



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

Nuevo modelo matemático para el sistema de señalización de la proteína Sonic Hedgehog (Shh)

Bartolomé Ortiz Viso
Tutor: Óscar Sánchez

Septiembre 2018

Abstract

During human development, cells are exposed to a complex network of regulatory signals, which must be interpreted correctly in order to success doing functions necessary for the organism. Therefore, the transition of signals and cascades of genetic regulation can be understood as mechanisms of information processing that translate extracellular information into intracellular decisions.

The present work aims to show the differences, in terms of a qualitative behavior, that can be found through these complex systems of biological regulation process through different theoretical approaches.

We were particularly interested in the Shh signaling system, among its many roles during development, patterns spinal cord and limb bud tissue differentiation and controls midbrain and ventral forebrain neuronal differentiation.

There are a few models that has been described in order to understand its behaviour. The most important was developed in [Lai et al., 2004]. In particular, these mathematicians use the thermodynamic approach to Shh's gene expression mechanish. This approach, in rough outlines, aim to model the gene transcription systems enumerating all the possible states of the promoter and enchancers of gene transcription activation, and then, relating all of them with their theoretically calculate transcriptional activation level. While these steps can be done in multiple ways, they focused their work on the stimulated approach, which links the transcriptional activity to the transcriptional factors (uniquely).

However, some discrepancies has been observed in biological experiments, mainly focused in the existence of an unique stable state, casting aside the biestable swicht behavior shown in the classic model.

As a result of these state of the art, we thought it would be necessary to offer a new model that update the classic one, but at the same time, we still want to use the BEWARE approach.

Our main goal has been to develop and study a new model base on the same BEWARE strategy but approaching it by the recruitment perspective, that is, taking into account the fundamental part of the RNAP in this whole biological process and its hability of produce the transcriptional activation.

This work presents a deduction of our new model based on the approach made in [Cambon, 2017] and a qualitative study of both models (old and new) through numerical simulations (numerical integration, parameter tunning, bifurcation diagrams, steady states, etc), our discoveries during these and our conclusions about the new and old models.

Specifically, we linked the biestable behaviour of the old model not only to the Shh/K_{Shh} ratio in our cell but with the basal rate of Gli3 (a common trancription factor in this process). We haven't seen that last link in any paper.

Furthermore, we found that our new model offers a surprising searched conclusion. Even though the main thermodynamic operator exhibit a highly similar behaviour, our global simulations show a single steady state, no matter how far we alter our parameters.

We hope that these experiments should motivate a deep analytic research of our new model, because our results suggest it could fit the actual biological paradigm, helping us to understand quite a lot about this important topic.⁵

Key Words: *Signaling Systems, Sonic Hedgehog, Math Models, Beware models*

Agradecimientos

I would like to express my gratitude to:

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

'Remember that all models are wrong; the practical question is how wrong do they have to be to not be useful'.

George Box, 1987.

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	3
1.2.2. Interacción entre Ptc y Shh	6
1.2.3. Señal de transcripcion	7
1.2.4. Dinámica de Gli3 y Gli3R	8
1.3. Modelado BEWARE	9
2. Modelo clásico	14
2.1. Introducción	14
2.2. Modelado BEWARE	14
2.3. Sistema final	16
2.4. Estados estacionarios	16
2.5. Simulaciones	19

2.5.1. Parámetros	19
2.5.2. Variación del operador BEWARE (promoter y basal)	19
2.5.3. Evolución temporal	21
2.5.4. Análisis numérico de los estados estacionarios	22
2.5.5. Diagramas de bifurcación	24
2.6. Críticas	26
3. Modelo alternativo	27
3.1. Introducción	27
3.2. Modelado BEWARE	28
3.2.1. Calculo del operador	29
3.3. Sistema final	34
3.4. Estados estacionarios	36
3.5. Simulaciones	38
3.5.1. Parámetros	38
3.5.2. Variación del operador BEWARE	39
3.5.3. Evolución temporal	39
3.5.4. Análisis numérico de los estados estacionarios	39
4. Conclusiones	41
4.1. Conclusiones y trabajo futuro	41
Bibliografía	41

Índice de cuadros

2.1. Tabla de parámetros de [Lai et al., 2004]	20
3.1. Tabla de parámetros, operador <i>BEWARE</i>	38

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]	5
2.1. Variación del Operador Promoter bajo la variación de Gli3R	21
2.2. Variación del Operador Basal bajo la variación de Gli3R	22
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]	23
2.4. Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 0,1$	24
2.5. Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 1,5$	25
2.6. Diagrama de Bifurcación de [Lai et al., 2004] con Gli frente a r_{g3b}	26
3.1. Variación del nuevo operador BEWARE	39
3.2. Variación del nuevo operador BEWARE en más rango	40
3.3. Evolución temporal del nuevo operador BEWARE	40

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación y objetivos

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 distintas aproximaciones teóricas.

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.
- Modela la diferenciación del tejido de la yema del miembro.



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

- Controla la diferenciación neuronal del mesencéfalo.
- Controla la diferenciación neuronal del prosencéfalo ventral.

Una de las características más importantes es que el Shh puede modelar distintos tejidos durante el desarrollo formando un gradiente de concentración [Saha and Schaffer, 2006]. Debido a este gradiente las células detectan su posición dentro del mismo y se diferencian en distintos fenotipos ¹ según la concentración y el tiempo de exposición a 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 cualitativa, un cambio en el procedimiento teórico de modelado de los mecanismo bioquímicos involucrados en la expresión genéticas. Centrándonos en redes de regulación/expresión que relacionan las proteínas *Ptc*, *Gli* y *Shh*.

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

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 [i Altaba, 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 o metaestables. Y, por supuesto, de como están relacionados y como 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)**: Proteína 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, tendremos distintas descripciones de la actividad global de la **ARN polimerasa**.

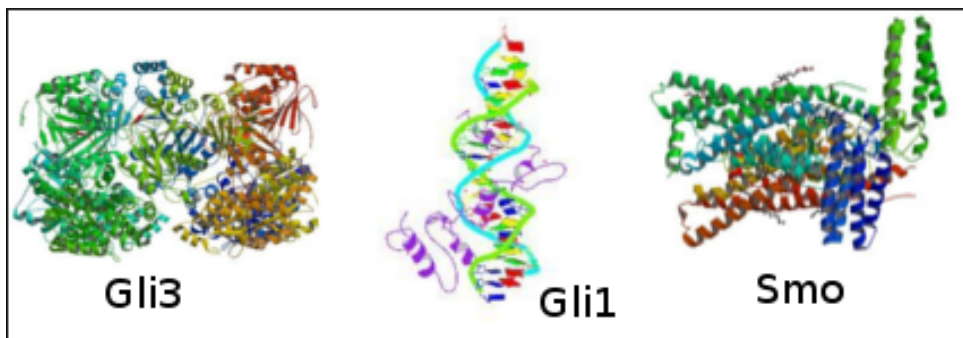


Figura 1.2: Representación esquemática de las proteínas Gli1, Gli3 y Smo. Fuente: [Hornbeck PV, 2015]

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)*.
3. La unión de *Shh* y *Ptc* neutraliza el efecto inhibitorio de *Ptc* sobre *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.

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 3. En la figura 1.3 se puede encontrar un dibujo esquemático del proceso.

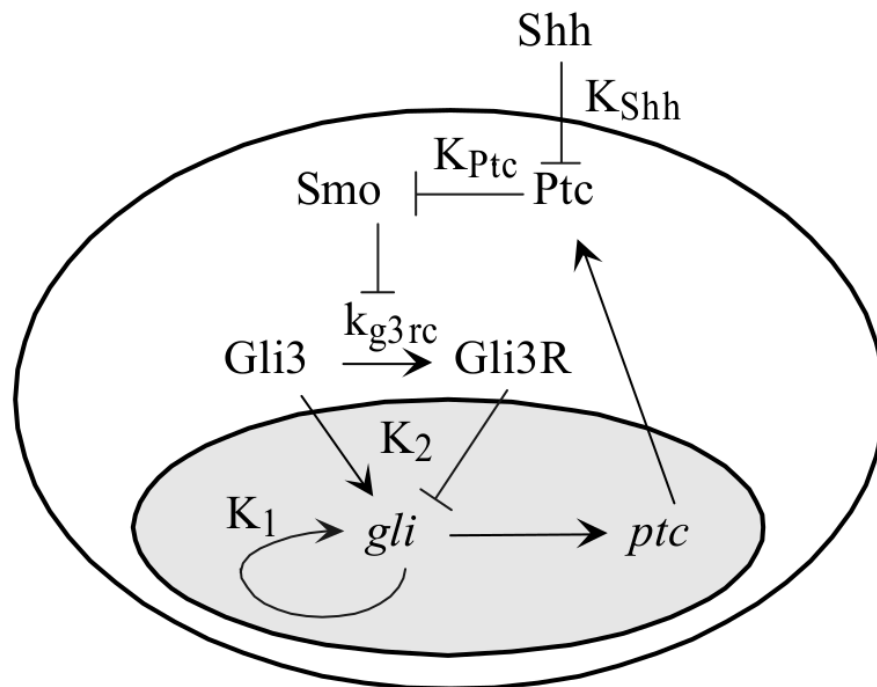
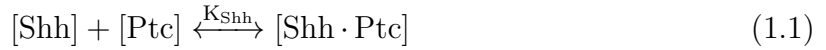


Figura 1.3: Representación esquemática de la red de transcripciónn. Fuente: [Lai et al., 2004]

1.2.2. Interacción entre Ptc y Shh

Shh y Ptc se unen de forma reversible con una constante de disociación K_- y de asociación K_+ . Al cociente entre ambas es lo que denominaremos 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 cuál 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].

Sea una reacción como (1.1) tenemos que:

$$K_{Shh} = \frac{[Shh \cdot Ptc]}{[Shh][Ptc]}$$

de donde

$$[Shh \cdot Ptc] = K_{Shh}[Shh][Ptc]$$

Sea ahora ν representando los moles de ligando unido por mol de proteína, en primer lugar tenemos:

$$\nu = \frac{[Shh \cdot Ptc]}{[Ptc_{Total}]} \quad (1.2)$$

Ahora bien, si operamos:

$$\nu = \frac{[Shh \cdot Ptc]}{[Ptc_{Total}]} = \frac{[Shh \cdot Ptc]}{[Ptc \cdot Shh] + [Ptc]} = \frac{K_{Shh}[Shh][Ptc]}{[Ptc] + K_{Shh}[Shh][Ptc]} = \frac{K_{Shh}[Shh]}{1 + K_{Shh}[Shh]}$$

Finalmente:

$$\nu = \frac{[Shh]}{[Shh] + K_{Shh}^{-1}} \quad (1.3)$$

En este caso, uniendo 1.3 y 1.2 expresión:

$$[Shh.Ptc] = \frac{[Shh][Ptc_{Total}]}{K_{Shh}^{-1} + [Shh]} \quad (1.4)$$

Si bien este es el procedimiento empleado en [Lai et al., 2004], hacemos notar que la primera relación de Scatchard introducida se puede obtener basándonos en el estado de equilibrio de la ley de acción de masas.

Partiendo así de 1.1:

$$\frac{d}{dt}[Shh.Ptc] = k_+[Shh][Ptc] - K^-[Shh.Ptc] \quad (1.5)$$

Si suponemos que el compuesto está en equilibrio:

$$\frac{d}{dt}[Shh.Ptc] = 0 = K_+[Shh][Ptc] - K^-[Shh.Ptc] \implies \frac{[Shh.Ptc]}{[Shh][Ptc]} = K_+/K_- \implies \text{def } K_{Shh} \quad (1.6)$$

Para evitar complicaciones excesivas en la notación, denominaremos a K_{Shh}^{-1} como k_{Shh} .

1.2.3. Señal de transcripción

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

$$[Shh.Ptc] = \frac{[Ptc_{libre}][Smo_{Total}]}{k_{Ptc} + [Ptc_{libre}]} \quad (1.7)$$

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:

$$Signal = \frac{[Smo_{libre}]}{[Smo_{Total}]} = \frac{[Smo_{total}] - [Smo.Ptc]}{[Smo_{Total}]} \quad (1.8)$$

Finalmente, usando 1.7 y 1.4 en 1.8 nos queda:

$$Signal = \frac{[Smolibre]}{[Smototal]} = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{Ptc}{k_{ptc}}} \quad (1.9)$$

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:

$$\frac{dGli_3}{dt} = \frac{r_{g3b}}{Gli} - k_{deg}Gli_3 - \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) Gli_3, \quad (1.10)$$

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 proteolítica y, además, un término de degradación (cuya constante de degradación es igual a la constante de degradación de Gli3).

Esto nos deja con la expresión:

$$\frac{dGli3R}{dt} = \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) Gli3 - k_{deg} Gli3R, \quad (1.11)$$

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**.

Antes de continuar vamos a ofrecer una breve descripción generalista del proceso general que planteamos modelar: la transcripción génica.

Biología de la transcripción génica

Segun se expone en [Gilbert, 2000], el proceso general de transcripción es un proceso biológico complejo. En primer lugar la enzima ARN polimerasa (ARNp), que forma una nueva molécula de ARN a partir del código proporcionado por el ADN, debe unirse al ADN del gen. Se adjunta en un lugar anterior al código genético que queremos transcribir. Esta zona se conoce como **promotor**.

La **ARNp** necesita de ayuda para unirse a esta sección que hemos llamado **promotor**. Para este proceso aparecen conjunto de proteínas llamadas factores de transcripción.

4

Vamos a detenernos en esta parte, para comprender mejor los factores de transcripción. Un factor de transcripción típico se une al ADN en una determinada secuencia diana. Una vez que está unido, el factor de transcripción hace que sea más difícil o más fácil que la ARN polimerasa se una al promotor del gen. Con esto en mente, podemos clasificar este tipo de factores de activación, según faciliten o dificulten esta unión.

Por un lado algunos factores de transcripción activan la transcripción. Por ejemplo, pueden ayudar a que los factores de transcripción generales y / o la ARN polimerasa se unan al promotor, como se muestra en el siguiente diagrama.

Diagrama de un activador unido a una secuencia de ADN específica que es su sitio de unión. El otro extremo del activador transcripcional (el que no está unido al ADN) interactúa con factores de transcripción generales, ayudando a los factores de transcripción generales y a la polimerasa a unirse al promotor cercano. Represores

⁴Sin embargo, muchos factores de transcripción (¡incluidos algunos de los más geniales!) No son del tipo general. En cambio, existe una gran clase de factores de transcripción que controlan la expresión de genes individuales específicos. Por ejemplo, un factor de transcripción podría activar solo un conjunto de genes necesarios en ciertas neuronas.

Otros factores de transcripción reprimen la transcripción. Esta represión puede funcionar en una variedad de formas. Como un ejemplo, un represor puede interferir con los factores de transcripción basales o la ARN polimerasa, por lo que no pueden unirse al promotor o comenzar la transcripción.

Diagrama de una secuencia de ADN de represor a específico que es su sitio de unión. Cuando se une a este sitio, el represor bloquea la formación del complejo de iniciación de la transcripción en el promotor de un gen cercano. Sitios de enlace

5

Las partes de una proteína activadora: el dominio de unión al ADN (que se une al sitio de reconocimiento en el ADN) y el dominio de activación, que es el "extremo comercial" del activador que realmente promueve la transcripción, por ejemplo, facilitando la formación de la transcripción complejo de iniciación La flexibilidad del ADN es lo que permite que los factores de transcripción en sitios de unión distantes hagan su trabajo. El ADN se bifurca como un espagueti cocido para traer sitios de unión lejanos y factores de transcripción cercanos a factores de transcripción generales o proteínas "mediadoras". En la caricatura anterior, un factor de transcripción activador enlazado a un sitio lejano ayuda a la ARN polimerasa a unirse al promotor y comenzar a transcribir.

Modelado 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 termodinámicamente es el cálculo de cómo las diferentes combinaciones de distintos lugares y números de unión en una región reguladora funcionan juntos para producir la expresión a lo largo del tiempo de un gen.

⁵Los sitios de unión para los factores de transcripción a menudo están cerca del promotor de un gen. Sin embargo, se pueden encontrar en otras partes del ADN, a veces muy lejos del promotor, y aún afectan la transcripción del 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 cálculo 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 número de estados aumenta considerablemente (en nuestro caso hipotético 25 entre vinculados y no vinculados).

Otro de los factores a tener en cuenta es el cálculo 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 parámetros 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 expresión génica 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 unión del ARN-polimerasa (*enfoque recruitment*), la cual viene modificada por 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 entiende actualmente que estos saltos teoricos no aportan gran información al sistema tal y como se expone en [Ay and Arnosti, 2011], aún así, creemos que es conveniente no perderlos de vista, debido a que es un cambio en los objetivos de los que se pretende modelar (nuestro nuevo modelo incluye la actividad de la ARN polimerasa) lo que ha supuesto un esperanzador cambio en el ajuste de este modelo con la realidad.

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 génética) 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). Las zonas de unión al ADN de todas las formas de Gli están altamente relacionadas, 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 una tasa de la activación de transcripción génica 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) produce un estado con la máxima tasa transcripcional posible, igual a $(v_{max,G} + r_{bas})$ para el promotor gli.

En este caso 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 para 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.

Finalmente, 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:

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

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

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 nues-

tro modelo. En primer lugar procedemos afrontando el problema desde una perspectiva analítica.

Sean las ecuaciones (2.3)(2.4)(2.5)(2.6), si suponemos que éstas se encuentran en un estado estacionario entonces las concentraciones de las sustancias 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 (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):

$$\begin{cases} 0 = \frac{r_{g3b}}{Gli} - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right), \\ 0 = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) - k_{deg}Gli_3R. \end{cases}$$

Sumando, obtenemos:

$$\begin{aligned} 0 = \frac{r_{g3b}}{Gli} - Gli_3 k_{deg} - k_{deg} Gli3R &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli3R \implies \\ &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli3R} = Gli \end{aligned} \quad (2.8)$$

Con estas cuentas, podemos obtener, en primer lugar, una función de *Signal* (??) 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:

$$\frac{r_{g3b}}{Gli} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli3R \implies Gli_3 = \frac{r_{g3b}(K_{g3rc} + Signal_{modificada})}{k_{deg}(K_{g3rc} + Signal_{modificada})Gli} \quad (2.10)$$

Y de nuevo, por (2.8):

$$Gli3R = \frac{r_{g3b}}{k_{deg} Gli} - Gli_3 \quad (2.11)$$

Debido a la capacidad de expresar Gli3R 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]. Para estudiar este modelo y reproducir algunos resultados, seguimos el siguiente esquema:

- **Recolección y contraste de los parámetros** usados
- **Estudio y comparación de la variabilidad del operador BEWARE.** Dentro de este apartado comparamos numéricamente las reducciones desarrolladas en [Cambon and Sanchez,] con el fin de asegurar la exactitud de las mismas y, finalmente, usar la forma reducida para obtener programas más eficientes.
- **Análisis numérico de las soluciones estacionarias:** Desarrollamos la formula analítica para obtener un código que nos permita rastrear cambios en el comportamiento cualitativo ante grandes variaciones en los parámetros.
- En aquellos parámetros con especial interés por la reproducibilidad o la novedad en su estudio, **computamos un diagrama de bifurcación.**

2.5.1. Parámetros

A menos que se especifique lo contrario, para las simulaciones hemos tomado como valores de parametros los expuesto en la tabla 2.1.

2.5.2. Variación del operador BEWARE (promoter y basal)

En primer lugar antes de comenzar la simulación completa comprobamos la reproducibilidad de los operadores que conforma el modelado BEWARE.

Además, pretendíamos tener una base para comparar posteriormente estos comportamientos con el nuevo operador.

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_{degp}	$0,09min^{-1}$	constante de degradacion de Ptc	[Cambon, 2017]

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

Dentro las figuras se puede apreciar una línea discontinua. Esta línea marca el comportamiento asintótico del nuevo operador BEWARE a modo de adelanto de la siguiente seccion. Para repetir las simulaciones hemos simulado la variación de Promoter 2.1 y Basal 2.2 con $Gli3 = 0$ y un cambio en la cantidad de Gli3R. Este método es el utilizado en [Lai et al., 2004] y posteriormente también es el mismo utilizado para observar el comportamiento del nuevo operador BEWARE.

Reducción de la complejidad del operador

En los siguientes apartados tendremos que hacer grandes volúmenes de cuentas para estudiar variaciones en el comportamiento cualitativo del modelo. Por este motivo cualquier simplificación u optimización es altamente bienvenida a la hora de programar.

En nuestro caso, basándonos en los resultados de [Cambon and Sanchez,] tuvimos acceso a una simplificación de los operadores promoter y basal. Antes de realizar el estudio, sin embargo, quisimos comprobar numéricamente la viabilidad frente a múltiples variaciones de las dos expresiones.

Prueba de ello es la figura 2.3, donde mostramos como ambas expresiones son equivalentes

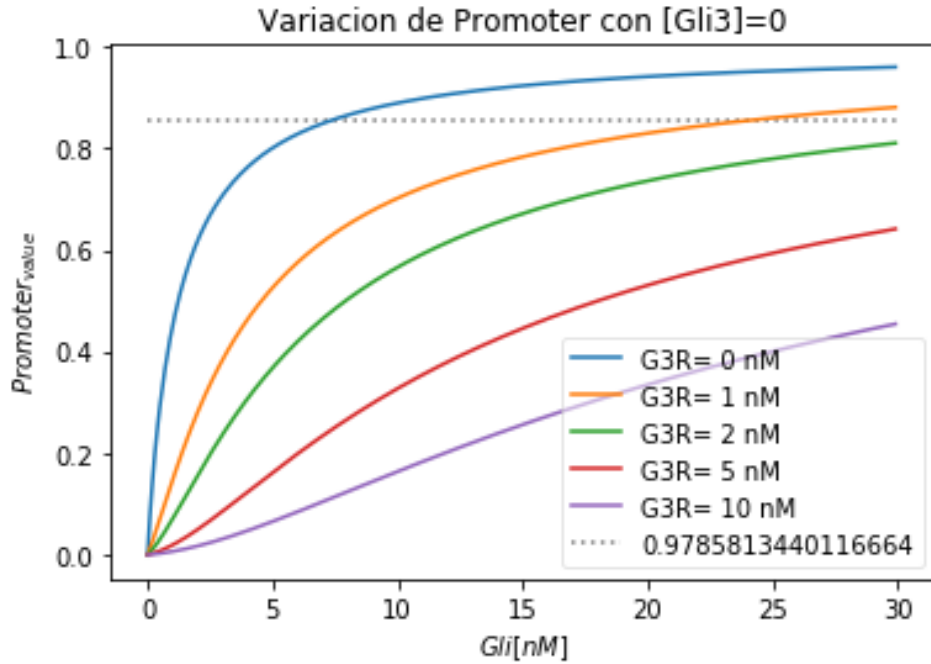


Figura 2.1: Variacion del Operador Promoter bajo la variacion de Gli3R

cualesquiera variaciones hagamos. Dentro de esta tenemos en color la expresión clásica de los operadores y en líneas discontinuas mostramos la nueva expresión. Como se ve, la coincidencia es perfecta.

2.5.3. Evolución temporal

Una vez computamos los operadores en su forma reducida, procedimos a simular la evolución temporal del sistema.

Para ello utilizamos el módulo de cálculo numérico de Python y el algoritmo lsode que es robusto frente a comportamientos stiff. (Estos cálculos además han sido validados y reproducidos con Octave)

En particular corrimos simulaciones con distintas condiciones iniciales y distintos valores de Shh:

- lista de las condiciones (4)

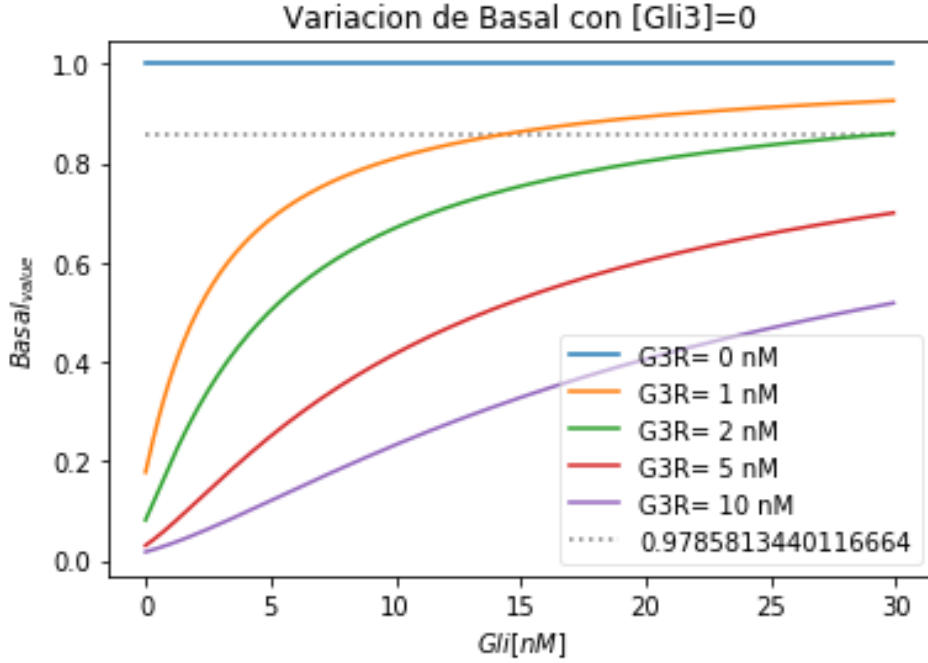


Figura 2.2: Variacion del Operador Basal bajo la variación de Gli3R

Dentro de estas simulaciones preliminares, en cuanto al estudio cualitativo, observamos dos interesantes comportamientos según varía la cantidad de $Shh/k_{Shh} = 0,1$ en 2.4, $Shh/k_{Shh} = 1,5$ en 2.5. Esto nos confirma la multiestabilidad del sistema que se afirma en el artículo original. Pero, como veremos más adelante, esta debe ser tomada con precaución.

Los estados estacionarios sirvieron también de punto de partida para nuevas simulaciones, sin embargo, hay resultados de [Lai et al., 2004] que hemos concluido irreproducibles, destacando la dinámica del sistema con un cambio brusco de la cantidad de Shh¹.

2.5.4. Análisis numérico de los estados estacionarios

Para el análisis numérico de los estados estacionarios seguimos dos estrategias. En primer lugar programamos las expresiones analíticas obtenidas en el apartado 2.4. Con ellas podemos representar la función y la recta $y = Gli$.

¹Figura 2(A) de [Lai et al., 2004].

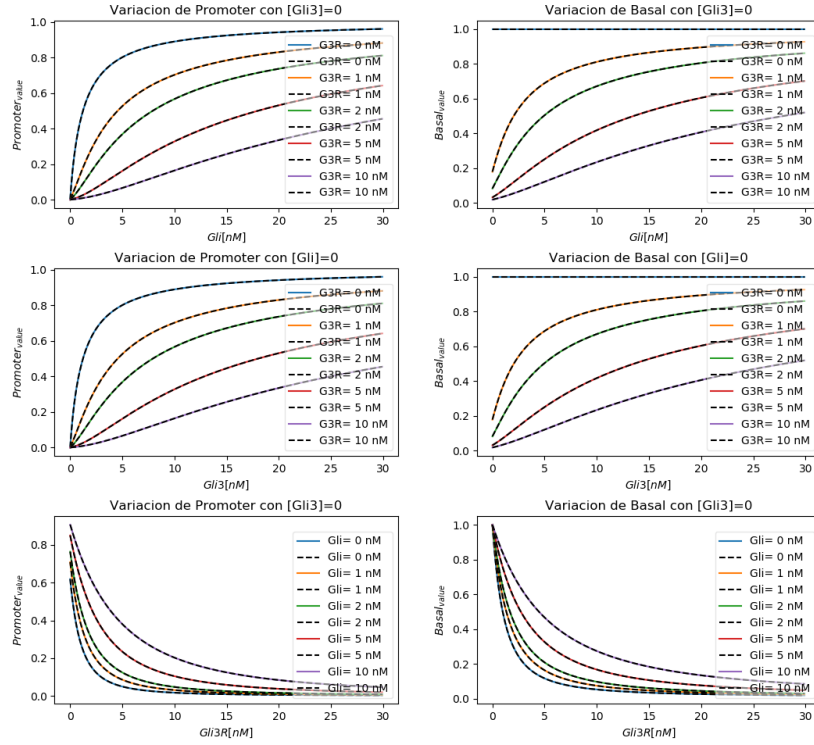


Figura 2.3: Comparación numérica de las formas de reducidas de Promoter y Basal (en negro discontinuo) frente a las formas de [Lai et al., 2004]

Esta representación nos permite observar los puntos de corte de ambas funciones y, con ello inferir los estados estacionarios. Más aun, nos permite observar el comportamiento de la curva más claramente según varían los parámetros para decidir como alterarlos de manera que se produzcan puntos de corte (lo que nos dió una primera intuición sobre r_{g3b}).

(insertar foto de los dos programas)

Con esta primera parte, para analizar grandes volúmenes de variaciones de parámetros cambiamos el enfoque. Dado que calculamos de forma discreta, escribimos un programa que computaba la resta de ambas funciones y nos devuelve el número de veces que la resta cambia de signo (es decir, el punto i -ésimo es mayor que cero y el i -ésimo +1 es menor, o viceversa).

(insertar extracto del log que localiza los ceros en Shh y r_{g3b}).

Con ello, obtuvimos intuición sobre que diagramas de bifurcación computar, y obtuvimos

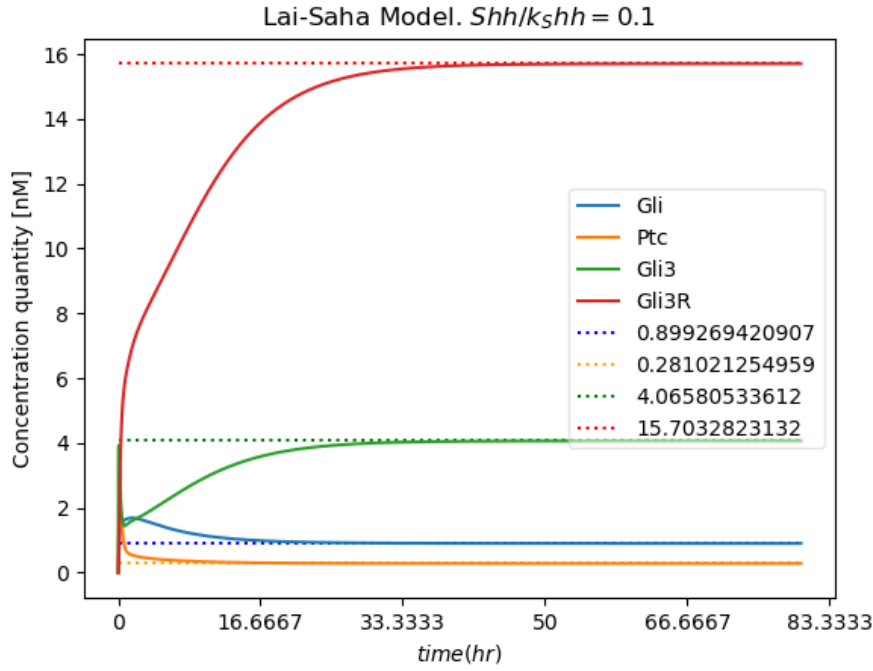


Figura 2.4: Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 0,1$

el código base para explorar el nuevo modelo.

2.5.5. Diagramas de bifurcación

Durante el estudio de este modelo procedimos también a realizar diagramas de bifurcación² con aquellos parámetros que el análisis numérico nos mostró como relevantes. Además, procedimos a evaluar la reproducibilidad del artículo en los diagramas que presentan.

La herramienta escogida para tal fin fue AUTO, un motor para el cálculo de diagrama de bifurcaciones. En particular utilizamos XppAut, un intérprete de AUTO que nos permite realizar continuación, cambios de ramas y diagramas de bifurcación completos, así como el cálculo de la estabilidad de los puntos fijos.

Para una mayor profundización en el análisis numérico de bifurcaciones puede consultarse [Meijer et al., 2012]. Además, en mi trabajo de fin de grado [Ortiz, 2017] puede encontrarse

²Un diagrama de bifurcación de un sistema dinámico es una estratificación de su espacio de parámetros inducida por la equivalencia topológica, junto con los retratos de fase representativos de cada estrato.

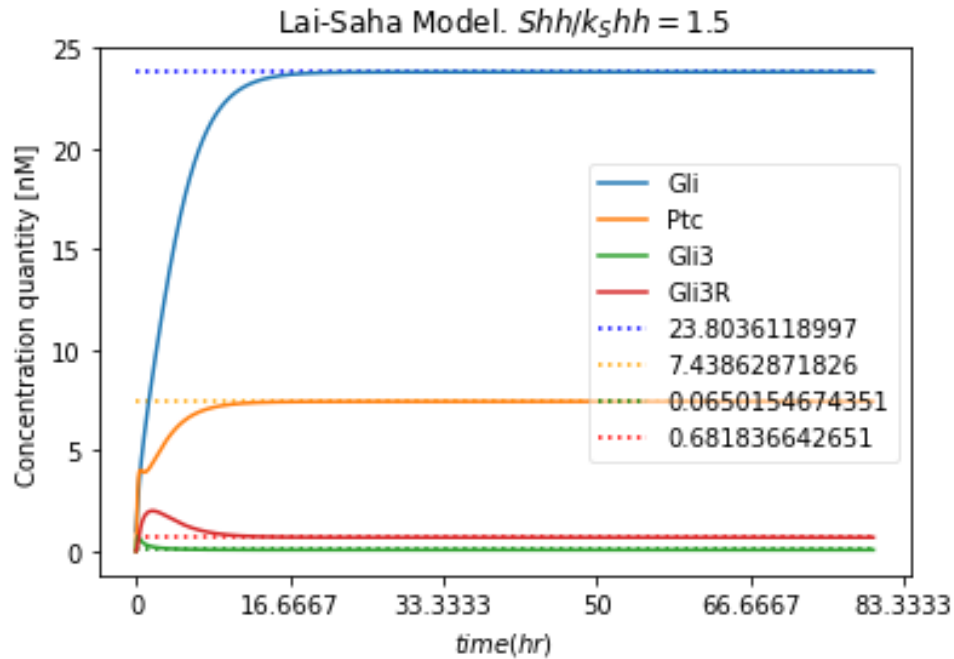


Figura 2.5: Evolución del modelo [Lai et al., 2004] con $Shh/k_{Shh} = 1,5$

una guía básica de AUTO para interpretar los resultados que imprime por pantalla (se maneja desde la terminal) y como pasarlos a un diagrama.

Bifurcación bajo Shh/K_{Shh}

falta añadir la imagen del diagrama

Debido a las diferencias que pudimos encontrar durante el desarrollo del modelo, nos pareció interesante intentar reproducir el comportamiento de Gli frente a la variación de Shh/K_{Shh} . En la figura ?? se puede encontrar el diagrama hallado.

En este caso, frente a los resultados del paper, obtenemos un comportamiento de interruptor bi estable, sin embargo este no es reversible si no irreversible.

Estos resultados, aunque muestran una dinámica similar, difieren cualitativamente de [Lai et al., 2004]. Sin embargo una revisión bibliográfica nos mostró como se relacionan con los posteriores trabajos del equipo, en concreto [Saha and Schaffer, 2006].

Bifurcación bajo r_{g3b}

Durante el desarrollo de los estados estacionarios, pudimos observar como las variaciones en la tasa de sintetización basal del gli3 afectaban dramáticamente a los puntos de corte.

Con ello, teniendo como referencia los códigos del apartado ?? desarrollamos el diagrama de bifurcaciones de Gli frente a la variación de este parámetro 2.6, algo que no tenemos constancia de que se hubiese llevado a cabo.

En general, concluimos que la tasa de generación de Gli3 juega un papel fundamental en la dinámica de este modelo, tanto por su posible alteración escogiendo como elemento delimitante Gli o Ptc como por la variación de este en si misma.

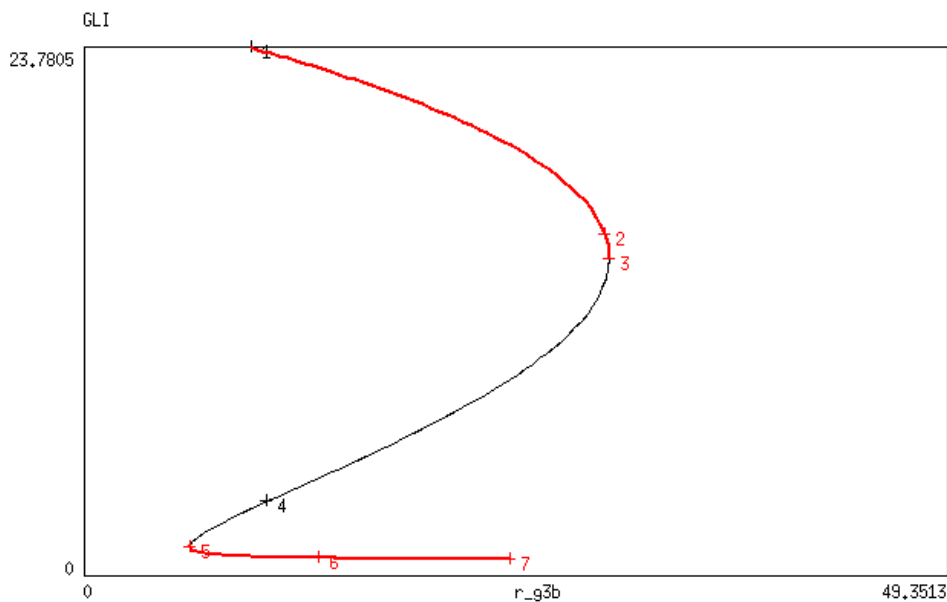


Figura 2.6: Diagrama de Bifurcación de [Lai et al., 2004] con Gli frente a r_{g3b}

2.6. Críticas

Redactando:

- erratas en el paper
- algunas simplificaciones del modelo

Capítulo 3

Modelo alternativo

3.1. Introducción

Como adelantábamos en la sección 1.3 si nos centramos en el modelado BEWARE de la transcripción génica esencialmente tenemos dos enfoques: modelar la expresión génica como una cantidad proporcional a la suma ponderada de los factores de transcripción o hacerlo proporcional a la probabilidad de unión del ARN polimerasa, que va modificada por los factores de transcripción.

Tras extenso estudio que se ha hecho del modelo [Lai et al., 2004], la multiestabilidad está más que demostrada para conjuntos de valores de parámetros esperables, así como para un conjunto de condiciones iniciales que también podrían esperarse en situaciones biológicas.

Sin embargo, debido a esto (la multiestabilidad que se pone de manifiesto en el estudio del modelo) sabemos que este modelo debe ser modificado, puesto no tiene un soporte experimental biológico contrastado.

Es decir, en experimentos biológicos no observamos este tipo de multiestabilidad. Por tanto si queremos que nuestro modelo de transcripción represente fielmente el comportamiento de la transcripción genética debemos modificarlo o cambiarlo.

Así, antes de cambiar grandes características de nuestro modelo, nace la idea de modificar nuestra forma de crear el operador BEWARE usando el segundo enfoque que tiene en cuenta el ARN polimerasa.

Tras el esquema de modelado, vamos a presentar los experimentos numéricos que nos llevan a pensar que podemos estar ante un comportamiento más fiel a lo observado en biología con sólo un estado estable.

3.2. Modelado BEWARE

Comenzamos aplicando las ideas del método termodinámico a nuestros dos genes, *gli* y *ptc*, los cuales suponemos controlados por tres factores de transcripción $\{Gli, Gli_3, Gli3R\}$ que son activador, activador y represor, respectivamente.

Consideraciones iniciales

- Destacamos de nuevo, antes de comenzar el resto del calculo del operador, que la expresión de la evolución de la cantidad de las proteínas generadas por *gli* y *ptc*, *Gli* y *Ptc*, vendrá disminuida por la degradación natural de estas moléculas con dos constantes de degradación. Esto implica que nuestro resutlado final será un modelo de la forma:

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

e igual con el *Ptc*.

- En el modelo, además, las reacciones de unión de los factores de transcripcón y del ARN polimerasa son mucho más rápidos que la síntesis de la proteína *Gli* o *Ptc*, por lo tanto, consideramos en equilibrio termodinámico dado por la Ley de Acción de Masas.
- Por otra parte en este trabajo se considera una versión del operador con cooperatividad total/ausencia de cooperatividad entre factores de transcripción. Podríamos

estudiar cómo afecta la hipótesis de tener una cooperatividad parcial en futuros desarrollos del mismo, siguiendo las indicaciones de [Cambon, 2017].

Todos los pasos siguen el esquema general presentado en [Cambon, 2017]:

3.2.1. Calculo del operador

Nuestro objetivo es averiguar la expresión del operador BEWARE en 3.1. Partiendo de la segunda consideración inicial, calculamos la expresion de los primeros complejos que se formarían al unir a una region de regulación vacía ($[B]$ de ahora en adelante) con alguno de los promotores (Gli y Gli_3), represores ($Gli3R$) o ARN polimerasa. En ese caso, tienen una concentración en el equilibrio termodinámico expresada como:

$$[BW] = \frac{K_{+W}^{(1)}}{K_{-W}^{(1)}}[W][B] := \frac{[W]}{K_W^{(1)}}[B] \quad (3.2)$$

donde W representa cualquier activador, represor o ARN polimerasa y $K_W^{(1)}$ es la constante de disociación. Además, siguiendo la notacion de [Cambon, 2017], el superíndice (1) representa que no hay otro factor de transcripcion en el momento de la union en el complejo.

Nuestro enfoque principal ocurre en una situación de cooperatividad¹. Por tanto, cuando nuevos factores se unan al complejo su constante de disociación vendrán modificada por los anteriores. Esto es, sea la reaccion



las concentraciones de equilibrio cendrían dadas siguiendo el equilibrio termodinamico:

$$[BWW] = \frac{[W][W]}{K_W^{(2)} K_W^{(1)}}[B] \quad (3.4)$$

¹Si se produce la cooperación, sería necesario saber qué factores de transcripcion se ven afectados por otros puesto que el la concentración del equilibrio dependerá de estas relaciones. En nuestro caso particular, sí podemos usar este enfoque.

sin embargo, la cooperatividad se refleja si imponemos que, para $i, k = Gli, Gli3, Gli3R, ARNP$:

$$K_i^{(2)} = K_k^{(1)} / c$$

donde c es una constante positiva mayor que 1. En particular, nuestro modelado está enmarcado en la situacion de cooperatividad total, esto implica que cuando se une un factor de transcripcion a nuestro complejo este modifica las afinidades de todos los siguientes de la misma manera.

Notemos n el número de posiciones de union (en nuestro caso $n=3$) de manera que j_A sea el numero de activadores unidos ($j_{Gli} + j_{Gli3}$), $j_R = j_{Gli3R}$ el numero de represores y $j_0 = n - j_A - j_R$ como el numero de espacios libres.

Con ello, para calcular el estado de equilibrio de cualquier disposicion, tenemos:

$$[BGli^{j_{Gli}}Gli_3^{j_{Gli3}}Gli3R^{j_{Gli3R}}] = [B]c^{(j_A+j_R-1)+} \left(\frac{[Gli]}{K_{Gli}} \right)^{j_{Gli}} \left(\frac{[Gli_3]}{K_{Gli_3}} \right)^{j_{Gli3}} \left(\frac{[Gli3R]}{K_{Gli3R}} \right)^{j_{Gli3R}} \quad (3.5)$$

Donde $+$ denota la funcion parte positiva, puesto que la cooperatividad no tiene lugar si no hay 2 o mas factores de transcripcion cooperativos en la configuracion.

Con respecto al proceso de unión de ARN polimerasa, los factores de transcripcion trabajan juntos tratando de activar o reprimir el proceso de union por un mecanismo conocido como reclutamiento.

Por lo tanto, consideramos que los activadores interactúan con RNAP con una interacción 'adhesiva' que da lugar a una modificación de la afinidad de la unión de la ARN polimerasa: K_{RP}/a^{j_A} donde a es una constante de cooperatividad mayor que 1.

Por el contrario, el efecto de los represores se modela en términos de una interacción repulsiva" que modifica el afinidad de unión K_{RP}/r^{j_R} con un factor anti-cooperatividad r menor que 1.

Espacio de todas las configuraciones

Para avanzar en la obtención del operador BEWARE siguiendo el esquema, comenzamos calculando el espacio de todas las posibles configuraciones. Sea un complejo compuesto por j_{Gli} , j_{Gli_3} , j_{Gli_3R} , j_0 , j_P activadores, represores, espacios vacíos y ARN polimerasa. En particular j_p puede ser 0 o 1 según encontremos o no ARNp en el compuesto.

Supongamos que no hay ningún ARN polimerasa en nuestro complejo (esto es, $j_p = 0$). En ese caso el estado de equilibrio vendría dado por la expresión:

$$C(C)[B] \left(\frac{[Gli]}{K_{Gli}} \right)^{j_{gli}} \left(\frac{[Gli_3]}{K_{Gli_3}} \right)^{j_{gli_3}} \left(\frac{[Gli_3R]}{K_{Gli_3R}} \right)^{j_{gli_3R}} \quad (3.6)$$

donde $C(C)$ hace referencia a $c^{(j_A+j_R-1)+}$. Además, como hemos dicho, nuestro modelo no tiene en cuenta la disposición espacial, con lo que este estado puede venir dado por todas las combinaciones espaciales del número de activadores, represores y espacios vacíos que nos indica j_{Gli} , j_{Gli_3} , j_{Gli_3R} , j_0 . Por tanto, multiplicamos este estado por todas las combinaciones que pueden darle lugar a él. Esta cantidad viene dada por simple combinatoria:

$$\frac{3!}{j_{Gli}!j_{Gli_3}!j_{Gli_3R}!j_0!}$$

Tenemos por tanto, la expresión de todas las configuraciones de equilibrio sin el papel del ARNp:

$$\begin{aligned} Z^{(3)}(j_{Gli}, j_{Gli_3}, j_{Gli_3R}, j_P = 0; C) &= \\ &= C(C) \frac{3!}{j_{Gli}!j_{Gli_3}!j_{Gli_3R}!j_0!} [B] \frac{[RNAP]}{K_{RP}} \left(\frac{[Gli]}{K_{Gli}} \right)^{j_{gli}} \left(\frac{[Gli_3]}{K_{Gli_3}} \right)^{j_{gli_3}} \left(\frac{[Gli_3R]}{K_{Gli_3R}} \right)^{j_{gli_3R}} \end{aligned} \quad (3.7)$$

Supongamos ahora que el ARN está en nuestro complejo (esto es, $j_p = 1$). De nuevo vamos a tener unos espacios ocupados y otros vacíos, dados por: j_{Gli} , j_{Gli_3} , j_{Gli_3R} , j_0 .

Todas las formas posibles de configuración para obtener una concentración de equilibrio con j_{Gli} , j_{Gli_3} , j_{Gli_3R} , j_P activadores, represores de nuevo se obtienen con la misma expresión.

Sin embargo, ahora tenemos en cuenta el valor que aporta el ARNp. Siguiendo lo expuesto en los preliminares, la existencia de activadores y represores, modifica la afinidad de union del ARN. Tenemos por tanto que el factor del ARNp dentro de nuestro complejo, en ausencia de factores viene expresado como:

$$[B.ARNp] = \frac{[ARNp]}{K_{RP}}[B] \quad (3.8)$$

En caso de que existan factores de transcripcion tenemos que modificar la afinidad según comentabamos:

$$\frac{K_{RP}}{a_{Gli}^{j_{Gli}} a_{Gli3}^{j_{Gli3}} r_{Gli3R}^{j_{Gli3R}}} \quad (3.9)$$

Donde $a_{Gli}a_{Gli3}r_{Gli3R}$ son las constante de cooperatividad y anticooperatividad asociadas a los factores de transcripción (y aparecen en la expresión modificadas según el numero de cada una, lo cual viene indicado en el exponente)

Tenemos pues la expresión para describir el estado:

$$C(C) \frac{3!}{j_{Gli}!j_{Gli3}!j_{Gli3R}!j_0!} [B] \frac{[RNAP] a_{Gli}^{j_{Gli}} a_{Gli3}^{j_{Gli3}} r_{Gli3R}^{j_{Gli3R}}}{K_{RP}} \left(\frac{[Gli]}{K_{Gli}} \right)^{j_{Gli}} \left(\frac{[Gli_3]}{K_{Gli_3}} \right)^{j_{Gli_3}} \left(\frac{[Gli3R]}{K_{Gli3R}} \right)^{j_{Gli3R}} \quad (3.10)$$

Agrupando por exponentes, podemos obtener la expresión final:

$$\begin{aligned} Z^{(3)}(j_{Gli}, j_{Gli_3}, j_{Gli3R}, j_P = 1; C) &= \\ &= C(C) \frac{3!}{j_{Gli}!j_{Gli_3}!j_{Gli3R}!j_0!} [B] \frac{[RNAP]}{K_{RP}} \left(\frac{a_{gli}[Gli]}{K_{Gli}} \right)^{j_{gli}} \left(\frac{a_{gli_3}[Gli_3]}{K_{Gli_3}} \right)^{j_{gli_3}} \left(\frac{r_{gli3R}[Gli3R]}{K_{Gli3R}} \right)^{j_{gli3R}} \end{aligned} \quad (3.11)$$

Esto nos permite describir todo el espacio muestral, es decir, el espacio de todas las posibles configuraciones, atendiendo al numero de factores de transcripción y a la existencia o no de ARN polimerasa:

$$\Omega = \{(j_{Gli}, j_{Gli_3}, j_{Gli3R}, j_P); j_{Gli}, j_{Gli_3}, j_{Gli3R} \geq 0; j_{Gli} + j_{Gli_3} + j_{Gli3R} \leq 3, j_P = 0, 1\} \quad (3.12)$$

Definicion de la probabilidad de cada configuración

Una vez que hemos descrito todas las configuraciones posibles en términos de las concentraciones de activador Gli y Gli3, del represor Gli3R y ARN polimerasa, obtenemos fácilmente la probabilidad de encontrar el promotor en una configuración particular de j_P ARN polimerasa y de factores de transcripcion $j_{Gli}, j_{Gli3}, j_{Gli3R}$ relacionados por una cooperatividad c .

$$P^{(3)}(j_{Gli}, j_{Gli3}, j_{Gli3R}, j_P; C) = \frac{Z^{(3)}(j_{Gli}, j_{Gli3}, j_{Gli3R}, j_P; C)}{\sum_{\{j'_{Gli}, j'_{Gli3}, j'_{Gli3R}, j'_P\} \in \Omega} Z^{(3)}(j'_{Gli}, j'_{Gli3}, j'_{Gli3R}, j'_P; C)} \quad (3.13)$$

con $(j_{Gli}, j_{Gli3}, j_{Gli3R}, j_P) \in \Omega$

Resultado final del operador BEWARE

$$\begin{aligned} BEWARE([Gli][Gli3][Gli3R][ARNP]; C) &= \\ &= C_B \sum_{\substack{j_{Gli} + j_{Gli3} + j_{Gli3R} \leq n \\ j_{Gli}, j_{Gli3}, j_{Gli3R} \geq 0}} P^{(n)}(j_{Gli}, j_{Gli3}, j_{Gli3R}, j_P = 1; C) \end{aligned} \quad (3.14)$$

Al dividir el denominador en dos sumas, segun la ARN polimerasa este ligada o no a la configuración, esta expresión puede reescribirse en términos de la función del factor de regulación, F_{reg} :

$$BEWARE(Gli, Gli3, Gli3R) = \frac{c_b}{1 + \frac{k_{RNAP}}{F_{reg}(Gli, Gli3, Gli3R)RNAP}}, \quad (3.15)$$

Realizando los calculos indicados en [Cambon, 2017], vía el paquete [Meurer et al., 2017], este factor de regulación se puede reducir para facilitar el comprensión del proceso general.

Se obtiene así, la expresion:

$$F_{reg}([Gli][Gli_3][Gli3R]; C) = \frac{S^{(3)}(a_{Gli}[Gli]K_{Gli}^{-1}, a_{Gli_3}[Gli_3]K_{Gli_3}^{-1}, r_{Gli3R}[Gli3R]K_{Gli3R}^{-1}; C)}{S^{(3)}([Gli]K_{Gli}^{-1}, [Gli_3]K_{Gli_3}^{-1}, [Gli3R]K_{Gli3R}^{-1}; C)} \quad (3.16)$$

donde $S^{(3)}(x, y, z; C)$ viene dads por la cooperatividad total que hemos asumido:

$$S^{(3)}(x, y, z; C) = 1 + \frac{1}{c} (1 + cx + cy + cz)^3 - \frac{1}{c} \quad (3.17)$$

Concluimos así el calculo del modelado del operador BEWARE con un enfoque stimulated. Con este operador y las ecuaciones definidas en el capítulo 1 podemos disponer ya de nuestro modelo completo.

3.3. Sistema final

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

$$\frac{dGli}{dt} = BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) - k_{deg}Gli, \quad (3.18)$$

$$\frac{dGli_3}{dt} = \frac{r_{g3b}}{Ptc} - Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right), \quad (3.19)$$

$$\frac{dGli3R}{dt} = Gli_3 \left(\frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + Signal} \right) - k_{deg}Gli3R, \quad (3.20)$$

$$\frac{dPtc}{dt} = BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) - k_{degp}Ptc. \quad (3.21)$$

Donde tenemos, por definición:

$$Signal = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{Ptc}{k_{ptc}}}, \quad (3.22)$$

y,

$$BEWARE(Gli, Gli_3, Gli3R) = \frac{c_b}{1 + \frac{k_{RNAP}}{F_{reg}(Gli, Gli_3, Gli3R)RNAP}}, \quad (3.23)$$

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:

$$F_{reg} = \frac{1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli a Gli}{k_{Gli}} c + \frac{Gli_3 a Gli_3}{k_{Gli_3R}} c + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} r_{Gli3R} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c}}{1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli c}{k_{Gli}} + \frac{Gli_3 c}{k_{Gli3R}} + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c}} \quad (3.24)$$

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

$$\frac{dGli}{dt} = -Gli k_{deg} + \frac{c_b}{1 + \frac{k_{RNAP} \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli c}{k_{Gli}} + \frac{Gli_3 c}{k_{Gli3R}} + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}{RNAP \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli a Gli}{k_{Gli}} c + \frac{Gli_3 a Gli_3}{k_{Gli3R}} c + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} r_{Gli3R} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}}. \quad (3.25)$$

$$\frac{dGli_3}{dt} = -Gli_3 \left(k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{ptc}{k_{ptc}}}} \right) + \frac{r_{g3b}}{ptc}. \quad (3.26)$$

$$\frac{dGli3R}{dt} = Gli_3 \left(-Gli3R k_{deg} + \frac{k_{g3rc}}{K_{g3rc} + \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{ptc}{k_{ptc}}}} \right). \quad (3.27)$$

$$\frac{dPtc}{dt} = \frac{c_b}{1 + \frac{k_{RNAP} \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli c}{k_{Gli}} + \frac{Gli_3 c}{k_{Gli3R}} + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}{RNAP \left(1 + \frac{1}{c} \left(\frac{Gli a Gli}{k_{Gli}} c + \frac{Gli_3 a Gli_3}{k_{Gli3R}} c + \frac{Gli3Rc}{k_{Gli3R}} r_{Gli3R} + 1 \right)^3 - \frac{1}{c} \right)}} - k_{deg} Ptc. \quad (3.28)$$

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. En primer lugar procedemos afrontando el problema desde una perspectiva analítica.

Sean las ecuaciones 3.183.193.203.21, 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 3.18 y 3.21:

$$\begin{cases} 0 = BEWARE - k_{deg}Gli, \\ 0 = c_b BEWARE - k_{degp}Ptc. \end{cases}$$

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:

$$k_{deg}Gli = BEWARE = \frac{k_{degp}}{c_b}Ptc \implies \frac{k_{deg}}{c_b k_{degp}}Gli = Ptc$$

En particular si llamamos $k_{cc} = \frac{k_{deg}}{c_b k_{degp}}$:

$$k_{cc}Gli = Ptc \tag{3.29}$$

Por otra parte, de 3.19 y 3.20:

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

Sumando, obtenemos:

$$\begin{aligned} 0 = \frac{r_{g3b}}{Gli} - Gli_3 k_{deg} - k_{deg} Gli_3 R &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R \implies \\ &\implies \frac{r_{g3b}}{Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R} = Gli \end{aligned} \quad (3.30)$$

Con estas cuentas, podemos obtener, en primer lugar, una función de $Signal_{3.22}$ modificada gracias a 3.29, la llamaremos $Signal_{modificada}$:

$$Signal_{modificada} = \frac{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1}{\frac{Shh}{k_{shh}} + 1 + \frac{k_{cc}}{k_{ptc} Gli}}. \quad (3.31)$$

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 3.30 nos quedaría:

$$\frac{r_{g3b}}{Gli} = Gli_3 k_{deg} + k_{deg} Gli_3 R \implies Gli_3 = \frac{r_{g3b}(K_{g3rc} + Signal_{modificada})}{k_{deg}(K_{g3rc} + Signal_{modificada}) Gli} \quad (3.32)$$

Y de nuevo, por 3.30:

$$Gli_3 R = \frac{r_{g3b}}{k_{deg} Gli} - Gli_3 \quad (3.33)$$

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 3.18 igualado a cero :

$$Gli = \frac{1}{k_{deg}} BEWARE_{modificado}(Gli) \quad (3.34)$$

3.5. Simulaciones

3.5.1. Parámetros

Salvo que especifiquemos lo contrario, los valores de los parámetros serán los recogidos en la tabla 3.1

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 3.1: Tabla de parámetros, operador *BEWARE*

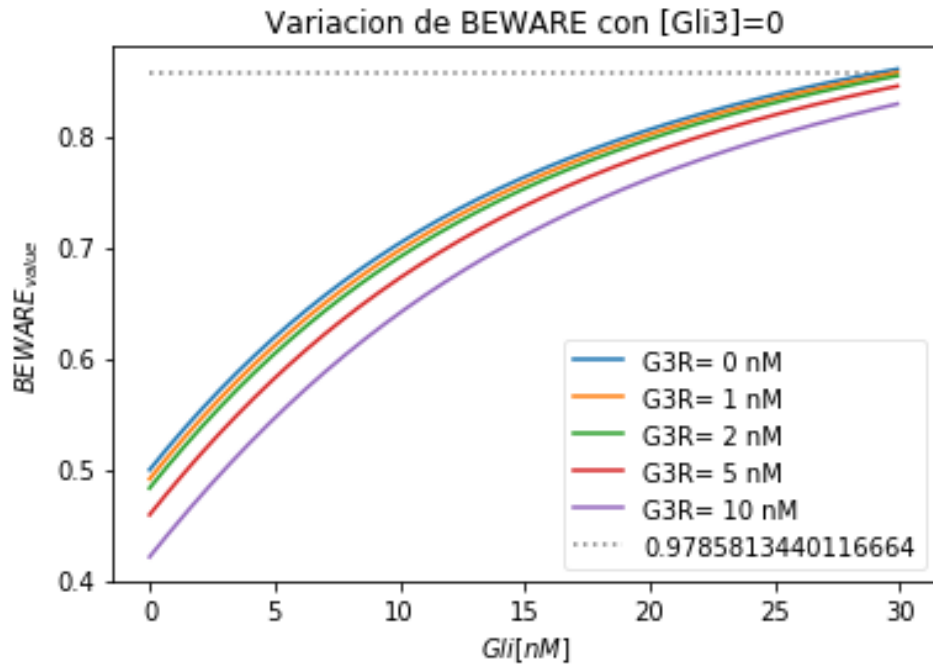


Figura 3.1: Variación del nuevo operador BEWARE

3.5.2. Variación del operador BEWARE

3.5.3. Evolución temporal

3.5.4. Análisis numérico de los estados estacionarios

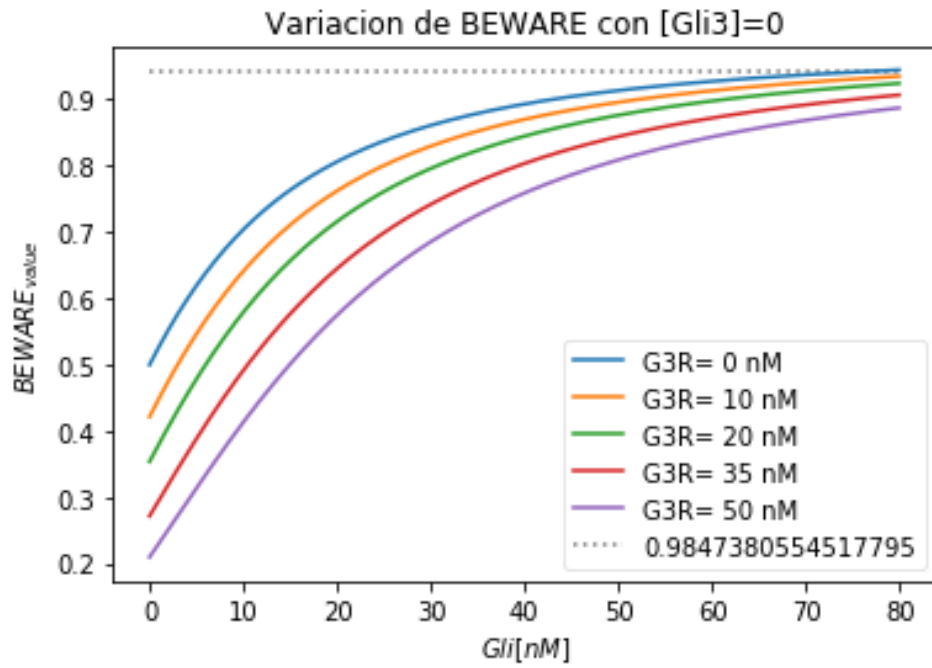


Figura 3.2: Variación del nuevo operador BEWARE en más rango

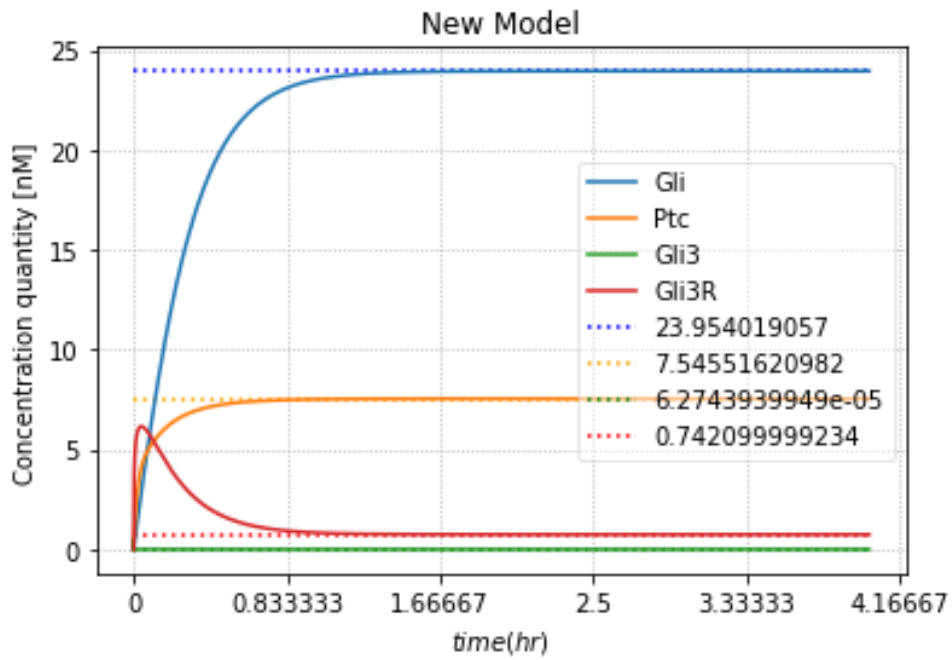


Figura 3.3: Evolución temporal del nuevo operador BEWARE

Capítulo 4

Conclusiones

4.1. 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 i 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 i 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.
- [Gilbert, 2000] Gilbert, S. (2000). Developmental biology. 6th edition.
- [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.
- [Ortiz, 2017] Ortiz, B. (2017). Análisis cualitativo de sistemas dinámicos con origen biológico. Mathematics bachelor’s degree thesis, Universidad de Granada.
- [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].