they influence a decay in FFTF SS for both connected and disconnected cases as can be seen in subSections Appendices B.2 and B.1.

#### 4.1.2. Deterministic effects on FFTF molecular differential degradation species

In this subsection we assess different degradation rates of TF-DNA bound complexes for each mechanism (Fig. 10). This is achieved by evaluating  $\delta_3$  values from 0 to two times  $\delta_1$ . We did this with the aim to explore the possible protective effects of downstream sites in case the TF-DNA complexes could not be degraded and to assess directly the impact on the connected/disconnected relation of FFTF of making faster the degradation of these complexes.

In these simulations (Fig. 10), a set of different behaviors can be observed for the ratio of FFTF molecules (disconnected vs connected case) caused by degradation change. First of all, the change in FFTF caused by interconnection in SMB is clearly affected by the FFTF-DNA complex degradation ( $\delta_3$ ) in both weak and strong regime. The dependence of the change in FFTF upon interconnection for DB is only observable for the weak regime (and in to a greater extent than in SMB), while both strong regimes seem to be severely affected by any  $\delta_3$  bigger than 0.

In the case of CSB, the change in FFTF upon interconnection is affected by the degradation rate to a lesser extent than DB and a greater extent than SMB. As observed in DB, all the  $\delta_3$  assessed values in the strong regimes but 0 had a very similar behavior (the ratio between connected and disconnected FFTF was close to 0). In the weak regime, each  $\delta_3$  value accounted for a different behavior of the ratios between connected and disconnected case; there, ratios had a wider range than in SMB—where all ratios were close to 1—and DB—where most of the ratios were close to 0.2—.

The CSB\_D behaviors had the same trends as the CSB ones. However, at least for  $\delta_3 = 0$  in the strong regimes, the connected and disconnected ratio in CSB\_D seems to have a smaller delay to get similar than in CSB.

These trends in the mechanisms caused by degradation seem to

indicate that, even if all these mechanisms may be easily regulable via proteases specific for the DNA-TF complexes, SMB in the strong regimes, and CSB and CSB\_D in the weak one, account for a smoother regulation with intermediate ratios of connected vs disconnected FFTF. In the other hand, DB, CSB, and CSB\_D in the strong binding regimes would account for a switch like regulation where small changes in  $\delta_3 = 0$  could lead to large changes in the ratio between connected and disconnected FFTF. Finally, weak binding SMB is the TFBP where the similarity between connected and disconnected FFTF would be more robust to changes in  $\delta_3 = 0$ .

#### 4.1.3. FFTF deterministic simulations

We did a particular realization of each mechanism in order to assess how retroactivity affects each mechanism dynamically when all of them reach the same SS for each of the binding regimes.

**4.1.3.1. Weak regime deterministic simulations of FFTF.** In this Subsection, we assess the retroactivity effects in the FFTF number of molecules using deterministic simulations and the subset of parameters in Tables 1, 2, and 4. Here, we intend to follow such effects across the whole dynamic simulation and not only in the SS.

DB was the mechanism where the number of FFTF molecules changed the most between connected and disconnected cases, while SMB is the mechanism where the smallest change of FFTF molecules was observed (see Fig. 11). CSB and CSB\_D represent intermediate cases where there is a considerable decrease in the number of FFTF molecules upon interconnection in comparison to SMB.

There may be several reasons why DB is more susceptible to downstream connections (i.e., the interconnection radically changes FFTF number of molecules) than the other mechanisms. For example, the need of extra steps for dimer binding (dimer formation and dimer stabilization).

These extra steps represent a delay and a bottleneck in the availability of binding TFs (FFTF), which is not present in SMB and CSB. This could have variable effects depending on the FFTF concentration reached. CSB\_D, which also has these intermediate steps, seems to be compensating the delay with the fast binding monomers that are involved on its dynamics.

On the other hand, SMB has the greatest resistance to the presence of downstream binding sites. With resistance we mean that the number of FFTF molecules only changed slightly between connected and disconnected cases. Thus, the ratio between them was close to one.

The fact that DB mechanism seemed more susceptible to retroactive effects could account for its participation in plastic responses. On the other hand, thanks for its resistance to change, SMB may be well suited to preserve functionalities for changing environments when big loads are present.

**4.1.3.2. Strong regimes deterministic simulations of FFTF.** In this section, we show the results for the deterministic simulations of the four binding mechanisms considering strong binding sites. As we mentioned before, the bigger the association rates, the smaller the ratio between connected and disconnected simulations. This means that when the binding is strong, the TF functionality is more sensitive to the presence of downstream loads as the TF tend to bind to those sites easily. This is in accordance with previous observations (Del Vecchio et al., 2008a).

We want to point out that in this section, the precedence of resistance and susceptibility to downstream binding sites remained the same in spite we changed the velocity of association. As previously stated, resistance means that the number of FFTF molecules is only slightly changed (or not at all) and susceptibility is the ability of changing number of FFTF due to interconnection.

Overall, for the chosen subset of parameters found in Table 1, SMB is the mechanism where FFTF molecules remain unchanged the most, even if it changed largely. DB was the mechanism where the

number of FFTF was changed the most upon interconnection. CSB and CSB\_D remained in their intermediate status with roughly the same ratio of connected vs disconnected FFTF (see Figs. 12 and 13).

The fact that this trend – SMB as the least changed, and DB as the most changed mechanism – is conserved not only in the deterministic simulations, but also in the SS calculations, rises the question if such stability in SMB upon interconnection and the change in DB are also accompanied by small and large variabilities, respectively. In the next section, we analyze the variability of each mechanism under the same parameters assessed in this section to find out if there is a relationship between the bigger FFTF difference and change in its variability upon interconnection.

## 4.2. Stochastic

We start this section comparing the FFTF mean in the stochastic simulation ensembles with the deterministic simulations in Section 4.2.1. Then, in the same subsection, we assess the coefficient of variation (CV) of the disconnected cases for each mechanism in each regime to be able to contrast the intrinsic differences in variability without the need of downstream connections. There, we also analyze the differences between the FFTF molecules distribution using D-statistic in a Kolmogorov-Smirnov test.

We simulated the Stochastic counterpart of Sections 4.1.3.1 and 4.1.3.2 in Sections 4.2.2.1 and 4.2.2.2, respectively to determine the relationship between the deterministic differences in terms of ratio of FFTF molecules and variability. We also wanted to have a more powerful way to compare how similar connected and disconnected cases are. By using stochastic models we can compare whole distributions of FFTF at each time via D-statistic in Section 4.2.2. The use of D-statistic turns relevant because the comparisons used to assess the differences between connected and disconnected cases in the deterministic counterparts have not a significance measurement.

### 4.2.1. CV and differences between distributions of the disconnected cases

In order to validate the usage of stochastic BioNetGen simulations, we plotted the mean of FFTF stochastic simulations ensemble for each mechanism to compare it with its deterministic counterpart. As we can see in Figs. A1–A3 the FFTF mean coincides with the deterministic simulations.

Regarding the CVs of the disconnected mechanisms in Fig. 14 it is easy to notice that regardless of the regime, DB is the mechanism where the number of FFTF number of molecules varies the most. Even if in the strong regimes lack a clear difference between SMB, CSB and CSB\_D CV's at latter times, before the first 10 min, the SMB mechanism seems to be more variable than CSB and CSB\_D.

We compared the distributions because, even if all disconnected mechanisms share their mean behavior, CVs allowed us to notice that there are changes in variability regardless of the mean. By comparing the distributions of all disconnected cases using D-statistic (see Table 6) we found that differences tend to be small ( $D < 0.2$ ). The most significant  $p$ -values were for the pairs SMB vs DB, DB vs CSB and CSB vs CSB\_D. This seems to indicate that even if DB is notably more variable than any other mechanism, mechanisms with dimerization are more similar between themselves than to SMB or CSB. The pair with the most similar distributions is SMB vs CSB, where the difference is not big enough is not way to discriminate between both distributions (distance is small and  $p$ -value is large).

### 4.2.2. FFTF simulations comparisons

In order to compare the connected vs disconnected cases for the stochastic counterparts of Sections 4.1.3.1 and 4.1.3.2, in this section we compared the CV and distribution of the ensembles in Sections 4.2.2.1 and 4.2.2.2, respectively.

**4.2.2.1. Weak regime stochastic simulations of FTF.** We ran stochastic simulations of the FTF number of molecules for each mechanism considering the regime where FTF binds weakly. For each mechanism we calculated both the difference in distributions between connected and disconnected cases using D-statistic and their difference of variation using the coefficient of variation (CV).

The only mechanisms where no large differences were observed between the connected and disconnected cases was SMB in the weak regime. There,  $D$  was always smaller than 0.09, which accounts only for a difference of 9% of the distribution and the significance level was  $>0.001$ . For the other mechanisms  $D$  was consistently larger than 0.3 and the  $p$ -value was always smaller than 0.001 (see Table 7).

Even if the FTF molecules means in the stochastic simulations ensembles are congruent with the deterministic number of FTF, we wanted to figure out if there is a relationship between retroactivity, along with the chosen mechanism in each case, and the TF-molecules variability of the system. We noticed that the FTF distribution is wider (and because of that more variable) for the disconnected cases in contrast to the connected ones in the third and fourth mechanisms (see Supplementary data Figs. 3–5). To further clarify if variability really changed from the disconnected to the connected case, taking into account the mean effect over the standard deviation, we calculated the coefficient of variation (CV) at each time point.

As we can see in Fig. 15, DB is the mechanism where FTF varied the most upon interconnection. This could be explained by the fluctuations on dimer concentrations given by the association/dissociation process of dimer formation in contrast with the other mechanisms where monomer is available.

Under this regime, there does not seem to be any difference between the connected and disconnected cases variability of the mechanisms. Even the areas under the curve were quite similar. Despite those similarities, CSB and DB were the mechanisms where the area under the curve changed the most (Fig. 15).

For the systems that we analyzed, the DB mechanism was the most responsive (sensitive) to loads effects, it is also the noisiest mechanism when dealing with weak BS's. This properties may limit the participation of dimerization in fine tuned point responses in natural systems where a fixed and constant number of molecules may be needed.

**4.2.2.2. Strong regimes stochastic simulations of FTF.** When analyzing the variance we can notice that the variability of FTF changes drastically for strong connected binding regimes in both  $k_{off}/100$  and  $100k_{on}$ .

Consistent with the weak binding regime, dimerization is the most variable mechanism (Figs. 16 and 17). An important change in contrast to the weak regime is that for all mechanisms in the connected case of the strong regimes the number of FTF molecules is more variable than for disconnected cases. DB was the mechanism where the variability increased the most in the connected case in comparison with its disconnected counterpart. The second most changed variability, was the SMB one. However, after the first 50 min, the variabilities of SMB, CSB, and CSB\_D connected cases matches the disconnected ones.

DB, by being the only mechanism where the connected case CV does not becomes the same as the disconnected one over time, may be suitable to change the variability properties of a system upon interconnection.

## 5. Conclusions and perspectives

This study provides an assessment of the potential roles of binding mechanisms promoting or restricting retroactivity effects. All mechanisms displayed different levels of change in the number of FTF molecules upon interconnection. DB was the mechanism where the FTF changed the most, both dynamically and at SS level,

whereas SMB consistently showed the smallest change in FTF molecules upon interconnection. If we order them by general trend from the most resistant to the most susceptible to downstream loads we get: SMB, both CSB and CSB\_D (with precedence depending on the regime), and DB. This shows that binding mechanisms display heterogeneous trends of retroactive effects. Such trends seem to depend on delays as the most affected mechanism is DB (employing intermediate dimerization steps prior to binding), followed by CSB (where two monomers binding steps may slow down the FTF reinsertion in the FTF pool) and CSB\_D.

Regarding parameters, DB is the mechanism where changing the association and dissociation rate relation alters the most, for a wider range of parameters (half of them), the distance between connected and disconnected cases. Only in CSB and CSB\_D mechanisms the relation between connected and disconnected FTF molecules is particularly affected by the relationship between  $\delta_1$  and  $\delta_2$ . The clearer relationship between  $p_{tot2}$  and degradation parameters that affected the distance between connected and disconnected FTF molecules was the one with  $\delta_3$ . In the case of the assessment of the interaction between  $p_{tot2}$  and  $S$ , for strong regimes, the larger  $p_{tot2}$  and the smaller  $S$ , the larger the distance between connected and disconnected cases. Even if this result seems intuitive, the trend is not the same for the weak regime, where the larger both  $S$  and  $p_{tot2}$ , the larger the difference. These observations were further confirmed by the individual analysis of the parameters in Appendix B. There, particularities of the difference between connected and disconnected cases were further described.

As far as FTF molecules variability is concerned, DB was the mechanism where FTF was most variable and its distribution was closer to the CSB\_D one than to the one of any other mechanism. SMB and CSB distributions were indistinguishable one from another. The largest difference between FTF distributions was the one exhibited by the comparison between SMB and DB. These facts point to intrinsic differences between the mechanisms regardless of them displaying the same mean.

Even if in all mechanisms the FTF CVs remained the same upon interconnection for the weak regime, in the strong regime DB showed, by being the only mechanism where the connected case CV does not becomes the same as the disconnected one over time, that it may be suitable to change the variability properties of a system upon interconnection.

Our results allow us to propose potential roles for different binding processes in both natural and synthetic systems. We suggest to check other systems context and particular properties before making experimental assessments. We stress the former, because this work does we do not consider a complete organism containing the mechanisms, this simplifies the possible interactions that could be happening in an actual system as: regulation by one or more extra TFs, covalent modifications, participation of complexes that aid or difficult DNA binding, among others.

Our results may shed light in which mechanism could be expected to be found in a network according to the regulatory function that a transcription factor achieves (master regulator, hub, environmental response transcription factor, among others) and the dynamical needs (stability, ultrasensitivity, bistability, etc) of each response. For example, upon degradation changes, DB could act as a mechanism promoting ultrasensitivity, thus reacting to an environmental stress such as heat. Likewise, SMB may account for a master regulator of very stable developmental programs. DB, given their resistance to change the connected/disconnected ratio upon degradation could account for pathways where a response should be ensured regardless of the presence of proteases in the media.

Our results could be further tested experimentally in different systems where more than one mechanism takes place as in Sox10 and GCN4 case through the assessment of a reporter gene in connected and disconnected cases. Given the few transcriptional systems known



at the level of TF binding mechanism, it could also be possible to use generic TFs and force them to act by alternative mechanisms (e.g., using glutamine repeats in a TF that usually acts as a monomer to force it to oligomerize as in [Stott et al. \(1995\)](#)). The drawbacks here would be that we cannot be sure that a the TF will be able to guide transcription when forced to follow alternative binding pathways. Moreover, other components such as the binding sites may require further modifications to make the modified TF possible or even functional.

In natural regulatory networks, the set of binding mechanisms presented here may not be straightforward, as other auxiliary processes modifications may be needed such as small ligands binding, post-translational modifications, and heterologous protein interactions (see the work by [Beckett \(2001\)](#) for a detailed review on the topic). In this work, our exposition is limited to plain TF binding mechanisms without such modifications, because we wanted to explore the role of the transcription intrinsic components before gaining further insight from other players such as signaling components.

Previous works discussing the relevance of different regulatory motifs have taken into account different dynamical properties that could make a motif functionally relevant in biological systems. However, given the limited amount of information regarding the exact kinetic mechanism used to achieve binding by every single TF, most of these approaches do not consider details as fine as the ones we regard in this study.

To conclude, our research strongly suggests that the biological

function of the chosen binding mechanisms is modulated by reactivity. Thus, this connectivity-related phenomenon can play a role as a proxy to explore functionality in biological networks.

### Acknowledgments

Libertad Pantoja-Hernández acknowledges that this paper was a part of her doctoral thesis in the ‘Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)’ and received the fellowship 325016 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

We want to thank Katya Frank and Silvia Welke for all their help in the grammar and structure editing of this manuscript.

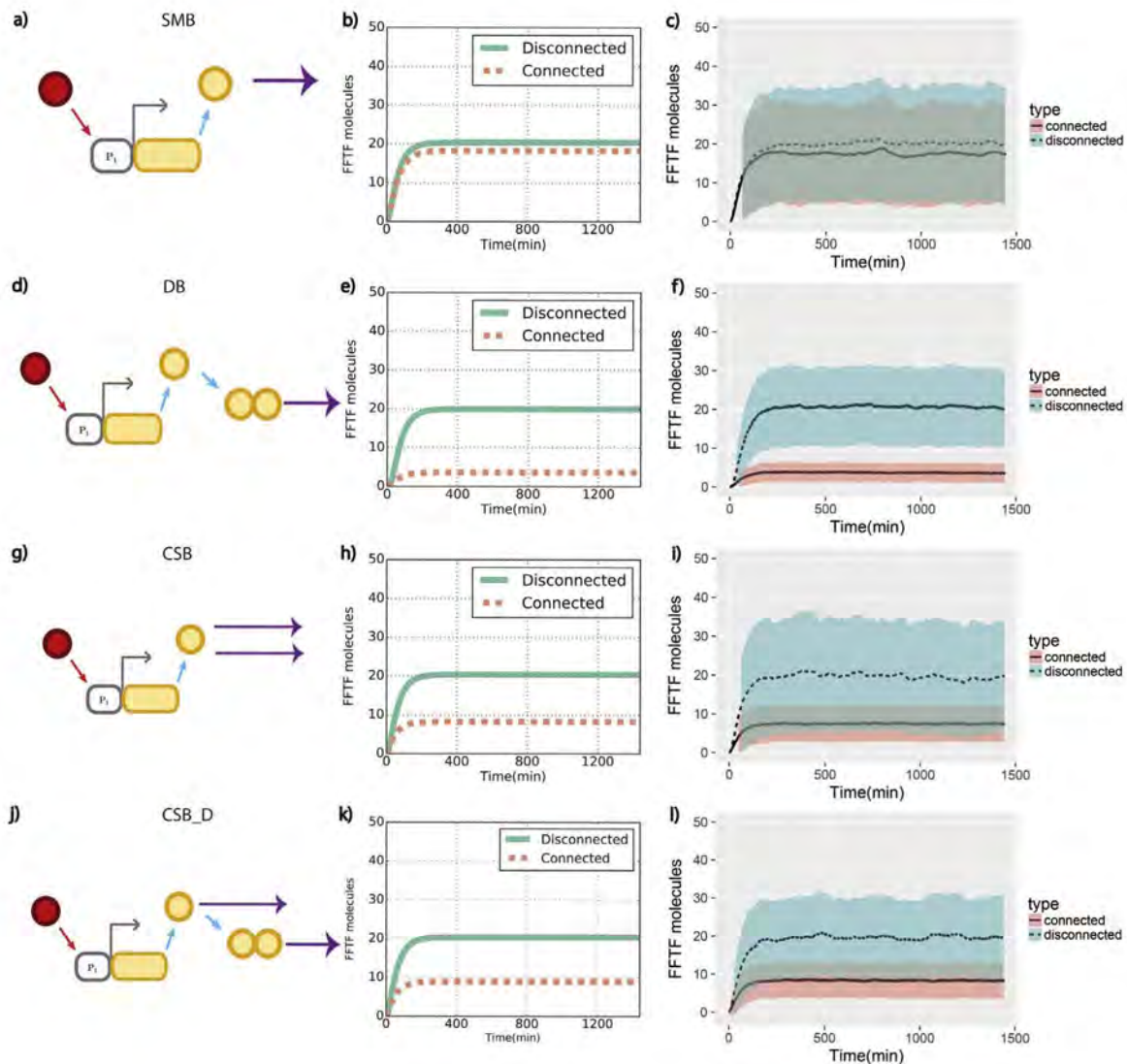
We also want to thank Carlos Villarreal and José Díaz for all their helpful comments.

We want to thank as well to CONACYT’s project 180380 for the support in the realization of this work.

We wish to express our thanks to the editor and the anonymous reviewers for all the suggestions, comments, and corrections, that greatly improved the original manuscript.

### Appendix A. Stochastic vs deterministic simulations

Figs. A1-A3.



**Fig. A1.** Stochastic vs deterministic FFTF molecules simulations in weak regime. (a), (d), (g) and (j) are representations of the mechanisms, where (a) is simple monomer binding, (d) is dimerization prior binding, (g) is monomer sequential binding and (j) is dimerization with monomer sequential binding. (b), (e), (h) and (k) are the deterministic simulations plots for the values of  $S$  are listed on [Table 2](#) 300 downstream binding sites. The continuous line represents the simple or disconnected system and the dashed one the connected.  $y$  axis is the functional TF molecules present, whereas  $x$  is time in minutes. (c), (f), (i) and (l) represent the means and standard deviations of the stochastic simulations ensemble.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Hello world. <https://guides.github.com/activities/hello-world/>. Acceso: 2016-10-03.
- [2] Scitable glossary. <http://www.nature.com/scitable/glossary#T>. Acceso: 2016-09-326.
- [3] Caroline M. Ajo-Franklin, David A. Drubin, Julian A. Eskin, Elaine P.S. Gee, Dirk Landgraf, Ira Phillips, and Pamela A. Silver. Rational design of memory in eukaryotic cells. *Genes & Development*, 21(18):2271–2276, 2007. doi: 10.1101/gad.1586107. URL <http://genesdev.cshlp.org/content/21/18/2271.abstract>.
- [4] Uri Alon. *An introduction to systems biology: Design principles of biological circuits*. Chapman and Hall, 2007.
- [5] Lewin B. *Genes IX*, chapter Catabolite repression., pages 249–256. Jones and Bartlett Publishers, Magasanik B. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008.
- [6] Albert-Laszlo Barabasi and Zoltan N. Oltvai. Network biology: understanding the cell’s functional organization. *Nat Rev Genet*, 5:101 – 113, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1272>.
- [7] Dorothy Beckett. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation1. *Journal of Molecular Biology*, 314(3):335 – 352, 2001. ISSN 0022-2836. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2001.5134>.
- [8] Archana Belle, Amos Tanay, Ledion Bitincka, Ron Shamir, and Erin K. O’Shea. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35):13004–13009, 2006. doi: 10.1073/pnas.0605420103.
- [9] Matthew R. Bennett, Dmitri Volfson, Lev Tsimring, and Jeff Hasty. Transient dynamics of genetic regulatory networks. *Biophysical Journal*, 92(10):3501 – 3512, 2007. ISSN 0006-3495. doi: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.095638>.
- [10] Christine Berger, Luciano Piubelli, Ursula Haditsch, and Hans Rudolf Bosshard. Diffusion-controlled dna recognition by an unfolded, monomeric bzip transcription factor. *FEBS Letters*, 425:14–18, 1998. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00156-2.

- [11] Anthony R. Borneman, Justine A. Leigh-Bell, Haiyuan Yu, Paul Bertone, Mark Gerstein, and Michael Snyder. Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes and Development*, 20(4):435–448, 2006. doi: 10.1101/gad.1389306. URL <http://genesdev.cshlp.org/content/20/4/435.abstract>.
- [12] Robert C. Brewster, Franz M. Weinert, Hernan G. Garcia, Dan Song, Mattias Rydenfelt, and Rob Phillips. The transcription factor titration effect dictates level of gene expression. *Cell*, 156(6):1312 – 1323, 2014. ISSN 0092-8674. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.022>.
- [13] Nicolas E. Buchler and Frederick R. Cross. Protein sequestration generates a flexible ultrasensitive response in a genetic network. *Molecular Systems Biology*, 5(1), 2009. ISSN 1744-4292. doi: 10.1038/msb.2009.30.
- [14] R. Bundschuh, F. Hayot, and C. Jayaprakash. The role of dimerization in noise reduction of simple genetic networks. *Journal of Theoretical Biology*, 220(2):261 – 269, 2003. ISSN 0022-5193. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.2003.3164>.
- [15] Anat Burger, Aleksandra M. Walczak, and Peter G. Wolynes. Abduction and asylum in the lives of transcription factors. *PNAS*, 107(9): 4016–4021, 2010. doi: 0.1073/pnas.0915138107.
- [16] Jean-Pierre Changeux. *El hombre de verdad*. FCE, 2005.
- [17] S. Crazz, C. Berger, Baici A., I. Jelesarov, and H. R. Bosshard. Monomeric and dimeric bZIP transcription factor GCN4 bind at the same rate to their target DNA site. *Biochemistry*, 43(3):718–727, 2004. doi: 10.1021/bi0355793.
- [18] Charles Darwin. The darwin letters at shrewsbury school. *Communications of the ACM*, December 1880.
- [19] Domitilla Del Vecchio and Eduardo D. Sontag. *Control Theory and Systems biology*, chapter Synthetic Biology, a systems engineering perspective, pages 101–124. The MIT Press, 2011.
- [20] Domitilla Del Vecchio, A. J. Ninfa, and Eduardo D. Sontag. A systems theory with retroactivity: Application to transcriptional modules. *American Control Conference*, pages 1368–1373., 2008. doi: 10.1109/ACC.2008.4586683.
- [21] Domitilla Del Vecchio, Alexander J. Ninfa, and Eduardo D. Sontag. Modular cell biology: retroactivity and insulation. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 2008. ISSN 1744-4292. doi: 10.1038/msb4100204.
- [22] James R. Faeder, Michael L. Blinov, and William S. Hlavacek. Rule-based modeling of biochemical systems with BioNetGen. *Methods in Molecular Biology*, Volume 500:113–167, 2009. doi: 10.1007/978-1-59745-525-1\_5.

- [23] Alister P. W. Funnell and Merlin Crossley. Homo- and heterodimerization in transcriptional regulation. In Jacqueline M. Matthews, editor, *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology*, volume 747 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 105–121. Springer New York, 2012. ISBN 978-1-4614-3228-9. doi: 10.1007/978-1-4614-3229-6\_7.
- [24] Marcel Geertz, David Shore, and Sebastian J. Maerkl. Massively parallel measurements of molecular interaction kinetics on a microfluidic platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41):16540–16545, 2012. doi: 10.1073/pnas.1206011109.
- [25] Michael A. Gilchrist and Andreas Wagner. A model of protein translation including codon bias, nonsense errors, and ribosome recycling. *Journal of Theoretical Biology*, 239(4):417–434, 2006. ISSN 0022-5193. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.08.007>.
- [26] Daniel T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(25):2340–2361, 1977. doi: 10.1021/j100540a008.
- [27] Andras Gyorgy and Domitilla Del Vecchio. Modular composition of gene transcription networks. *PLoS Comput Biol*, 10(3):e1003486, 03 2014. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003486. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003486>.
- [28] Petter Hammar, Mats Wallden, David Fange, Fredrik Persson, Ozden Baltekin, Gustaf Ullman, Prune Leroy, and Johan Elf. Direct measurement of transcription factor dissociation excludes a simple operator occupancy model for gene regulation. *Nat Genet*, 46(4):405–408, 04 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2905>.
- [29] Leland H. Hartwell. From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402:SUPP: C47–C52, 1999.
- [30] Narmada Herat and Domitilla Del Vecchio. Tradeoffs between retroactivity and noise in connected transcriptional components. *Proc. American Control Conference*, pages 1–8, 2014. doi: 10.1109/ACC.2014.6859174.
- [31] Shridhar Jayanthi and Domitilla Del Vecchio. On the compromise between retroactivity attenuation and noise amplification in gene regulatory networks. *Joint 48th IEEE Conference on Decision and Control and 28th Chinese Control Conference*, pages 4565–4571, 2009. doi: 10.1109/CDC.2009.5400631.
- [32] Shridhar Jayanthi and Domitilla Del Vecchio. Tuning genetic clocks employing DNA binding sites. *PLOS ONE*, 7:e41019, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041019.

- [33] Shridhar Jayanthi, Kayzad Soli Nilgiriwala, and Domitilla Del Vecchio. Retroactivity controls the temporal dynamics of gene transcription. *ACS Synth. Biol*, 2:431–441, 2013. doi: 10.1021/sb300098w.
- [34] Peng Jiang, Alejandra C. Ventura, Eduardo D. Sontag, Sofia D. Merajver, Alexander J. Ninfa, and Domitilla Del Vecchio. Load-induced modulation of signal transduction networks. *Sci Signal*, 4:194, 2011. doi: 10.1126/scisignal.2002152.
- [35] Frank J. Massey Jr. The kolmogorov-smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46(253):68–78, 1951. doi: 10.1080/01621459.1951.10500769. URL <http://amstat.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1951.10500769>.
- [36] J. S. Karres, V. Hilgers, I. Carrera, J. Treisman, and S. M. Cohen. The conserved microRNA mir-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in drosophila. *Cell*, (131):136 – 145, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.020>.
- [37] Andrew D. Keller. Specifying epigenetic states with autorregulatory transcription factors. *Journal of Theoretical Biology*, 170:175–181, 1994. doi: 10.1006/jtbi.1994.1177.
- [38] Andrew D. Keller. Model genetic circuits encoding autoregulatory transcription factors. *Journal of Theoretical Biology*, 172:169–185, 1995. doi: 10.1006/jtbi.1995.0014.
- [39] B. Kim and J.W. Little. Dimerization of a specific DNA-binding protein on the DNA. *Science*, 255:203 – 206, 1992. doi: 10.1126/science.1553548.
- [40] Donald E. Knuth. Computer Programming as an Art. *Communications of the ACM*, 17(12):667–673, December 1974.
- [41] S. Kosugi and Y. Ohashi. Dna binding and dimerization specificity and potential targets for the tcp protein family. *Plant J*, 30:337 – 348, 2002. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01294.x.
- [42] Krish Krishnan. *Data Warehousing in the Age of Big Data*. Elsevier, 2013.
- [43] F. Kühner, L. T. Costa, P. M. Bisch, S. Thalhammer, W. M. Heckl, and H. E. Gaub. Lexa-dna bond strength by single molecule force spectroscopy. *Biophysical Journal*, 87(4):2683–2690, 3 2004. ISSN 0006-3495. doi: [doi:10.1529/biophysj.104.048868](http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.048868). URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.048868>.
- [44] Douglas A. Lauffenburger. Cell signaling pathways as control modules: Complexity for simplicity? *PNAS*, 97:5031–5033, 2000.
- [45] Carles M. Llorca, Maren Potschin, and Ulrike Zentgraf. bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *frontiers in Plant Science*, 5(169), 2007. doi: 10.3389/fpls.2014.00169.

- [46] Agustino Martínez-Antonio and Julio Collado-Vides. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5):482 – 489, 2003. ISSN 1369-5274. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.002>.
- [47] Steven J. Metallo and Alanna Schepartz. Distribution of labor among bzip segments in the control of DNA affinity and specificity. *Chemistry & Biology*, 1(3):143 – 151, 1994. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/1074-5521\(94\)90004-3](http://dx.doi.org/10.1016/1074-5521(94)90004-3).
- [48] S. Mou and D. Del Vecchio. How retroactivity impacts the robustness of genetic networks. In *2015 54th IEEE Conference on Decision and Control (CDC)*, pages 1551–1556, 2015. doi: [10.1109/CDC.2015.7402431](https://doi.org/10.1109/CDC.2015.7402431).
- [49] Robert Nechanitzky, Duygua Akbas, Stefanie Scherer, Ildiko Gyory, Thomas Hoyler, Senthilkumar Ramamoorthy, Andreas Diefenbach, and Rudolf Grosschedl. Transcription factor EBF<sub>1</sub> is essential for the maintenance of B cell identity and prevention of alternative fates in committed cells. *Nature Immunology*, 14(8):867 – 875, 2013. doi: [10.1038/ni.2641](https://doi.org/10.1038/ni.2641). URL <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2641>.
- [50] Matteo Osella, Carla Bosia, Davide Corá, and Michele Caselle. The role of incoherent microRNA-mediated feedforward loops in noise buffering. *PLoS Comput Biol*, 7(3):e1001101, 2011. doi: [10.1371/journal.pcbi.1001101](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001101).
- [51] Libertad Pantoja-Hernández and Juan Carlos Martínez-García. Retroactivity in the context of modularly structured biomolecular systems: a synthetic biology concern. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(85), 2015. ISSN 2296-4185. doi: [10.3389/fbioe.2015.00085](https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00085). URL <http://www.frontiersin.org/biomolecular-engineering/10.3389/fbioe.2015.00085/abstract>.
- [52] Libertad Pantoja-Hernández, Elena Álvarez-Buylla, Carlos F. Aguilar-Ibáñez, Adriana Garay-Arroyo, Alberto Soria-López, and Juan Carlos Martínez García. Retroactivity effects dependency on the transcription factors binding mechanisms. *Journal of Theoretical Biology*, pages–, 2016. ISSN 0022-5193. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.08.012>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519316302454>.
- [53] Reto I. Peirano and Wegner Michael. The glial transcription factor Sox<sub>10</sub> binds to dna both as a monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Research*, 28(16):3047–3055, 2000. doi: [10.1093/nar/28.16.3047](https://doi.org/10.1093/nar/28.16.3047).
- [54] Vicent Pelechano, Sebastián Chávez, and José E. Pérez-Ortín. A complete set of nascent transcription rates for yeast genes. *PLoS ONE*, 5(11):e15442, 11 2010. doi: [10.1371/journal.pone.0015442](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015442).

- [55] Anantanarayanan Raman. Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions. *Flora*, 206:517–533, 2011.
- [56] J. Saez-Rodriguez, A. Kremling, and E. D. Gilles. Dissecting the puzzle of life: modularization of signal transduction networks. *Computers & Chemical Engineering*, 29(3):619 – 629, 2005. ISSN 0098-1354. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compchemeng.2004.08.035>. Computational Challenges in Biology.
- [57] Karline Soetaert. *rootSolve: Nonlinear root finding, equilibrium and steady-state analysis of ordinary differential equations*, 2009. R package 1.6.
- [58] Karline Soetaert and Peter M.J. Herman. *A Practical Guide to Ecological Modelling. Using R as a Simulation Platform*. Springer, 2009. ISBN 978-1-4020-8623-6.
- [59] Michael Springer, Jonathan S. Weissman, and Marc W. Kirschner. A general lack of compensation for gene dosage in yeast. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 2010. doi: 10.1038/msb.2010.19.
- [60] K. Stott, J. M. Blackburn, P. J. Butler, and M. Perutz. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14):6509–6513, 1995. URL <http://www.pnas.org/content/92/14/6509.abstract>.
- [61] Yuichi Taniguchi, Paul J. Choi, Gene-Wei Li, Huiyi Chen, Mohan Babu, Jeremy Hearn, Andrew Emili, and X. Sunney Xie. Quantifying e. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*, 329(5991):533–538, 2010. doi: 10.1126/science.1188308. URL <http://www.sciencemag.org/content/329/5991/533.abstract>.
- [62] Martin E. van Royen, Wiggert A. van Cappellen, Carola de Vos, Adriaan B. Houtsmuller, and Jan Trapman. Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal of Cell Science*, 125(8), 2012. doi: 10.1242/jcs.096792.
- [63] Gunter P. Wagner, Mihaela Pavlicev, and James M. Cheverud. The road to modularity. *Nature Reviews Genetics*, 8:921–931, 2007.
- [64] Baojun Wang, Mauricio Barahona, and Martin Buck. Engineering modular and tunable genetic amplifiers for scaling transcriptional signals in cascaded gene networks. *Nucleic Acids Research*, 42(14):9484–9492, 2014. ISSN 1362-4962. doi: AN-PMC4132719.
- [65] Pei Wang, Jinhu Lü, and Xinghuo Yu. Identification of important nodes in directed biological networks: A network motif approach. *PLoS ONE*, 9(8):e106132, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0106132.

- [66] Yufang Wang, Ling Guo, Ido Golding, Edward C. Cox, and N. P. Ong. Quantitative transcription factor binding kinetics at the single-molecule level. *Biophysical Journal*, 96(2):609–620, 3 2009. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/j.bpj.2008.09.040. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.040>.
- [67] Yulei Wang, Chih L. Liu, John D. Storey, Robert J. Tibshirani, Daniel Herschlag, and Patrick O. Brown. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:5860–5865, 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.092538799>.





## COLOFÓN

Este documento fue realizado con el estilo `classicthesis` desarrollado por André Miede. El estilo está inspirado en el libro de Robert Bringhurst "*The Elements of Typographic Style*". `classicthesis` puede obtenerse para L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X y L<sup>Y</sup>X:

<http://code.google.com/p/classicthesis/>

Las letras capitales y otros detalles del diseño de página están inspirados en la contribución de "Fran"<sup>en</sup>:

<http://tex.stackexchange.com/questions/1319/showcase-of-beautiful-typography-done-in-tex-friends>

*Final Version* as of 2 de marzo de 2017 (`classicthesis` version 1.0).