



Universidad de Granada
Máster en Física y Matemática
Departamento de Matemática Aplicada

Title

Bartolomé Ortiz Viso

Septiembre 2018

Abstract

Agradecimientos

I would like to express my gratitude to:

- My sister and my parents. Thank you for being there every time I need you.

And also: To all my professors, for the education they give me. Specially:

- My supervisor: Óscar Sánchez .

Thank you for guiding and helping me at my first steps in applied mathematical research.

‘A mathematician, like a painter or a poet, is a maker of patterns. If his patterns are more permanent than theirs, it is because they are made with ideas.’

G. H. Hardy

Índice general

Abstract	I
Agradecimientos	III
1. Introducción	1
1.1. Motivación y objetivos	1
1.2. Sistema de señalización de Shh	3
1.2.1. Descripción bioquímica del proceso	4
1.2.2. Interacción entre Ptc y Shh	5
1.2.3. Señal de transcripcion	7
1.2.4. Dinámica de Gli3 y Gli3R	7
1.3. Modelado BEWARE	9
2. Modelo clásico	12
2.1. Introducción	12
2.2. Modelado BEWARE	12
2.3. Sistema final	14
2.4. Estados estacionarios	15
2.5. Simulaciones	17

2.5.1. Parámetros	17
2.5.2. Variación del operador BEWARE (promoter y basal)	18
2.5.3. Evolución temporal	18
2.5.4. Análisis numérico de los estados estacionarios	19
2.5.5. Diagramas de bifurcación	19
2.6. Críticas	19
3. Modelo alternativo	22
3.1. Introducción	22
3.2. Modelado BEWARE	22
3.3. Sistema final	22
3.4. Estados estacionarios	24
3.5. Simulaciones	26
3.5.1. Variación del operador BEWARE	26
3.5.2. Evolución temporal	26
3.5.3. Análisis numérico de los estados estacionarios	26
4. Análisis cualitativo	28
4.1. Notas provisionales	28
4.2. Parámetros	28
5. Conclusiones	30
5.1. Conclusiones y trabajo futuro	30
Bibliografía	30

Índice de cuadros

2.1. Tabla de parámetros de [Lai et al., 2004]	17
4.1. Tabla de parámetros, operador <i>BEWARE</i>	29

Índice de figuras

1.1. Representación esquemática de la proteína de Shh. Fuente: [Wikipedia contributors, 2018]	2
1.2. Representación esquemática de la proteínas Gli1, Gli3 y Smo. Fuente: [Hornbeck PV, 2015]	4
1.3. Representación esquemática de la red de transcripción. Fuente: [Lai et al., 2004]	6
2.1. Variación del Operador Promoter bajo la variación de Gli3R	18
2.2. Variación del Operador Basal bajo la variación de Gli3R	19
2.3. Comparación numérica de las formas de reducidas de Promoter y Basal (en negro discontinuo) frente a las formas de [Lai et al., 2004]	20
2.4. Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 0,1$	20
2.5. Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 1,5$	21
2.6. Diagrama de Bifurcación de [Lai et al., 2004] con Gli frente a r_{g3b}	21
3.1. Variación del nuevo operador BEWARE	26
3.2. Variación del nuevo operador BEWARE en más rango	27
3.3. Evolución temporal del nuevo operador BEWARE	27

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación y objetivos

[Cambon and Sanchez, , Cambon, 2017, Lai et al., 2004, Saha and Schaffer, 2006, Bintu et al., 2005b, Parker et al., 2011, Meijer et al., 2012]

Durante el desarrollo humano, las células están expuestas a una compleja red de señales reguladoras las cuales deben interpretar correctamente para desarrollar las funcionalidades necesarias requeridas por el organismo. Por tanto, se pueden entender la transducción de señales y las cascadas de regulación genética como mecanismos de procesamiento de la información que traducen la información extracelular en decisiones intracelulares.

El presente trabajo pretende mostrar las diferencias en cuanto a comportamiento cualitativo que se pueden encontrar modelando estos complejos sistemas de regulación biológicos mediante distintos acercamientos teóricos.

En particular, nos centraremos en el estudio del sistema de señalización del Sonic Hedgehog (en adelante Shh). El Shh es una proteína que conforma uno de los factores de señalización canónicos, secretados para regular la función celular y, por tanto, el desarrollo en numerosos sistemas.

Por ejemplo, la importancia del Shh se pone de manifiesto teniendo en cuenta algunos de sus muchos roles durante el desarrollo:

- Modela la diferenciación del tejido de la médula espinal.



Figura 1.1: Representación esquemática de la proteína de Shh. Fuente: [Wikipedia contributors, 2018]

- Modela la diferenciación del tejido de la yema del miembro.
- Controla la diferenciación neuronal del mesencéfalo.
- Controla la diferenciación neuronal del prosencéfalo ventral.

todo: add references

Una de las características más importantes es que el Shh puede modelar distintos tejidos durante el desarrollo formando un gradiente de concentración. Debido a este gradiente las células detectan su posición dentro del mismo y se diferencian en distintos fenotipos ¹ según la concentración.

Aparte, como se destaca en [Lai et al., 2004] el Shh también controla la proliferación de numerosas poblaciones de células durante el desarrollo, incluidas las células granulares del cerebelo. Esto implica que las mutaciones dentro del sistema de señalización/regulación del Shh se han asociado con la proliferación de tumores (cáncer) en numerosos tejidos, como en el reciente artículo [Clement et al., 2007].

Con esta breve introducción ponemos de manifiesto la importancia de conocer el comportamiento de estas redes de señalización. Nuestro interés principal será conocer como afecta de manera

¹Denominamos fenotipo a la expresión del genotipo, es decir, la expresión de los genes, en función de un determinado ambiente.

cualitativa, un cambio en el procedimiento teórico de modelar los mecanismos bioquímicos involucrados en la expresión genética. Centrándonos en redes de regulación/expresión que relacionan las proteínas *Ptc*, *Gli* y *Shh*.

Acotando aún más el sujeto de estudio, los factores de transcripción dentro de la familia *Gli* desempeñan papeles críticos en la mediación e interpretación de las señales de *Shh* [Altava, 1999]. Elucidar cómo funcionan nuestras redes de regulación y las proteínas *Gli* nos permitirá ampliar nuestro conocimiento de cómo las células proliferan, diferencian o sobreviven en respuesta a señales de *Shh*, procesos con importancia capital en una gran cantidad de aspectos como por ejemplo [Dahmane et al., 1997]. En especial es importante conocer de qué manera afectan estos cambios a la aparición/desaparición y/o existencia/inexistencia de estados estables. Y, por supuesto, de cómo están relacionados y cómo podemos llegar de unos a otros.

Nuestro trabajo recoge un estudio completo del modelo clásico propuesto en [Lai et al., 2004], aportando nueva información dentro del mismo, y un conjunto de experimentos numéricos relacionando nuevos desarrollos teóricos con el modelo clásico.

Además, al contrario que los artículos originales, todos los códigos se encuentran online y libres para su uso y reproducibilidad, vía archivos y vía *Jupyter Notebooks*.

Por otra parte, presentamos un estudio teórico y numérico de una nueva forma de modelar desde el enfoque termodinámico este proceso, propuesta en [Cambon and Sanchez,] para comparar las diferencias cualitativas entre ambos, y avanzar qué posibles resultados podríamos obtener de este nuevo modelo.

1.2. Sistema de señalización de Shh

En esta sección pretendemos ofrecer una visión general de la red de regulación de *Shh* que se observa en la célula. Todos los modelos usados dentro de este trabajo poseen puntos de vista compartidos, por lo que todas aquellas características que comparten ambos modelos se pueden encontrar aquí.

Así pues, se puede encontrar en esta sección la descripción bioquímica del sistema de señalización de *Shh* y las ecuaciones estándar empleadas en los procesos e interacciones bioquímicas que poseen ambos modelos.

1.2.1. Descripción bioquímica del proceso

La red de señalización de *Shh* comprende la actividad de varias proteínas 1.2 y genes :

- **Sonic Hedgehog (Shh).** Gen: *shh*²
- **Smoothened (Smo):** Receptor de la superficie celular.
- **Patched (Ptc):** Receptor de la superficie celular. Gen: *ptc*
- **Factores de transcripción *Gli*:**
 - **Gli:** Engloba a *Gli1* y *Gli2*, puesto que sus funciones son similares. Genes: *gli1*, *gli2*
 - **Gli3:** Gen: *gli3*
 - **Gli3R:** Resultado de la proteólisis³ de *Gli3*

Además, según la estrategia al modelar, del efecto de la *ARN polimerasa*.

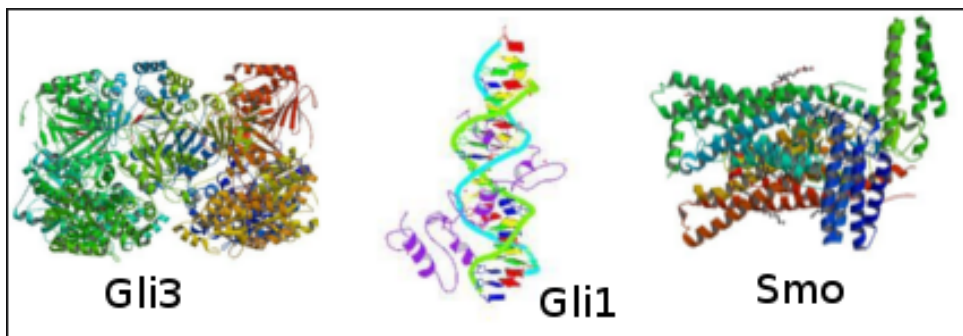


Figura 1.2: Representación esquemática de las proteínas Gli1, Gli3 y Smo. Fuente: [Hornbeck PV, 2015]

Presentamos el proceso de forma esquemática siguiendo las indicaciones de [Lai et al., 2004]:

1. El *Shh* interactúa con un receptor de superficie celular denominado *Patched (Ptc)*.
2. El *Ptc* inhibe la actividad de señalización de una segunda proteína de la superficie celular: *Smoothened (Smo)*.

²De forma convencional los genes que codifican una determinada proteína vienen expresados con el mismo nombre, pero en minúscula

³La proteólisis es la degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas peptidasas, o por medio de digestión intracelular.

3. La unión de *Shh* y *Ptc* neutraliza el efecto inhibitor de *Ptc* sobre *Smo*.
4. Cuando *Smo* no está inhibido afecta a la actividad de la familia de factores de transcripción *Gli*
5. En ausencia de *Shh*, *Gli3* es transformado mediante la proteólisis en *Gli3R* (represor de la transcripción génica)
6. Tras la señalización de *Shh* y *Smo*, la proteólisis se bloquea, lo que lleva a la acumulación de *Gli3*
7. El *Gli3* (activador de la transcripción génica) activa la transcripción de los genes *gli1*, *gli2*, *ptc*, *shh*.
8. La activación de la transcripción de estos genes provoca la creación de *Gli* y *Ptc*, lo cual a su vez, favorece la generación de *Gli* y *Ptc*.

El valor añadido de incluir la ARN polimerasa en el modelo vendrá explicado en la sección [?] . En la figura 1.3 se puede encontrar un dibujo esquemático del proceso.

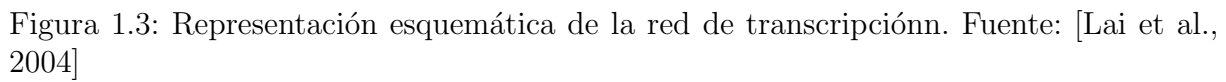
1.2.2. Interacción entre Ptc y Shh

Shh y Ptc se unen de forma reversible con una constante de disociación k_{shh} mediante el siguiente esquema:



Además, asumimos que las uniones entre Ptc y Shh llegan rápidamente a un estado estacionario si tomamos la escala temporal de transcripción genética y síntesis de proteínas. Para conocer cual es, utilizamos la ecuación de Scatchard.

La ecuación de Scatchard es una ecuación utilizada en bioquímica y biología molecular para calcular la constante de afinidad de un ligando con una proteína, propuesta por primera vez en [Scatchard, 1949].


$$k_{Shh} = \frac{[Shh.Ptc]}{[Shh][Ptc]}$$
$$[Shh.Ptc] = k_{Shh}[Shh][Ptc]$$
$$\nu = \frac{[Shh.Ptc]}{[Ptc_{Total}]} \quad (1.2)$$
$$\nu = \frac{[Shh.Ptc]}{[Ptc_{Total}]} = \frac{[Shh.Ptc]}{[Ptc.Shh] + [Ptc]} = \frac{k_{Shh}[Shh][Ptc]}{[Ptc] + k_{Shh}[Shh][Ptc]} = \frac{K_{Shh}[Shh]}{1 + k_{Shh}[Shh]}$$

Como las constantes de asociacion y disociacion son la misma:

$$\nu = \frac{[Shh]}{[Shh] + K_{Shh}} \quad (1.3)$$

En este caso, uniendo 1.3 y 1.2 expresión:

$$[Shh.Ptc] = \frac{[Shh][Ptc_{Total}]}{k_{Shh} + [Shh]} \quad (1.4)$$

1.2.3. Señal de transcripcion

Vamos a considerar el término **Señal** como la fracción de *Smo* liberada de la inhibicion del *Ptc*. Aunque *Ptc* y *Smo* no interactúan físicamente [Lai et al., 2004] propone modelarlo de manera similar a la union de *Shh* y *Ptc*, puesto que la cantidad de *Smo* libre puede interpretarse como la cantidad que no esta interactuando de forma eficiente con el *Ptc*. En este caso, tenemos:

$$[Shh.Ptc] = \frac{[Ptc_{libre}][Smo_{Total}]}{k_{Ptc} + [Ptc_{libre}]} \quad (1.5)$$

Donde *Ptc_{libre}* hace referencia al *Ptc* que no está interactuando con *Shh* y *k_{Ptc}* es la mitad de la concentración de *Ptc* necesaria para inhibir la actividad de *Smo*. Tal y como comentamos, definimos la **señal** (en adelante *Signal*) como:

$$Signal = \frac{[Smo_{libre}]}{[Smo_{Total}]} = \frac{[Smo_{total}] - [Smo.Ptc]}{[Smo_{Total}]} \quad (1.6)$$

Finalmente, usando 1.5 y 1.4 en 1.6 nos queda:

$$Signal = \frac{[Smo_{libre}]}{[Smo_{Total}]} = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{Ptc}{k_{ptc}}} \quad (1.7)$$

1.2.4. Dinámica de Gli3 y Gli3R

Dinámica de Gli3

En ausencia de señalización *Shh*, *Gli3* se escinde proteolíticamente en un fragmento que funciona como un represor transcripcional. En [Wang et al., 2000] muestran que el grado de proteólisis

disminuye con el aumento de Shh. En este caso, imponemos que la tasa de proteólisis varíe inversamente con el nivel de señalización Shh en el sistema.

Así, nuestra la cantidad de Gli3 disminuye con una tasa k_{g3rc} que se modifica por la cantidad de *Signal* en el sistema y un parámetro de saturación K_{g3rc} .

A su vez, se ha demostrado que a medida que se activa la red de regulación génica, gli3 es transcripcionalmente reprimido [Wang et al., 2000]. Dos lecturas del grado de activación de nuestra red son Ptc y Gli.

Esto es importante, puesto que, aunque Ptc ofrece tambien una lectura del grado de activación, los resultados pueden variar en gran cantidad dependiendo de cual elijamos.

Por lo tanto, asumimos una relación inversa entre la transcripcion de gli3 y la concentración de Gli en las ecuaciones para Gli3, partiendo de una tasa basal de generacion de Gli3 que viene dada por la constante r_{g3b} .

Finalmente, con toda la información podemos entender como modelar matemáticamente la evolución de Gli3:

$$\frac{dGli_3}{dt} = \frac{r_{g3b}}{Gli} - k_{deg}Gli_3 - \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) Gli_3, \quad (1.8)$$

Dinámica de Gli3R

La existencia de esta molecula es completamente dependiente a la existencia de Gli3.

En su dinámica vamos a encontrar un término positivo exactamente igual a la rapidez en la que Gli3 es separado de forma proteolitica y, además, un término de degradacion (cuya constate de degradación es igual a la constante de degradación de Gli3).

Esto nos deja con la expresión:

$$\frac{dGli3R}{dt} = \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) Gli_3 - k_{deg}Gli3R, \quad (1.9)$$

1.3. Modelado BEWARE

[Ay and Arnosti, 2011] [Bintu et al., 2005b] [Bintu et al., 2005a] [Fakhouri et al., 2010] [He et al., 2010] [Segal et al., 2008] **Rellenar los huecos con estas referencias**

Enfoques en el modelado de la regulación génica

El análisis detallado de las redes transcripcionales es clave para comprender los procesos biológicos centrales. Modelar correctamente la regulación de genes es fundamental para tal fin, puesto que la expresión génica está en el nexo de muchos procesos biológicos, y los cambios en los niveles de proteínas reguladoras o enlaces pueden ser la base de, por ejemplo, enfermedades de gran impacto como el cáncer.

A la hora de profundizar y aportar nuevo conocimiento en este área, las matemáticas se han desarrollado por diversos caminos, resaltando unas u otras características. Como se destaca en [Ay and Arnosti, 2011] dentro de este actual abanico de técnicas tenemos dos grandes estrategias iniciales: *Enfoque analítico o estadístico*.

Durante nuestro trabajo nos hemos centrado en el primero. Dentro del cual podemos encontrar tres grandes ramas: *modelos termodinámicos, booleanos y de ecuaciones diferenciales*. Cada una de las cuales debe ser tomada con cautela para obtener el máximo beneficio en cuanto al conocimiento del comportamiento cualitativo y cuantitativo de las soluciones.

Lo más habitual presentado en el grado y en el máster son los modelos basados en ecuaciones diferenciales, ya sean ordinarias o en derivadas parciales. Estos modelos surgen de la necesidad de crear sistemas dinámicos con muchas componentes que evolucionen a lo largo del tiempo. Como hemos visto en la sección anterior, esta técnica ha sido empleada por los dos modelos estudiados, en aquellos comportamientos dependientes de proteínas que modelaban la asociación y disociación de compuestos.

Sin embargo, a la hora de modelar el proceso de transcripción genética, tanto para *Gli* como para *Ptc*, el modelado va a seguir **el enfoque termodinámico**.

Este enfoque de modelado, como apunta [Ay and Arnosti, 2011], busca extraer información sobre la regulación génica a partir de las secuencias de las regiones reguladoras y la unión medida o inferida de los factores de transcripción específicos.

Es decir, supongamos que tenemos un promotor y algunos factores de transcripción que reprimen o promueven esta transcripción. En este caso, nuestro modelado quiere predecir cómo se activará o reprimirá la transcripción de un gen según estos factores y sus cantidades.

La clave fundamental modelando termodinamicamente es el calculo de cómo las diferentes combinaciones de distintos lugares y numeros de union en una región reguladora funcionan juntos para producir la expresión a lo largo del tiempo de un gen.

A grandes rasgos suponemos que la actividad del gen es proporcional al nivel de activadores unidos e inversamente proporcional al nivel de represores.

Procedimiento

Sea cual sea la estrategia a seguir, modelado termodinámico sigue dos pasos comunes a todos los modelos de esta rama:

- En primer lugar, se enumeran todos los estados posibles del potenciador, en función de las posibles interacciones entre el factor de transcripción y el ADN, con un peso estadístico asignado a cada estado.
- El segundo lugar calculamos el resultado de la expresión génica de cada estado. Los estados con alta ocupación de activadores son más proclives a inducir una expresión alta, mientras que la ocupación del represor puede dar como resultado una baja expresión.

Durante el primer paso es indispensable el calculo de la probabilidad de que un gen se ponga en funcionamiento, para ello calculamos la fracción de los estados con una cantidad de activadores unidos destacable frente a represores.

Esto por si solo ya genera una gran cantidad de estados a tener en cuenta, pensemos en nuestro caso: nuestra región regulatoria tiene tres lugares de unión, por tanto habrá nueve estados posibles, vinculados y no vinculados. Si queremos añadir nueva información (por ejemplo si nos interesamos por elementos con cinco lugares de unión) el numero de estados aumenta considerablemente (en nuestro caso hipotetico 25 entre vinculados y no vinculados).

Otro de los factores a tener en cuenta es el calculo del peso estadístico para un estado. Para ello usamos la concentración de factores de transcripción y la afinidad de estos factores por sus

sitios en el ADN. Para una unión abundante de proteínas a sitios de alta afinidad, el peso será mucho mayor que en los casos en que la transcripción el factor es escaso o el sitio de unión es débil. La probabilidad de cada estado se puede calcular por dividiendo el peso estadístico del estado por la suma del peso estadístico de todos los posibles estados.

Este proceso de cálculo puede incorporar propiedades que afectan la transcripción. por ejemplo, interacciones cooperativas y competitivas entre factores de transcripción y los efectos inhibidores de los represores sobre los activadores se pueden agregar explícitamente al modelo asignando pesos más altos o más bajos.

Como podemos observar, estamos ante una forma de modelado que nos da bastante juego a la hora de modificar distintos parametros y procedimientos. En particular, vamos a resaltar la mayor diferencia entre los distintos modelados que se han empleado en este trabajo:

- [Lai et al., 2004] modela la expresion genica como cantidad proporcional a la suma ponderada de los factores de transcripción.
- Por otra parte, [Cambon, 2017] proponen que la expresión génica sea proporcional a la probabilidad de union del ARN-polimerasa (*enfoque recruitment*), la cual viene modificada por los factores de transcripcion.

discutido a continuación, uno puede modelar la producción de expresión génica como proporcional a la unión probabilidad de la ARN polimerasa o suma ponderada de los factores de transcripción (

Críticas recibidas

Finalmente, como último apunte, aunque partimos un de una forma de modelado con amplios resultados queremos resaltar algunas de las criticas que ha recibido esta forma de modelar.

La implementación actual ignora procesos adicionales como la estructura y modificación de la cromatina, o la metilación del ADN, y no trata de forma independiente el reclutamiento de cofactores o la maquinaria general de transcripción.

Se supone que estos saltos teoricos no aportan gran información al sistema. (añadir referencias de esto a parte de [Ay and Arnosti, 2011])

Capítulo 2

Modelo clásico

2.1. Introducción

El modelo que planteamos en esta sección pertenece a el modelado considerado clásico realizado en [Lai et al., 2004].

Como tenemos gran parte de la dinámica ya planteada, en esta sección, tal y como avanzamos al principio, vamos a presentar la forma en la que se modela la generación de Gli y Ptc (la transcripción génica) aplicando un enfoque de métodos de termodinámica estadística.

2.2. Modelado BEWARE

Partimos de dos resultados experimentales que muestran que *gli1*, *gli2* y *ptc* están regulados transcripcionalmente por la señalización de Shh.

Definimos K_1 como la constante de enlace de disociación de equilibrio de Gli y K_2 como la constante de enlace de disociación de equilibrio de Gli3 (tanto activador como represor, Gli3R). Los dominios de unión a ADN de todas las formas de Gli están altamente conservados, lo que sugiere que estas las afinidades son similares.

Ante la decisión de que cantidad de enlaces tomar, [Lai et al., 2004], para simplificar, suponen que hay el mismo número de posibles enlaces Gli dentro de los promotores para Gli y Ptc.

El promotor puede existir en numerosos estados posibles (promotor vacío, dos Gli y un Gli3 y el resto de combinaciones de 3 elementos). Además la probabilidad de cada estado de unión está determinada por las concentraciones relativas de las tres especies (Gli, Gli3, Gli3R) y sus afinidades de unión al ADN.

Nuestro objetivo es desarrollar el modelo de acuerdo a procedimiento BEWARE, por tanto, para modelar el nivel de activación transcripcional del promotor, calculamos la suma de la probabilidad de cada posible estado del promotor multiplicado por la activación de transcripción de genes que la combinación particular induce.

Sin embargo, para ello debemos determinar correctamente el nivel de activación para un estado dado, con este fin [Lai et al., 2004, Saha and Schaffer, 2006] aplican varias reglas: En primer lugar la unión del número máximo de activadores transcripcionales (una combinación de Gli y Gli3) produjo un estado con la máxima tasa transcripcional posible, igual a $(v_{max,G} + r_{bas})$ para el promotor gli.

Aquí donde v_{max} es la tasa de transcripción inducida máxima y r_{bas} es igual a la tasa basal de transcripción que se obtendría para un promotor completamente independiente.

Implícita en esta expresión está la suposición de que [Lai et al., 2004] no tiene en cuenta la dinámica del ARNm, es decir, suponen que cada molécula de ARNm produce un número fijo de proteínas.

A continuación, se permite la posibilidad de unión cooperativa de proteínas al promotor, de forma que el promotor con uno o más factores unidos tuviera una afinidad incrementada por el siguiente factor. A este factor lo denominamos *factor de cooperatividad de unión* = c que habitualmente viene igualado a la unidad ($c = 1$).

Además, para cada número de activadores unidos menores que el número máximo de uniones posibles, la velocidad inducida $v_{max,G}$ se multiplica por un factor $e < 1$ para poner de manifiesto de una activación transcripcional menor que la máxima.

Además, para cada represor transcripcional *Gli3R* unido, la suma $(v_{max,G} + r_{bas})$ se multiplica por el factor de represión $r < 1$.

Con ambos elementos, multiplicamos la probabilidad de cada estado por la tasa de transcripción de cada estado, sumando los elementos resultantes entre sí y simplificando con ayuda de [Meurer et al., 2017].

El resultado son dos expresiones relativas al proceso promotor y el proceso de transcripción basal:

$$Promoter = \frac{(GliK_2 + Gli_3K_1)(3K_1^2K_2^2e^2 + 3K_1K_2ce(GliK_2 + Gli_3K_1 + 2Gli3RK_1er) + c^2(Gli^2K_2^2 + 3GliGli3K_1))}{K_1^2K_2^2(3Gli_3K_1 + 3Gli3RK_1 + K_2(3Gli + K_1)) + 3K_1K_2c(GliK_2 + Gli_3K_1 + Gli3RK_1)^2 + c^2} \quad (2.1)$$

$$Basal = \frac{K_1^2K_2^2(3GliK_2 + 3Gli_3K_1 + K_1(3Gli3Rr + K_2)) + 3K_1K_2c(GliK_2 + Gli_3K_1 + Gli3RK_1r)^2 + c^2}{K_1^2K_2^2(3Gli_3K_1 + 3Gli3RK_1 + K_2(3Gli + K_1)) + 3K_1K_2c(GliK_2 + Gli_3K_1 + Gli3RK_1)^2 + c^2} \quad (2.2)$$

2.3. Sistema final

Con los operadores BEWARE finalmente calculados podemos ya disponer de el sistema dinámico final que modeliza el sistema de señalización de Shh:

$$\frac{dGli}{dt} = v_{max,G}Promoter + r_{bas,G}Basal - k_{deg}Gli, \quad (2.3)$$

$$\frac{dGli_3}{dt} = \frac{r_{g3b}}{Ptc} - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right), \quad (2.4)$$

$$\frac{dGli3R}{dt} = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) - k_{deg}Gli3R, \quad (2.5)$$

$$\frac{dPtc}{dt} = v_{max,P}Promoter + r_{bas,P}Basal - k_{degP}Ptc. \quad (2.6)$$

2.4. Estados estacionarios

Siguiendo con el estudio estandar que se lleva a cabo en los modelos matemáticos procedemos con un estudio sobre los estados estacionarios que podemos encontrar en nuestro modelo. En primer lugar procedemos afrontando el problema desde una perspectiva analítica.

Sean las ecuaciones 2.32.42.52.6, si suponemos que éstas se encuentran en un estado estacionario entonces sus cantidades son constantes. Esto implica que su derivada temporal es igual a cero.

Dado que las ecuaciones contienen términos complejos, nos interesamos por agruparlas, de manera que los cálculos no sean más sencillo en un primer intento de extraer información:

Por un lado de 2.3 y 2.6:

$$\begin{cases} 0 = v_{max,G}Promoter + r_{bas,G}Basal - k_{deg}Gli, \\ 0 = v_{max,P}Promoter + r_{bas,P}Basal - k_{degp}Ptc. \end{cases}$$

Teniendo en cuenta:

$$r_{bas,G} = \frac{v_{max,G}}{100}, r_{bas,P} = \frac{v_{max,P}}{100}$$

Si igualamos ambas ecuaciones nos queda:

$$\frac{k_{deg}}{v_{max,G}}Gli = Promoter + \frac{1}{100}Basal = \frac{k_{degp}}{v_{max,P}}Ptc \implies \frac{v_{max,P}k_{deg}}{v_{max,G}k_{degp}}Gli = Ptc$$

En particular si llamamos $k_{cc} = \frac{v_{max,P}k_{deg}}{v_{max,G}k_{degp}}$:

$$k_{cc}Gli = Ptc \tag{2.7}$$

Por otra parte, de 2.4 y 2.5:

$$\begin{cases} 0 = \frac{r_{g3b}}{Gli} - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right), \\ 0 = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) - k_{deg} Gli_3 R. \end{cases}$$

Sumando, obtenemos:

$$\begin{aligned} 0 = \frac{r_{g3b}}{Gli} - Gli_3 k_{deg} - k_{deg} Gli_3 R &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R \implies \\ &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R} = Gli \end{aligned} \quad (2.8)$$

Con estas cuentas, podemos obtener, en primer lugar, una función de $Signal_{3.5}$ modificada gracias a 2.7, la llamaremos $Signal_{modificada}$:

$$Signal_{modificada} = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{k_{cc}}{k_{ptc} Gli}}. \quad (2.9)$$

Ahora, sustituimos los valores que tenemos de manera que podamos expresar todas las concentraciones en función de Gli.

Nuestro objetivo es intentar hallar los estados estacionarios mediante los puntos fijos entre dos expresiones de Gli. Con ello, usando 2.8 nos quedaría:

$$\frac{r_{g3b}}{Gli} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R \implies Gli_3 = \frac{r_{g3b}(K_{g3rc} + Signal_{modificada})}{k_{deg}(K_{g3rc} + Signal_{modificada}) Gli} \quad (2.10)$$

Y de nuevo, por 2.8:

$$Gli_3 R = \frac{r_{g3b}}{k_{deg} Gli} - Gli_3 \quad (2.11)$$

Debido a la capacidad de expresar $Gli_3 R$ y Gli_3 con respecto a Gli, podemos obtener la variación de Promoter y Basal directamente con Gli, substituyendo en ellos el valor de

Gli3R y Gli_3 Con ello, finalmente obtenemos una igualdad cuyos puntos fijos nos darán los posibles estados estacionarios. De 2.3 igualado a cero :

$$Gli = \frac{v_{max,G}}{k_{deg}} Promoter_{modificado}(Gli) + \frac{1}{100} Basal_{modificado}(Gli) \quad (2.12)$$

2.5. Simulaciones

En esta sección vamos a desarrollar todas las simulaciones numéricas llevadas a cabo en el estudio cualitativo del modelo de [Lai et al., 2004].

2.5.1. Parámetros

A menos que se especifique lo contrario, para las simulaciones hemos tomado como valores de parametros:

Tabla de parámetros de [Lai et al., 2004]			
Parámetro	Valor	Descripción	Fuente
Shh	$0 - 30$	Cantidad de Shh	[Cambon, 2017]
k_{Shh}	$0,58 - 2,0nM$	Constante de disociación de los enlaces Ptc-Shh	[Cambon, 2017]
k_{Ptc}	$8,3 \times 10^{-11}M$	Mitad de la máxima concentración de Ptc que inhibe la señal de Smo	[Cambon, 2017]
k_{deg}	$0,009min^{-1}$	Constante de degradacion de todas las moleculas Gli	[Cambon, 2017]
k_{g3rc}	$0,012min^{-1}$	Constante deconversion de Gli3 en Gli3R	[Lai et al., 2004]
r_{g3b}	$1,6 \times 10^{-19}M^2/min$	Tasa basal de sintesis de Gli3	[Lai et al., 2004]
K_{g3rc}	$0,1$	Constante de sensibilidad de la conversioon a fuerza de la señal	[Lai et al., 2004]
k_{deg_p}	$0,09min^{-1}$	constante de degradacion de Ptc	[Cambon, 2017]

Cuadro 2.1: Tabla de parámetros de [Lai et al., 2004]

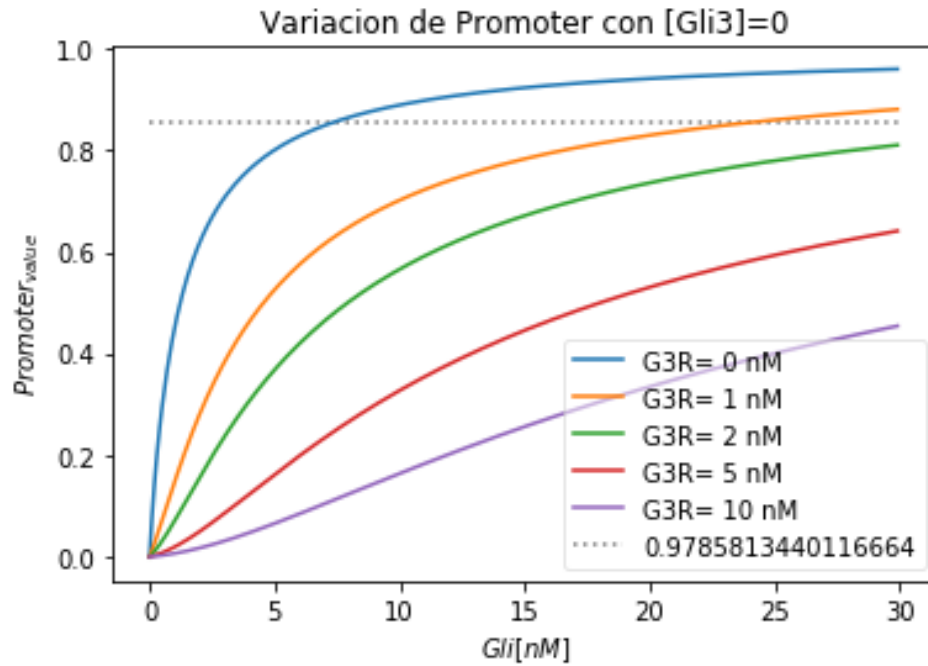


Figura 2.1: Variacion del Operador Promoter bajo la variacion de Gli3R

2.5.2. Variación del operador BEWARE (promoter y basal)

Reducción de la complejidad del operador

2.5.3. Evolución temporal

Observamos dos interesantes comportamientos según varía la cantidad de $Shh/k_{Shh} = 0,1$ en 2.4, $Shh/k_{Shh} = 1,5$ en 2.6:

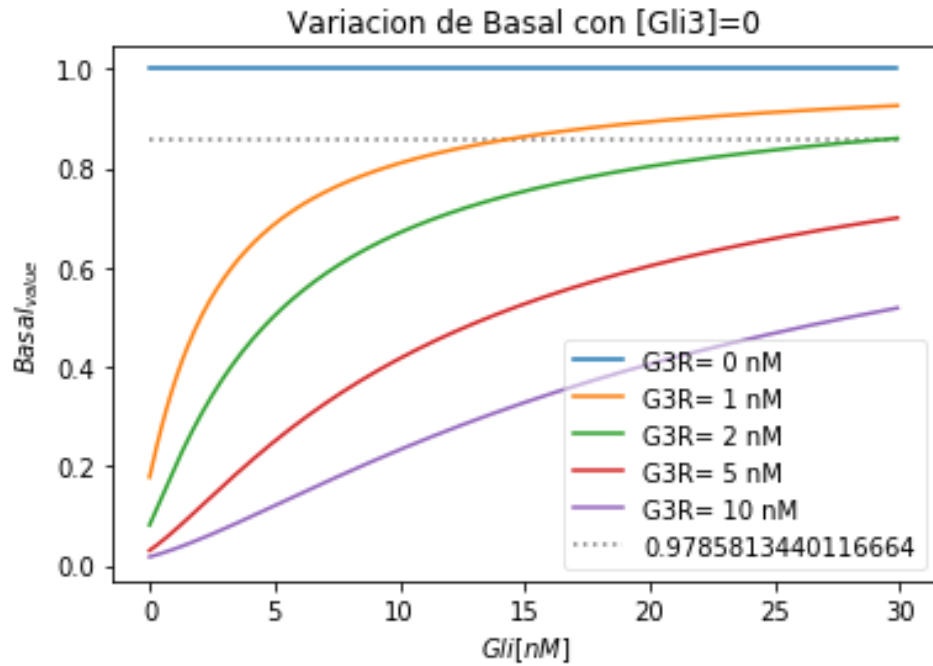


Figura 2.2: Variacion del Operador Basal bajo la variación de Gli3R

2.5.4. Análisis numérico de los estados estacionarios

2.5.5. Diagramas de bifurcación

Bifurcación bajo Shh/K_{Shh}

Bifurcación bajo r_{g3b}

2.6. Críticas

Redactando:

- erratas en el paper
- algunas simplificaciones del modelo

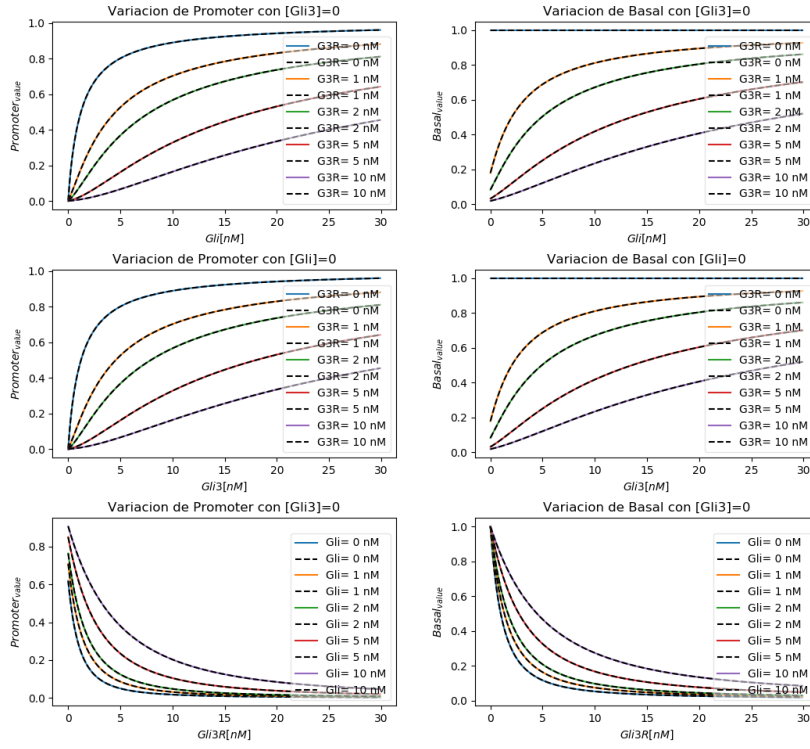


Figura 2.3: Comparación numérica de las formas de reducidas de Promoter y Basal (en negro discontinuo) frente a las formas de [Lai et al., 2004]

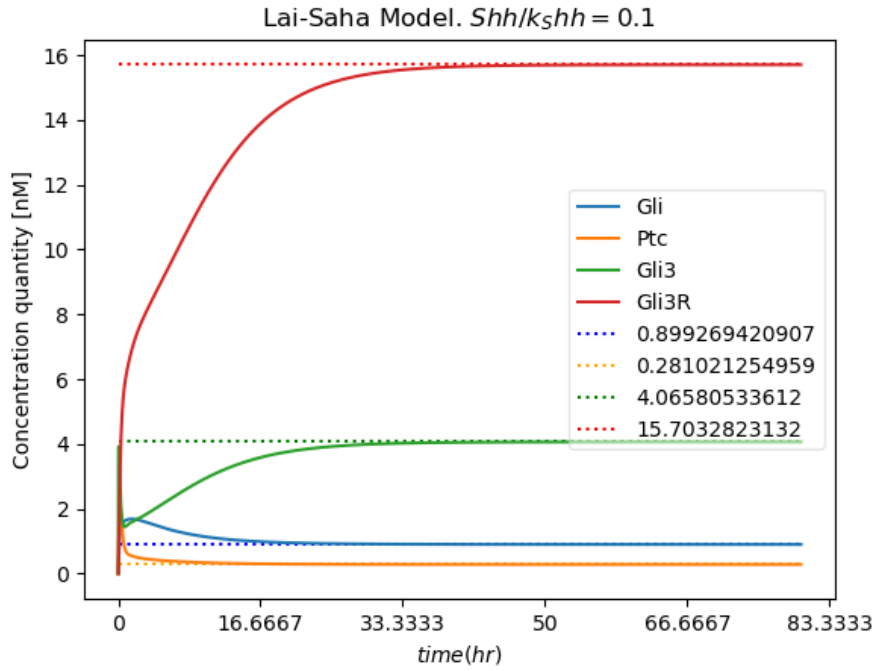


Figura 2.4: Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 0,1$

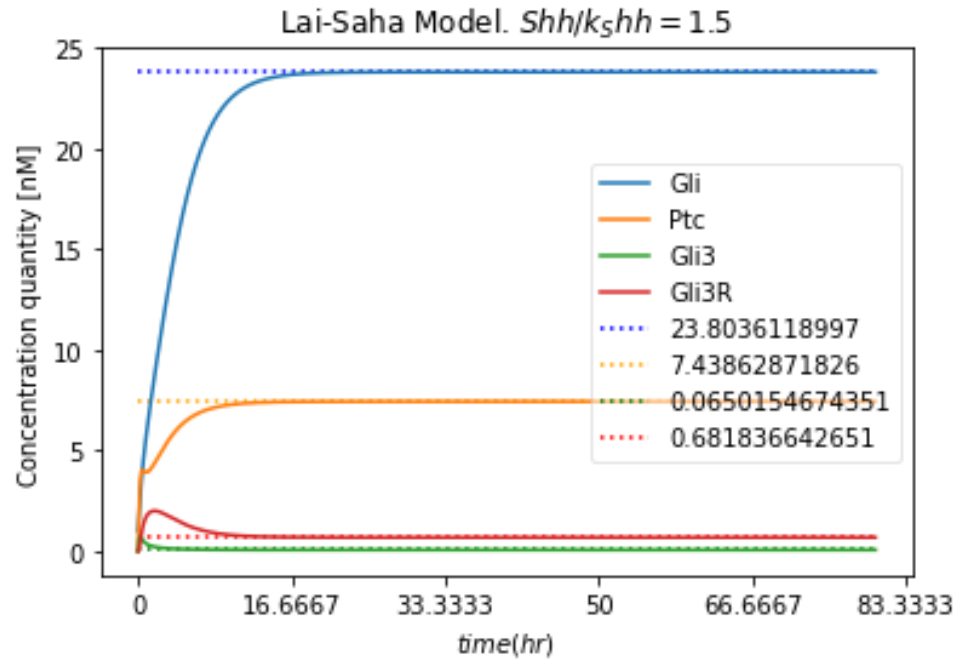


Figura 2.5: Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 1,5$

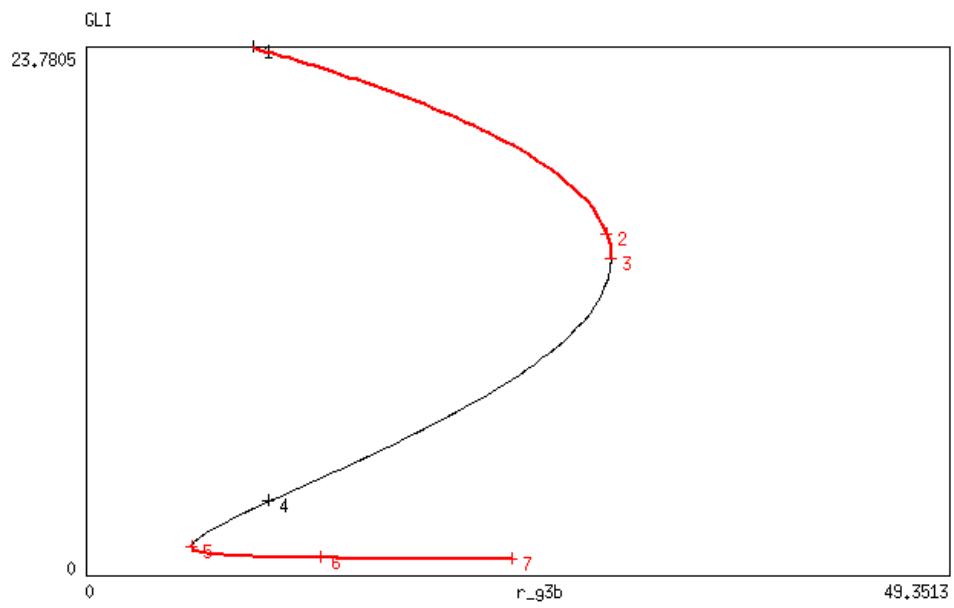


Figura 2.6: Diagrama de Bifurcación de [Lai et al., 2004] con Gli frente a r_{g3b}

Capítulo 3

Modelo alternativo

3.1. Introducción

3.2. Modelado BEWARE

3.3. Sistema final

La mayoría de cuentas del apartado se han generado con la ayuda de [Meurer et al., 2017].

$$\frac{dGli}{dt} = BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) - k_{deg}Gli, \quad (3.1)$$

$$\frac{dGli_3}{dt} = \frac{r_{g3b}}{Ptc} - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right), \quad (3.2)$$

$$\frac{dGli3R}{dt} = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) - k_{deg}Gli3R, \quad (3.3)$$

$$\frac{dPtc}{dt} = BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) - k_{deg}Ptc. \quad (3.4)$$

Donde tenemos, por definición:

$$Signal = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{Ptc}{k_{ptc}}}, \quad (3.5)$$

y,

$$BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) = \frac{C_b}{1 + \frac{k_{RNAP}}{F_{reg}(Gli, Gli_3, Gli3R)RNAP}}, \quad (3.6)$$

donde solo nos queda describir F_{reg} . En el caso de de gradientes opuestos y no/total cooperatividad de los factores de transcripción nos queda:

$$F_{reg} = \frac{1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli a_{Gli}}{k_{Gli}} c + \frac{Gli_3 a_{Gli_3}}{k_{Gli_3R}} c + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} r_{Gli3R} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c}}{1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli c}{k_{Gli}} + \frac{Gli_3 c}{k_{Gli3R}} + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c}} \quad (3.7)$$

Podemos desarrollar las funciones en cada uno de los términos, quedándonos las siguientes expresiones:

$$\frac{dGli}{dt} = -Gli k_{deg} + \frac{C_b}{1 + \frac{k_{RNAP} \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli c}{k_{Gli}} + \frac{Gli_3 c}{k_{Gli3R}} + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}{RNAP \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli a_{Gli}}{k_{Gli}} c + \frac{Gli_3 a_{Gli_3}}{k_{Gli3R}} c + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} r_{Gli3R} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}}. \quad (3.8)$$

$$\frac{dGli_3}{dt} = -Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{ptc}{k_{ptc}}}} \right) + \frac{r_{g3b}}{ptc}. \quad (3.9)$$

$$\frac{dGli3R}{dt} = Gli_3 \left(-Gli3R k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{ptc}{k_{ptc}}}} \right). \quad (3.10)$$

$$\frac{dPtc}{dt} = \frac{C_b}{1 + \frac{k_{RNAP} \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli}{k_{Gli}} + \frac{Gli_3c}{k_{Gli3R}} + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}{RNAP \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli a Gli}{k_{Gli}} c + \frac{Gli_3 a Gli_3}{k_{Gli3R}} c + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} r_{Gli3R} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}} - k_{degp} Ptc. \quad (3.11)$$

3.4. Estados estacionarios

Siguiendo con el estudio estandar que se lleva a cabo en los modelos matemáticos procedemos con un estudio sobre los estados estacionarios que podemos encontrar en nuestro modelo.

Frente a los modelos propuestos anteriormente en [Saha and Schaffer, 2006, Lai et al., 2004] nos interesa la posibilidad de no encontrar un interruptor biestable en el comportamiento cualitativo de nuestro modelo. En primer lugar procedemos afrontando el problema desde una perspectiva analítica.

Sean las ecuaciones 3.13.23.33.4, si suponemos que éstas se encuentran en un estado estacionario entonces sus cantidades son constantes. Esto implica que su derivada temporal es igual a cero.

Dado que las ecuaciones continen términos complejos, nos interesamos por agruparlas, de manera que los cálculos no sean más sencillo en un primer intento de extraer información:

Por un lado de 3.1 y 3.4:

$$\begin{cases} 0 = BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) - k_{deg} Gli, \\ 0 = BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) - k_{degp} Ptc. \end{cases}$$

Si igualamos ambas ecuaciones nos queda:

$$k_{deg} Gli = k_{degp} Ptc \implies \frac{k_{deg}}{k_{degp}} Gli = Ptc \quad (3.12)$$

Por otra parte, de 3.2 y 3.3:

$$\begin{cases} 0 = \frac{r_{g3b}}{Ptc} - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right), \\ 0 = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) - k_{deg} Gli_3 R. \end{cases}$$

Sumando, obtenemos:

$$\begin{aligned} 0 = \frac{r_{g3b}}{Ptc} - Gli_3 k_{deg} - k_{deg} Gli_3 R &\implies \frac{r_{g3b}}{Ptc} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R \implies \\ &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R} = Ptc \end{aligned} \quad (3.13)$$

Con estas cuentas, podemos obtener una función de *Signal*3.5 modificada, la llamaremos *Signal*_{modificada}:

$$Signal_{modificada} = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{r_{g3b}}{k_{ptc}(Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R)}}. \quad (3.14)$$

Ahora, sustituimos los valores que tenemos para intentar hallar los estados estacionarios. Haciéndolo, 3.2 nos quedaría:

$$0 = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal_{modificado}} \right), \quad (3.15)$$

y 3.3:

$$0 = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc}} + Signal_{modificada} \right) - k_{deg} Gli_3 R. \quad (3.16)$$

Esto nos deja un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas que resolvemos:

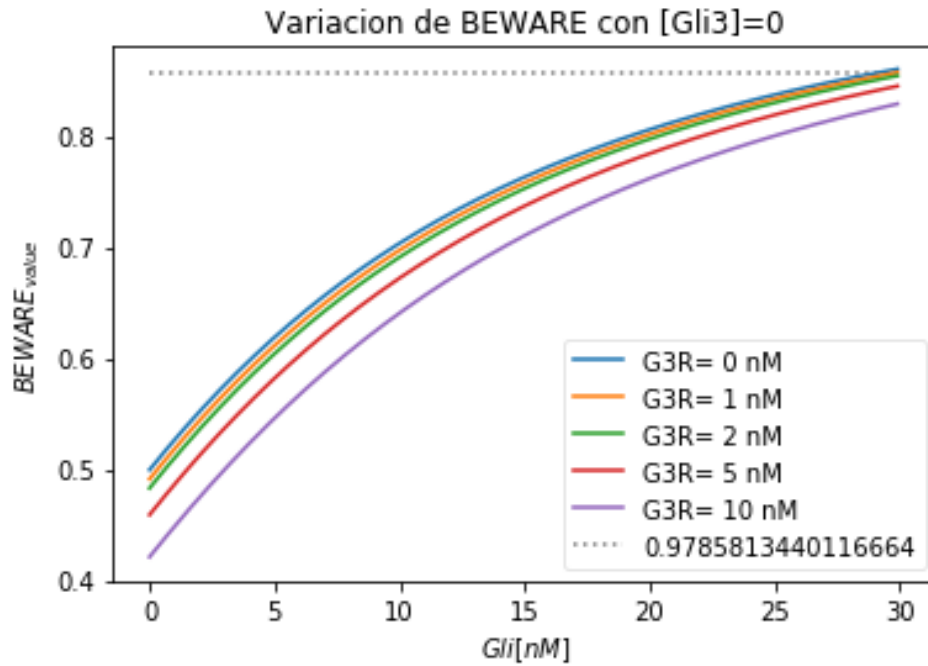


Figura 3.1: Variación del nuevo operador BEWARE

3.5. Simulaciones

3.5.1. Variación del operador BEWARE

3.5.2. Evolución temporal

3.5.3. Análisis numérico de los estados estacionarios

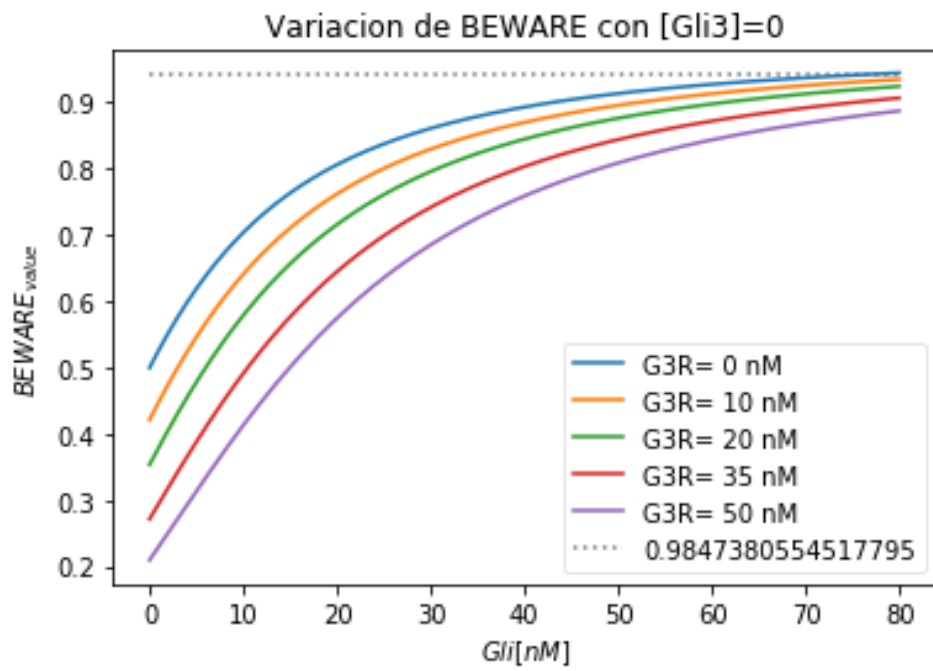


Figura 3.2: Variación del nuevo operador BEWARE en más rango

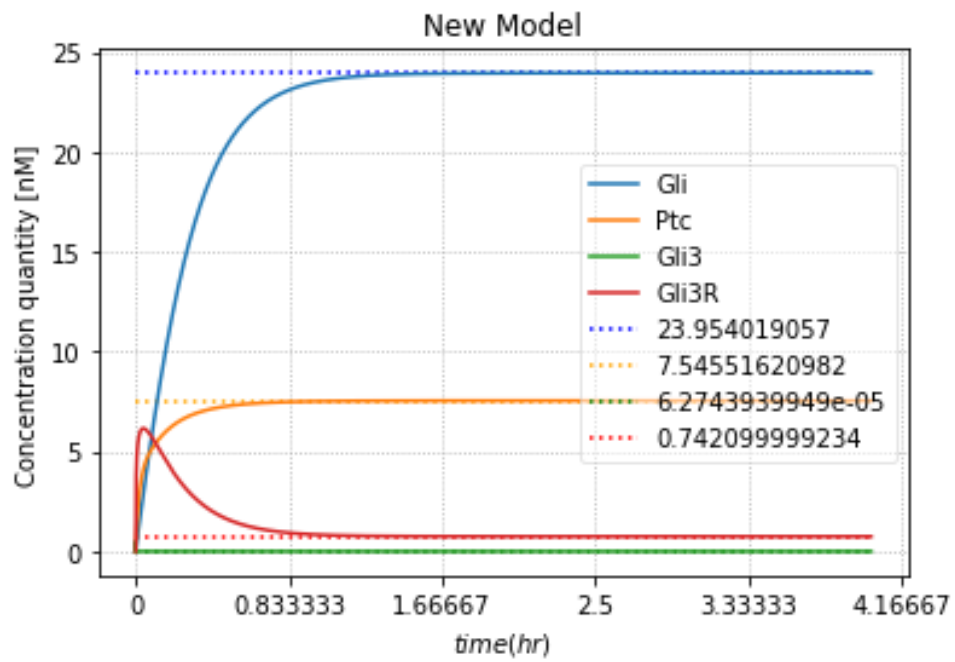


Figura 3.3: Evolución temporal del nuevo operador BEWARE

Capítulo 4

Análisis cualitativo

4.1. Notas provisionales

- Por ahora apenas hay sensibilidad del modelo a la variación de la cantidad de Shh
- Se observa que la intensidad de la activación transcripcional ($a_{Gli, Gli3}$) sí que provoca cambios significativos en el comportamiento cualitativo
- la cantidad de ARNP también tiene un impacto importante. Su disminución provoca un cambio disminutivo en el punto fijo
- cambio en el comportamiento del crecimiento de Gli en las cercanías de 0.07 ARNP
- el mayor cambio se observa al modificar la constante del beware. Sobre 0.27 obtenemos un estado estacionario de Gli como el que se obtiene en [Lai et al., 2004]

4.2. Parámetros

Tabla de parámetros, operador <i>BEWARE</i>			
Parámetro	Valor	Descripción	Fuente
c	1	Constante positiva (valor 1 implica cooperatividad total)	[Cambon, 2017]
a_{Gli}	4.35	Intensidad de represión transcripcional de Gli	[Cambon, 2017]
a_{Gli3}	4,35	Intensidad de represión transcripcional de Gli3	[Cambon, 2017]
r_{Gli3R}	5×10^{-5}	Intensidad de represión transcripcional de Gli	[Cambon, 2017]
k_{Gli}	9×10^1	Constante de disociación de los activadores para los potenciadores genéticos	[Cambon, 2017]
k_{Gli3}	9×10^1	Constante de disociación de los activadores para los potenciadores genéticos	[Cambon, 2017]
k_{Gli3R}	9×10^1	Constante de disociación de los represores para los potenciadores genéticos	[Cambon, 2017]
k_{RNAP}	1	Afinidad de unión de RNA polimerasa	[Cambon, 2017]
$RNAP$	1	Concentración de RNA polimerasa	[Cambon, 2017]
c_b	$1 \text{ } nMmin^{-1}$	Constante del operador	[Cambon, 2017]

Cuadro 4.1: Tabla de parámetros, operador *BEWARE*

Capítulo 5

Conclusiones

5.1. Conclusiones y trabajo futuro

Bibliografía

- [Ay and Arnosti, 2011] Ay, A. and Arnosti, D. N. (2011). Mathematical modeling of gene expression: a guide for the perplexed biologist. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(2):137–151.
- [Bintu et al., 2005a] Bintu, L., Buchler, N. E., Garcia, H. G., Gerland, U., Hwa, T., Kondev, J., Kuhlman, T., and Phillips, R. (2005a). Transcriptional regulation by the numbers: applications. *Current opinion in genetics & development*, 15(2):125–135.
- [Bintu et al., 2005b] Bintu, L., Buchler, N. E., Garcia, H. G., Gerland, U., Hwa, T., Kondev, J., and Phillips, R. (2005b). Transcriptional regulation by the numbers: models. *Current opinion in genetics & development*, 15(2):116–124.
- [Cambon, 2017] Cambon, M. (2017). Analysis of biochemical mechanisms provoking differential spatial expression in Hh target genes. *ArXiv e-prints*.
- [Cambon and Sanchez,] Cambon, M. and Sanchez, O. Beware modules with multiple competitive transcription factors. Work in progress.
- [Clement et al., 2007] Clement, V., Sanchez, P., De Tribolet, N., Radovanovic, I., and Altaba, A. R. (2007). Hedgehog-gli1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Current biology*, 17(2):165–172.
- [Dahmane et al., 1997] Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P., and Altaba, A. R. (1997). Activation of the transcription factor gli1 and the sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*, 389(6653):876.

- [Fakhouri et al., 2010] Fakhouri, W. D., Ay, A., Sayal, R., Dresch, J., Dayringer, E., and Arnosti, D. N. (2010). Deciphering a transcriptional regulatory code: modeling short-range repression in the drosophila embryo. *Molecular systems biology*, 6(1):341.
- [He et al., 2010] He, X., Samee, M. A. H., Blatti, C., and Sinha, S. (2010). Thermodynamics-based models of transcriptional regulation by enhancers: the roles of synergistic activation, cooperative binding and short-range repression. *PLoS computational biology*, 6(9):e1000935.
- [Hornbeck PV, 2015] Hornbeck PV, Zhang B, M. B. K. J. L. V. S. E. (2015). Phosphositeplus, 2014: mutations, ptms and recalibrations. *nucleic acids res.* 43:D512-20.
- [i Altaba, 1999] i Altaba, A. R. (1999). Gli proteins and hedgehog signaling: development and cancer. *Trends in genetics*, 15(10):418–425.
- [Lai et al., 2004] Lai, K., Robertson, M. J., and Schaffer, D. V. (2004). The sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch. *Biophysical Journal*, 86(5):2748–2757.
- [Meijer et al., 2012] Meijer, H., Dercole, F., and Oldeman, B. (2012). Numerical bifurcation analysis. In *Mathematics of Complexity and Dynamical Systems*, pages 1172–1194. Springer.
- [Meurer et al., 2017] Meurer, A., Smith, C. P., Paprocki, M., Čertík, O., Kirpichev, S. B., Rocklin, M., Kumar, A., Ivanov, S., Moore, J. K., Singh, S., Rathnayake, T., Vig, S., Granger, B. E., Muller, R. P., Bonazzi, F., Gupta, H., Vats, S., Johansson, F., Pedregosa, F., Curry, M. J., Terrel, A. R., Roučka, v., Saboo, A., Fernando, I., Kulal, S., Cimrman, R., and Scopatz, A. (2017). Sympy: symbolic computing in python. *PeerJ Computer Science*, 3:e103.
- [Parker et al., 2011] Parker, D. S., White, M. A., Ramos, A. I., Cohen, B. A., and Barolo, S. (2011). The cis-regulatory logic of hedgehog gradient responses: key roles for gli binding affinity, competition, and cooperativity. *Sci. Signal.*, 4(176):ra38–ra38.
- [Saha and Schaffer, 2006] Saha, K. and Schaffer, D. V. (2006). Signal dynamics in sonic hedgehog tissue patterning. *Development*, 133(5):889–900.

- [Scatchard, 1949] Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51(4):660–672.
- [Segal et al., 2008] Segal, E., Raveh-Sadka, T., Schroeder, M., Unnerstall, U., and Gaul, U. (2008). Predicting expression patterns from regulatory sequence in drosophila segmentation. *Nature*, 451(7178):535.
- [Wang et al., 2000] Wang, B., Fallon, J. F., and Beachy, P. A. (2000). Hedgehog-regulated processing of gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, 100(4):423–434.
- [Wikipedia contributors, 2018] Wikipedia contributors (2018). Sonic hedgehog — Wikipedia, the free encyclopedia. [Online; accessed 16-July-2018].