

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



Análisis preliminares de la reestructuración del Paisaje de Atractores de la red de regulación genética del nicho de células troncales de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

POR

Jorge Luis Posada Corona

TESIS DE LICENCIATURA PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO COMO
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

MÉXICO D.F.

ABRIL 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Análisis preliminares de la reestructuración del Paisaje de Atractores de la red de regulación genética del nicho de células troncales de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

POR

Jorge Luis Posada Corona

HA SIDO APROBADO

ABRIL 2018

COMITÉ EVALUADOR:

Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces, Propietaria

Dra. Tatiana Fiordelisio Coll, Propietaria

Lic. José Dávila Velderrain, Propietario

Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, Suplente

Dra. Berenice García Ponce de León, Suplente

RESUMEN

En esta tesis usamos una red de interacciones que de manera preliminar estudió su papel en la diferenciación celular y formación de patrones del NCT (Nicho de Células Troncales) en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Esta red fue propuesta por Azpeitia et. al. [65]. La red está sustentada en datos experimentales para 9 genes y sus interacciones. Esta red converge a 4 atractores con perfiles o configuraciones de expresión para los 9 genes incluidos en esta red que coinciden, con los reportados en la literatura, para los principales tipos celulares observados en el NCT de raíz: las células iniciales vasculares (IV), las células iniciales del cortex-endodermis (CEn), el centro quiescente (CQ) y las células iniciales de la cofia de la raíz (CEp). Recientemente se propuso un método que permite analizar de manera semicuantitativa el efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red en el paisaje de los atractores de la misma. Y con ello, permite analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de los genes son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro. En esta tesis se hizo un análisis preliminar en este sentido para la RRG-NCT de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. De acuerdo con lo anterior, se usó el método propuesto en [73] para analizar la tasa de degradación de los genes. El análisis de bifurcaciones específicas a cada nodo, mediante su tasa de degradación permitió identificar nodos capaces de generar cambios cualitativos en el PA e identificar patrones en estos cambios.

Se analizó la dinámica de un modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT. Después, se propuso y analizó un modelo de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDOs) consistente con el mismo. Por último, se hizo un análisis numérico para explorar la tendencia de los nodos para cambiar cualitativamente el PA en respuesta a un incremento en el valor de la tasa de degradación. 5 nodos de la red (SHR, SCR, Auxina, WOX5 y MGP) fueron capaces de generar cambios en el PA. Estos resultados son preliminares

usando una red del NCT igualmente preliminar. Estos estudios se han continuado en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. José Dávila Velderrain, en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Álvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo, Berenice García Ponce de León y Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo Ríos; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero. Agradezco especialmente a mi director de tesis, el Dr. José Dávila Velderrain por guiarme en la ejecución de este trabajo e instruirme en las cuestiones técnicas necesarias para realizar este trabajo, al igual que sus explicaciones y tiempo invertido en mi formación. Agradezco a la Dra. Elena Álvarez Buylla Roces por su apoyo para que pudiera concluir este trabajo y por su paciencia y tolerancia por la tardanza en el término del mismo. Además, agradezco las revisiones, observaciones y esfuerzos de mi Comité tutorial: las Dras. Berenice García Ponce de León y Ma. de la Paz Sánchez Jiménez y Tatiana Fiordelisis Coll, por hacer que este trabajo fuera de mayor calidad. Finalmente, agradezco a todas las personas que con su apoyo y cariño me permitieron llegar hasta aquí y que sin su ayuda jamás lo hubiera conseguido. Especialmente a mi madre, padre, hermana, tíos, abuelos, maestros, tutores y amigos.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis familiares más cercanos. A mi madre, mi padre, mi hermana, mi abuelito, mi abuelita, y mis tíos.

Índice general

Índice de Figuras	xv
1. Marco Teórico	1
1.1. Introducción	1
1.1.1. Biología del Desarrollo	1
1.1.2. Biología del Desarrollo de la Raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.1.3. Biología de Sistemas	25
1.1.4. La Perspectiva de la Teoría de Sistemas Dinámicos hacia la Biología Celular	27
1.1.5. La Red de Regulación Genética del Nicho de Células Troncales de la Raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
1.1.6. Reestructuración del Paisaje de Atractores	38
1.2. Hipótesis	40
1.3. Objetivos	40
1.3.1. Objetivo General	40

1.3.2. Objetivos Específicos	40
2. Métodos	42
2.1. Análisis dinámico del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT . .	43
2.2. Transformación del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT, a un sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias	44
2.3. Análisis dinámico del sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias	50
2.4. Análisis de las Bifurcaciones	53
3. Resultados	55
3.1. Análisis dinámico del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT . .	55
3.2. Análisis dinámico del sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias	56
3.3. Análisis de las Bifurcaciones	64
4. Discusión	75
5. Conclusiones	79
Bibliografía	80

Índice de figuras

1.1. Embriogénesis hasta estadio con forma de corazón	13
1.2. Etapas de la embriogénesis de <i>A. thaliana</i>	15
1.3. Anatomía de la raíz de <i>A. thaliana</i>	18
1.4. Paisaje	28
1.5. Modelo A. Las interacciones de regulación están indicadas por flechas (activación) o flechas terminadas en barra (represión) en la RRG. Las interacciones resaltadas en rojo son las interacciones que caracterizan a este modelo. Es importante hacer notar que las flechas pueden representar tanto una interacción directa como una interacción mediada por uno o más intermediarios moleculares.	38
1.6. Modelo B. Las interacciones de regulación están indicadas por flechas (activación) o flechas terminadas en barra (represión) en la RRG. Las interacciones resaltadas en rojo son las interacciones que caracterizan a este modelo. Es importante hacer notar que las flechas pueden representar tanto una interacción directa como una interacción mediada por uno o más intermediarios moleculares.	39

- 3.1. Atractores del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT. Las columnas corresponden a cada uno de los 4 atractores de la red: (1) Columela Epidermis, (2) Iniciales Vasculares, (3) Cortex Endodermis y (4) Centro Quiescente. Cada fila corresponde a 1 de los 9 nodos de la red, en el eje vertical está especificado a qué nodo corresponde. El color rojo corresponde al estado 0 (ausente) del nodo y el color verde corresponde al estado 1 (presente) del nodo. En la parte superior de las columnas, en el eje horizontal, están (en porcentaje) los tamaños de las cuencas de atracción. 57
- 3.2. Histogramas de PLT, ARF, Auxin y IAA generados a partir de las columnas 1-4 de la matriz que almacena las soluciones del sistema de 9 EDOs. Se estandarizaron ambos ejes de cada histograma para poder comparar los 9 histogramas. En el eje x el valor mínimo de la matriz y el valor máximo de la matriz son los límites inferior y superior, respectivamente. En el eje y el límite inferior es cero y el superior es 512. Nótese que las mayores frecuencias se encuentran en algún extremo del eje x 58
- 3.3. Histogramas de SHR, SCR, JKD y MGP generados a partir de las columnas 5-8 de la matriz que almacena las soluciones del sistema de 9 EDOs. Se estandarizaron ambos ejes de cada histograma para poder comparar los 9 histogramas. En el eje x el valor mínimo de la matriz y el valor máximo de la matriz son los límites inferior y superior, respectivamente. En el eje y el límite inferior es cero y el superior es 512. Nótese que las mayores frecuencias se encuentran en los extremos del eje x 59

- 3.4. Histograma de WOX5 generado a partir de la columna 9 de la matriz que almacena las soluciones del sistema de 9 EDOs. Se estandarizaron ambos ejes de cada histograma para poder comparar los 9 histogramas. En el eje x el valor mínimo de la matriz y el valor máximo de la matriz son los límites inferior y superior, respectivamente. En el eje y el límite inferior es cero y el superior es 512. Nótese que las mayores frecuencias se encuentran en los extremos del eje x 60
- 3.5. Atractores y sus respectivas cuencas de atracción recuperados con valores de 1, 5, 7.5 y 10 para el parámetro b . NA refiere a un atractor que no es alguno de los 4. 1 corresponde al atractor Iniciales Vasculares, 2 corresponde al atractor Centro Quiescente, 3 corresponde al atractor Cortex Endodermis y 4 corresponde al atractor Columela Epidermis. Los porcentajes indican el tamaño de la cuenca de atracción asociada a cada atractor. 62
- 3.6. Atractores y sus respectivas cuencas de atracción recuperados con valores de 15, 20, 25 y 30 para el parámetro b . 1 corresponde al atractor Iniciales Vasculares, 2 corresponde al atractor Centro Quiescente, 3 corresponde al atractor Cortex Endodermis y 4 corresponde al atractor Columela Epidermis. Los porcentajes indican el tamaño de la cuenca de atracción asociada a cada atractor. 63
- 3.7. Atractores y sus respectivas cuencas de atracción recuperados con valores de 35 y 40 para el parámetro b . 1 corresponde al atractor Iniciales Vasculares, 2 corresponde al atractor Centro Quiescente, 3 corresponde al atractor Cortex Endodermis y 4 corresponde al atractor Columela Epidermis. Los porcentajes indican el tamaño de la cuenca de atracción asociada a cada atractor. 64

3.8. Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos PLT, ARF y Auxina en el atractor Columela Epidermis. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en una sola gráfica (gráfica de Auxina) donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de la gráfica con líneas punteadas se menciona que atractor corresponde al inicial y cual al atractor final (CEp refiere a Columela Epidermis). 66

3.9. Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos activos PLT, ARF, SHR y Auxina en el atractor Iniciales Vasculares. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde cual al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis e IV refiere a Iniciales Vasculares). 67

3.10. Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos PLT, ARF, SHR y Auxina en el atractor Cortex Endodermis. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis y CEn refiere a Cortex Endodermis). 68

3.11. Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos SCR, JKD y MGP en el atractor Cortex Endodermis. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis, CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente). 69

3.12. Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos PLT, ARF, SHR y Auxina en el atractor Centro Quiescente. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis y CQ refiere a Centro Quiescente). 70

3.13. Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos SCR, JKD y WOX5 en el atractor Centro Quiescente. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CQ refiere a Centro Quiescente, IV refiere a Iniciales Vasculares y CEn refiere a Cortex Endodermis). 71

<p>3.14. Transiciones generadas por los parámetros de degradación k_i de los nodos SHR, SCR, Auxina y MGP. Del lado izquierdo de las figuras se muestran los atractores iniciales, del lado derecho está el atractor final. En el centro de las figuras se muestra el valor de k_i suficiente para generar la transición (bifurcación). CEp refiere a Columela Epidermis, IV refiere a Iniciales Vasculares, CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente.</p>	72
<p>3.15. Transición generada por el parámetro k del gen WOX5. Del lado izquierdo se muestra el atractor inicial, del lado derecho está el atractor final. En el centro se muestra el valor de k suficiente para generar la transición (bifurcación). CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente.</p>	73

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. Introducción

1.1.1. Biología del Desarrollo

Una de las principales diferencias entre un ser vivo y una máquina es que la máquina nunca requiere funcionar antes de que sea terminada de construir. En cambio, en cada ser vivo el proceso de formación es parte misma de su función [1]. Los organismos multicelulares cuando nacen no tienen todas las características de su etapa adulta, al contrario, estas características se generan por un proceso relativamente lento que consiste en un cambio progresivo al que se le ha denominado Desarrollo. En casi todos los casos, el desarrollo de un organismo multicelular comienza con una sola célula, el huevo fertilizado o cigoto, el cual se divide mitóticamente para producir todas las células del cuerpo, pero el desarrollo no se detiene en el nacimiento o incluso en la etapa adulta, la mayoría de los organismos nunca terminan su proceso de desarrollo. Por ejemplo, los humanos son capaces de reemplazar, cada día, más de un gramo de células de piel. Otro ejemplo de que el desarrollo no termina en la

etapa adulta es el hecho de que la médula ósea es el tejido encargado de producir millones de nuevas células rojas por minuto. Además, algunos animales son capaces de regenerar varias partes, y muchas especies pasan por un proceso de metamorfosis (como la transformación de un renacuajo en una rana o el de una oruga en una mariposa). Por lo anterior es que en años recientes se ha vuelto una costumbre hablar de Biología del Desarrollo como la disciplina que estudia los procesos embrionarios y otros procesos del desarrollo. En este trabajo lo que nos interesa estudiar es la Biología del Desarrollo de un grupo de células (el nicho de células troncales, el cual describiremos en la segunda sección) del meristemo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Respecto a la descripción de la Biología del Desarrollo como disciplina, es posible identificar 3 grandes aproximaciones para estudiar el Desarrollo: 1) la aproximación Anatómica, 2) la aproximación Experimental y 3) la aproximación Genética. Cada una de estas aproximaciones ha predominado en una etapa determinada, pero las tres aproximaciones siguen vigentes y continúan aportando al entendimiento del desarrollo de los organismos multicelulares. Respecto a la aproximación Anatómica, ésta se divide en tres. La primera es la Embriología Comparativa, la cual estudia el cómo cambia la anatomía durante el desarrollo de diferentes organismos y los compara entre sí. La segunda es la Embriología Evolutiva que estudia cómo influyen cambios en el desarrollo de un organismo en cambios evolutivos y cómo el linaje de un organismo pudo haber sido determinado por los tipos de cambios anatómicos posibles. La tercer y última división es la Teratología, la cual estudia los defectos de nacimiento. En este trabajo la única rama de la aproximación anatómica que usamos es la primera aproximación de la de Embriología Comparativa aplicada en el Nicho de Células Troncales (NCT) de la Raíz de *A. thaliana*.

La aproximación experimental tiene que ver más con las tecnologías y métodos es-

pecíficos que se aplican para contestar preguntas del desarrollo como métodos de vanguardia de la microscopía, métodos de reconstrucción tridimensional de objetos mediada por equipo de cómputo, e incluso métodos de matemáticas aplicadas a la biología. En este trabajo seguiremos dos aproximaciones experimentales: 1) el uso de modelos matemáticos y 2) el análisis computacional de dichos modelos. Ambas aproximaciones enfocadas al NCT de la Raíz de *A. thaliana*.

Por último, respecto a la aproximación genética, recordemos que fueron los estudios citológicos hechos en el siglo XX los que establecieron que los cromosomas de cada célula del organismo son descendientes mitóticos de los cromosomas establecidos en el proceso de la fertilización ([86]). En otras palabras, cada núcleo de una célula somática tiene los mismos cromosomas y también los mismos genes que el resto de los otros núcleos somáticos. A lo anterior se le denomina Equivalencia Genómica. Con la Equivalencia Genómica una de las preguntas que se intentó responder en el siglo XX fue la de: ¿cómo es que los genes nucleares pueden dirigir el desarrollo cuando estos genes son los mismos en cada tipo celular? Si cada célula en el cuerpo contiene los genes para las proteínas de la hemoglobina y la insulina, ¿porqué es que las proteínas de la hemoglobina sólo se sintetizan en los eritrocitos, porqué las proteínas de la insulina son sólo sintetizadas en ciertas células pancreáticas y porqué ninguna de estas dos proteínas se sintetiza en los riñones o en el sistema nervioso? Con base en la evidencia embriológica para la equivalencia genómica como también en modelos bacteriales de regulación genética se llegó a una respuesta consenso en 1960 que consiste en la expresión genética diferencial, la cual se basa en 3 postulados: 1) Cada núcleo celular contiene un genoma completo, el cual fue establecido en el proceso de fertilización, por lo que en términos moleculares significa que los DNAs de todas las células diferenciadas son idénticas. 2) Los genes no usados en las células diferenciadas no se destruyen ni se cambian, pero si retienen su potencial de

ser expresados. 3) Sólo un porcentaje bajo del genoma es expresado en cada célula y una porción del RNA sintetizado en cada célula es específico para cada tipo celular. En este trabajo nos interesa proponer una explicación basada en un modelo integrativo de la expresión genética diferencial de ciertos Factores Transcripcionales del NCT de la Raíz de *A. thaliana* para las diferencias de de la células de dicho NCT.

Actualmente se sabe que la expresión genética puede ser regulada a diferentes niveles: La primera es a nivel transcripcional, donde se regula qué gen nuclear es el que será transcrito a RNA nuclear. La segunda es a nivel selectiva de RNA, donde se regula qué RNA transcrito es capaz de entrar al citoplasma y convertirse en RNA mensajero. La tercera es a nivel traduccional, donde se regula qué RNA mensajero en el citoplasma será traducido a proteína. Y La última consiste en modificaciones post-traduccionales, donde se regula qué proteínas son capaces de mantenerse y funcionar dentro de la célula. En este trabajo el único nivel de regulación que nos interesa es el primero de los 4 descritos anteriormente, el de regulación a nivel transcripcional. A continuación describiremos los protagonistas y los elementos necesarios para tener acceso a los genes y hacer posible que se transcriban.

El primer elemento al que le analizaremos su composición es al de la cromatina, ya que es el nivel de organización más predominante en el tiempo de vida de una célula eucariota común. Para empezar, el componente protéico constituye cerca de la mitad del peso de la cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, el cual se conforma de un octámero de proteínas llamadas histonas (4 homodímeros de las histonas H2A, H2B, H3 y H4), en el cual se enrolla el DNA con un total aproximado de unos 140 pares de bases de longitud ([4]) y con un aproximado de 14 puntos de contacto con el nucleosoma ([5]). La mayoría del tiempo estos nucleosomas están agrupados en selenoides, que son conjuntos de nucleosomas, estabilizados por la histona H1 ([6]). Esta conformación de los nucleosomas dependiente de H1

inhibe la transcripción de los genes en las células somáticas al empaquetar nucleosomas adyacentes en ajustados aglomerados que previenen el acceso a los genes, por parte de los factores de transcripción y RNA polimerasas. Por lo anterior es que se piensa que la condición estándar de la cromatina es la de estado reprimido, y que los genes específicos de tejido se activan por interrupciones locales de esta represión ([7]). En esta interrupción del estado de represión, las histonas son cruciales, porque son las responsables de mantener la represión de la expresión génica. La naturaleza de esta represión es física, las Histonas mantienen las hebras de DNA fuertemente unidas a ellas, mediante interacción eléctrica (las histonas tienen carga básica), impidiendo físicamente que se les una la RNA polimerasa. Es posible modificar la carga básica de las histonas, permitiendo la liberación de las hebras de DNA a su superficie y por consiguiente la unión de la RNA polimerasa a estas hebras. Represión y activación son controladas en gran medida por las colas de las histonas H3 y H4 con 2 grupos orgánicos pequeños: el residuo metilo (CH_3) y el residuo acetilo ($COCH_3$). En general, la acetilación de las histonas (el proceso de adición de grupos acetilo cargados negativamente a los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 por las enzimas acetiltransferasas de histonas) neutraliza la carga básica de la lisina y desajusta a las histonas, lo que permite la transcripción. La metilación de las histonas (el proceso de adición de grupos metilos a las histonas por las enzimas metiltransferasas de histonas) puede activar o reprimir la transcripción, dependiendo del aminoácido que es metilado y la presencia de otros grupos metilo y acetilo en la cercanía ([8], [9]). Cuando la acetilación de las colas de las histonas H3 y H4 coexiste con metilaciones de la lisina en la posición 4 de la histona H3 (es decir, H3K4; recordando que K es la abreviación en inglés de la lisina) usualmente se asocia con una cromatina capaz de transcribirse. En cambio, una combinación de ausencia de acetilación de las colas de las histonas H3 y H4 y una metilación de la lisina en la posición 9 de la histona H3 (H3K9) es usualmente asociada con una cromatina altamente reprimida. Es más,

metilaciones de las lisinas H3K9, H3K27 y H4K20 usualmente se asocian con una cromatina altamente reprimida. Además de regular el inicio del complejo transcripcional (es decir, el posicionamiento de la RNA polimerasa en el promotor), los nucleosomas también tienen la capacidad de regular la progresión de la RNA polimerasa y por ende el alargamiento del RNA mensajero. Se ha visto que la acetilación de la histona H3 en las posiciones 9 y 14 combinadas con la trimetilación de esa misma histona en la posición 4, es necesaria para permitir el alargamiento del RNA mensajero ([10], [11]).

Respecto a los genes, en su estructura hay 1 región (la región promotora) que tiene control sobre su transcripción, por lo mismo, brevemente describiremos la estructura de un gen típico de una célula eucariota (mencionaremos, como ejemplo, cada región del gen de la proteína de la beta globina humana al final de la descripción de cada región descrita).

Primero, cabe mencionar que la hebra sencilla del RNA mensajero eucariótico proviene de regiones no contiguas del cromosoma que se denominan exones (que refiere a las regiones del DNA que codifican para una proteína) y hay otras secuencias eucarióticas llamadas intrones que no tienen que ver con la secuencia de aminoácidos de la proteína. Como ejemplo, describiremos la estructura del gen de la beta globina humana: el primer exón contiene 90 pares de bases que codifican para los aminoácidos del 1 al 30. Luego viene el primer intrón que contiene 130 pares de bases. La estructura de este primer intrón es importante para permitirle al RNA a ser procesado en RNA mensajero y poder salir del núcleo. El segundo exón contiene 222 pares de bases que codifican para los aminoácidos del 31 al 104. El segundo intrón es muy largo, con 850 pares, sin función alguna aparente. Y para terminar el tercer exón contiene 126 pares de bases que codifican para los aminoácidos del 105 al 146. Después de mencionar la conformación de exones e intrones de un gen, mencionaremos las regiones más importantes de un gen como de un genoma eucariótico. La primer región de un

gen es 1) la región promotora, la cual es la región responsable de unir a la RNA polimerasa y responsable también del inicio de la transcripción. En el caso del gen de la proteína de la beta globina humana su región promotora tiene 3 unidades diferentes y se extiende desde 95 hasta 26 pares de bases antes (río arriba) del sitio de inicio de la transcripción. 2) El sitio de inicio de la transcripción, el cual es ACATTTG para el gen de la beta globina humana. 3) el sitio de inicio de la traducción que siempre está constituido por las bases ATG. Este codón (que se convierte en AUG en el RNA mensajero) está localizado 50 pares de bases después del sitio de inicio de la transcripción en el gen de la beta globina humana. 4) La región no traducida 5' (UTR 5' por sus siglas en inglés), la cual consiste en la región comprendida entre el sitio de inicio de la transcripción y el sitio de inicio de la traducción. Esta región puede determinar la tasa con la que se lleva a cabo la traducción. En el caso del gen de la beta globina humana esta región no traducida consiste de 50 pares de bases de longitud. 5) El codón de término de la traducción, TAA. Este codón en el RNA mensajero se convierte en UAA. El ribosoma se disocia en este codón para permitir que la proteína sea liberada. 6) La región no traducida 3' (UTR 3') que aunque si se transcribe, no se traduce. Esta región incluye la secuencia AATAAA que es necesaria para la poliadenilación (la inserción de la cola de cerca de 200 a 300 residuos de adenina en el RNA transcrito, 20 bases río abajo de la secuencia AAUAAA). La función de esta cola de poliadeninas le confiere estabilidad al mRNA, le permite salir del núcleo y le permite ser traducido. 7) La secuencia de término de la transcripción. La transcripción puede continuar después de la secuencia AATAAA por cerca de 1000 nucleótidos, antes de ser terminada.

Habiendo dicho las principales partes de un gen, cabe mencionar que una vez transcrito un gen, el producto pasa por varias modificaciones. Para empezar, el producto de la transcripción original es llamado RNA nuclear (nRNA), algunas veces también llamado RNA heterogéneo nuclear o RNA premensajero. El nRNA contiene la se-

cuencia UTR 5', los exones, los intrones y la secuencia UTR 3'. Conforme el mRNA deja atrás el núcleo, sus intrones son removidos y los exones restantes son pegados contiguamente. Es de esta manera que las regiones codificantes del RNA mensajero (los exones) son pegados para formar un único transcrito, el cual es traducido a una proteína, la cual puede ser modificada posteriormente para hacerla funcional.

Además, dos secuencias son necesarias para controlar dónde y cuándo un gen particular es transcrito: los promotores y los potenciadores, por lo que vamos a mencionar algunas características de ambos. Empezando con el promotor, como lo habíamos mencionado anteriormente, los promotores son sitios en donde la RNA polimerasa se une al DNA para iniciar la transcripción. Los promotores de los genes que sintetizan RNA mensajeros (es decir, aquellos genes que codifican para proteínas) se localizan comúnmente río arriba, inmediatamente después del sitio de inicio de la transcripción. La mayoría de estos promotores contienen la secuencia TATA (También llamado caja TATA), donde la RNA polimerasa se une. Este sitio normalmente está 30 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Muchas regiones TATA son contiguas a regiones llamadas islas CPGs, las cuales son regiones de DNA ricas en esos dos nucleótidos ([12]). Las RNA polimerasas eucarióticas no se unirán de manera natural a la secuencia TATA, ellas necesitan la presencia de proteínas adicionales para ubicarse de manera adecuada en el promotor. 2 de estas proteínas extra son llamadas proteínas de unión a caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés) que forman un complejo (TFIID) con otras proteínas para formar una silla de montar sobre la cual se pueda situar la RNA polimerasa, y TFIIB, que recluta a la RNA polimerasa para las TBPs y posiciona a la RNA polimerasa de tal manera que pueda leer en codones la secuencia del DNA. Otras proteínas (TFIIA y TFIIF) estabilizan al complejo. Además, factores de transcripción auxiliares (FTAs) estabilizan la RNA polimerasa en el promotor y le permiten iniciar

la transcripción. Estos FTAs se unen al DNA en secuencias localizadas río arriba de la secuencia TATA, que se denominan elementos del promotor río arriba. Eventualmente, TFIIF fosforilará la región carboxilo terminal de la RNA polimerasa, permitiendo así su liberación de la silla de montar y poder transcribir el RNA mensajero.

Ahora mencionemos el otro elemento en la secuencia de DNA que también regula la transcripción: Los potenciadores. Un potenciador es una secuencia de DNA que controla la eficiencia y la tasa de la transcripción al tener control sobre promotores específicos. En otras palabras, los potenciadores nos dicen dónde y cuándo un promotor puede ser usado, y qué cantidad del producto de un gen hacer. Los potenciadores son capaces de unir Factores de Transcripción específicos, reclutar enzimas (como las acetiltransferasas de histonas) capaces de romper los nucleosomas cercanos o estabilizar el complejo de inicio de la transcripción. Los potenciadores son capaces de activar solamente promotores ligados en *cis* (*cis* se refiere a que se encuentra en el mismo cromosoma, en este caso promotores en el mismo cromosoma), por lo que son llamados comúnmente elementos regulatorios en *cis*. Pero, por el plegamiento del DNA, los potenciadores pueden regular genes a grandes distancias (algunos hasta millones de bases alejadas) del promotor ([13]). Más aún, los potenciadores no necesitan estar en el lado río arriba 5' del gen, ellos pueden estar en el extremo 3' o incluso dentro de los intrones ([14]). En el caso del gen de la proteína beta globina humana, éste tiene un potenciador en su UTR 3'. Esta secuencia potenciadora es necesaria para la expresión específica temporal y de tejido del gen beta globina en las células precursoras de las células rojas de la sangre de un adulto ([15]). Las secuencias potenciadoras del DNA son las mismas en cada tipo celular, lo que cambia es la combinación de los Factores de Transcripción (FT) que puede unir cada potenciador. Una vez unidos los FT a las secuencias potenciadoras, los FT son capaces de potenciar o suprimir la habilidad de las RNA polimerasas para iniciar

la transcripción. Los potenciadores pueden unir varios FT, y es esta combinación específica de FT lo que permite a un gen estar activo en un tipo celular particular.

Ahora examinaremos un poco más a fondo algunas propiedades de los Factores de Transcripción, ya que serán los principales elementos a usar en este trabajo. Natalie Angier ([16]) escribió: Una serie de nuevos descubrimientos sugieren que el DNA es más como un tipo particular de político, rodeado de muchos ayudantes y consejeros que deben vigorosamente masajearlo y hacerlo rotar. Estos ayudantes y consejeros son los Factores de Transcripción. Estos Factores pueden ser clasificados en familias de acuerdo a similitudes en su estructura. Los FT de alguna familia comparten regiones en las zonas de la proteína que usan para unirse a las secuencias del DNA. Como ya lo mencionamos antes, la función de los potenciadores es unir FT y aún más, cada potenciador puede tener diferentes sitios para unir varios FT. Los FT se unen a los potenciadores con una parte de la proteína y usan el resto para reclutar enzimas modificadoras de histonas. Además, los FT pueden funcionar al estabilizar el complejo de inicio de la transcripción que permite a la RNA polimerasa unirse al promotor. Una de las consecuencias más importantes de la asociación combinatoria de los FT es la expresión coordinada de los genes. La expresión simultánea de muchos genes específicos puede ser explicado por la unión de FT a los elementos potenciadores.

La estructura General de los FT se organiza en 3 grandes dominios, el primero es un dominio de unión al DNA que reconoce una secuencia particular del DNA en los potenciadores. El segundo es un dominio de transactivación que activa o suprime la transcripción de un gen. Este dominio permite al FT interactuar con las proteínas involucradas en unir a la RNA polimerasa (como es el caso de TFIIB o TFIIE, [17]) o con enzimas modificadoras de histonas. El tercer dominio (cuando lo hay) es un dominio de interacción de proteína-proteína que permite modular la actividad de FT por

Factores de Transcripción Auxiliares o incluso otros FT. La importancia de los FT fue elegantemente demostrada cuando [18] usaron 3 FT para convertir células pancreáticas exocrinas (que sintetizan amilasas, quimotripsina y otras enzimas digestivas) en células beta pancreáticas endocrinas secretoras de insulina. Los investigadores infectaron el páncreas de ratones con 2 meses de vida con virus inócuos que contenían los genes de los 3 FT: Pdx1, Ngn3 y Mafa. Encontraron que de todos los FT probados sólo los tres mencionados fueron cruciales para la conversión. Las células pancreáticas convertidas lucían idénticas a las células beta normales y también fueron capaces de secretar tanto insulina como factor inductor.. Las células convertidas mantuvieron sus nuevas propiedades por meses. Además, los ratones cuyas células beta fueron destruidas por una droga particular, desarrollaron diabetes tal como la diabetes observada en humanos diabéticos tipo 1. La diabetes de los ratones se pudo curar al inyectarles un virus que contenía los 3 FT. Cuando eso se hizo, cerca del 20 por ciento de las células pancreáticas exocrinas se convirtieron en células betas y capaces de secretar insulina.

Además de las formas ya mencionadas, existen otras formas involucradas en el control de la transcripción, como la metilación del DNA y las regiones silenciadoras. De igual manera, para cada 1 de los 3 niveles de regulación restantes (Determinación de a que RNA transcrito se le permite entrar al citoplasma y convertirse en RNA mensajero, determinación de a que RNA mensajero en el citoplasma puede ser traducido a proteína, y la determinación de que proteínas son capaces de mantenerse y funcionar dentro de la célula y cuáles no, mediante modificaciones posttraduccionales), también existen diferentes formas de regulación, como el procesamiento diferencial del RNA (la yuxtaposición alternativa, por mencionar un ejemplo), la longevidad diferencial del RNA mensajero, la inhibición selectiva de la traducción de RNA mensajeros, entre otros. Pero de ahora en adelante sólo nos enfocaremos en el primer nivel de regulación (inicio de la transcripción) específicamente con los FT involucrados en el manteni-

miento del NCT de la Raíz de *A. thaliana* que a continuación describiremos, y con un enfoque matemático-computacional que en la cuarta sección describiremos [19].

1.1.2. Biología del Desarrollo de la Raíz de *Arabidopsis thaliana*

La especie *Arabidopsis thaliana* es el principal modelo experimental de las plantas. Fue originalmente escogida como sistema para su análisis molecular genético por su tiempo corto de reproducción, gran número de progenie y relativo pequeño genoma diploide. *A. thaliana* fue la primer planta cuyo genoma se secuenció. El proceso de investigación en *Arabidopsis* ha contribuido a un entendimiento profundo de muchos procesos básicos de las plantas, incluyendo la producción de hormonas y sus respuestas, sus ritmos circadianos y su desarrollo.

La arquitectura postembrionaria de las plantas superiores se forma a partir de dos meristemas, que se establecen en el embrión. Partiendo de un cigoto -una sola célula totipotente-, la embriogénesis produce los primeros precursores tisulares y las primeras células madre, y al final de la embriogénesis el cigoto se ha transformado en un embrión maduro que invariablemente comprende los mismos tipos de tejidos básicos de cualquier planta postembrionaria: epidermis, tejidos vasculares y tejidos de parénquima ([20]). Los embriones de la mayoría de las plantas con flores crecen por divisiones celulares aparentemente caóticas y aleatorias, y sólo unos pocos (por ejemplo, los miembros de la familia Brassicaceae, incluida *A. thaliana*, sigue un patrón predecible, simple y altamente regular ([21]). En *Arabidopsis*, el embrión se somete a una secuencia altamente ordenada de divisiones celulares, durante el cual los tejidos emergentes se especifican y modelan la embriogénesis de *Arabidopsis*, la cual comienza con la fertilización del óvulo por una de las dos células espermáticas que se liberan por el tubo polínico ([22]). Después de la fertilización, el cigoto rápidamente se alarga

a lo largo del futuro eje apico-basal antes de pasar por su primera división (figura 1.1). Esta división es asimétrica y produce una célula basal apical más pequeña y más grande; la célula apical genera casi todo el embrión a excepción de su base, y la célula basal se atraviesa una serie de divisiones transversales que finalmente generarán un grupo de siete a nueve células, de las cuales todas menos la superior formarán el suspensor extra embrionario (figura 1.1 tomada de [23]).

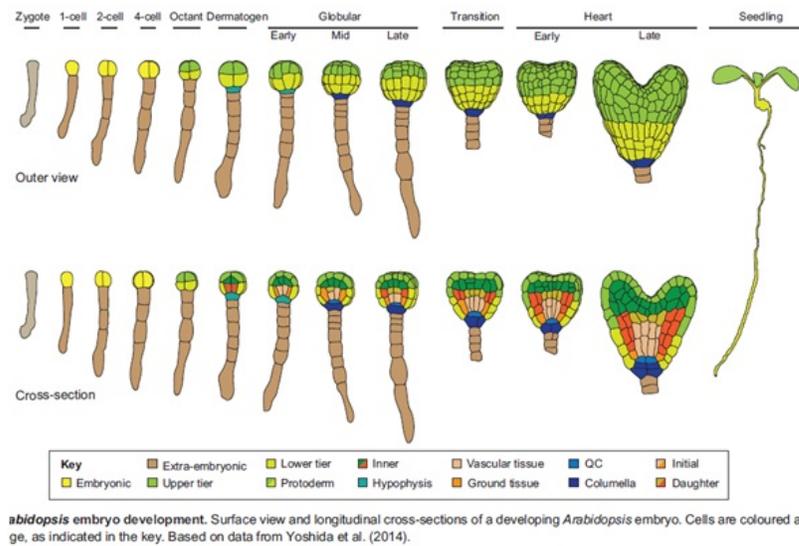


Figura 1.1: Embriogénesis hasta estadio con forma de corazón

Después de la primera división asimétrica, la célula apical se somete a una serie de divisiones de escisión rápidas que dividen el volumen celular original ([24]) Primero realiza dos rondas de divisiones longitudinales en ángulos rectos entre sí para producir cuatro células de igual tamaño. Esto es seguido por una división transversal que separa los dos niveles, generando el embrión de fase de octante (figura 1.1). En esta etapa, el nivel superior es grande, pero significativamente, más pequeño que el nivel inferior ([24]). Todas las células en ambos niveles se someten a una división tangencial, dando lugar a ocho células internas y ocho células externas (estadio de dermatógeno). Esta división separa el protodermo (el precursor de la epidermis) de los tejidos internos (los precursores del cortex y los tejidos vasculares) (figura 1.1). Trabajos recientes muestran que las células externas del embrión en estadio dermatógeno son más del

doble del volumen de las células internas, una característica que había sido imposible de detectar en secciones 2D ([24]).

En las siguientes etapas, tanto la orientación de la división celular como la asimetría volumétrica son muy regulares en la mitad inferior del embrión, mientras que están menos restringidas en la mitad superior. La próxima ronda de divisiones que forma la etapa globular temprana es un evento formativo central. Las células proto-dermales externas se dividen anticlinalmente, sólo para extender la capa externa. Por el contrario, las células internas se dividen longitudinalmente. Aquí, las cuatro células basales forman precursores de tejido terrestre exterior más grandes y precursores vasculares internos más pequeños. Casi al mismo tiempo, la parte superior de la célula del suspensor se especifica como la hipófisis y se divide asimétricamente para formar una célula con forma de lente más pequeña que es el precursor del centro inactivo (QC) y una célula basal más grande que es el precursor de las células madre distales del meristemo de la raíz (figura 1.1). En la etapa de octante, todas las células del embrión se dividen a lo largo de un plano tangencial, alineadas a lo largo del eje apico-basal, dando lugar a dos poblaciones de células con identidades muy diferentes: el protodermo y las células internas (figura 1.1). En la etapa globular temprana, la división longitudinal de las células internas conduce a la formación de células precursoras de tejido vascular (figura 1.1).

Después de las primeras dos rondas de división celular, el embrión de fase octante puede separarse anatómicamente en dos dominios de desarrollo, que comprenden las células de capa superior e inferior, que contribuyen a la formación de tejidos aéreos y los tejidos del hipocótilo y raíz, respectivamente (figura 1.1). Después de esta separación, estos dos dominios son fundamentalmente diferentes y los patrones de división celular son más regulares en el dominio inferior que en el superior.

En la fase globular tardía, cuando el número de células ha aumentado a más de cien,

el embrión asume gradualmente una forma triangular debido al crecimiento localizado en dos posiciones opuestas en la región apical (figura 1.2E y 1.2F tomado de [23]). El embrión en etapa temprana del estadio con forma de corazón (también conocido

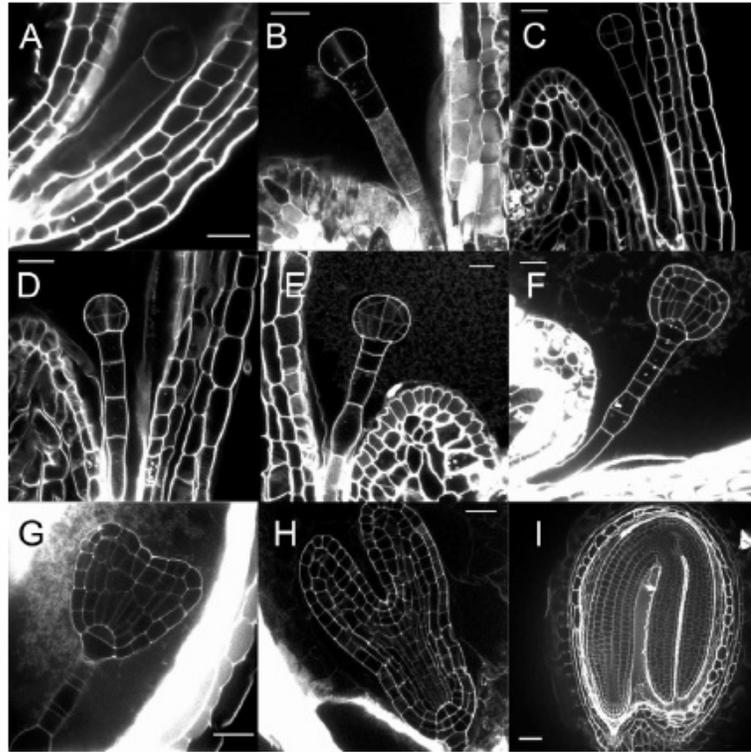


Figure 3. Stages of *Arabidopsis* embryogenesis.

- (A) Early embryo, with a single cell in the embryo proper.
 (B) Early embryo with 2 cells in the embryo proper.
 (C) Octant stage; four of eight cells in two tiers are visible. Cells of the upper and lower tier (*u.t.* and *l.t.*) of the octant will give rise to specific parts of the seedling (see Figure 1). Together with descendants of the uppermost suspensor cell (hypophyseal cell) the eight 'octant' cells will form all the structures of the seedling.
 (D) Dermatogen stage. A tangential division of each of the eight 'octant' cells produces inner cells and epidermis (protoderm) cells.
 (E) Early globular stage; divisions of the inner cells immediately after the dermatogen stage are oriented in the apical-basal dimension, endowing the embryo with a morphologically recognizable axis.
 (F) Triangular stage; now a polarized pattern of major elements is recognizable (see text): *u.t.* cells have generated two symmetrically positioned cotyledon primordia and *l.t.* cells a radially patterned cylinder (comprising epidermis, ground tissue and vascular tissue). Additional divisions distinguish the 'hypophyseal cell' from other suspensor cells. Its descendants will ultimately form the quiescent center of the primary root meristem and the columella initials.
 (G) Heart stage; cotyledon outgrowth. Subsequently, cells between the outgrowing cotyledons initiate the primary shoot meristem.
 (H) Mid-torpedo stage; enlargement of cotyledons and hypocotyl and further elaboration of the radial pattern.
 (I) Bent cotyledon stage embryo with elaborated radial pattern in different organs. In the cotyledons a single adaxial subepidermal layer of elongated cells (palisade mesophyll) can be distinguished from underlying mesophyll cells. The radial pattern of the hypocotyl is comprised of a single cell layer of

Figura 1.2: Etapas de la embriogénesis de *A. thaliana*

como etapa "triangular") comprende aproximadamente 200 células y los primordios de la mayoría de los principales órganos de las plántulas: cotiledones, hipocótilo y raíz primaria, así como los tipos de tejidos básicos, provasculares, protodermo y córtex son anatómicamente discernibles. El desarrollo del suspensor es algo variable, pero las dos células terminales adoptan destinos invariantes. La célula más superior, la

hipófisis, experimenta una secuencia de divisiones simétricas que dan lugar a parte del meristemo de la raíz primaria, que comprende el centro inactivo y las iniciales de la columela ([25]). La célula suspensora más basal se agranda dramáticamente y tiene un contacto abundante con los tejidos maternos circundantes, lo que probablemente facilita el suministro de nutrientes al embrión. Es interesante observar que en varias especies no se han observado plasmodesmos que conecten el embrión con el tejido materno, en marcado contraste con las extensas conexiones simplásticas, inicialmente presentes en el embrión ([26]). Por lo tanto, es poco probable que las moléculas de alto peso molecular de origen materno se puedan transferir al embrión. Se produce un refinamiento adicional del patrón embrionario durante las etapas de desarrollo subsiguientes, en las que el embrión adopta las siguientes formas de manera secuencial: "torpedo con cotiledón doblado" (figuras 1.2G, 1.2H e 1.2I).

En los embriones posteriores al estadio con forma de corazón, el meristemo de los brotes se vuelve discernible y aparece como tres capas celulares distintas que posteriormente lograrán una organización de túnica-carpus ([27]). En los embriones de torpedo y de etapa de cotiledón curvo, los tejidos provasculares también se vuelven reconocibles dentro de los primordios de cotiledón y se completa la organización celular del hipocótilo y la raíz (figura 1.2I). Aunque las células en la mayoría de los tejidos completarán la diferenciación después de la germinación, la complejidad del patrón tisular en el embrión de la etapa de cotiledón doblado es igual a la de la plántula. A continuación nos enfocaremos a mencionar el meristemo de raíz y sus células madre o totipotenciales.

Las células madre vegetales, como en los animales, se definen por su capacidad tanto para renovarse como para generar células hijas. Comparten varias características comunes, ya que ambas se mantienen en microambientes especializados, que se conocen como nichos de células madre o troncales, donde las señales locales de un organizador

actúan para mantener las células madre adyacentes. Estos nichos se mantienen dentro de un grupo organizado de células en división conocido como el meristemo. La actividad de los meristemas permite a las plantas generar continuamente nuevos órganos y estructuras a lo largo de su vida, lo que determina la arquitectura de la planta. Esto contrasta con el desarrollo animal, ya que el plan corporal animal se define principalmente durante el desarrollo embrionario; los adultos generalmente carecen de células madre pluripotentes y las células madre multipotentes funcionan principalmente para mantener la homeostasis tisular y la reparación de los tejidos. En los meristemas, ocurren dos procesos opuestos: la autorrenovación de las células madre se estimula para mantener la población de células madre, y las células se reclutan desde el meristemo hasta órganos en desarrollo. Sorprendentemente, el número de células madre y sus células hijas que se dividen en el meristemo permanece constante, a pesar del desplazamiento continuo de células diferenciadoras hacia nuevos órganos. Esto indica que la formación de nuevas células y la diferenciación celular se equilibran dinámicamente y casi perfectamente. En el caso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y en la cual nos enfocamos en este trabajo, son 2 meristemas con los que cuenta, los cuales son los responsables de casi todo el crecimiento que ocurre postembrionariamente: el meristema apical y el meristemo de raíz, que generan estructuras sobre el suelo y debajo del suelo, respectivamente. La organización celular de estos dos meristemas es dramáticamente diferente. Las quimeras periclinales han revelado que las células del meristemo de brotes están dispuestas en capas discretas en las que la capa externa (L1) se somete predominantemente a divisiones anticlinales para producir la epidermis del brote, mientras que las dos capas internas (L2 y L3) se dividen periclinamente y anticlinalmente, respectivamente, produciendo la mayor parte del tejido interno ([28]).

En contraste con los brotes, los meristemas de raíz son subterminales en su ubicación, ya que las células de la de la raíz, que se desprenden como parte de una vía de diferen-

ciación terminal definida, se producen distalmente y las células del resto de la raíz se producen proximalmente. Los linajes celulares se identifican fácilmente en las raíces debido a los grupos continuos de las células que surgen de las divisiones transversales repetidas en las células meristemáticas.

A partir de ahora nos olvidaremos del meristemo apical y hablaremos únicamente del meristemo de raíz. La morfología externa de la punta de la raíz de *Arabidopsis* se muestra en la figura 1.3A, tomada de [29] Hay tres zonas distintas pero contiguas.

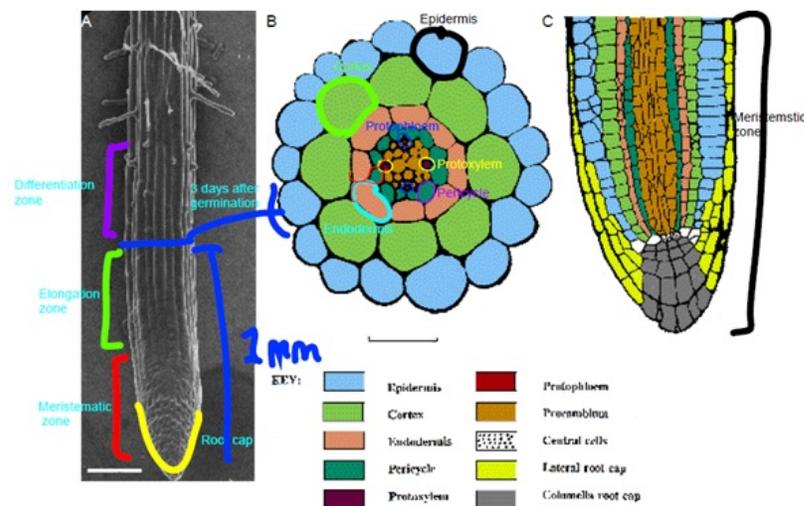


Fig. 1. Organisation of tissues in the *Arabidopsis* root. (A) Exterior view of *Arabidopsis* root. Bar, 100 μ m. (B) Transverse section of root approx. 1 mm behind to the root tip, labeled with anti-pectin antibodies, reverse-printed and colour-coded. (C) Median longitudinal section of root tip, labeled with anti-pectin, reverse-printed and colour-coded. The different cell types are indicated in the colour legend. [29]

Figura 1.3: Anatomía de la raíz de *A. thaliana*

La zona meristemática constituye los 250 micrometros distales de la raíz. Esta zona se caracteriza por pequeñas células apiladas desde el límite de la raíz. Proximal a esta zona, la zona de elongación es visible, que también abarca aproximadamente 250 micrometros. La siguiente zona es la zona de diferenciación, en la cual las células alargadas de los diferentes tejidos maduran en células completamente diferenciadas. El extremo distal de esta zona está marcado por células epidérmicas que están formando protuberancias en sus extremos distales, que madurarán en pelos radiculares. La figura 1.3B muestra una sección transversal coloreada, tomada aproximadamente

a 1 mm de la punta de la raíz primaria de una plántula de *Arabidopsis* 3 días después de la germinación. Este espécimen ilustra la organización característica de la raíz. El cilindro central es diárquico, con dos elementos de protofloema claramente diferenciados y a 90 grados de estos, hay dos elementos del protoxilema. La capa externa del cilindro central, el periciclo, se compone de un promedio de 12 células en circunferencia. Fuera de esta capa está la endodermis, que está compuesta por ocho células. En la región madura de la raíz, los elementos del protoxilema siempre colindan con las células del periciclo que cada una colinda con dos células endodérmicas (los 54 elementos del protoxilema en 27 raíces); las células del protofloema casi siempre flanquean al menos a una célula de periciclo que colinda una sola célula endodérmica (50 elementos protofloem en 27 raíces). La corteza, que colinda con la endodermis en su lado externo, también es un anillo único de ocho células. La epidermis está compuesta por dos tipos celulares discretos, cuya identidad depende de su posición en relación con las células corticales subyacentes. Las células epidérmicas que sobrepasan las paredes anticlinales entre las células corticales adyacentes se diferencian en células que producen pelos radiculares (tricoblastos, [30]). Las células adyacentes de la epidermis colindan sólo con una célula cortical y generalmente no producen un pelo radicular. Las secciones longitudinales mediales a través de la raíz primaria muestran las relaciones de los diversos grupos celulares entre sí (esquematisada en la figura 1.3C).

Las células del meristemo están organizadas en tres niveles de células y, por lo tanto, corresponden a la organización de meristemas cerrados de von Guttenberg ([31]). El nivel inferior de las células (protoderma) se compone de las iniciales de la cubierta más externa de la raíz. El nivel medio (periderma) se compone de células centrales flanqueadas por células que son contiguas a las células de la corteza y la endodermis. El nivel superior de células es contiguo con las células del stele. El nivel inferior forma dos tipos de células de la raíz, la columela central y la cubierta lateral de la raíz, cada una de las cuales surge de grupos de células completamente diferentes en ese mismo

nivel (Figura 1.3C). La columela de la cubierta de la raíz surge de las divisiones periclinales en el grupo de células en la base de la columela denominada 'iniciales de la columela'. La cubierta lateral de la raíz parece surgir de un conjunto de células que forman un collar alrededor de las iniciales de la columela. Por lo tanto, las células de la cubierta lateral de raíz no está relacionada clonalmente con las células de la columela. La epidermis se deriva del mismo conjunto de iniciales que la cubierta lateral de raíz. El nivel central contiene cuatro células centrales que son lateralmente continuas con la corteza y los grupos endodérmicos (figura 1.3C). Estas células no necesitan dividirse para preservar la unión de la columela y el resto de la raíz. También se les conoce como células del centro quiescente. Tanto las células centrales como las iniciales de la columela derivan de la hipófisis, que se divide produciendo una célula lenticelar que da lugar a las cuatro células centrales y, debajo de éstas, una célula se divide para formar las iniciales de la columela. Por el contrario, tanto las iniciales vasculares, las iniciales de la cubierta lateral y epidermis, las iniciales de cortex- endodermis se originan en células derivadas del embrión "propriadamente dicho" (derivadas de la célula distal del proembrio). A continuación mencionaremos los elementos genéticos que se han identificado y su papel en la especificación las células iniciales del meristemo de raíz.

Se han estudiado mucho los componentes genéticos que especifican las células iniciales en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A continuación haremos una revisión de los más importantes.

Comencemos por la hormona Auxina y los elementos necesarios para transportarla, detectarla y mediar la transcripción de los genes de respuesta a esta hormona. Auxin es la palabra que los antiguos griegos usaban para 'crecer', y en 1931 Kögl y Haagen-Smit acuñaron el término auxina para la sustancia que observaron capaz de modular el crecimiento de la planta. Desde entonces, se han realizado muchos esfuerzos para tratar de elucidar los componentes moleculares implicados en la actividad de la auxi-

na durante el desarrollo de la planta. La auxina bioactiva es el ácido indol-3-acético (IAA) ([32]). IAA es un ácido débil ($pK = 5.4$) que existe en la planta como forma libre o está conjugado a un azúcar o aminoácido para su degradación o almacenamiento.

Los genes que codifican los componentes moleculares de la vía biosintética de IAA se expresan en la raíz y su actividad es necesaria para controlar el desarrollo de la raíz. Las respuestas al desarrollo de la hormona vegetal auxina (IAA) están mediadas por pares interactivos de dos familias de proteínas: proteínas inhibidoras Aux-IAA de corta duración y factores de transcripción ARF (Auxin Response Factor, por sus siglas en inglés). Estas últimas tienen en común un dominio que reconoce la llamada región ERA (Elemento de Respuesta a Auxina o ARF, por sus siglas en inglés, y por el que reciben su nombre, la cual es 5'-TGTCTC-3') ([33]). Un ejemplo de este par interactivo de Aux-IAAs con ARFs nos lo provee el gen *MP* (*MONOPTEROS*) y el gen *BDL* (*BODENLOS*). *MP* fue uno de los primeros ARFs en ser estudiado, el cual es importante para controlar una correcta respuesta a IAA. Se sabe que participa en la especificación de células vasculares, principalmente porque las mutaciones en el gen interfieren con la formación de estas células en todas las etapas y también con el establecimiento del eje apico-basal en el embrión temprano ([34]). Respecto al gen *BDL*, se le ha identificado como gen necesario para detectar IAA y formar la raíz principal, junto con la especificación del QC de *A. Thaliana*, ya que plantas carentes de este gen tienen muchas deficiencias en la organización interna de su raíz ([35]). Y se ha demostrado que *BDL* consigue todo lo anterior al inhibir a *MP* ([36]). Otros 2 ejemplos de genes Aux-IAA son *AUX3* o *IAA17* y *SHY2* o *IAA3* ([37], [38]).

Entonces, un panorama muy general de la respuesta genética a Auxina es la siguiente: Todo inicia con la detección del IAA intracelular por parte de unos receptores muy específicos, los receptores TIR1 / AFB (RESISTENTE AL TRANSPORTADOR INHIBIDOR 1 / SEÑAL AUXILIAR F-BOX). TIR1 y AFB1-AFB5 contienen la F-box

que participa en el complejo de ubiquitina ligasa SCFTIR1 ([39]). Después, Las proteínas Aux-IAA se unen a los ARFs y evita que se transcriban genes que responden a auxinas. La transducción de señal de auxina depende fuertemente de la concentración intracelular de auxina. Una alta concentración de IAA actúa para estabilizar la unión de los receptores TIR1 / AFB a las proteínas de auxina / IAA (Aux- IAA) que causan la ubiquitinación y la degradación de Aux- IAA a través del proteasoma. Las proteínas Aux- IAA funcionan a través de la heterodimerización con ARFs, reprimiendo así su actividad transcripcional. Por lo tanto, la degradación Aux-IAA causa la activación de los ARFs que modulan la transcripción de genes diana sensibles a auxinas, uniéndose al ERA (ARE: 5'-TGTCTC-3') ([40]). A una baja concentración de IAA, el complejo ubiquitina ligasa SCFTIR1 muestra menos afinidad por proteínas Aux- IAA, por lo que aumenta la cantidad de proteína Aux-IAA estable, lo cual provoca la formación de heterodímeros Aux-IAA - ARF lo cual inhibe la transcripción de genes diana.

Otro grupo de genes que pese a que tienen una respuesta tardía a la presencia de IAA, se demostró ([41]) que son necesarios y no independientes para tener una respuesta a Auxina en el meristemo de raíz, son los genes *PLT* (*PLETHORA*). En el genoma de *A. thaliana* existen 4 genes *PLT*. Primeramente se demostró que los genes *PLTs* son imprescindibles para el desarrollo de la raíz, cuando sólo se conocían 2 *PLTs* ([41]), *PLT1* y *PLT2*, se demostró que es necesario perder ambos genes para observar el deterioro de la raíz, al perder uno solo, el desarrollo de la raíz se mantiene, lo que indicó que estos 2 genes son redundantes en el mantenimiento del meristemo de la raíz. Respecto a los últimos 2 *PLTs*, *PLT3* y *PLT4* en conjunto con los 2 pasados *PLTs*, se demostró ([42]) que las actividades de *PLT* son principalmente aditivas y dependen de la dosis. Los altos niveles de actividad de *PLTs* promueven la identidad y el mantenimiento de las células madre, mientras que niveles más bajos promueven la actividad mitótica de las células hijas de las iniciales, y por último que con una

mayor reducción se promueve la diferenciación celular.

Además, se ha demostrado que, los 4 componentes previos (IAA, *ARFs*, *Aux-IAA* y *PLTs*) están presentes (IAA) y expresados (*Aux-IAA*, *ARFs* y *PLTs*) en todos los tipos de células iniciales presentes en el meristemo de raíz (células del Centro Quiescente, iniciales vasculares, iniciales Cortex-Endodermis, iniciales de columela e iniciales de capa lateral de raíz y epidermis) sus funciones son necesarias para mantenerlas como iniciales. Específicamente en el caso de IAA la ubicación y restricción a ese espacio de una concentración máxima de IAA, la cual se consigue con transportadores (AUX1, LAX1, LAX2 y LAX3) ([42][43]) Y exportadores PINs, de los cuales hay 8 en el genoma de *A. thaliana*, pero sólo de 6 se ha caracterizado su transcrito ([44]), generan la especificación de las células iniciales vasculares, de las iniciales de columela y las células del Centro Quiescente ([45]).

Otro grupo de genes que tiene una gran importancia en la especificación de las células iniciales del meristemo de raíz y que no están involucrados en una respuesta a auxina, son los *SHORT ROOT (SHR)*, *SCARECROW (SCR)*, *MAGPIE (MGP)* y *JACKDAW (JKD)*. La primera función que se asoció a *SHR* fue la de especificar a las células de endodermis, porque en las plantas carentes del gen, solamente se forma una capa de células entre el periciclo y la epidermis, mientras que en plantas silvestre son 2 capas. Además, 2 marcadores de endodermis se pierden en estas plantas carentes del gen ([46]) En el caso de *SCR*, los primeros estudios lo identificaron como necesario para generar 2 capas entre el periciclo y la epidermis. También tiene gran importancia para la identidad celular es en las células del centro quiescente, las cuales pierden parcialmente su identidad en plantas mutantes que no tienen este gen ([47]) El factor de transcripción *SHR* se desplaza hacia el tejido del endodermis y cortex desde su sitio de transcripción en el estele. Las células vasculares iniciales también lo expresan ([100]) En *SHR* y el factor de transcripción *SCR* controlan una división

celular orientada en hijas de células iniciales de cortex- endodermis. La acción de *SHR* y *SCR* está regulada por dos proteínas de la familia de dominio indeterminado (IDD, por sus siglas en inglés), *JACKDAW* (*JKD*) y *MAGPIE* (*MGP*), los cuales regulan los límites de los tejidos y la división celular asimétrica. Además, la expresión de *MGP* depende de *SCR* y *SHR*, y sólo se expresa en el centro quiescente ([49]); en el caso de *JKD*, su expresión se realiza de manera independiente a la de *SHR* y su función específica es regular el dominio de expresión de *SCR* fuera del stele ([50]). *JKD* se expresa tanto en el centro quiescente como en la iniciales de cortex-endodermis ([49]).

Por último, hay un gen que sólo se expresa en las células del centro quiescente y que al inhibir su expresión ocasiona la pérdida de identidad a dichas células, y es el gen *WOWCHEL-RELATED HOMEODOMAIN BOX5* (*WOX5*), es un homólogo del gen *WUSCHEL* (*WUS*), el cual mantiene de manera no autónoma a las células madre en el meristemo de los brotes. La pérdida de la función *WOX5* en el nicho de células madre del meristemo de la raíz causa la diferenciación terminal en las células iniciales distales y, de forma redundante con otros reguladores, también provoca la diferenciación del meristemo proximal. Por el contrario, la ganancia de la función *WOX5* bloquea la diferenciación de los descendientes de células madre distales que normalmente se diferencian ([51]).

Dado que nuestro interés de aproximación experimental a la Biología del Desarrollo de la Raíz de *A. thaliana* es enfocarnos en su complejidad, dejemos por ahora la práctica de ver al desarrollo en términos de secuencias de DNA, células y órganos, e introduzcamos el marco conceptual (Biología de Sistemas) y el marco teórico (Perspectiva de la Teoría de Sistemas Dinámicos hacia la Biología Celular) con el que trabajaremos el resto del tiempo.

1.1.3. Biología de Sistemas

La Biología de Sistemas es un intento de redefinir las prioridades de la Biología como disciplina, enfocándose en su complejidad e integración. Existen diferentes aproximaciones de la Biología de Sistemas y cada una de ellas enfatiza diferentes principios ([52]). Algunas son extensiones de la biología molecular e intentan modelar las redes moleculares que subyacen la diversidad fenotípica de cada especie y entre ellas. En estas aproximaciones, los modelos propuestos están fundamentados en información bioinformática (secuencia de genomas, composición de las proteínas, etc.) y los experimentos se llevan a cabo para confirmar o negar un modelo. Por lo tanto, hay un ciclo continuo de experimentación de laboratorio y de modelación computacional.

Otra aproximación de la Biología de Sistemas está representada por la Aproximación de la Teoría de Sistemas que intenta entender los principios detrás de la organización biológica y relacionarla con los diferentes niveles de organización (genes, células, tejidos, órganos, organismos, ecosistemas, etc.). Respecto a la Biología del Desarrollo, la Teoría de Sistemas provee una visión complementaria, más abstracta, de mirar al Desarrollo: Ella ve al Desarrollo como flujo de información. Esta información está contenida en los genes, los órganos y el ambiente externo. De hecho, si el flujo de información es el proceso que unifica estas entidades dispares, uno esperaría poder establecer ecuaciones y modelos para el fenómeno del Desarrollo. Dicho modelaje es una de las metas de muchos biólogos de sistemas del Desarrollo ([53]).

Esto último nos hace pensar ¿qué es un modelo? ¿acaso un modelo es una buena representación o aproximación de la realidad? ¿tiene limitantes trabajar con un modelo?

Una buena forma de contestar esto es con una metáfora. Platón escribió un cuento conocido como el cuento de la cueva de Platón, cuyo tema central es la relación entre un modelo y realidad. El cuento comienza explicando la existencia de prisioneros

neros encadenados en lo profundo de una cueva de tal manera que su visión está limitada a una sola pared de la cueva. Detrás de los prisioneros hay una gran fogata y varias personas que están usando la luz que emana de la fogata para proyectar objetos tridimensionales como animales y plantas en la pared de la cueva. Platón propone que los prisioneros están encadenados desde su niñez y nunca han visto algo más que las sombras proyectadas en la pared. Por lo cual, ellos asumen que esas sombras son la realidad, aunque esas sombras no son más que simplificaciones, modelos de dos dimensiones de los objetos tridimensionales proyectados detrás de ellos. Entonces, un modelo es una simplificación de la realidad y está limitado por nuestra visión sobre el sistema real y las hipótesis inherentes del modelo. [54].

Aunque el énfasis sobre las prioridades que hay que resaltar difieren ampliamente entre los Biólogos de Sistemas, como vimos en los párrafos previos, la Biología de Sistemas puede ser caracterizada en 4 principios. El primero refiere a las propiedades dependientes del Contexto. El significado o rol de un componente individual de un sistema es dependiente de su contexto, en lo que hay antes, después, arriba o debajo de él. El segundo refiere a las propiedades específicas de cada nivel de organización y a la propiedad de emergencia. Las propiedades de un sistema a cualquier nivel de organización determinado no puede ser totalmente explicado por aquellos niveles debajo de él. Entonces, por ejemplo, la temperatura no es una propiedad de un átomo, si no una propiedad que emerge de un conjunto de átomos. De igual manera, el potencial de Voltaje es una propiedad de la membrana biológica y no de sus componentes. Las propiedades de niveles superiores resultan de las actividades de los niveles de inferiores, pero deben ser entendidos en el contexto que se este manejando. El tercero refiere a la causalidad heterogénea y a la integración. En biología, la causalidad es vista en dos direcciones, de abajo hacia arriba, i.e., de los genes hacia el ambiente y de arriba hacia abajo, i.e., desde el ambiente hacia los genes. Mientras que lo que es la célula

depende de ambos, de sus genes y de las otras células que la rodean a ella (i.e., en las señales que recibe de las fuentes internas y externas). La Biología de Sistemas demanda la integración de diferentes tipos de explicación, por ello necesita de la integración de los análisis (considerar las cosas separadas) y la síntesis (tomar las cosas juntas). La cuarta y última refiere a la modularidad y a la robustez. El organismo se comporta como un sistema conformado de módulos. Raff [53] definió un módulo del desarrollo como un elemento que tiene especificación genética discreta, organización jerárquica, interacción con otros módulos, una localización física particular dentro de un organismo en desarrollo y la habilidad de pasar por transformaciones debido tanto escalas de tiempo del desarrollo como escalas de tiempo evolutivos. La robustez (algunas veces llamada canalización) refiere a la habilidad de un organismo de desarrollar el mismo fenotipo pese a perturbaciones del ambiente o pese a mutaciones. Denis Noble [55] escribió que la meta última de la Biología de Sistemas es el reconectar los modelos Fisiológicos y los modelos del Desarrollo con las teorías evolutivas. También hizo notar que apenas se está iniciando esta tarea. A Continuación describiremos el marco teórico que usaremos en estudiar de manera sistémica el NCT de la Raíz de *A. thaliana*.

1.1.4. La Perspectiva de la Teoría de Sistemas Dinámicos hacia la Biología Celular

El objetivo de esta sección es presentar las definiciones y elementos necesarios para describir el modelo matemático-computacional que usaremos para estudiar la dinámica e interacción de los principales genes del NCT de la Raíz de *A. thaliana*. La primera definición que necesitaremos es la de una red de regulación genética (RRG), la cual es una representación gráfica donde los nodos de una gráfica representan la forma funcional de una proteína y los trazos dirigidos representan el mecanismo de

activación o inhibición [56, 57]. El segundo elemento a presentar es el postulado de la Teoría de Sistemas Dinámicos hacia la Biología Celular, pero como precedente de él mencionaremos la conceptualización genética de una célula propuesta por Waddington. Cabe mencionar que Conrad H. Waddington, realizó contribuciones considerables tanto a la Biología del Desarrollo como a la Biología de Sistemas. Él veía al desarrollo como un paisaje montañoso y a los tipos celulares como valles o cuencas dentro de dicho paisaje (ver Figura 1.1). Como una pelota rodando colina abajo, una célula eventualmente se encontraría a si misma en uno u otro de estos valles o cuencas, debido principalmente a las interacciones entre los componentes genéticos de dichas células. Recientemente, una visualización moderna de la imagen del paisaje de Wad-

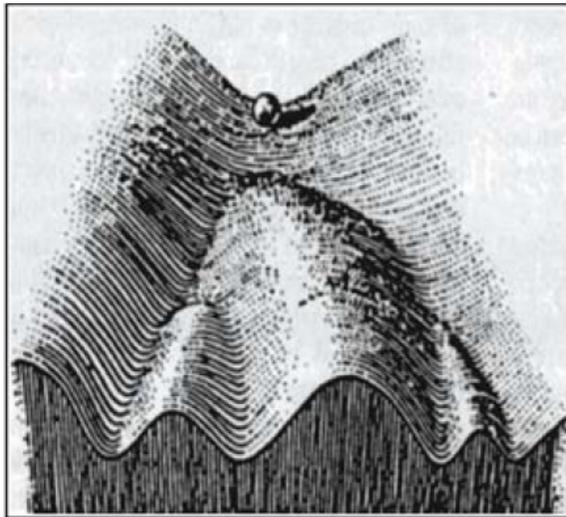


Figura 1.4: Paisaje

ddington ha surgido desde el contexto de las RRG. Kauffman ([58], [59] y [60]) y otros ([61] y [62]) ven a los valles o cuencas de la visión de Waddington como una configuración estable y robusta de la expresión de los genes. Y es justo con esta visualización moderna con la que se puede describir el postulado de la teoría de sistemas dinámicos hacia la biología celular, la cual supone que el comportamiento de una célula puede entenderse con las propiedades dinámicas de la red de regulación asociada a dicho comportamiento celular. Esta idea, particularmente en el contexto del desarrollo, es

compatible con la idea de Waddington, y ahora está sustentada por trabajo teórico y experimental sólido [58, 60, 62, 61, 63], gracias a que las técnicas experimentales modernas han permitido que el número conocido de interacciones entre genes crezca y que por consecuencia los mecanismos de regulación genética puedan llegar a ser entendidos. Como consecuencia, el rol de mando de las RRG en la dinámica del desarrollo es ahora ampliamente aceptado. Y un ejemplo muy claro que valida el postulado es la demostración experimental de que es posible convertir tanto células pancreáticas exocrinas como células de hígado en células pancreáticas endocrinas, con sólo manipular un conjunto de Factores de Transcripción ([18]). Muchas combinaciones de FT y potenciadores se suponen inestables. Aquellas combinaciones que son estables, sin embargo, pueden convertirse en tipos celulares. Huang y sus colegas ([62] y [61]) han dado evidencia basada en un análisis con enfoque de teoría de sistemas de que las células neutrófilas (un tipo de células blanca de la sangre) son un tipo celular estable. Su análisis computacional que conectó cerca de 2750 genes en redes, encontró que el patrón de expresión de los genes de las células neutrófilas es el patrón más estable, y que el único rival para este tipo celular es la célula neutrófila con leucemia.

Habiendo dicho lo que es una RRG y el postulado de la Teoría de Sistemas Dinámicos hacia la Biología Celular, tenemos ya descritos los elementos que necesitamos para modelar a una célula como un sistema dinámico. Para empezar, debemos asumir que el estado de una célula en cierto tiempo puede ser descrito como un conjunto de variables dependientes del tiempo. Como una primera aproximación, podemos asumir que una cantidad de proteínas diferentes y sus respectivos niveles de expresión, son los elementos necesarios y suficientes para describir el estado de una célula en el tiempo t , y suponer que este estado corresponde a un fenotipo celular. Por lo tanto, la expresión de estas proteínas puede ser tomado como un conjunto de variables que representan el estado de una célula. Es posible expresar lo anterior en términos de una

RRG. Podemos hacer que cada nodo de una RRG de la célula en cuestión represente una variable. Entonces, al conjunto de variables lo podemos representar matemáticamente como un vector, donde cada elemento representa el nivel de expresión de una proteína:

$$x(t) = (x_1(t), x_2(t), \dots, x_N(t)) \quad (1.1)$$

En el cual N es el número de proteínas, variables o nodos de la RRG, $x_i(t)$, con i elemento de $1, 2, 3, \dots, N$, corresponde al nivel de expresión de cada proteína, variable o nodo de la RRG en el tiempo t , y $x(t)$ corresponde al estado de la célula en el tiempo t y que podemos suponer que es un fenotipo celular. Por lo tanto, podemos decir que el vector matemático representa un fenotipo celular. Además, cualitativamente es útil ver la expresión de una proteína no en términos de concentraciones, sino como presente o ausente. Matemáticamente la presencia se representará con un 1 y la ausencia como un 0. De esta manera, el vector matemático compuesto solamente por combinación de ceros y unos también representa un fenotipo celular. Lo anterior debe hacerse pensando en usar la menor cantidad de proteínas, de tal forma que al considerarlas nos permita distinguir entre cada tipo celular en cuestión, pese a que la expresión de algunas proteínas no sea exclusiva de un tipo celular. Un ejemplo de lo anterior es nuestro caso, en el cual 3 elementos (Auxina, las proteínas ARFs y las proteínas Aux-IAA) están expresados o presentes (el caso de Auxina que no es proteína) en los 4 tipos celulares considerados (células del centro Quiescente, iniciales de cortex endodermis, iniciales de vasculares e iniciales de columela-epidermis).

Regresemos a la descripción del modelo, como hemos propuesto ver al estado de una célula como un conjunto de variables dependientes del tiempo, específicamente siendo las variables dependientes del tiempo el nivel de expresión de cada elemento del conjunto de proteínas, entonces podemos proponer un modelo determinista, si determinamos las funciones matemáticas que nos permitirán ir actualizando el nivel

de expresión de cada elemento del conjunto de proteínas cada vez que la variable tiempo (t) cambie. Para nuestros fines, podemos hacer que la variable tiempo cambie de unidad entera en unidad entera, i.e., que sea una variable discreta, y las funciones matemáticas que adoptaremos serán las funciones booleanas (ver Métodos), las cuales reflejan directamente la naturaleza de las interacciones entre proteínas, mismas que son posibles de analizar y visualizar en una gran diversidad de estudios genéticos de pérdida y ganancia de función que hay en la literatura. Con lo anterior, tenemos los dos elementos necesarios para hablar de la Dinámica del Sistema. La ventaja de considerar ceros y unos, dependiendo del número de variables dependientes del tiempo consideradas, en este caso, la cantidad de proteínas, es que la combinación de ceros y unos es finita. La cantidad de combinaciones sigue la función potencia de 2^N , Donde N es el número de proteínas consideradas. Cabe mencionar que al conjunto de estas combinaciones se le llama espacio de estados. Ahora, llamemos a cada una de estas combinaciones condición inicial, recordando además que son un vector matemático que representa un fenotipo tan sólo representa una combinación específica de expresión o no expresión de las N proteínas consideradas. Siendo algunas de ellas representativas de un tipo celular particular y otras que no.

Habiendo dicho lo que es una condición inicial, pasemos a explicar en lo que consiste la dinámica del sistema. Empecemos con un conjunto de funciones booleanas dado, las cuales reflejen la influencia de unas proteínas sobre el nivel de expresión de otras proteínas. Al movernos una unidad de tiempo sobre una condición inicial, las reglas booleanas se aplicarán, y los niveles de expresión de cada una de las proteínas del conjunto considerado cambiarán o algunas de ellas se mantendrán, y, por la visión cualitativa de presencia o ausencia de una proteína, la combinación de ceros y unos también cambiará. Sucede que existen combinaciones de ceros y unos que una vez que se llega a ellos, sin importar la cantidad de veces extra que se le aplique el con-

junto de funciones booleanas, no cambiarán. A las combinaciones de ceros y unos que poseen esta propiedad se les denominan Atractores. Interpretar biológicamente a los atractores resulta interesante. Partiendo de que un atractor es un vector matemático compuesto solamente de ceros y unos, y por lo dicho previamente, representa un fenotipo celular, la particularidad de un atractor es que no es transitorio y se mantiene por tiempo indefinido. Lo anterior apunta a que los atractores corresponden a estados celulares visibles macroscópicamente, permanentes y constantes [64].

Por último, un término que debemos explicar porque más tarde lo usaremos (ver Métodos), y que recientemente se le dió una interpretación biológica [106], es el de cuenca de atracción. A una cuenca de atracción siempre se le asocia un único atractor y lo representa un porcentaje, el cual indica la proporción de condiciones iniciales que llegan a dicho atractor al aplicarles muchas veces el conjunto de funciones booleanas consideradas. El significado consiste en interpretar el tamaño (la cantidad de condiciones iniciales que abarcan) de la cuenca como la probabilidad que tiene una célula de llegar al destino celular que corresponde al atractor de la cuenca. La cantidad de cuencas y su tamaño determina la dinámica del sistema. Nosotros nos referiremos a esta estructura ordenada de cuencas en el espacio de estados como el PA.

Un modelo dinámico booleano preliminar (Ver Métodos) para el Nicho de Células Troncales de la Raíz de *Arabidopsis thaliana* ya fue diseñado en [65]. A continuación describiremos brevemente las características de dicho modelo, sus variantes, y más adelante el análisis hecho a él en este trabajo.

1.1.5. La Red de Regulación Genética del Nicho de Células Troncales de la Raíz de *Arabidopsis thaliana*

Existe un modelo dinámico discreto preliminar (con 4 modelos diferentes: A, A', B y B') basado en RRG para el NCT de la raíz de *A. thaliana* (RRG-NCT), propuesto por Azpeitia et. al. 2010 [65]. Este modelo propone perfiles o configuraciones de expresión para los genes incluidos en esta red que coinciden con los reportados en la literatura para los tipos celulares del NCT de la raíz de *A. thaliana* (ver Sección 1.1.2). La red está fundamentada en datos experimentales para más de 10 componentes moleculares y sus interacciones. Los nodos que están en todos los modelos son: SHR, SCR, JKD, MGP, WOX5, AUX, IAA, ARF y PLT. Algunos nodos contemplan un único gen, mientras que otros, por simplificar y reducir al máximo la cantidad de componentes genéticos y sus interacciones representan a más de un gen. A continuación describiremos dicha representación. El nodo SHR (SHORTROOT) y SCR (SCARECROW) Cada uno representa a un único gen y es al que lleva su nombre. Lo mismo ocurre con los nodos JKD, MGP, y WOX5. En el caso del nodo PLT este representa a los 4 genes *PLT* de *A. thaliana*, y la razón es porque hasta cierta medida los 4 se pueden considerar redundantes en la función que tienen de mantener indeterminado al meristemo de raíz ([41] y [42]). En el caso del nodo Auxin, este representa no a un gen si no a la molécula Auxina, sin distinguir si es la forma activa, protonada o neutra. Por último, los nodos ARF e IAA no representan a genes particulares, si no representan la característica general de su respectiva familia de proteínas, porque el mecanismo de acción es prácticamente el mismo (ver sección 1.1.2).

Estos modelos (A, A', B y B') están fundamentados en evidencia experimental. Las figuras 1.2 y 1.3 resumen los genes e interacciones que consideran respectivamente los modelos A y los modelos B. Primero cabe mencionar la diferencia que hay entre los

modelos A y A' con los modelos B y B', la cual radica en la interacción entre 3 genes. El modelo A (y también el A') asume que el gen *MAGPIE* (*MGP*) [66] reprime al gen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*) [49] y viceversa, mientras que el modelo B (al igual que el B') asume que en raíz existe un mecanismo similar al del meristemo aéreo donde el gen *WUS* (*WUSCHEL*, equivalente a *WOX5*), fuera del Centro Organizador (un grupo de células equivalentes a las que están en el QC del meristemo de raíz) es reprimido por la proteína *CLV3* (*CLAVATA3*). Al asumir que en el meristemo de raíz existe un mecanismo similar al descrito anteriormente, también se asume que la proteína inhibidora de *WOX5* es muy parecida a *CLE3*, por lo cual a este gen se le llamó *CLEX*, donde la X al final se le hace referencia a un elemento desconocido. En este mismo modelo (B y B') se mantuvo la represión del gen *WOX5* sobre el gen *MGP*, pero se removió la interacción de *MGP* a *WOX5*. La única diferencia entre los modelos A y B con sus análogos primarios (A' y B') está en la línea 14 de las reglas lógicas de *SCR*; los modelos originales (A y B) mantienen apagado (0) a *SCR* y las versiones (A' y B') lo mantienen prendido (1) (ver tablas 1.1, 1.2 y 1.3). De todas las interacciones que muestran las figuras 1.2 y 1.3, sólo la activación del gen *SCR* y el gen *MGP* por el dímero protéico *SHR/SCR*, la Auxina reprimiendo las proteínas IAA y las proteínas IAA reprimiendo los genes que componen al nodo ARF, han sido experimentalmente confirmados como interacciones directas. El resto son interacciones indirectas o no confirmadas experimentalmente como directas. Como el objetivo de este trabajo es hacer un análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma. Y con ello, analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de los genes son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro. Por lo anterior se eligió el modelo A (que consta de 9 nodos: *SHR*, *SCR*, *MGP*, *JKD*, *WOX5*, *PLT*, *ARF*, Auxina, e IAA) por dos razones principales: primero, porque utiliza ele-

mentos ya conocidos, cosa que el modelo B no hace (p.ej. CLEX). Y segundo, porque recupera sólo 4 atractores (CQ, IV, CE_p y CE_n) a diferencia de los 5 que recupera el modelo B. Este modelo (el A) fue verificado en [65] de dos formas diferentes: (1) mediante pérdidas y ganancias de función y (2) mediante un análisis de robustez. La pérdida de función convierte el estado del nodo X a 0 en todas las tablas lógicas en donde funga como regulador. En el caso de ganancia de función es lo mismo que lo anterior, pero el valor al que se cambia es a 1. El fundamento es que la pérdida de función corresponde a una mutación *knock-out* o a un silenciamiento transcripcional, y la ganancia de función corresponde a una sobreexpresión del gen. La verificación se consiguió al comparar y no encontrar discrepancias entre los fenotipos, observados y confirmados experimentalmente, de los mutantes y los atractores que se obtienen al correr la dinámica con las modificaciones hechas en las tablas lógicas. Para la RRG-NCT en esta verificación, sólo se encontraron tres discrepancias (2 en pérdida de función con *MGP* y *JKD* y 1 en ganancia de función con *SHR*, ver [65]). El análisis de robustez se consiguió al realizar alteraciones puntuales en los estados del nodo X al azar, que generan las reglas lógicas de los componentes reguladores del nodo X. Después de realizar esta alteración, a partir de todas las condiciones iniciales posibles (en este caso 512), se obtienen los atractores de la dinámica de esta red y se compara con los atractores de la dinámica del modelo discreto de la red sin alteraciones. Lo anterior se repite hasta que la proporción de redes que generan nuevos atractores (respecto a los atractores de la red sin alterar) es cero. Véanse [63, 68] como ejemplos en donde se usaron estas dos formas de verificar. Para el modelo A, el 62.85 % de las alteraciones probadas no generaron un nuevo atractor o al menos mantuvieron los cuatro atractores de la RRG-NCT [65].

ARF	SHR	SCR	MGP	WOX5	WOX5
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	0	0
0	0	0	1	1	0
0	0	1	0	0	0
0	0	1	0	1	0
0	0	1	1	0	0
0	0	1	1	1	0
0	1	0	0	0	0
0	1	0	0	1	0
0	1	0	1	0	0
0	1	0	1	1	0
0	1	1	0	0	0
0	1	1	0	1	0
0	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0
1	0	0	1	0	0
1	0	0	1	1	0
1	0	1	0	0	0
0	0	1	0	1	0
1	0	1	1	0	0
1	0	1	1	1	0
1	1	0	0	0	0
1	1	0	0	1	0
1	1	0	1	0	0
1	1	0	1	1	0
1	1	1	0	0	1
1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1

SHR	SCR	JKD	MGP	SCR
0	0	0	0	0
0	0	0	1	0
0	0	1	0	0
0	0	1	1	0
0	1	0	0	0
0	1	0	1	0
0	1	1	0	0
0	1	1	1	0
1	0	0	0	0
1	0	0	1	0
1	0	1	0	0
1	0	1	1	0
1	1	0	0	1
1	1	0	1	0/1
1	1	1	0	1
1	1	1	1	1

Tabla 1.1: Reglas lógicas de los Modelos A. 9 genes están considerados en el Modelo A, y aquí se presenta la influencia de sus reguladores. El nodo que está siendo regulado está resaltado en negritas.

SHR	SCR	WOX5	MGP	SHR	SCR	JKD	ARF	PLT
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	1	1
0	0	1	0	1	1	1		
1	1	0	0					
1	1	1	0					
1	1	0	1					
1	1	1	0					
IAA	ARF	Auxin	IAA	Auxin	Auxin	SHR	SHR	
0	1	0	1	0	1	0	1	
1	0	1	0	1	1	0	1	

Tabla 1.2: Continuación de reglas lógicas de los Modelos A. Ver Tabla 1.1.

ARF	SHR	SCR	CLEX5	WOX5	SHR	CLEX	CLEX
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	1	0
0	0	1	0	0	1	0	0
0	0	1	1	0	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	1	0	1	1	1
1	0	1	0	0			
1	0	1	1	0			
1	1	0	0	0			
1	1	0	1	0			
1	1	1	0	1			
1	1	1	1	0			

Tabla 1.3: Reglas lógicas de los Modelos B. Como se puede apreciar en las Figuras 1.2 y 1.3, sólo dos interacciones son diferentes entre los modelos A y los Modelos B (ver texto). En esta tabla sólo se presentan las reglas lógicas de esas dos interacciones que el modelo B posee y el A no. El nodo que está siendo regulado está resaltado en negritas.

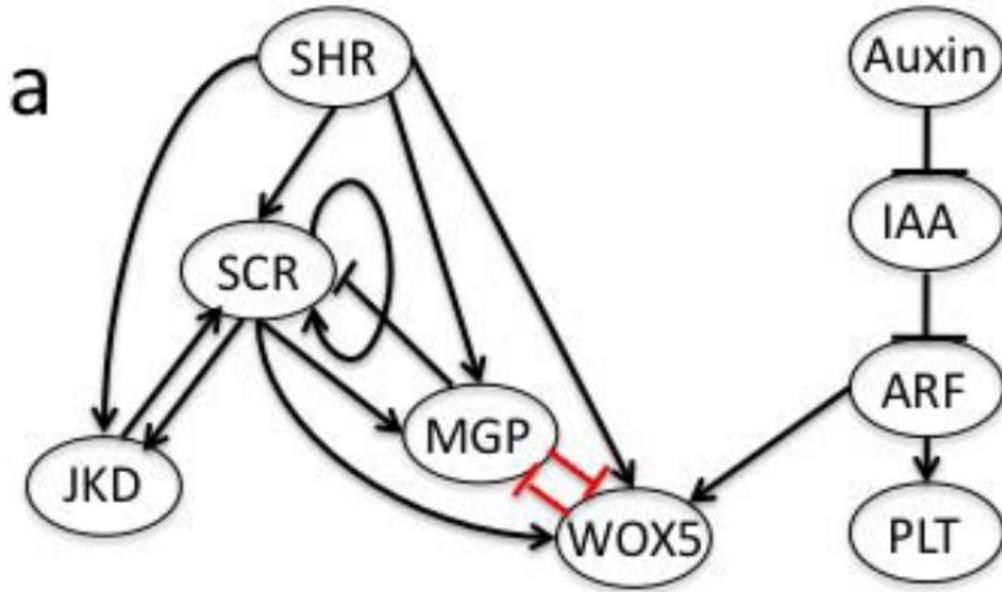


Figura 1.5: Modelo A. Las interacciones de regulación están indicadas por flechas (activación) o flechas terminadas en barra (represión) en la RRG. Las interacciones resaltadas en rojo son las interacciones que caracterizan a este modelo. Es importante hacer notar que las flechas pueden representar tanto una interacción directa como una interacción mediada por uno o más intermediarios moleculares.

1.1.6. Reestructuración del Paisaje de Atractores

En la teoría de sistemas dinámicos, un cambio cualitativo en el espacio de estados en respuesta a cambios en algún parámetro se le conoce como una bifurcación [69]. La aparición o desaparición de atractores, los cambios en el volumen de las cuencas de atracción son ejemplos de cambios cualitativos en el espacio de estados. En el ámbito de la Biología Celular estos cambios cualitativos corresponden a cambios topográficos en el Paisaje de Atractores (PA). Lo anterior, con respecto a la escala de tiempo que se considere, tiene dos interpretaciones: Primero, con respecto a grandes escalas de tiempo (escalas evolutivas), en el marco conceptual de Waddington, estos cambios topográficos en el PA corresponden a cambios ocasionados por mutaciones genéticas. Segundo, con respecto a pequeñas escalas de tiempo, en el marco conceptual del desarrollo, estos cambios topográficos corresponden a eventos como:

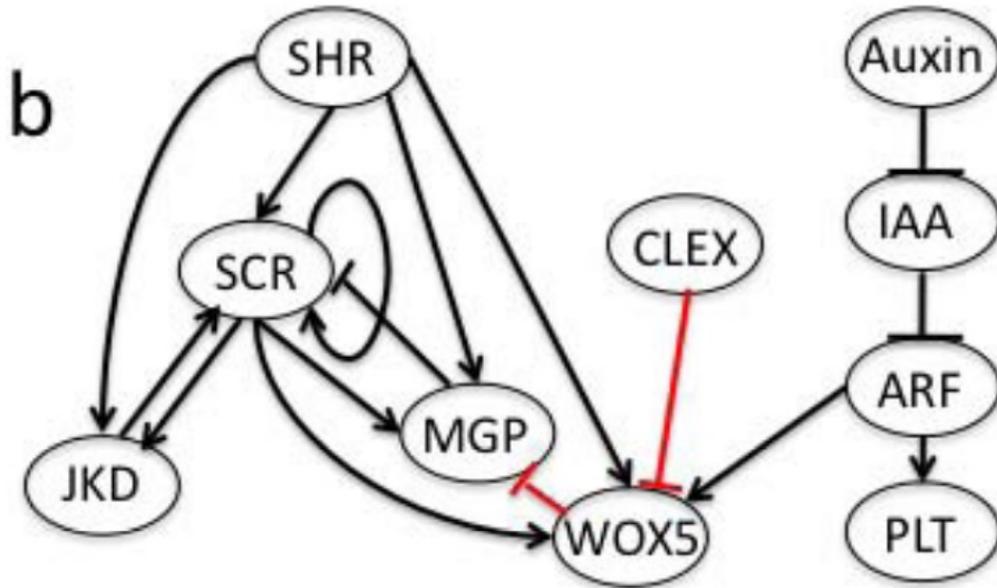


Figura 1.6: Modelo B. Las interacciones de regulación están indicadas por flechas (activación) o flechas terminadas en barra (represión) en la RRG. Las interacciones resaltadas en rojo son las interacciones que caracterizan a este modelo. Es importante hacer notar que las flechas pueden representar tanto una interacción directa como una interacción mediada por uno o más intermediarios moleculares.

desarrollo embrionario, diferenciación celular, morfogénesis y ciclo celular, entre otros. El parámetro responsable de cambios en estos últimos eventos puede corresponder a eventos de señalización y/o fluctuaciones estocásticas, por mencionar algunos. Recientemente se propuso un esquema teórico general [70], que permite analizar de manera semicuantitativa (mediante la presencia de bifurcaciones en las gráficas) el efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red en el paisaje de los atractores de la misma. Y con ello, permite analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de gen son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro. Dicho esquema teórico ya fue usado en otra RRG con fundamento experimental [63, 106, 71, 72], la RRG de Especificación del órgano Floral (RRG-EOF) de *Arabidopsis thaliana*. Y resultó ser útil para identificar nodos capaces de reestructurar el PA. Lo anterior es lo que se busca en este trabajo, hacer un análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada

uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma. Y con ello, analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de los genes son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro, usando el esquema teórico antes mencionado.

1.2. Hipótesis

Alterar los niveles de expresión de los genes a través de modificar la tasa de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* genera cambios en el Paisaje de Atractores.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Hacer un análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma.

1.3.2. Objetivos Específicos

(1) Confirmar la utilidad de alterar las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje para hacer que el sistema cambie de un atractor a otro.

(2) Proponer y analizar la dinámica de un modelo continuo (de Ecuaciones Diferencia-

les Ordinarias) equivalente al modelo discreto (booleano).

(3) Realizar un análisis de bifurcación como en [73] para cada uno de los genes de la red de cada atractor.

(4) Caracterizar el rol funcional de los genes de acuerdo a su capacidad de generar cambios en el PA.

Capítulo 2

Métodos

El objetivo de este trabajo es hacer un análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma. Y con ello, analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de los genes son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro. Para cumplirlo, se usará un modelo continuo [73], donde se variará el parámetro de degradación de cada nodo. Para variar el parámetro de degradación de los genes en el modelo continuo, 3 pasos serán necesarios: 1) Caracterizar el comportamiento dinámico del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT y su PA asociado. 2) Transformar el modelo discreto (booleano) en un sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDOs). 3) Determinar la equivalencia del modelo continuo (sistema de EDOs) con el modelo discreto (booleano). Por último se realizará un análisis de bifurcación para cada nodo por cada atractor, para cada uno de los 4 atractores, usando la tasa de degradación de cada nodo como parámetro de control.

2.1. Análisis dinámico del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT

Como lo dijimos en la sección de La Perspectiva de la Teoría de los Sistemas Dinámicos hacia la Biología Celular, las funciones booleanas reflejan, de una manera muy simple, la influencia de unas proteínas sobre el nivel de expresión de otras proteínas. Pero, ¿Qué son? Primero comencemos con decir que una red booleana es un modelo dinámico con tiempo discreto y variables discretas. El modelo puede expresarse formalmente como:

$$x_i(t + 1) = F_i(x_1(t), x_2(t), \dots, x_k(t)),$$

donde están inmersas las funciones booleanas, las cuales son el conjunto de funciones F_i , que son sentencias lógicas (o tablas de verdad) que representan la relación entre un nodo i y sus k reguladores. las variables de estado $x_i(t)$ pueden tomar los valores discretos 1 ó 0, indicando si el nodo i es expresado o no en un cierto tiempo t , respectivamente.

Habiendo explicado el modelo que usaremos, lo primero que haremos será un análisis dinámico del modelo discreto (booleano), que consiste en: 1) determinar si una red tiene atractores, 2) encontrarlos y 3) determinar el tamaño de las cuencas de atracción, con funciones del paquete *Boolnet* [74] (perteneciente al ambiente de programación estadístico R, www.R-project.org) que permiten encontrar los atractores y cuencas de atracción de la red.

2.2. Transformación del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT, a un sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias

Con el fin de caracterizar bifurcaciones en la dinámica de la RRG bajo variaciones continuas de un parámetro (en este caso una tasa de degradación de un nodo), se estudiará una representación continua del modelo discreto (booleano). Varias aproximaciones han sido usadas para describir una RRG Booleana como un sistema continuo [75, 68]. Se empezará transformando los operadores lógicos ($\&$, \vee y \neg) a operadores numéricos (multiplicación, suma y resta), respectivamente, al seguir 3 reglas de asignación (observemos que esto no nos dará el carácter continuo, ya que pese a las operaciones numéricas, los valores que obtendremos seguirán siendo 0 y 1):

$$x_i(t) \wedge x_j(t) \rightarrow x_i(t) * x_j(t) \tag{2.1}$$

$$x_i(t) \vee x_j(t) \rightarrow x_i(t) + x_j(t) - x_i(t) * x_j(t) \tag{2.2}$$

$$\neg x_i(t) \rightarrow 1 - x_i(t) \tag{2.3}$$

Donde x_i representa el nivel de expresión (0 ó 1) de la proteína reguladora i en el tiempo t . Por ejemplo, el estado de JKD en el tiempo $t + 1$ depende sólo del estado de dos nodos, SHR y SCR en el tiempo t , y la regla lógica booleana que determina el estado de JKD en el tiempo $t + 1$ es: SCR $\&$ SHR, donde SHR y SCR toman valor de 0 ó 1 (ver tabla 1.2). Entonces, usando la ecuación (2.1) tenemos la regla con operación numérica: SHR $*$ SCR. Hicimos la transformación de regla lógica a regla con operación continua para cada 1 de los 9 nodos de la RRG-NCT (ver tabla 2.1).

Nodo	Regla lógica	Regla con operador numérico
PLT	ARF	ARF
Auxin	Auxin \vee \neg Auxin	$1 + Auxin^2 - Auxin$
ARF	\neg IAA	$1 - IAA$
IAA	\neg Auxin	$1 - Auxin$
SHR	SHR	SHR
SCR	SHR \wedge SCR	SHR * SCR
JKD	SHR \wedge SCR	SHR * SCR
MGP	(SHR \wedge SCR) \wedge \neg WOX5	SHR * SCR - SHR * SCR * WOX5
WOX5	(SH \wedge SC \wedge AR) \wedge \neg (MG \wedge \neg WO)	SH*SC*AR-SH*SC*AR*MG+SH*SC*AR*MG*WO

Tabla 2.1: Regla lógica y regla con operador numérico de cada 1 de los 9 nodos de la RRG-NCT.

El siguiente paso consistirá en usar una función continua que nos permita representar la formación de una proteína dependiente de sus proteínas reguladoras. Usaremos la siguiente función exponencial:

$$f[\theta(t)] = \frac{1}{1 + e^{-b(\theta(t)-\epsilon)}} \quad (2.4)$$

Es una función dependiente del tiempo y univariada (θ). Como puede verse en la ecuación 2.4, el principal argumento de la función es una función exponencial $e^{-b(\theta(t)-\epsilon)}$, cuya variable es ($\theta(t)$) que representa la concentración de las proteínas reguladoras de la proteína en cuestión y consta de 2 parámetros (b y ϵ), los cuales regulan la velocidad de formación de la proteína en cuestión.

A dicha función le haremos algunos cambios, ahora los mencionaremos. La primera modificación a hacer es sustituir la función dependiente del tiempo ($\theta(t)$) por la representación cualitativa del nivel de expresión de una proteína regulada por otras proteínas ($w_i(t)[x_1(t), x_2(t), \dots, x_j(t)]$), donde $w_i(t)$ representa, cualitativamente, el nivel de expresión de la proteína o nodo i en el tiempo t y $x_j(t)$ representa, cualitativamente, el nivel de expresión de la proteína o nodo regulador j en el tiempo t . Esta sustitución nos permite hacer a la función dependiente del nivel cualitativo de

expresión de una proteína. Además, matemáticamente esto es posible, primero porque ambas funciones son dependientes del tiempo, entonces son intercambiables. Y segundo, porque el contradominio de la variable original es, teóricamente, cualquier número real positivo, dentro del cual yacen los 2 puntos (0 y 1) que conforman el contradominio de $(w_i(t)[x_1(t), x_2(t), \dots, x_j(t)])$. El intercambio se hará simplemente al introducir la regla numérica de cada nodo (ver tabla 2.1) por $(\theta(t))$. P.ej, siguiendo con el nodo JKD, lo anterior sería así:

$$f[JKD] = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR*SCR)-\epsilon}} \quad (2.5)$$

A continuación se enlistan cómo quedan las funciones logísticas de cada nodo después de realizar la sustitución:

$$f[PLT] = \frac{1}{1 + e^{-b(ARF-\epsilon)}} \quad (2.6)$$

$$f[Auxin] = \frac{1}{1 + e^{-b*((1+AUx^2-AUX)-\epsilon)}} \quad (2.7)$$

$$f[ARF] = \frac{1}{1 + e^{-b*((1-IAA)-\epsilon)}} \quad (2.8)$$

$$f[IAA] = \frac{1}{1 + e^{-b*((1-Auxina)-\epsilon)}} \quad (2.9)$$

$$f[SHR] = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR-\epsilon)}} \quad (2.10)$$

$$f[SCR] = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR*SCR)-\epsilon}} \quad (2.11)$$

$$f[MGP] = \frac{1}{1 + e^{-b*((SHR*SCR-SHR*SCR*WOX5)-\epsilon)}} \quad (2.12)$$

$$f[WOX5] = \frac{1}{1 + e^{-b*((SHR*SCR*ARF-SHR*SCR*ARF*MGP+SHR*SCR*ARF*MGP*WOX5)-\epsilon)}} \quad (2.13)$$

Para tener determinada por completo las funciones aún nos falta determinar dos parámetros (b y ϵ). Pero por ahora notemos que la sustitución que hicimos, omitiendo los dos parámetros faltantes, nos permite poner la función como dependiente del nivel de expresión del nodo en cuestión, lo cual se traduce a representar el nivel de producción de dicho nodo. Ahora introduzcamos el modelo continuo que será la base para construir el modelo continuo equivalente al discreto que buscamos. El modelo diferencial con el que iniciaremos será uno muy sencillo, aquel que en bioquímica para determinar la cantidad de proteína en un tiempo t dado sólo contempla la resta de la producción menos la degradación de una proteína, contemplando una tasa de producción y una de degradación:

$$\frac{dx_i}{dt} = k_{i1}x_i(t) - k_{i2}x_i(t) \quad (2.14)$$

Entonces tenemos una ecuación diferencial dependiente del tiempo, donde k_{i1} es la tasa de producción de la proteína (x_i) y k_{i2} es la tasa de degradación de la misma proteína. Pero, como habíamos notado anteriormente, las funciones que creamos re-

presentan la producción de los nodos, por lo que podemos sustituir cada función de cada nodo por el término de activación ($k_i x_i(t)$) de la ecuación 2.15. P.ej, para el nodo JKD quedaría así:

$$\frac{dJKD}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR*SCR)-\varepsilon}} - k_i2 * JKD * JKD \quad (2.15)$$

Se hizo lo mismo con el resto de los 8 nodos (ver ecuaciones 2.17- 2.25).

$$\frac{dPLT}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*(ARF-0.5)}} - 1 * PLT \quad (2.16)$$

$$\frac{dAuxina}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*((1+AuxX^2-AUX)-0.5)}} - k_i2 * Auxina \quad (2.17)$$

$$\frac{dARF}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*((1-IAA)-0.5)}} - k_i2 * ARF \quad (2.18)$$

$$\frac{dIAA}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*((1-Auxin)-0.5)}} - k_i2 * IAA \quad (2.19)$$

$$\frac{dSHR}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR-0.5)}} - k_i2 * SHR \quad (2.20)$$

$$\frac{dSCR}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR*SCR)-0.5}} - k_i2 * SCR \quad (2.21)$$

$$\frac{dJKD}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*(SHR*SCR)-0.5}} - k_i2 * JKD \quad (2.22)$$

$$\frac{dMGP}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*((SHR*SCR - SHR*SCR*WOX5) - 0.5)}} - k_i2 * MGP \quad (2.23)$$

$$\frac{dWOX5}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-b*((SHR*SCR*ARF - SHR*SCR*ARF*MGP + SHR*SCR*ARF*MGP*WOX5) - 0.5)}} - k_i2*WOX5 \quad (2.24)$$

De esta manera tenemos las ecuaciones que usaremos para explorar la capacidad del nivel de expresión de cada nodo de la RRG para generar cambios en el Paisaje de Atractores, pero para poder usar el sistema de 9 EDOs, en nuestros análisis tuvimos que determinar el valor de tres parámetros; k_i2 , ϵ y b . Para k_i2 elegimos el valor de 1, porque es el caso lineal más sencillo, aunque para el análisis de bifurcaciones se usarán diferentes valores pertenecientes a un intervalo específico el cual será establecido (ver Resultados). Para ϵ elegimos el valor de 0.5, pensando en una concentración media que debe haber en la célula para que la proteína pueda interactuar con sus degradadores. Por último, para b tendremos que resolver el sistema de 9 EDOs para diferentes valores y elegir un valor que permita tener una equivalencia (misma cantidad de atractores y un porcentaje muy similar de las cuencas de atracción) entre el modelo discreto y el continuo. A continuación describiremos el cómo proceder para determinar la equivalencia.

2.3. Análisis dinámico del sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias

Para determinar la equivalencia entre un modelo continuo y un modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT es necesario que el análisis dinámico (el determinar los atractores y cuencas de atracción asociadas a ellos) del modelo continuo recupere las propiedades de la dinámica del modelo discreto (booleano): cuatro atractores (IV, CQ, CE_p y CE_n) y sus respectivas cuencas de atracción (25 % para IV, 7 % para CQ, 50 % para CE_p y 17 % para CE_n). Para mostrar la equivalencia es necesario, primero resolver el sistema de EDOs. Lo anterior se traduce en resolver problemas de valores iniciales. A continuación se describe en qué consisten dichos problemas.

La forma general de una ecuación diferencial ordinaria (EDO) es:

$$y' = f(x, y) \tag{2.25}$$

donde f es una función de x y y . A x se le llama variable independiente y a $y = y(x)$ la variable dependiente. Las ecuaciones de la forma (2.25) son llamadas de primer orden porque no contienen derivadas de orden superior a 1. También se les llama ordinarias porque y depende de una sola variable. Una función diferenciable $y(x)$ es una solución de la ecuación (2.25), si para todo x se cumple:

$$y(x) = f(x, y(x)) \tag{2.26}$$

Si además, se supone que x_0 se conoce, la solución de la ecuación (2.25), válida en el intervalo $[x_0, x_1]$, se puede obtener integrando por ambos lados a la ecuación (2.25)

con respecto de x :

$$y(x) - y(x_0) = \int f(t, y(t)) dt, x \in [x_0, x_1]. \quad (2.27)$$

En algunos casos esta integral puede ser calculada, cuando eso pasa se dice que se obtiene una solución analítica. Podría pensarse que la regla es encontrar soluciones analíticas para EDOs, pero al contrario, es la excepción [76]. Por esta razón es necesario resolver las EDOs numéricamente. Esta forma consiste en dividir el dominio de la variable independiente x en un número finito de puntos, y a partir de ellos calcular los valores aproximados de las variables dependientes y y las derivadas de y con respecto a los puntos elegidos. Se sabe que la solución de una EDO contiene un parámetro C , por ej. la solución analítica de:

$$y' = y^2 + 1 \quad (2.28)$$

es:

$$y = \tan(x + C) \quad (2.29)$$

y ese parámetro queda determinado si imponemos una condición inicial de la forma $y(x_0) = y_0$. El problema del valor inicial (PVI) depende de cuál sea la condición inicial que determina el inicio del intervalo de integración. Por ej., si introducimos la condición inicial de $y(0)=1$ para la ecuación (2.28), al sustituir en la ecuación (2.29) tendríamos: $y(0) = \tan(0+C) = 1 \Rightarrow c = \arctan(1) = \frac{\pi}{4}$, por lo tanto $y = \tan(x + \frac{\pi}{4})$ es la única solución. La representación general de un PVI de primer orden es:

$$y' = f(x, y) \quad (2.30)$$

con

$$y(x_0) = y_0 \quad (2.31)$$

donde y puede ser un vector. Respecto a nuestro objetivo, el primer paso para determinar la equivalencia entre el modelo continuo y el modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT será resolver problemas de valor inicial de las EDOs (con el valor de k y ϵ establecidos en Métodos, y un valor de $b = 100$) de la forma de la ecuación (2.14) para cada uno de los valores iniciales o condiciones iniciales ($512 = 2^9$, ver Introducción) compuestos solamente de ceros y unos, p. ej. (0,1,0,1,0,1,0,1,0). Eso se hará con códigos de R, al utilizar las funciones que proveen los paquetes deSolve [77] y rootSolve [77]. Para ello tendremos que almacenar las 512 condiciones iniciales compuestas por ceros y unos en una matriz, compuesta de 9 columnas (los 9 nodos) y 512 filas (las condiciones iniciales de 0s y 1s). Para cada columna de la matriz (los nodos) tendremos que generar un histograma, y para que podamos comparar estos histogramas, tendremos que usar los mismos límites para los ejes X y Y, respectivamente, en todos los histogramas. El segundo paso consistirá en usar la función estadística *kmeans* para 2 centros, del paquete estadístico R, con el objetivo de discretizar las soluciones del sistema de 9 EDOs. El método estadístico *kmeans*, consiste en particionar N puntos en k grupos al minimizar la distancia de los puntos a k valores. Teniendo como resultado k grupos con cantidades diferentes de puntos. En nuestro caso nos interesó $k = 2$. El último paso consistirá en comparar las soluciones discretizadas del modelo continuo con el modelo discreto y comparar las cuencas de atracción para determinar si son o no equivalentes los dos modelos. Para esto tendremos que confirmar que dentro de las soluciones sólo hay exactamente 4 opciones, i.e., los 4 atractores que recupera el modelo discreto (booleano), y si además recuperamos la misma proporción del total de soluciones (cuenca de atracción). Para ello, todos los renglones (512) de la Matriz donde almacenamos las soluciones, las tendremos que pegar consecutivamente en un vector y este convertirlo de una variable numérica a una variable caracter. De esta manera generaremos 4 variables tipo caracter, cada una con el patrón de 0s y 1s correspondiente a los 4 atractores de la dinámica del modelo discreto, y median-

te una condición lógica compararemos cada atractor (como variable caracter) con el vector caracter que contiene todas las soluciones, para obtener un vector lógico. De esta forma bastará con contar el número de TRUEs para que podamos determinar la cuenca de atracción del atractor comparado. Tendremos que hacer lo anterior para cada uno de los 4 atractores. Si, cuando sumemos los TRUEs de todos los atractores tenemos un número menor a 512, significará que al menos hay otro atractor ajeno a los recuperados en el modelo discreto y no son equivalentes, si el caso es el contrario entonces resultará que si son equivalentes.

2.4. Análisis de las Bifurcaciones

Una vez explicada la forma de determinar la equivalencia entre el modelo continuo (sistema de EDOs) y el modelo discreto (booleano) es que se buscarán bifurcaciones, es decir, cambios cualitativos en el espacio de estados (paisaje de atractores) ocasionados por cambios en el valor de un parámetro. En este caso, el parámetro de interés es el parámetro k_i (tasa de degradación del nodo i) del sistema de EDOs. Si se confirma lo último, se confirma la capacidad de los nodos de la RRG-NCT de reestructurar el Paisaje de Atractores (PA). Se seguirán los siguientes pasos para confirmar bifurcaciones en el PA: (1) se tomará un atractor específico como condición inicial, en un problema de valor inicial, del sistema de 9 ecuaciones diferenciales ordinarias. (2) Para cada nodo activo en el estado del atractor se elegirá un conjunto de valores ordenados para el parámetro de control (k_i). (3) Con lo anterior, el sistema de EDOs se resolverá numéricamente hasta alcanzar un estado de equilibrio, para cada tiempo se usará un valor del parámetro diferente, abarcando todos los valores del parámetro en un conjunto particular (ver Resultados). Y (4) Para cada gen activo de cada atractor, en cada 1 de los 4 atractores, se generará una gráfica con los valores del parámetro k_i como variable independiente (eje x), y como variable dependiente (eje y), el valor $y(x)$

representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de EDOs. Los pasos anteriores se harán para cada atractor. Las bifurcaciones se identificarán cualitativamente por la ocurrencia de saltos en las gráficas.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Análisis dinámico del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT

Con base en el objetivo de este trabajo que es hacer un análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma, y con ello analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de los genes son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro, 3 pasos previos tuvimos que hacer: El primero fue caracterizar el comportamiento dinámico del modelo discreto (booleano) de la RRG y su Paisaje de Atractores (PA) asociado. Por lo anterior analizamos el comportamiento dinámico global del modelo a través de una exhaustiva caracterización de todos los atractores usando todas las condiciones iniciales posibles (ver métodos). El orden de los nodos en las representaciones de estado es: PLT, Auxina, ARF, IAA, SHR, SCR, JKD, MGP y WOX5. Encontramos, conforme a lo esperado, cuatro atractores (las columnas de la figura 3.1): (1) las células iniciales de la capa lateral de Columela-Epidermis, cuya representación de

estados es $(1,1,1,0,0,0,0,0,0)$, (2) las células Iniciales Vasculares, cuya representación de estados es $(1,1,1,0,1,0,0,0,0)$, (3) las células iniciales del Cortex-Endodermis, cuya representación de estados es $(1,1,1,0,1,1,1,1,0)$ y (4) las células del Centro Quiescente, cuya representación de estados es $(1,1,1,0,1,1,1,0,1)$. En la misma figura, cada 1 de las 9 filas corresponde a 1 de los 9 nodos de la RRG-NCT. Como se mencionó en la introducción, cada atractor tiene asociado una cuenca de atracción, que representa a todas las condiciones iniciales cuyo estado límite bajo la dinámica es el atractor mismo. En el caso de la RRG-NCT, el 50 % de las condiciones iniciales convergen al atractor Columela Epidermis, el 25 % de las condiciones iniciales convergen al atractor Iniciales Vasculares, el 14.84 % de las condiciones iniciales convergen al atractor Cortex Endodermis, y el 10.16 % de las condiciones iniciales convergen al atractor Centro Quiescente.

3.2. Análisis dinámico del sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias

Respecto a la confirmación de la equivalencia entre el modelo continuo con el modelo discreto, los histogramas para cada columna están en las figuras 3.2- 3.4. Respecto a los límites que se usaron para el eje X y el eje Y, el límite inferior fue el mínimo valor de la matriz y el superior fue el máximo valor de la matriz, y el límite inferior fue el cero y el límite superior fue 512, pensando en el escenario de que todos los datos quedaran en una clase (como puede apreciarse en la Figura 3.2), respectivamente. En las figuras 3.3 y 3.4, las mayores frecuencias se encuentran en los extremos del eje X, lo cual significa que la discretización en dos valores fue exitosa. Por último, como puede verse en la tabla 3.1, la discretización de las soluciones del sistema de 9 EDOs contiene únicamente los 4 atractores del modelo discreto y las

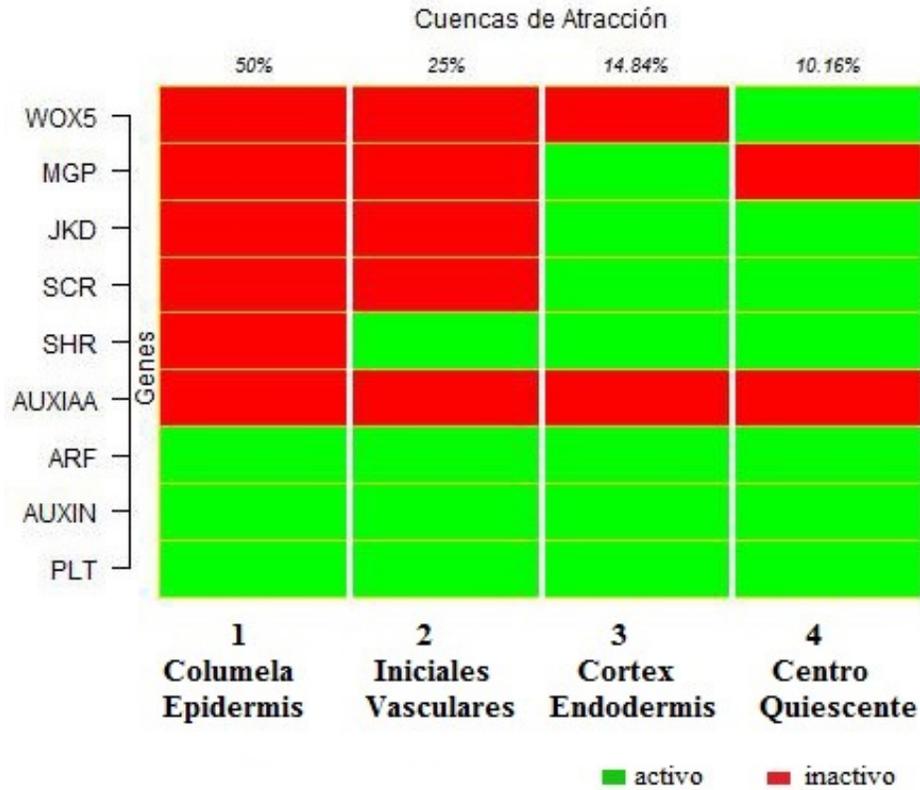


Figura 3.1: Atractores del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT. Las columnas corresponden a cada uno de los 4 atractores de la red: (1) Columela Epidermis, (2) Iniciales Vasculares, (3) Cortex Endodermis y (4) Centro Quiescente. Cada fila corresponde a 1 de los 9 nodos de la red, en el eje vertical está especificado a qué nodo corresponde. El color rojo corresponde al estado 0 (ausente) del nodo y el color verde corresponde al estado 1 (presente) del nodo. En la parte superior de las columnas, en el eje horizontal, están (en porcentaje) los tamaños de las cuencas de atracción.

cuencas de atracción son casi idénticas (con $b = 100$). Por lo cual, concluimos que el modelo continuo (de EDOs) es equivalente al modelo discreto.

Atractor	Cuenca en el modelo continuo	Cuenca en el modelo discreto
Columela Epidermis	256	256
Iniciales Vasculares	128	128
Cortex Endodermis	77	76
Centro Quiescente	51	52

Tabla 3.1: Cuencas de atracción del modelo discreto (booleano) y de las soluciones del sistema de 9 EDOs después de discretizar.

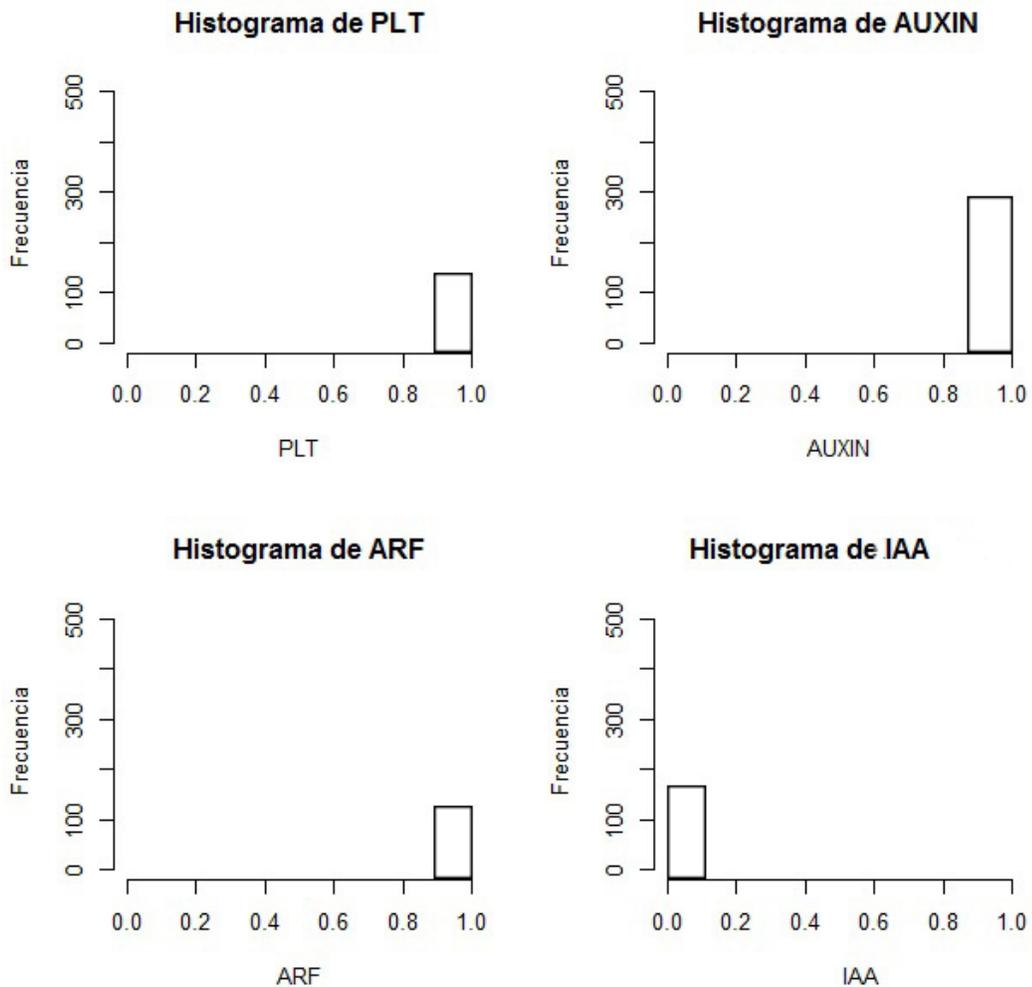


Figura 3.2: Histogramas de PLT, ARF, Auxin y IAA generados a partir de las columnas 1-4 de la matriz que almacena las soluciones del sistema de 9 EDOs. Se estandarizaron ambos ejes de cada histograma para poder comparar los 9 histogramas. En el eje x el valor mínimo de la matriz y el valor máximo de la matriz son los límites inferior y superior, respectivamente. En el eje y el límite inferior es cero y el superior es 512. Nótese que las mayores frecuencias se encuentran en algún extremo del eje x .

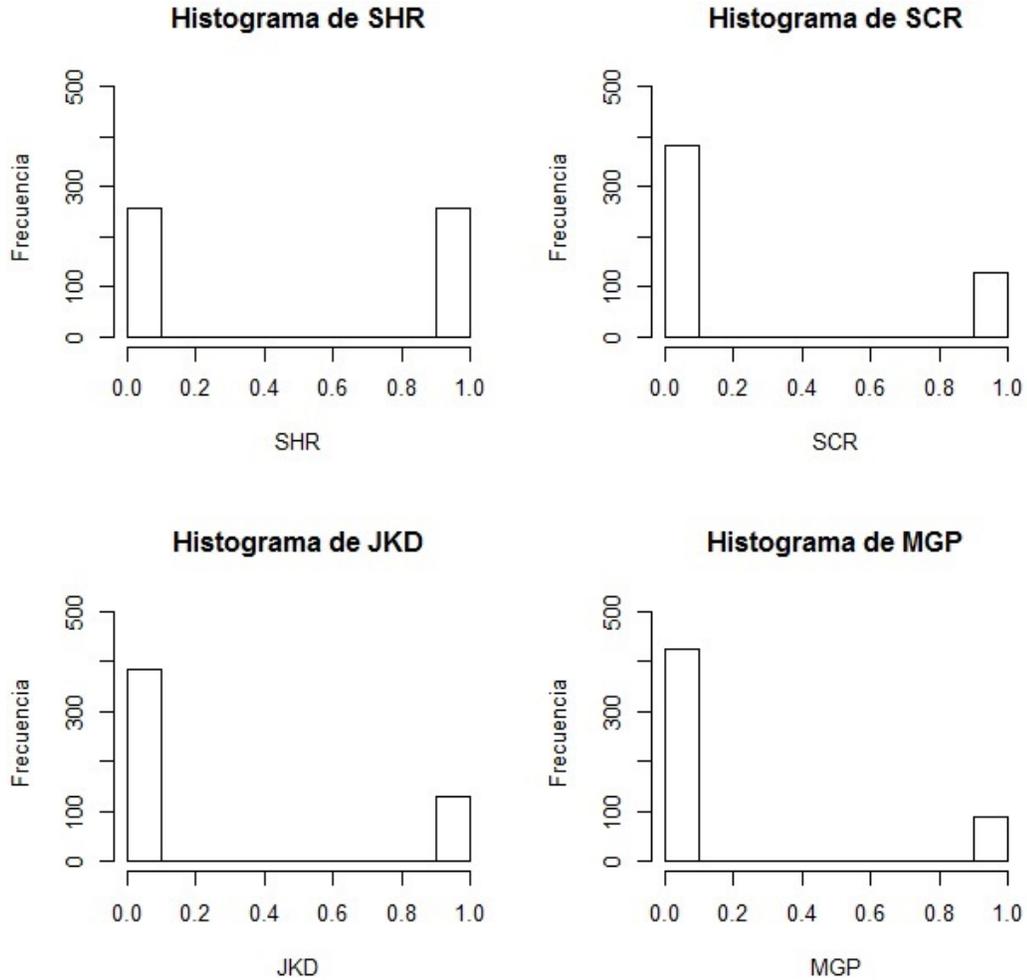


Figura 3.3: Histogramas de SHR, SCR, JKD y MGP generados a partir de las columnas 5-8 de la matriz que almacena las soluciones del sistema de 9 EDOs. Se estandarizaron ambos ejes de cada histograma para poder comparar los 9 histogramas. En el eje x el valor mínimo de la matriz y el valor máximo de la matriz son los límites inferior y superior, respectivamente. En el eje y el límite inferior es cero y el superior es 512. Nótese que las mayores frecuencias se encuentran en los extremos del eje x .

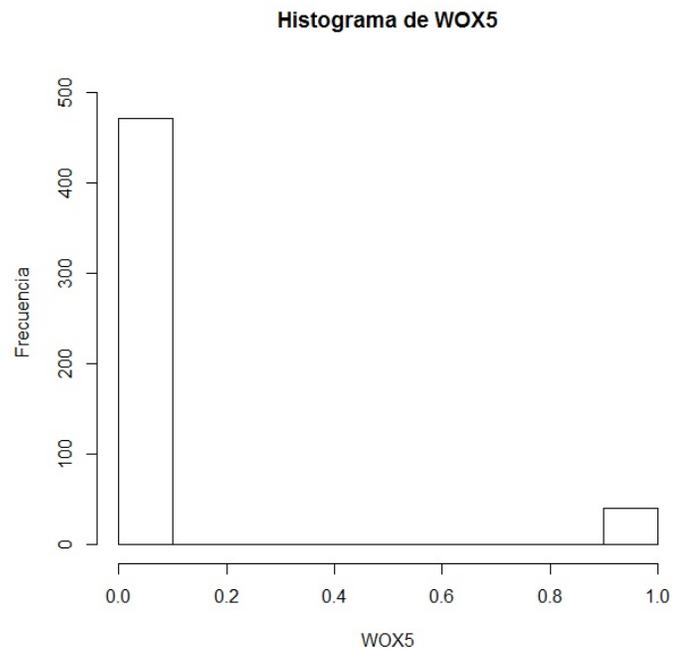


Figura 3.4: Histograma de WOX5 generado a partir de la columna 9 de la matriz que almacena las soluciones del sistema de 9 EDOs. Se estandarizaron ambos ejes de cada histograma para poder comparar los 9 histogramas. En el eje x el valor mínimo de la matriz y el valor máximo de la matriz son los límites inferior y superior, respectivamente. En el eje y el límite inferior es cero y el superior es 512. Nótese que las mayores frecuencias se encuentran en los extremos del eje x .

A continuación lo que hicimos fue determinar un intervalo para el parámetro b con el cual la dinámica del modelo continuo fuera equivalente (mismo número de atractores y una similitud muy alta en los porcentajes de cuencas de atracción de los atractores) a la dinámica del modelo. Para determinar el intervalo, resolvimos el sistema de 9 EDOs (con $k = 1$ y $\epsilon = 1/2$) con todas las condiciones iniciales posibles de ceros y unos (ver Métodos), para 10 valores diferentes para b : 1, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40. Y encontramos que para un valor de $b \geq 15$ es posible recuperar los mismos atractores y sus cuencas de atracción que los obtenidos con el modelo discreto (ver figuras 3.5- 3.7). Así que decidimos elegir el valor de $b = 35$ para realizar los análisis de bifurcación por ser capaz de recuperar los mismos atractores y las cuencas de atracción del modelo discreto (booleano) y ser uno de los últimos valores probados.

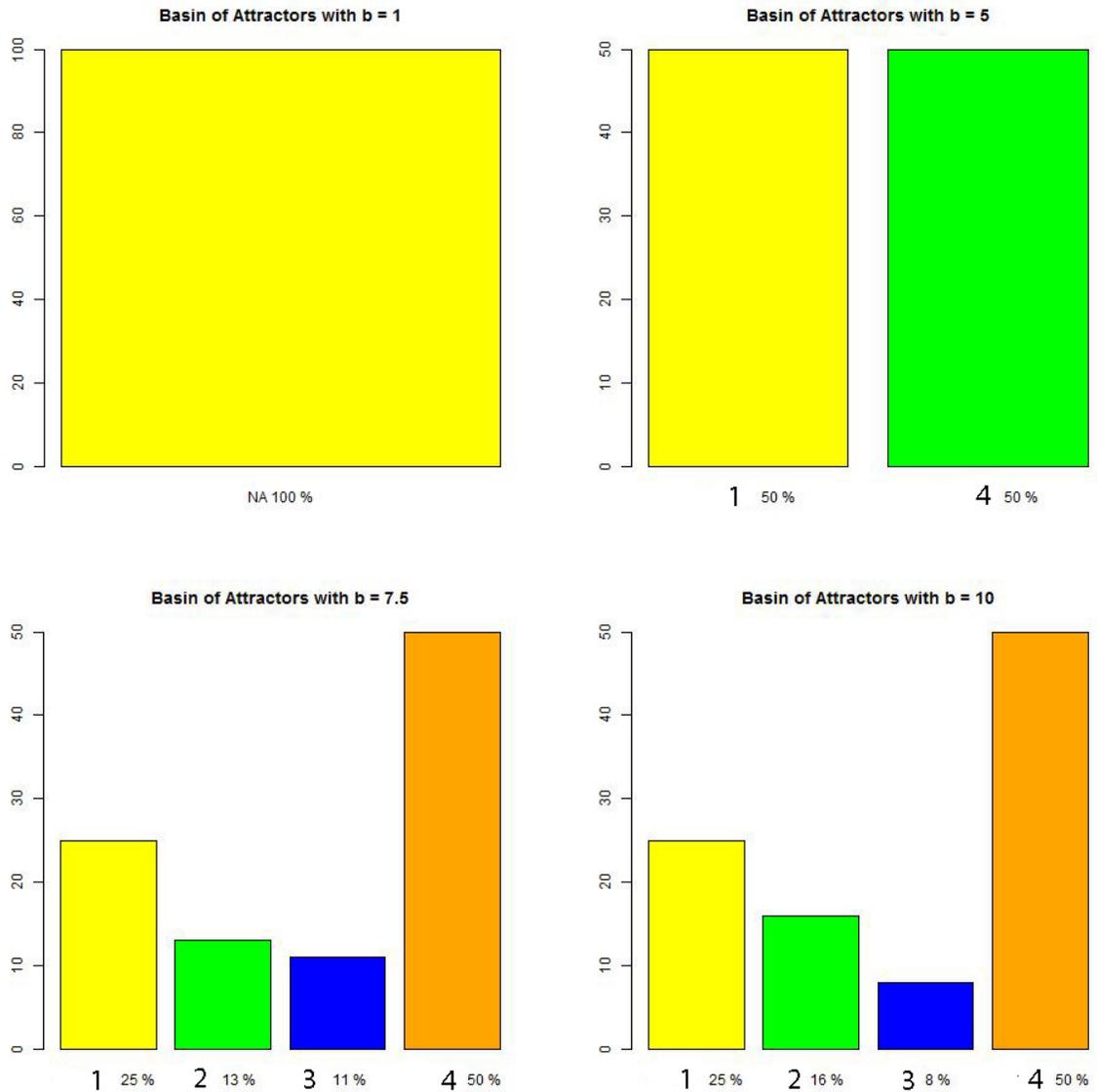


Figura 3.5: Atractores y sus respectivas cuencas de atracción recuperados con valores de 1, 5, 7.5 y 10 para el parámetro b . NA refiere a un atractor que no es alguno de los 4. 1 corresponde al atractor Iniciales Vasculares, 2 corresponde al atractor Centro Quiescente, 3 corresponde al atractor Cortex Endodermis y 4 corresponde al atractor Columela Epidermis. Los porcentajes indican el tamaño de la cuenca de atracción asociada a cada atractor.

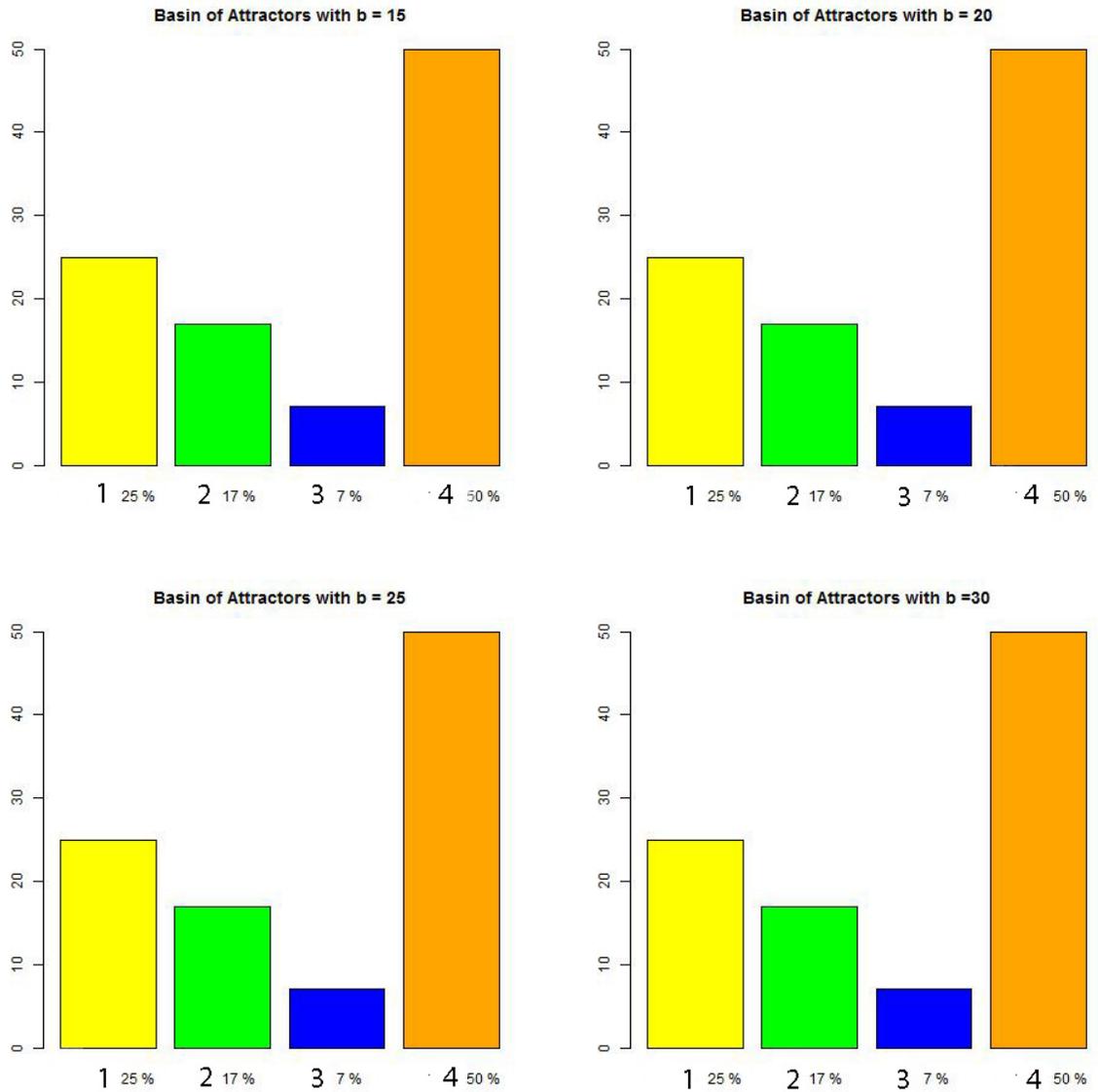


Figura 3.6: Atractores y sus respectivas cuencas de atracción recuperados con valores de 15, 20, 25 y 30 para el parámetro b . 1 corresponde al atractor Iniciales Vasculares, 2 corresponde al atractor Centro Quiescente, 3 corresponde al atractor Cortex Endodermis y 4 corresponde al atractor Columela Epidermis. Los porcentajes indican el tamaño de la cuenca de atracción asociada a cada atractor.

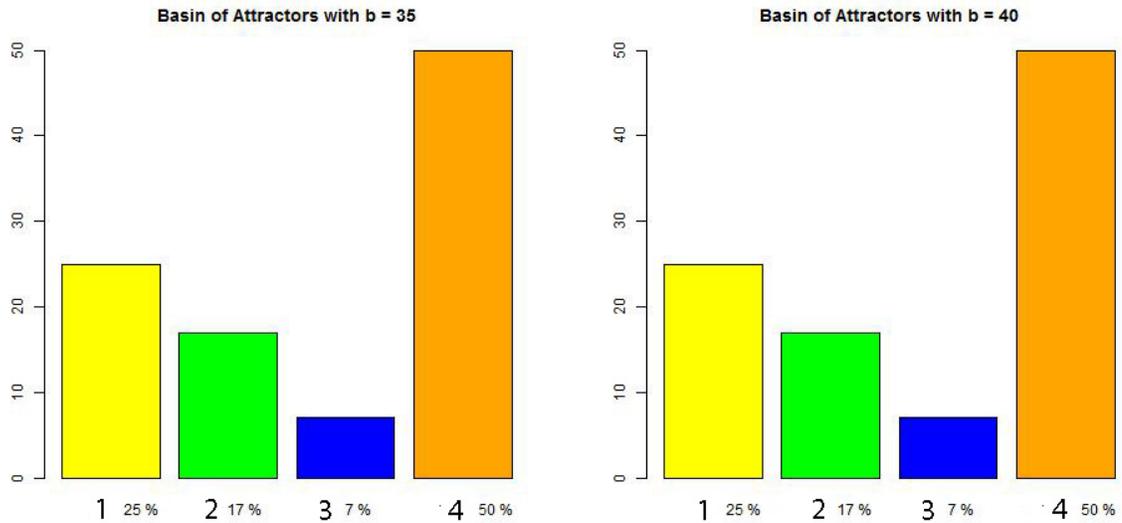


Figura 3.7: Atractores y sus respectivas cuencas de atracción recuperados con valores de 35 y 40 para el parámetro b . 1 corresponde al atractor Iniciales Vasculares, 2 corresponde al atractor Centro Quiescente, 3 corresponde al atractor Cortex Endodermis y 4 corresponde al atractor Columela Epidermis. Los porcentajes indican el tamaño de la cuenca de atracción asociada a cada atractor.

3.3. Análisis de las Bifurcaciones

Finalmente, el objetivo de esta sección es hacer el análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma. Para ello, generamos un conjunto de gráficas, una por cada gen activo en cada atractor, para cada uno de los 4 atractores (ver Figuras 3.8 - 3.13).

Para el atractor Columela Epidermis sólo el parámetro de degradación k_i del nodo Auxina (figura 3.8c) generó una bifurcación. Para el atractor Iniciales Vasculares el parámetro de degradación k_i Auxina (figura 3.9c) generó una bifurcación, al igual que el parámetro k_i del nodo SHR (figura 3.9d). La bifurcación de este último dirigió al atractor Columela Epidermis. Para el atractor Cortex Endodermis, 4 bifurcaciones fueron identificadas, la primera fue generada por el parámetro de degradación k_i del

nodo Auxina (figura 3.10c), la segunda fue generada por el parámetro de degradación k_i del nodo SHR (figura 3.10d) que condujo al atractor Columela Epidermis, la tercera bifurcación fue generada por el parámetro de degradación k_i del nodo SCR (figura 3.11a) y condujo al atractor Iniciales Vasculares, y la última bifurcación fue generada por el parámetro de degradación k_i del nodo MGP (figura 3.11c) y condujo al atractor Centro Quiescente. Para el atractor Centro Quiescente también se identificaron 4 bifurcaciones: la primera la generó el parámetro de degradación k_i del nodo Auxina (figura 3.12c), la segunda la generó el parámetro de degradación k_i del nodo SHR (figura 3.12d) y condujo al atractor Columela Epidermis. La tercera la generó el parámetro de degradación k_i del nodo SCR (figura 3.13a) que condujo al atractor Iniciales Vasculares. Y la cuarta la generó el parámetro de degradación k_i del nodo WOX5 (figura 3.13c) y condujo al atractor Cortex Endodermis.

Observamos que cada parámetro del nodo X que produce una bifurcación lo hace siempre hacia el mismo atractor (figuras 3.14 y 3.15). El parámetro de degradación del nodo Auxina condujo a un atractor desconocido, el del nodo SHR condujo al atractor Columela Epidermis, el del nodo SCR conduce al atractor Iniciales Vasculares, el del nodo MGP condujo al atractor Centro Quiescente, y el del nodo WOX5 condujo al atractor Cortex Endodermis. También, para cada parámetro de degradación k_i identificamos que el valor para el cual se produjo la bifurcación (ver figuras 3.14 y 3.15), fue de 1.4 y solamente para dos parámetros no lo fue. El primero fue el parámetro de degradación del nodo Auxina que generó la bifurcación en el valor 1.9, y el segundo fue el parámetro de degradación del nodo WOX5 que generó la bifurcación en el valor 1.99. La tabla 3.3 resume el número de bifurcaciones que cada nodo generó y en qué atractor lo generó. Sólo 5 de los nodos involucrados en la RRG-NCT fueron capaces de generar bifurcaciones.

La tabla 3.4 resume: (1) la capacidad de cada nodo, en cada atractor, para pro-

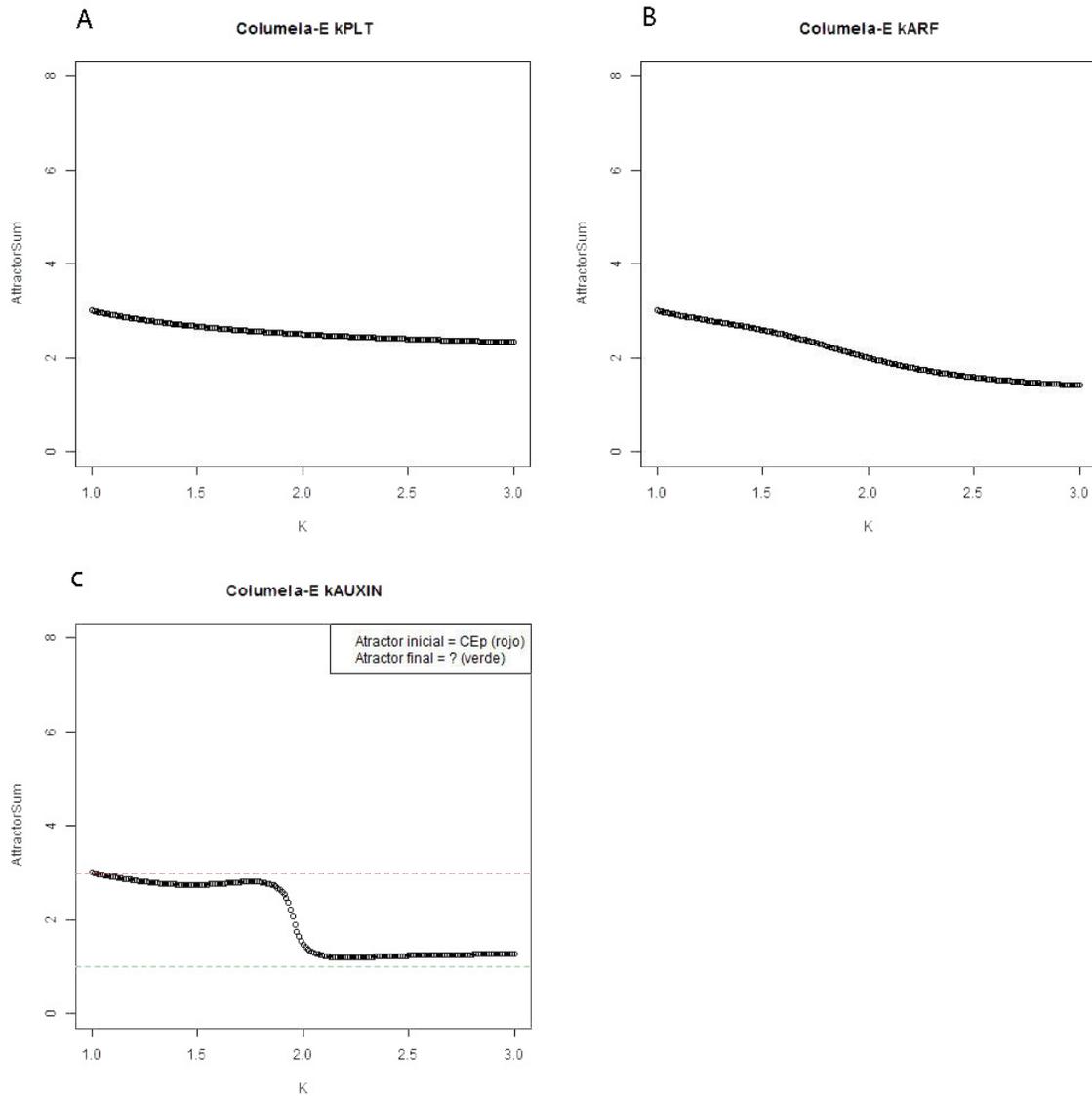


Figura 3.8: Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos PLT, ARF y Auxina en el atractor Columela Epidermis. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en una sola gráfica (gráfica de Auxina) donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de la gráfica con líneas punteadas se menciona que atractor corresponde al inicial y cual al atractor final (CEp refiere a Columela Epidermis).

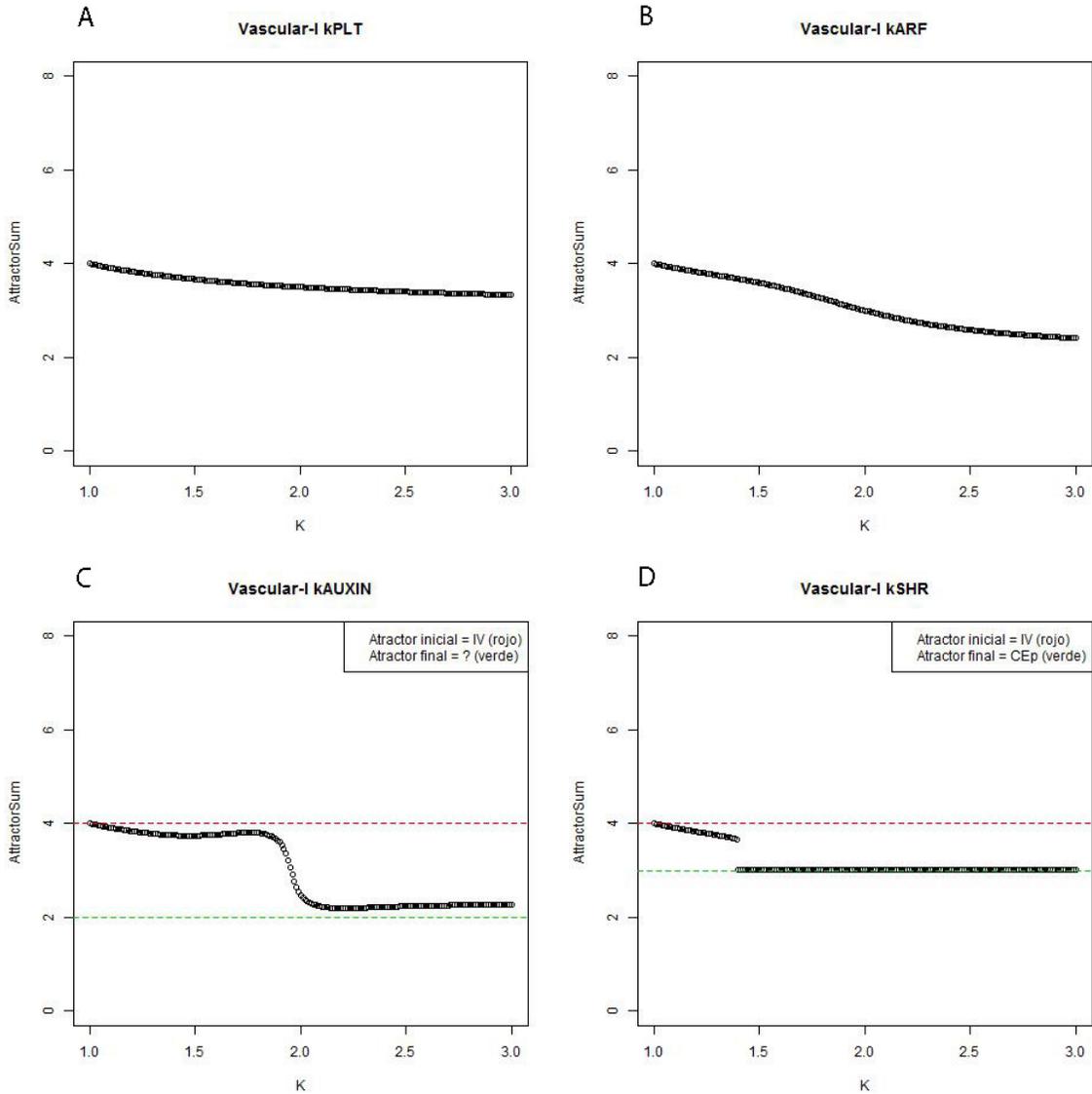


Figura 3.9: Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos activos PLT, ARF, SHR y Auxina en el atractor Iniciales Vasculares. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde cual al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis e IV refiere a Iniciales Vasculares).

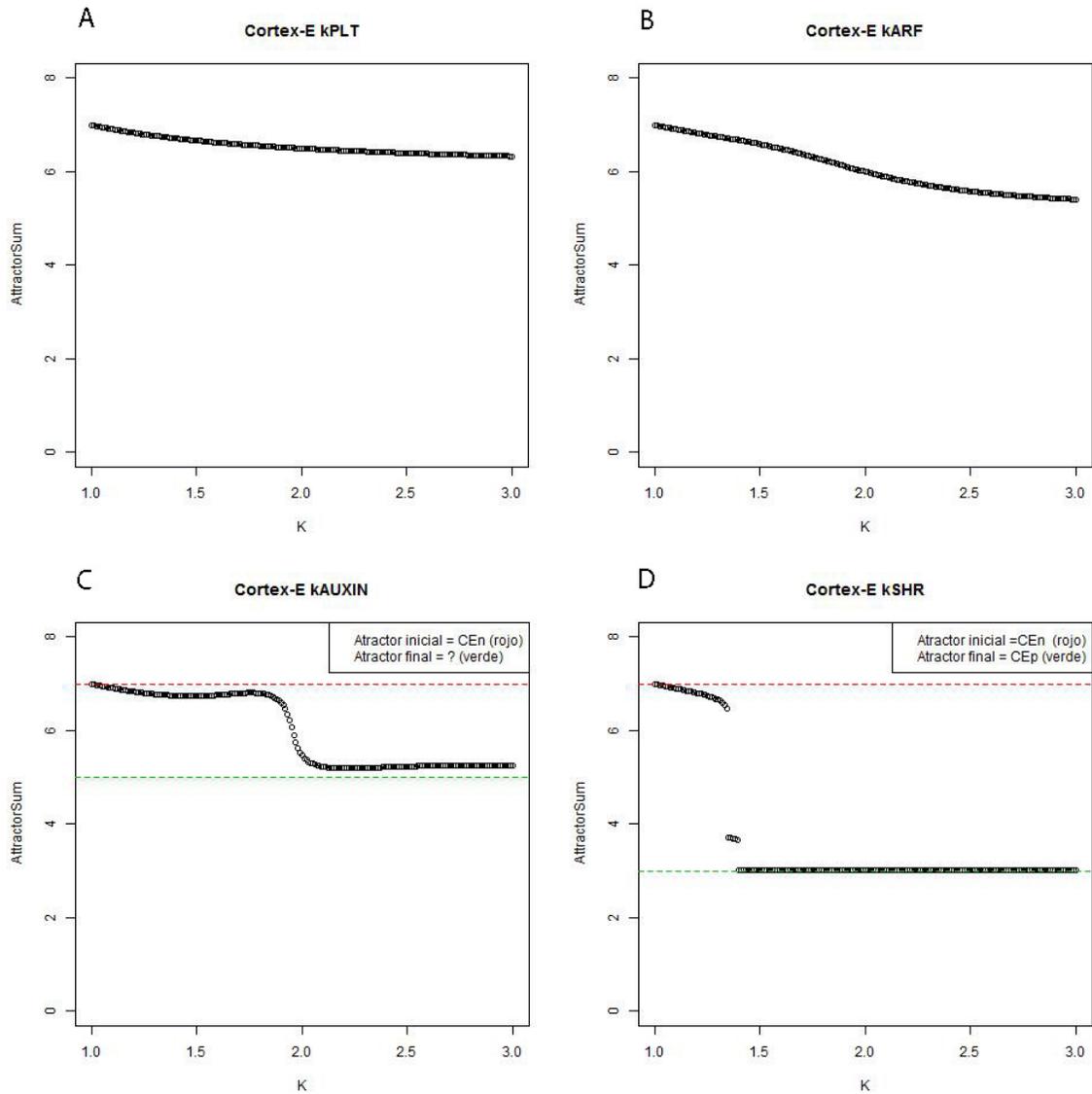


Figura 3.10: Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos PLT, ARF, SHR y Auxina en el atractor Cortex Endodermis. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis y CEn refiere a Cortex Endodermis).

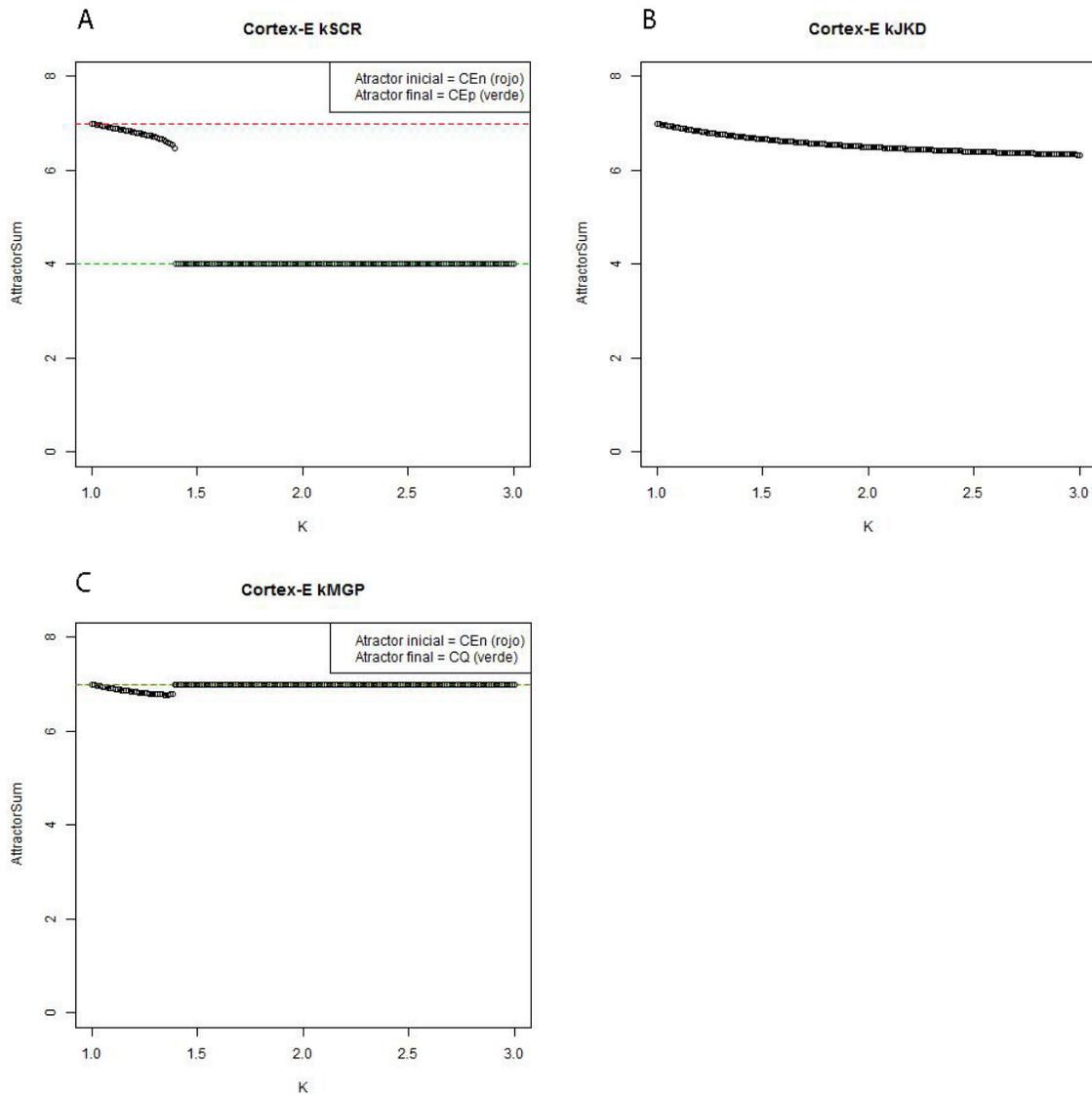


Figura 3.11: Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos SCR, JKD y MGP en el atractor Cortex Endodermis. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcacion. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis, CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente).

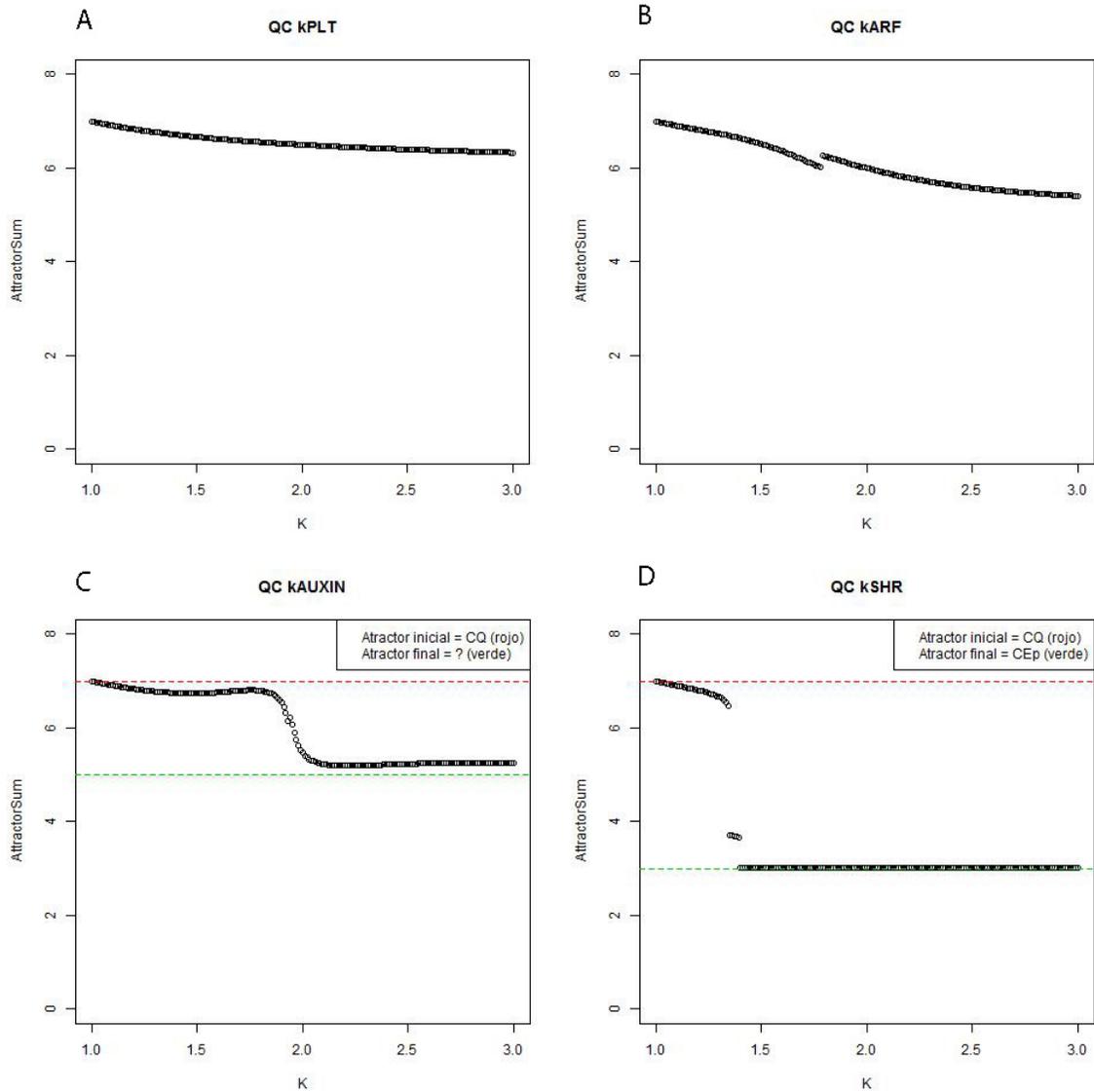


Figura 3.12: Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos PLT, ARF, SHR y Auxina en el atractor Centro Quiescente. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CEp refiere a Columela Epidermis y CQ refiere a Centro Quiescente).

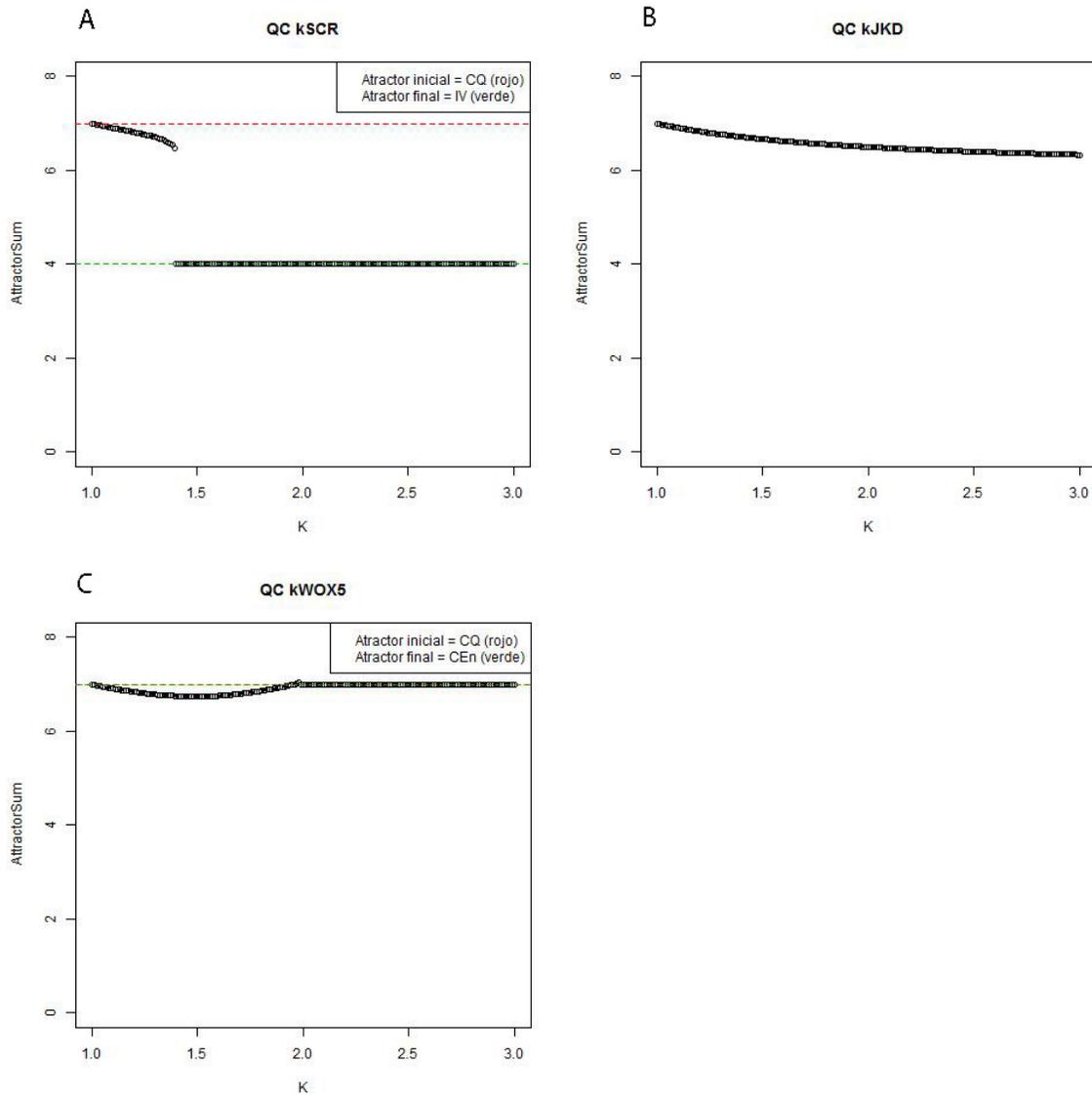


Figura 3.13: Análisis de los parámetros de degradación k_i de los nodos SCR, JKD y WOX5 en el atractor Centro Quiescente. Cada gráfica en el eje x , como variable independiente, tiene los valores del parámetro de degradación k_i del nodo. Y en el eje y , como variable dependiente, el valor representa la suma de las 9 entradas del vector solución para el sistema de 9 EDOs. Las líneas punteadas, roja y verde están presentes en las gráficas donde se observó una bifurcación. La línea roja indica el atractor inicial y la línea verde indica el atractor final. En la parte superior derecha de las gráficas con líneas punteadas se menciona el atractor que corresponde al inicial y el que corresponde al atractor final, respectivamente (CQ refiere a Centro Quiescente, IV refiere a Iniciales Vasculares y CEn refiere a Cortex Endodermis).

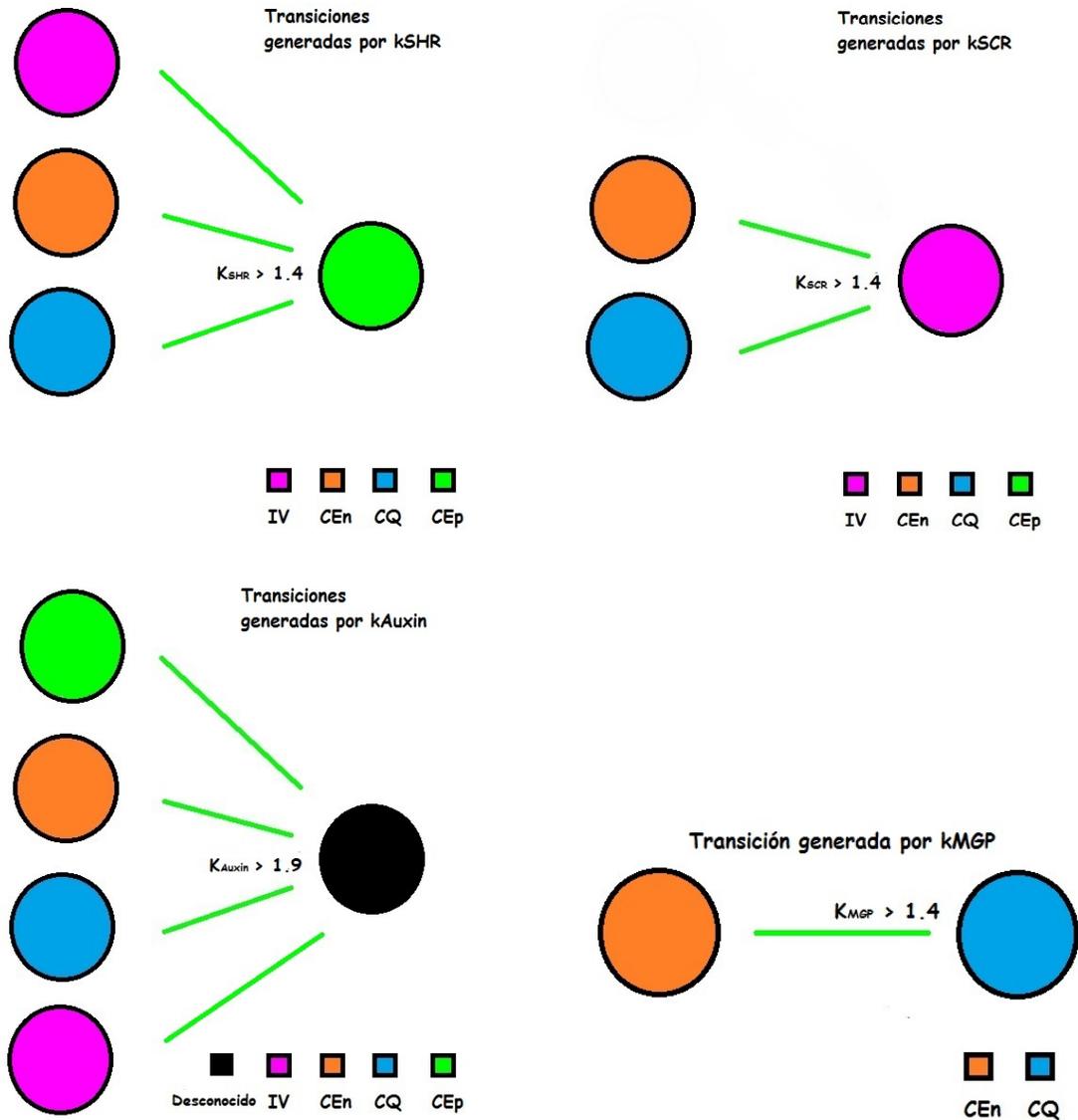


Figura 3.14: Transiciones generadas por los parámetros de degradación k_i de los nodos SHR, SCR, Auxina y MGP. Del lado izquierdo de las figuras se muestran los atractores iniciales, del lado derecho está el atractor final. En el centro de las figuras se muestra el valor de k_i suficiente para generar la transición (bifurcación). CEp refiere a Columela Epidermis, IV refiere a Iniciales Vasculares, CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente.

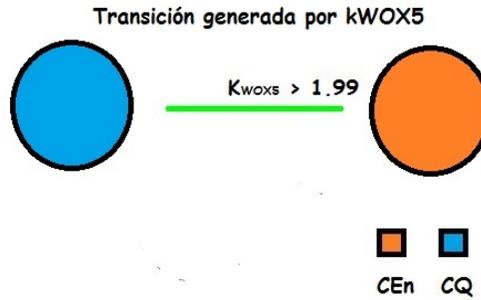


Figura 3.15: Transición generada por el parámetro k del gen $WOX5$. Del lado izquierdo se muestra el atractor inicial, del lado derecho está el atractor final. En el centro se muestra el valor de k suficiente para generar la transición (bifurcación). CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente.

Nodo	No. de Bifurcaciones	Atractor destino
SHR	3	CEp
SCR	2	IV
Auxin	4	Desconocido
MGP	1	CQ
WOX5	1	CEn

Tabla 3.2: Resumen de Bifurcaciones. En la primera columna, de izquierda a derecha, nodos capaces de reestructurar el PA. En la segunda columna, el número de bifurcaciones que generó, y en la tercera columna, el atractor destino de esas bifurcaciones. CEp refiere a Columela Epidermis, IV refiere a Iniciales Vasculares, CQ refiere a Centro Quiescente y CEn refiere a Cortex Endodermis.

ducir una bifurcación en el Paisaje de Atractores, (2) El destino (atractor conocido o desconocido) hacia el que condujo la bifurcación, y (3) el valor del parámetro de degradación k_i para el cual ocurrió la bifurcación. Encontramos que para cada atractor al menos uno de sus nodos activos es capaz de producir una bifurcación.

Atractor	Nodo	$\dot{\iota}$ Bifurcaci3n?	Valor (k_i)	Atractor destino
1 (CEp)	PLT	NO	-	-
1	ARF	NO	-	-
1	Auxina	SI	1.9	Desconocido
2 (IV)	PLT	NO	-	-
2	ARF	NO	-	-
2	Auxina	SI	1.9	Desconocido
2	SHR	SI	1.4	CEp
3 (CEn)	PLT	NO	-	-
3	ARF	NO	-	-
3	Auxina	SI	1.9	Desconocido
3	JKD	NO	-	-
3	SHR	SI	1.4	CEp
3	SCR	SI	1.4	IV
3	MGP	SI	1.4	CQ
4 (CQ)	PLT	NO	-	-
4	ARF	NO	-	-
4	Auxina	SI	1.9	Desconocido
4	JKD	NO	-	-
4	SHR	SI	1.4	CEp
4	SCR	SI	1.4	IV
4	WOX5	SI	1.99	CQ

Tabla 3.3: En la primera columna, de izquierda a derecha, N3mero de atractor. En la segunda columna, el listado de los genes activos en cada atractor. En la tercera columna, la capacidad o incapacidad de los genes de producir bifurcaciones. En la cuarta columna, s3lo para aquellos genes capaces de generar bifurcaciones, se muestra el valor del par3metro k_i que gener3 la bifurcaci3n. En la 3ltima columna se menciona el atractor destino de la bifurcaci3n. CEp refiere a Columela Epidermis, IV refiere a Iniciales Vasculares, CEn refiere a Cortex Endodermis y CQ refiere a Centro Quiescente.

Capítulo 4

Discusión

EL objetivo de este trabajo es hacer un análisis preliminar del efecto de alteraciones de las tasas de degradación de cada uno de los componentes de la red de RRG-NCT de la raíz de *A. thaliana* en el paisaje de los atractores de la misma. Y con ello, analizar hasta qué punto alteraciones en los niveles de expresión de los genes son capaces de hacer que el sistema cambie de un atractor a otro. Conforme a lo anterior obtuvimos: 1) la dinámica del modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT de raíz de *A. thaliana* (ver figura 3.1), 2) un modelo continuo (de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias) equivalente al modelo discreto (booleano) de la RRG-NCT, 3) un análisis de bifurcación, con el parámetro de degradación k_i2 como parámetro de control y 4) transiciones entre atractores del Nicho de Células Troncales (NCT) de la raíz (ver tabla 3.4). A continuación se mencionan las transiciones entre atractores que se identificaron (ver figuras 3.14 y 3.15) y los posibles significados biológicos que podrían tener.

Al resolver el sistema de EDOs con la condición inicial $(1,1,1,0,1,0,0,0,0)$ que corresponde al atractor Iniciales Vasculares y modificar el valor del parámetro de degradación k_i2 del nodo SHR a 1.4, se pierde dicha condición y se recupera el estado $(1,1,1,0,0,0,0,0,0)$ que corresponde al atractor Columela Epidermis. Esto podría ser

corroborado si al examinar plantas sin el gen *SHR* el enhancer trap Q1630 (que se expresa en células iniciales de columela) aparece en la posición de las iniciales vasculares. Experimentalmente se ha observado que al ablar las células del centro quiescente, son iniciales vasculares las que ocupan su lugar y adquieren su identidad celular ([78]). También se ha reportado que al ablar una inicial de cortex-endodermis, es una inicial vascular la que ocupa su lugar y adquiere su identidad celular. Pero este par de ejemplos, en principio no podrían ser explicados por aumentar la tasa de degradación del producto de uno de los 9 nodos considerados en este trabajo, porque tanto el centro quiescente como iniciales de cortex-endodermis tienen más expresados que las iniciales vasculares. Otro mecanismo debe mediar esta transición.

Al resolver el sistema de EDOs con la condición inicial $(1,1,1,0,1,1,1,1,0)$ que corresponde al atractor Cortex Endodermis y modificar el valor del parámetro de degradación $k_i/2$ del nodo SHR a 1.4, se pierde dicha condición y se recupera el estado $(1,1,1,0,0,0,0,0,0)$ que corresponde al atractor Columela Epidermis. La evidencia experimental muestra que la pérdida de este gen no es suficiente para que las iniciales cortex-endodermis pierdan su identidad, si no que solamente son células diferenciadas del cortex y de endodermis las que se ven afectadas ([46]). Bajo la misma condición inicial, pero ahora al modificar el valor del parámetro de degradación $k_i/2$ de SCR a 1.4, se pierde dicha condición y se recupera el estado $(1,1,1,0,1,0,0,0,0)$ que corresponde al atractor Iniciales Vasculares. De igual forma que la transición pasada, la evidencia experimental muestra que la pérdida de este gen no es suficiente para que las iniciales cortex-endodermis pierdan su identidad, si no que solamente son células diferenciadas del cortex y de endodermis las que se ven afectadas ([47]). Nuevamente, al modificar solamente el valor del parámetro de degradación $k_i/2$ del nodo MGP se pierde la condición inicial $(1,1,1,0,1,1,1,1,0)$ y se recupera el estado $(1,1,1,0,1,1,1,0,1)$ que corresponde al atractor Centro Quiescente. La propuesta es examinar si en plantas sin el gen *MGP* el trap QC184 o el QC25 o el QC46 de promotor aparecen en la

posición de las iniciales Cortex-Endodermis.

Al resolver el sistema de EDOs con la condición inicial $(1,1,1,0,1,1,1,0,1)$ que corresponde al atractor Centro Quiescente y modificar el valor del parámetro de degradación $k_i/2$ del nodo SHR a 1.4, se pierde dicha condición y se recupera el estado $(1,1,1,0,0,0,0,0,0)$ que corresponde al atractor Columela Epidermis. Esto podría ser corroborado si al examinar plantas sin el gen *SHR* el enhancer trap Q1630 (que se expresa en células iniciales de columela) aparece en la posición de las células del centro quiescente. Bajo la misma condición inicial, pero ahora al modificar el valor del parámetro de degradación $k_i/2$ del nodo SCR a 1.4 se pierde dicha condición y se recupera el estado $(1,1,1,0,1,0,0,0,0)$ que corresponde al atractor Iniciales Vasculares. Nuevamente, al modificar solamente el valor del parámetro de degradación $k_i/2$ del nodo WOX5 a 1.99, se pierde la condición inicial se recupera el estado $(1,1,1,0,1,1,1,1,0)$ que corresponde al atractor Cortex Endodermis. También la propuesta es examinar si en plantas sin el gen *WOX5* el trap CD 92 de promotor (indicador de iniciales Cortex- Endodermis) aparece en la posición de las células del centro quiescente.

Cabe destacar que todos los nodos que produjeron alguna bifurcación pertenecen al módulo SCR/SHR o tienen alguna interacción con los genes pertenecientes a este módulo (ver Introducción), y que a excepción de WOX5, ningún otro nodo fuera de este módulo produjo bifurcación alguna.

Respecto al nodo PLT que no produjo bifurcación alguna, queda corroborado con que el fenotipo de las cuádruples mutantes ([41, 42]) pierde las iniciales del NCT y por lo tanto determina el meristemo, indicándonos el que no se haya producido alguna bifurcación con PLT, que estos genes son esenciales para el NCT.

Respecto a que las bifurcaciones de Auxina hayan convergido a un atractor desconocido podría tener sentido bajo la evidencia que indica que la pérdida del máximo de Auxina en QC e iniciales de columela, ocasiona que ambas se conviertan en células

de columela diferenciadas ([43]).

Por último cabe mencionar algunas de las ventajas que se identificaron para cada tipo de modelo: 1) el modelo discreto nos resultó útil para determinar el mínimo número de nodos necesarios y suficientes para recuperar un fenotipo observado, en nuestro caso el fenotipo del NCT de raíz, 2) el modelo continuo equivalente al modelo discreto nos fue útil para extender el modelo discreto y hacer estudios de cómo se diferencian las tasas de decaimientos de los genes, valores interruptores de expresión, tasas de saturación y otros aspectos cuantitativos; aspectos que no es posible analizar con el modelo discreto, y 3) El análisis de bifurcaciones nos fue útil para explorar y proponer mecanismos y rutas para transitar de un atractor (tipo celular) a otro. En particular, la tasa de degradación pareció ser un mecanismo capaz de generar estas transiciones. Tanto la investigación en torno a la red de regulación que sustenta la diferenciación celular y formación de patrones en el NCT de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, como el análisis de la reestructuración del paisaje de los atractores a los cuales converge dicha red, se ha seguido investigando por distintos miembros del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas (en particular ver García, et. al. [105]). Esta tesis constituyó parte de los análisis preliminares del repatroneamiento del paisaje de atractores usando las metodologías propuestas por Dávila-Velderraín [73].

Capítulo 5

Conclusiones

No todos los nodos produjeron alguna bifurcación. Los nodos que si lo hicieron, no fue aleatoria la transición que se produjo ni tampoco el gen que lo produjo. Dado un nodo que si produjo una bifurcación, sin importar del atractor inicial del que se partiera, siempre terminaba en el mismo atractor final. Estos nodos fueron: (SHR, SCR, Auxina, WOX5 y MGP). De confirmarse experimentalmente lo anterior, expone una forma de robustez del meristemo para recuperar cualquier pérdida de iniciales a partir de otro grupo de iniciales. Nuevamente señalar que estas conclusiones provienen de los análisis preliminares del repatroneamiento del paisaje de atractores usando las metodologías propuestas por Dávila-Velderraín [73], y que se ha seguido investigando por distintos miembros del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas (En particular ver García, et. al. [105]).

Bibliografía

- [1] Gilbert, Scott, F.; “Developmental Biology”. *Sinauer Associates Inc.* 2010, pp 1-2.
- [2] Huxley, Julian.; “Evolution. The Modern Synthesis.” 1942
- [3] Wilson, Edmund B.; “The cell-lineage of Nereis. A contribution to the cytogeny of the annelid body”. *Journal of morphology* **6**, 3, (1892), pp. 361-480.
- [4] Kornberg, R.D. and Thomas, J.O.; “Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA”. *Science* **184**, 1, (1974), pp. 868-871.
- [5] Luger, Karolin and Mäder, Armin W and Richmond, Robin K and Sargent, David F and Richmond, Timothy J; “Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution”. *Nature* **389**, 6648, (1997), Nature Publishing Group, pp. 251-260.
- [6] Weintraub M, Hasday JD, Mushlin AI, Lockwood DH; “A Double-blind Clinical Trial in Weight Control Use of Fenfluramine and Phentermine Alone and in Combination”. *Arch Intern Med* **6**, 144, (1984), pp. 1143–1148.
- [7] Weintraub, Harold; “Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states”. *Cell* **3**, 42, (2003), pp. 705 - 711.
- [8] Strahl, B.D. and Allis, C.D.; “The Language of Covalent Histone Modifications”. *Nature* **1**, 403, (2000), pp. 41-45.

- [9] Michael S Cosgrove, Jef D Boeke and Cynthia Wolberger; “Regulated nucleosome mobility and the histone code”. *Nature Structural & Molecular Biology* **1**, 11, (2004), pp. 1037–1043.
- [10] Guenther, Matthew G. et al.; “A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells”. *Cell* **1**, 130, (2002), pp. 77 - 88.
- [11] Li, Bing et al.; “The Role of Chromatin during Transcription”. *Cell* **4**, 128, (2004), pp. 707 - 719.
- [12] Thomas A. Down and Tim J. P. Hubbard; “Computational Detection and Location of Transcription Start Sites in Mammalian Genomic DNA”. *Genome Res.* **2**, 12, (2002), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 458-461.
- [13] Axel Visel, Matthew J. Blow, Zirong Li, Tao Zhang, Jennifer A. Akiyama, Amy Holt, Ingrid Plajzer-Frick, Malak Shoukry, Crystal Wright, Feng Chen, Veena Afzal, Bing Ren, Edward M. Rubin & Len A. Pennacc; “ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers”. *Nature* **1**, 457, (2009), pp. 854–858.
- [14] T Maniatis, S Goodbourn, JA Fischer; “Regulation of inducible and tissue-specific gene expression”. *Science* **1**, 236, (1987), pp. 1237-1245.
- [15] Marie Rude and Frank Costantin; “A enhancer contributes to the stage-specific expression of the human gene. The cell-lineage of Nereis. A contribution to the cytogeny of the annelid body”. *Development* **1**, 3, (1987), pp. 954-961.
- [16] Natalie Angier; “A First Step in Putting Genes Into Action: Bend the DNA”.
- [17] Frank Sauer, Stig K. Hansen, Robert Tjian; “Multiple TAFIIs Directing Synergistic Activation of Transcription”. *Science* **270**, 5243, (1995), pp. 1783-1788.

- [18] Qiao Zhou, Juliana Brown, Andrew Kanarek, Jayaraj Rajagopal and Douglas A. Melton; “In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells”. *Nature* **6**, 455, (2008), pp. 627–632.
- [19] Waddington, Conrad Hal; “The strategy of the genes”. 20 Routledge, 2014.
- [20] Esau, K.; “Anatomy of Seed Plants: DEMONSTRATION OF THE THREE GERM LAYERS IN THE SHOOT APEX OF DATURA BY MEANS OF INDUCED POLYPLOIDY IN PERICLINAL CHIMERAS”. *Journal of morphology* **6**, 3, (1977), John Wiley & Sons, New York, pp. 1-550.
- [21] Mansfield, L. G. Briarty and Gerd Jürgens; “Axis formation in plant embryogenesis: Cues and clues”. *Journal of morphology* **4**, 81, (1995), pp. 467-470.
- [22] Christian Dumas and Peter Rogowski; “Fertilization and early seed formation”. *Comptes Rendus Biologies* **10**, 331, (2008), pp. 715-725.
- [23] Colette A. Hove, Kuan-Ju Lu and Dolf Weijers; “Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo”. *Development* **2**, 142, (2015), pp. 420-430.
- [24] Saiko Yoshida, Pierre Barbier de Reuille, Brendan Lane, George W. Bassel, Przemyslaw Prusinkiewicz, Richard S. Smith; “Genetic Control of Plant Development by Overriding a Geometric Division Rule”. *Developmental cell* **1**, 29, (2014), pp. 75-87.
- [25] B. Scheres, H. Wolkenfelt, V. Willemsen, M. Terlouw, E. Lawson, C. Dean, P. Weisbeek; “Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials”. *Development* **6**, 120, (1994), pp. 2475-2487.
- [26] Insoon Kim and Patricia Zambrysk; “Cell-to-cell communication via plasmodesmata during Arabidopsis embryogenesis”. *Journal of morphology* **6**, 8, (2005), pp. 593-599.

- [27] M. K. Barton, R. S. Poethig; "Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant". *Development* **5**, 119, (1993), pp. 823-831.
- [28] A., Satina, A. F. Blakeslee Amos G. Avery; "DEMONSTRATION OF THE THREE GERM LAYERS IN THE SHOOT APEX OF *DATURA* BY MEANS OF INDUCED POLYPLOIDY IN PERICLINAL CHIMERAS". *American journal of botany* **10**, 27, (1940), pp. 361-480.
- [29] Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.; "Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root". *Development* **119**, 1, (1993), pp. 71-84.
- [30] S. B. Cormack and L. Stubbs; "The production of 96 sulphuric acid on a chamber plant". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **5**, 68, (1949).
- [31] H. von Guttenberg; "Die Ntwicklung der Wurzel". *Phytomorph* **2**, 14, (1964), pp. 265-287.
- [32] Thimann, K.V.; "Hormone action in the whole life of plants". *The University of Massachusetts Press, Amherst*.
- [33] Tim Ulmasov, Jane Murfett, Gretchen Hagen, and Tom J. Guilfooy; "Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements". *The Plant Cell* **2**, 9, (1997), pp. 1963-1971.
- [34] Christian S.Hardtke and Thomas Berleth; "The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development". *The EMBO Journal* **5**, 17, (1998), pp. 1405-1411.

- [35] Thorsten Hamann, Ulrike Mayer and Gerd Jürgens; “The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo”. *Development* **3**, 126, (1999), pp. 1387-1395.
- [36] Thorsten Hamann, Eva Benkova, Isabel Bäurle, Marika Kientz, and Gerd Jürgens; “The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning”. *Genes and Development* **2**, 16, (2002), pp. 1610–1615.
- [37] Dean Rouse, Pamela Mackay, Petra Stirnberg, Mark Estelle and Ottoline Leyse; “Changes in Auxin Response from Mutations in an AUX/IAA Gene”. *Science* **227**, 279, (1998).
- [38] Qing Tian and Jason W. Reed; “Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene”. *Development* **6**, 126, (1998), pp. 711-721.
- [39] Renhou Wang Mark Estelle; “Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway”. *Journal of morphology* **3**, 21, (2014), pp. 51-58.
- [40] D. Roeland Boer, Alejandra Freire-Rios6, Willy A.M. van den Berg, Terrens Saaki, Iain W. Manfield, Stefan Kepinski, Irene López-Vidrieo, Jose Manuel Franco-Zorrilla, Sacco C. de Vries, Roberto Solano and Dolf Weijer; “Structural Basis for DNA Binding Specificity by the Auxin-Dependent ARF Transcription Factors”. *Cell* **3**, 156, (2014), pp. p577–589.
- [41] Mitsuhiro Aida, Dimitris Beis, Renze Heidstra, Viola Willemsen, Ikram Blilou, Carla Galinha, Laurent Nussaume, Yoo-Sun Noh, Richard Amasino and Ben Scheres; “The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche”. *Cell* **2**, 119, (2004), pp. 109–120.

- [42] Carla Galinha, Hugo Hofhuis, Marijn Luijten, Viola Willemsen, Ikram Blilou, Renze Heidstra and Ben Scheres; “PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development”. *Nature* **25**, 449, (2007).
- [43] Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S. And Swarup, R.; “AUX/LAX Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during Arabidopsis Development”. *The plant cell* **7**, 24, (2012), pp. 2874–2885.
- [44] Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. And Zazimalová, E. ; “The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters”. *Journal of morphology* **12**, 10, (2009).
- [45] Sabrina Sabatini, Dimitris Beis, Harald Wolkenfelt, Jane Murfett, Tom Guilfoyle, Jocelyn Malamy, Philip Benfey, Ottoline Leyser, Nicole Bechtold, Peter Weisbeek and Ben Scheres.; “An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root”. *Cell* **6**, 99, (1999), pp. 463–472.
- [46] Philip N. Benfey, Paul J. Linstead, Keith Roberts, John W. Schiefelbein, Marie-Theres Hauser and Roger A. Aeschbacher; “Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis”. *Journal of morphology* **2**, 119, (1993), pp. 57-70.
- [47] Sabrina Sabatini, Renze Heidstra, Marjolein Wildwater and Ben Scheres; “SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem”. *Genes and Development* **6**, 3, (2003), pp. 361-480.
- [48] Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G. and Benfey, P. N.; “The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root”. *Cell*, **86**, 3, (1996), pp. 423-433.

- [49] Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., & Laux, T.; “Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*”. *Development* **131**, 3, (2004), pp. 657-668
- [50] Hiromi Ogasawara, Ryuji Kaimi, Joseph Colasanti and Akiko Kozaki; “Activity of transcription factor JACKDAW is essential for SHR/SCR-dependent activation of SCARECROW and MAGPIE and is modulated by reciprocal interactions with MAGPIE, SCARECROW and SHORT ROOT”. *Plant Mol Biol* **4**, 77, (2011), pp. 489–499.
- [51] Ananda K. Sarkar, Marijn Luijten, Shunsuke Miyashima, Michael Lenhard and Takashi Hashimoto, Keiji Nakajima, Ben Scheres, Renze Heidstra & Thomas Laux; “Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizer”. *Nature* **12**, 446, (2007), pp. 361-480.
- [52] Daniel De Backer, Patrick Biston, Jacques Devriendt, Christian Madl, Didier Chochrad, Cesar Aldecoa, Alexandre Brasseur, Pierre Defrance, Philippe Gontignies, and Jean-Louis Vincent; “Comparison of Dopamine and Norepinephrine in the Treatment of Shock”. *N Engl J Med* **6**, 362, (2010), pp. 779-789.
- [53] Raff, R.A; “The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form”. *University of Chicago Press pp. 520. 1*, (1996).
- [54] Velten, Kai; “Mathematical modeling and simulation: introduction for scientists and engineers”. *John Wiley & Sons* 2009.
- [55] Noble Denis; “The Music of Life”. *Oxford University Press Canada 1*, (2006).
- [56] Bulyk, M., Walhout, A.J.; “Gene Regulatory Networks. In In Handbook of Systems Biology”. 2013, 65-88.

- [57] Barzel, B., Sharma, A. and Barabási, A-L.; “Graph Theory Properties of Cellular Networks. In In Handbook of Systems Biology”. 2013, 177-193.
- [58] Kauffman, S., A.; “Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets.” *Journal of theoretical biology* **22**, 3, (1969), pp. 437-467.
- [59] Kauffman, Stuart, A.; “Developmental logic and its evolution”. *Bioessays* **2**, 6, (1987), pp. 82-87.
- [60] Stuart A. Kauffman; “The origins of order: Self organization and selection in evolution”, Oxford university press, 1993.
- [61] Huang, S., and Kauffman, S., A.; “Complex Gene Regulatory Networks—from Structure to Biological Observables: Cell Fate Determination”. *Encyclopedia of complexity and systems science*. Springer New York, 2009, pp. 1180-1213.
- [62] Huang, S.; “Multistability and multicellularity: Cell fates as highdimensional attractors of gene regulatory networks.” *Computational systems biology, 2005*.
- [63] Espinosa-Soto, Carlos, Pablo Padilla-Longoria, and Elena R. Alvarez-Buylla. “A gene regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles”. *The Plant Cell* **16**, 11 (2004), pp. 2923-2939.
- [64] Horb, Marko E et al.; “Experimental Conversion of Liver to Pancreas.”. *Current Biology* **2**, 13, (1892), pp. 105-115.
- [65] Azpeitia, Eugenio and Benítez, Mariana and Vega, Iliusi and Villarreal, Carlos and Alvarez-Buylla, Elena R; “Single-cell and coupled GRN models of cell patterning in the Arabidopsis thaliana root stem cell niche”. *BMC systems biology* **4**,1,(2010), BioMed Central Ltd, pp. 134.

- [66] Welch, D., Hassan, H., Blilou, I., Immink, R., Heidstra, R. and Scheres, B.; “Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT ROOT action”. *Genes and development*, **21**, 17, (2007) pp. 2196-2204.
- [67] Yvonne Stahl, Rene H. Wink, Gwyneth C. Ingram, and Rüdiger Simon; “A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in Arabidopsis Root Meristems. *Current Biology* **11**, 19, (2009), pp. 909–914.
- [68] Azpeitia, Eugenio and Dávila-Velderrain, José and Villarreal, Carlos and Álvarez-Buylla, Elena R; “Flower Development: Gene regulatory network models for floral organ determination”. *Springer* 2014, pp. 441-469.
- [69] Sole, Ricard, J.; “Phase transitions”. *Princeton University Press* 2011
- [70] Davila-Velderrain, Jose and Martinez-Garcia, Juan C and Alvarez-Buylla, Elena R; “Modeling the epigenetic attractors landscape: toward a post-genomic mechanistic understanding of development”. *Frontiers in genetics* **6**,(2015).
- [71] Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Dávila, E. B., Chaos, A., Espinosa-Soto, C., & Padilla-Longoria, P.; “Gene regulatory network models for plant development”. *Current opinion in plant biology* **10**, 1, (2007), pp. 83-91
- [72] Mendoza, L., & Alvarez-Buylla, E. R.; “Dynamics of the genetic regulatory network for arabidopsis thaliana flower morphogenesis ”. *Journal of theoretical biology* **193**, 2, (1998), pp. 307-319
- [73] Davila-Velderrain, Jose and Villarreal, Carlos and Alvarez-Buylla, Elena R; “Reshaping the epigenetic landscape during early flower development: induction of attractor transitions by relative differences in gene decay rates” *BMC systems biology* **9**,1,(2015), *BioMed Central Ltd*, pp. 20

- [74] Müssel, Christoph and Hopfensitz, Martin and Kestler, Hans A; “BoolNet an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks”. *Bioinformatics* **26**, 10, (2010), Oxford Univ Press, 1378-1380.
- [75] Glass, Leon; “Classification of biological networks by their qualitative dynamics”. *Journal of Theoretical Biology* **54**, 1, (1975), Elsevier, pp. 85-107.
- [76] Soetaert, Karline and Cash, Jeff and Mazzia, Francesca; “Solving differential equations in R”. *Springer Science & Business Media*, 2012.
- [77] Soetaert, KER and Petzoldt, Thomas and Setzer, R Woodrow; “Solving differential equations in R”. *The R Journal* **2**, 2010.
- [78] Claudia van den Berg, Viola Willemsen, Giel Hendriks, Peter Weisbeek and Ben Scheres; “Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem”. *Nature* **20**, 390, (1997).
- [79] Benítez, Mariana and Miramontes, Octavio and Valiente-Banuet, Alfonso; “Frontiers in Ecology, Evolution and Complexity”, CopIt ArXives, 2014.
- [80] Slack, Jonathan MW; “Conrad Hal Waddington: the last renaissance biologist?.”, *Nature Reviews Genetics* 3.11 (2002): 889-895.
- [81] Flores Valdés, Jorge, and Gustavo Martínez Mekler; “Encuentros con la complejidad”. *Siglo XXI Editores* 2011. México, D.F.
- [82] Carvunis, R., Roth, F. P., Calderwood, M. A., Cusick, M. E., Superti-furga, G. and Vidal, M; “Interactome networks. In Handbook of Systems Biology”. 2013, 45–63.
- [83] Davila-Velderrain, Jose and Alvarez-Buylla, Elena R; “Bridging the genotype and the phenotype: towards an epigenetic landscape approach to evolutionary systems biology”. *bioRxiv* Cold Spring Harbor Labs Journals, 2014, pp. 004218.

- [84] Sun Zhongyao, Sun and Albert Réka; “Boolean Models of Cellular Signaling Networks. In In Handbook of Systems Biology”. 2013, 197-210.
- [85] Aldana, M., Coppersmith, S and Kadanoff, L. P; “Boolean dynamics with random couplings. In Perspectives and Problems in Nolinear Science”. Springer New York, 2003, pp. 23-89.
- [86] Huxley, Julian.; “Evolution. The Modern Synthesis.” 1942
- [87] Benfey, Philip N and Scheres, Ben; “Arabidopsis as a Model for Systems Biology”. *Elsevier Inc.*, 2013
- [88] Verbelen, J. P., Cnodder, T. D., Le, J., Vissenberg, K., & Baluska, F. (2006).; “The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone”. *Plant signaling & behavior* **1**, 6, (2006), pp. 296-304
- [89] Baluska, F., Volkmann, D., & Barlow, P. W.; “Specialized zones of development in roots: view from the cellular level”. *Plant Physiology* **112**, 1, (1996)
- [90] Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G. and Benfey, P. N.; “The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling”. *Cell* **101**, 5, (2000), pp. 555-567.
- [91] Hassan, H., Scheres, B. and Blilou, I.; “JACKDAW controls epidermal patterning in the *Arabidopsis* root meristem through a non-cell-autonomous mechanism”. *Development*, **137**, 9, (2010), pp. 1523-1529.
- [92] Stahl, Y., Wink, R. H., Ingram, G. C. and Simon, R.; “A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems”. *Current Biology*, **19**, 11, (2009), pp. 909-914.

- [93] Cui, H., Levesque, M. P., Vernoux, T., Jung, J. W., Paquette, A. J., Gallagher, K. L. and Benfey, P. N.; “An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants”. *Science*, **316**, 5823, (2007), pp. 421-425.
- [94] Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K. and Laux, T. “Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers”. *Nature*, **446**, 7137, (2007), pp. 811-814.
- [95] Welch, D., Hassan, H., Blilou, I., Immink, R., Heidstra, R., & Scheres, B.; “*Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action”. *Genes & Development* **21**, 17, (2007), pp.), 2196-2204
- [96] Villarreal, Carlos and Padilla-Longoria, Pablo and Alvarez-Buylla, Elena R; “General theory of genotype to phenotype mapping: derivation of epigenetic landscapes from N-node complex gene regulatory networks”. *Physical review letters* **109**, 11, (2012), APS, pp. 118102.
- [97] Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M. and Scheres, B.; “SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem”. *Genes and development*, **17**, 3, (2003), 354-358.
- [98] Scheres, B., Benfey, P. and Dolan, L. “Root development”. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 2002, pp. 1.
- [99] Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R. and Scheres, B.; “PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development”. *Nature*, **449**, 7165, (2007), pp. 1053-1057.

- [100] Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G. and Benfey, P. N.; “The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root”. *Cell*, **86**, 3, (1996), pp. 423-433.
- [101] Levesque, M. P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J. Y., Blilou, I. and Scheres, B.; “Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis”. *PLoS biology*, **4**, 5, (2006), pp. 739.
- [102] Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A. and Perata, P.; “A turanose insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in Arabidopsis thaliana”. *The Plant Journal*, **44**, 4, (2006), pp. 633-645.
- [103] Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C. and Scheres, B. “The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche”. *Cell*, **119**, 1, (2004) pp. 109-120.
- [104] Mockaitis, K and Estelle, M.; “Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm”. *Annual review of cell and developmental biology*, **24**, (2008), pp. 55-80.
- [105] García-Gómez, M. L., Azpeitia, E., & Álvarez-Buylla, E. R.; “A dynamic genetic-hormonal regulatory network model explains multiple cellular behaviors of the root apical meristem of Arabidopsis thaliana”. *PLoS computational biology*, **13**, 4, (2017).
- [106] Alvarez-Buylla, Elena R and Chaos, Álvaro and Aldana, Maximino and Benítez, Mariana and Cortes-Poza, Yuriria and Espinosa-Soto, Carlos and Hartasánchez, Diego A and Lotto, R Beau and Malkin, David and Escalera Santos, Gerardo J and others; “Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network

epigenetic landscape”. *Plos one* **3**, 11, (2008), Public Library of Science, pp. e3626.

[107] Nakajima, Keiji, et al; “Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning.” *Nature*, (2001), pp. 307-311..