



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LA DINÁMICA DE LA RED DE REGULACIÓN MOLECULAR DETERMINA LA ESTABILIDAD Y  
PLASTICIDAD EN LA MADURACIÓN DE LOS PROGENITORES DE  
GRANULOCITOS-MONOCITOS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
CARLOS RAMÍREZ ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
COMITÉ TUTOR  
DRA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLÁ ROCES  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ORIENTE

CD. MX.

NOVIEMBRE DE 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Agradecimientos

Dedico esta tesis a mis padres Margarito Ramírez Ruiz y Lucía Teresa Álvarez Hernández por todo su amor y por darme el privilegio de cursar estudios universitarios. A mi hermano Óscar Ramírez Álvarez y a toda mi familia por ser la mejor compañía así como por todo el apoyo.

Este trabajo fue asesorado por el Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra al cual quiero agradecer su guía, disponibilidad, amabilidad y en general por ser una excelente persona que me dió la libertad de explorar y desarrollar mi curiosidad académica durante el doctorado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quiero agradecer por el financiamiento de este trabajo a través de la beca de doctorado 251420.

También doy gracias a mi novia Dení Esther Espinosa Guillén por estar conmigo y ser una gran compañera de viaje y de vida. Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Biología Computacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por toda la retroalimentación que recibí durante el desarrollo de este trabajo, en especial a Adhemar Liquitaya y Akram Méndez.

Finalmente, gracias a mis queridos amigos Angélica Méndez, Rafael Hernández, Juan Carlos Bravo, Ulises Juárez y Joaquín Enríquez por los buenos momentos que hemos compartido.

# Lista de abreviaturas

**CLP:** Progenitor Común Linfoide

**CMP:** Progenitor Común Mieloide

**GMP:** Progenitores de Granulocitos-Monocitos

**HSC:** Células Troncales Hematopoyéticas

**MC:** Mastocitos

**MEP:** Progenitor Megacarioeritroide

**MPP:** Progenitor multipotente

**RB:** Redes Booleanas

# Resumen

El tejido sanguíneo ha sido reconocido como un sistema experimental ideal para estudiar la diferenciación celular, principalmente por su accesibilidad y porque comparte con otros procesos de desarrollo características como son los patrones de ramificación jerárquicos y graduales. Por otro lado, la hematopoyesis ha sido estudiada de forma intensiva y por esta razón existen muchos datos moleculares acerca del proceso. Sin embargo, no es claro cómo las redes de regulación subyacentes determinan o restringen el proceso de diferenciación. En la presente tesis se infiere una red de regulación de moléculas claves en la diferenciación de una subpoblación de células sanguíneas, aquellas que se derivan del Precursor de Granulocitos-Monocitos (GMP), y que contiene a los monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células cebadas.

Integramos los datos cualitativos conocidos en un modelo de red que describe la evolución de los patrones temporales de expresión observados en las células derivadas de los GMP. Se estudió el comportamiento dinámico de la red mediante un modelo Booleano. Las soluciones del modelo fueron asociadas con los perfiles de expresión observados en monocitos, células cebadas, neutrófilos, basófilos y eosinófilos en contextos silvestres y mutantes. Además, se simularon ambientes intra y extra celulares fijos, así como perturbaciones transitorias sencillas y se observó una concordancia en lo general con los datos experimentales reportados en cada caso.

## Objetivo

- Desarrollar un modelo dinámico que integre la información conocida sobre las redes de regulación molecular que participan en el proceso de diferenciación de las células derivadas de los Precursores de Granulocitos-Monocitos (GMP).

## Resultados principales

- El modelo apoya la existencia de una serie de interacciones indirectas incluidas como hipotéticas.
- El modelo refleja la variabilidad observada en células derivadas de GMP así como patrones complejos de transición entre linajes.
- Encontramos transiciones entre linajes que hubiera sido difícil inferir mediante experimentos clásicos de perturbación.

# Contenido

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introducción</b>                               | <b>8</b>  |
| 1.1      | Hematopoyesis . . . . .                           | 8         |
| 1.2      | Células derivadas de GMP . . . . .                | 11        |
| 1.2.1    | Monocitos . . . . .                               | 11        |
| 1.2.2    | Neutrófilos . . . . .                             | 12        |
| 1.2.3    | Eosinófilos . . . . .                             | 13        |
| 1.2.4    | Basófilos . . . . .                               | 13        |
| 1.2.5    | Células cebadas . . . . .                         | 13        |
| 1.3      | Diferenciación de los GMP . . . . .               | 14        |
| 1.4      | Regulación del compromiso celular . . . . .       | 16        |
| 1.5      | Modelos de redes . . . . .                        | 19        |
| 1.5.1    | El formalismo de RB . . . . .                     | 20        |
| 1.5.2    | Un pequeño ejemplo de RB . . . . .                | 21        |
| 1.6      | Modelos de redes en procesos biológicos . . . . . | 21        |
| 1.7      | Modelos de redes en la hematopoyesis . . . . .    | 23        |
| 1.8      | Motivación . . . . .                              | 25        |
| <b>2</b> | <b>Objetivo</b>                                   | <b>27</b> |
| 2.1      | Objetivo general . . . . .                        | 27        |
| 2.2      | Objetivos particulares . . . . .                  | 27        |
| <b>3</b> | <b>Métodos</b>                                    | <b>29</b> |
| 3.1      | Búsqueda de interacciones . . . . .               | 29        |
| 3.2      | Definición del modelo . . . . .                   | 31        |
| 3.3      | Patrones observados <i>vs</i> simulados . . . . . | 31        |
| 3.3.1    | Búsqueda de atractores . . . . .                  | 31        |
| 3.4      | Validación . . . . .                              | 32        |
| 3.4.1    | Mutantes . . . . .                                | 32        |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>CONTENIDO</i>                                  | 7         |
| 3.4.2 Entornos fijos . . . . .                    | 32        |
| 3.4.3 Robustez de la red . . . . .                | 32        |
| 3.4.4 Perturbaciones transitorias . . . . .       | 33        |
| <b>4 Resultados</b>                               | <b>34</b> |
| 4.1 Patrones moleculares esperados . . . . .      | 34        |
| 4.2 Un modelo de interacciones directas . . . . . | 35        |
| 4.3 Insuficiencia del primer modelo . . . . .     | 38        |
| 4.4 La red de regulación extendida . . . . .      | 39        |
| 4.5 Atractores del modelo extendido . . . . .     | 41        |
| 4.6 Mutantes . . . . .                            | 43        |
| 4.7 Robustez del modelo . . . . .                 | 45        |
| 4.8 Perturbaciones deterministas . . . . .        | 47        |
| 4.9 Entornos fijos . . . . .                      | 48        |
| <b>5 Discusión</b>                                | <b>50</b> |
| <b>6 Conclusiones</b>                             | <b>57</b> |
| <b>A Apéndice</b>                                 | <b>58</b> |



# Introducción

*“Tan importante es tener ideas como deshacerse de ellas”.*

Francis Crick

## 1.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el cual se producen, desarrollan y maduran las células del tejido sanguíneo. Este proceso es un paradigma experimental en la biología del desarrollo [172]. Clásicamente, la hematopoyesis ha sido vista como un proceso irreversible y ramificado en el cual células progenitoras dan origen a subpoblaciones celulares cada vez más comprometidas las cuales a su vez originan a las células maduras o linajes celulares, véase la [figura 1.1](#) [76]. Sin embargo, existe evidencia de que esta visión determinista no es del todo exacta dado que es posible observar transiciones entre células comprometidas de linajes distintos (esto se discutirá más adelante en la [sección 1.3](#)). Esta característica también se observa en otros procesos de diferenciación y se ha denominado *plasticidad*. Para una revisión del tema consúltese [76].

Las células sanguíneas maduras están compuestas por células mieloides (eritrocitos, megacariocitos, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y células cebadas), células linfoides (células B, T y NK) y otros linajes sin clasificar descubiertos de forma más reciente [156]. La formación de estas células maduras comienza con una subpoblación de Células Troncales Hematopoyéticas (HSCs) (véase la [figura 1.1](#)). Inicialmente, las HSCs fueron definidas como aquellas subpoblaciones que presentan las siguientes características: *i*) tienen el potencial de dar origen a todos los linajes sanguíneos (multipotencia) y *ii*) tienen la capacidad de producir subpoblaciones similares a ellas (autorenovación) [196]. Las HSCs de ratones adultos poseen el

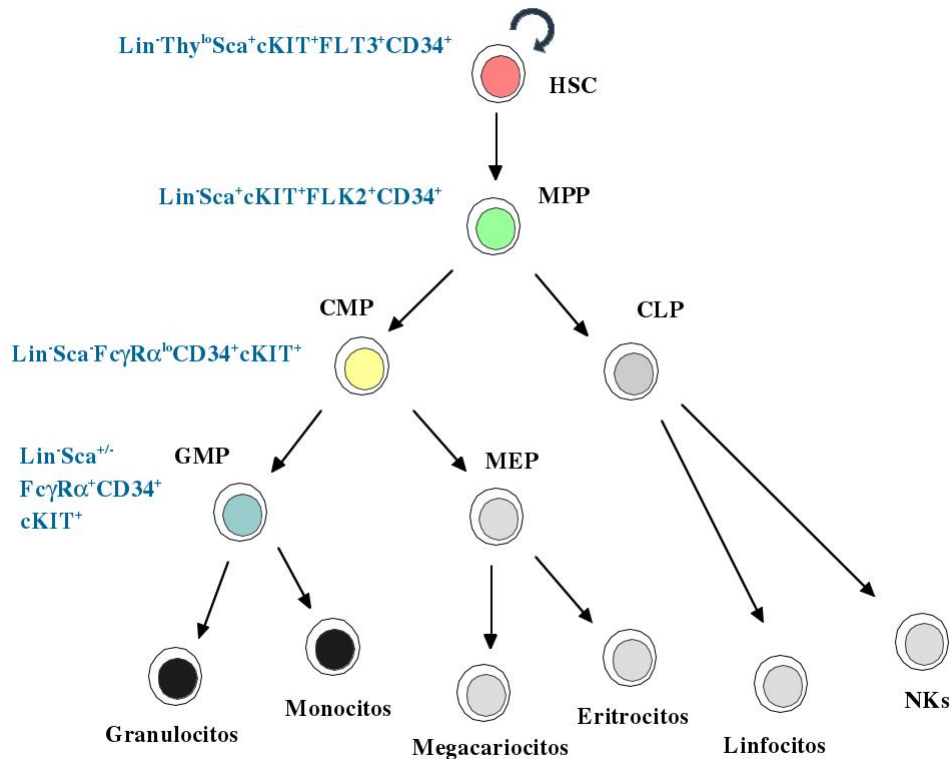


Figura 1.1: **Hematopoyesis.** Principales patrones temporales observados en sistemas experimentales murinos. Los linajes en gris quedan fuera del alcance de este trabajo. Hasta abajo se encuentran los linajes maduros. HSC (Células Troncales Hematopoyéticas), MPP (Progenitor Multipotente), CMP (Progenitor Común Mielode), MEP (Progenitor Megacarioeritroide), CLP (Progenitor Común Linfoide) y NK (Natural Killer).

inmunofenotipo  $\text{Lin}^{-}\text{Thy}^{\text{lo}}\text{Sca}^{+}$  [204]. En la actualidad, las HSCs son aisladas por la expresión los marcadores c-KIT, FLT3 y la baja expresión de CD34 [173] y mediante otros marcadores adicionales [53]. Las HSCs originan a progenitores que conservan multipotencialidad pero han perdido la capacidad de autorrenovarse. Estas células denominadas progenitores multipotenciales (MPPs) poseen el perfil de expresión  $\text{Lin}^{-}\text{Sca}^{+}\text{c-KIT}^{+}\text{FLK-2}^{-}\text{CD34}^{+}$  [38, 173]. Las células MPP dan origen a los progenitores mieloides y linfoides denominados Progenitores Comunes Mieloides (CMP, caracteri-

zados por la expresión de  $\text{lin}^- \text{Sca}^{-/lo} \text{Fc}\gamma\text{R}\alpha^{lo} \text{CD34}^+ \text{c-KIT}^+$  y Progenitores Comunes Linfoides (CLP, que expresan  $\text{Lin}^- \text{FLK-2}^+ \text{IL-7R}\alpha^+ \text{CD27}^+$ ) [111, 6]. Las células CMP a su vez producen a los Progenitores de los Eritrocitos/Megacariocitos (MEP) y los Progenitores de Granulocitos-Monocitos (GMP). Esta última subpoblación es la principal fuente de macrófagos, células dendríticas, granulocitos y células cebadas, los cuales se estudian en la presente tesis.

La diferenciación del tejido hematopoyético se regula a través de factores claves. Específicamente, los factores de transcripción C/EBP $\alpha$  y PU.1 son necesarios para la correcta maduración de todos los linajes derivados de GMP mientras que GATA-1/2 y MITF-1 son cruciales para la formación de eosinófilos, basófilos y células cebadas [140, 94, 155]. Aunque se sabe que estos y otros factores de transcripción son necesarios para la correcta diferenciación de las células GMP, aún no existe un consenso de cómo estas moléculas determinan de forma coherente y robusta los programas de desarrollo para cada linaje.

Debido a la complejidad de la hematopoyesis actualmente es imposible estudiar el proceso completo. Además, no contamos con un modelo integrado del proceso. Por esta razón, restringimos nuestro estudio al subconjunto de células que se derivan del Progenitor de Granulocitos-Monocitos. Los granulocitos y monocitos son células del sistema inmune que participan en la eliminación de microorganismos o antígenos que invaden al organismo en los animales mamíferos. También son de importancia médica dado que juegan un papel en el desarrollo de enfermedades alérgicas [151, 71]. Estas células se relacionan en términos de desarrollo y comparten elementos reguladores claves de sus procesos de maduración (esto será discutido en la [sección 1.2](#)).

Una revisión breve de las principales características biológicas y los perfiles de expresión de los linajes derivados de las células GMP en el modelo experimental murino así como de las funciones que ejercen en las respuestas inmunes se presenta en la siguiente [sección 1.2](#). Posteriormente, en la [sección 1.3](#) se describen las rutas de diferenciación observadas experimentalmente en células GMP así como los patrones moleculares asociados a cada fenotipo. Por último, en la [sección 1.4](#) se describen los mecanismos moleculares descritos acerca del proceso de diferenciación de estas células.

## 1.2 Células derivadas de GMP

Los Progenitores de Granulocitos-Monocitos (GMP) poseen el patrón de expresión  $\text{Lin}^{-c}\text{-KIT}^+\text{Fc}\gamma\text{RI}\alpha^+\text{Sca}^{-/lo}\text{CD34}^+$  y dan origen a monocitos, granulocitos y células cebadas [6]. Los granulocitos comprenden a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Los GMP son subpoblaciones heterogéneas con diferentes potenciales de linajes. Por ejemplo, Franziska *et al* (2015) encontraron siete diferentes subpoblaciones heterogéneas en un análisis transcrip-tómico de células individuales [176]. Sin embargo, en la actualidad no hay un consenso del número de subpoblaciones de GMPs, de sus patrones de expresión o de sus potenciales de linaje específicos. En el siguiente párrafo se describen los principales linajes celulares derivados de las GMPs.

### 1.2.1 Monocitos

Los monocitos son células fagocíticas mononucleares con importantes roles en la homeostasis de los tejidos y en respuestas inmunes. Tradicionalmente, se piensa que los monocitos son las células progenitoras de los macrófagos y las células dendríticas [224]. En la presente tesis no se incluyen las células dendríticas en la discusión dado que experimentalmente el potencial de linaje de monocitos generalmente se evalúa mediante la capacidad de dar origen a macrófagos maduros y por lo tanto nos enfocamos en estos. Además de su papel como progenitores de macrófagos y células dendríticas los monocitos también tienen funciones propias. Por ejemplo, participan en el mantenimiento de la homeostasis del tejido endotelial [73]. Se caracterizan clásicamente por la expresión de  $\text{LY6C}^{hi}$  aunque en realidad es una población heterogénea [72]. Los macrófagos son subpoblaciones heterogéneas que por lo general expresan M-CSFR, CD11b y F4/80 [151, 239] aunque pueden diferir en función y localización anatómica. Se pueden clasificar en osteoclastos, macrófagos alveolares, histiocitos y células de Kupffer de acuerdo a su localización en huesos, pulmones, tejidos conectivos intersticiales e hígado, respectivamente [75]. Los macrófagos también se pueden caracterizar por las funciones que ejercen. Por ejemplo, las subpoblaciones de macrófagos M1 (clásicamente activados) modulan respuestas inmunes contra patógenos mientras que las M2 (alternativamente activadas) se caracterizan por regular procesos antiinflamatorios [3]. Las moléculas principales para el reclutamiento de macrófagos a los tejidos inflamatorios son MIF-1 y CSF-1 [179, 31]. Los macrófagos buscan, fagocitan y destruyen células viejas e infectadas así como patógenos.

También regulan la respuesta inmune procesando y presentando antígenos a linfocitos T a través de moléculas MHC-II [142].

### 1.2.2 Neutrófilos

Los neutrófilos son reconocidos como la primera línea de defensa en los procesos inmunes. Son células de vida corta que se pueden encontrar en el bazo, pulmón, hígado y médula ósea en condiciones fisiológicas pero rápidamente migran a la sangre periférica y mucosas cuando ocurre inflamación [215, 110, 208]. Se han observado subpoblaciones de neutrófilos que difieren en sus patrones de funcionalidad y migración [221, 39]. Para llevar a cabo su función como mediadores de procesos inmunes los neutrófilos migran a mucosas en un proceso de extravasación bien caracterizado siguiendo un gradiente de moléculas tales como CXCL8, fMLP y C5a [67]. Una de las principales citocinas reguladoras de la producción de neutrófilos es GM-CSF, la cual promueve la movilización de los neutrófilos localizados en la médula ósea [124]. Durante la inflamación el número de neutrófilos se incrementa drásticamente. La maduración de los neutrófilos consta de varias etapas bien caracterizadas con métodos histológicos. Estos estadios son: mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, células segmentadas y polimorfonucleares [21]. El desarrollo de estas células es regulado por factores de transcripción, especialmente C/EBP $\alpha$ , PU.1 y GFI-1, estos factores serán discutidos con más detalle en la [sección 1.4](#). Durante el proceso de maduración se forman gránulos secretores. Estos gránulos contienen productos microbicidas y moléculas proinflamatorias [63]. Hay tres tipos de gránulos secretores: los gránulos secretores primarios que contienen mieloperoxidasas (MPO) que son proteínas microbicidas; los gránulos secretores secundarios que contienen lactoferrinas (LF); y por último, los gránulos terciarios caracterizados por la presencia de proteína gelatinasa. El mecanismo principal de eliminación de patógenos de los neutrófilos es la fagocitosis de los microbios a través de un compartimento de la membrana celular llamado fagosoma. El fagosoma se fusiona con los gránulos secretores los cuales contienen componentes microbicidas. En este proceso hay dos tipos importantes de mecanismos de eliminación de patógenos: el estallido oxidativo que es mediado por especies de oxígeno reactivas. El otro mecanismo es mediado por proteínas microbicidas que incluyen proteasas, lactoferrinas y defensinas [110].

### 1.2.3 Eosinófilos

Los eosinófilos son granulocitos que se desarrollan en la médula ósea. Pueden ser encontrados en circulación sanguínea así como en tejido linfoide y gastrointestinal. Se pueden distinguir de los neutrófilos por sus núcleos bilobulados y largos gránulos [191]. Llevan a cabo papeles importantes en la respuesta inmune ante parásitos multicelulares como helmintos y en procesos alérgicos [69, 24]. Algunos de los principales estímulos para la producción de eosinófilos son IL-5, CCR3, SIGLEC-8 y la activación del receptor TLR-7, véase [191] para una revisión. Los eosinófilos ejercen su función a través de la liberación de moléculas microbicidas y mediadores de la inflamación almacenados en sus gránulos. Estas moléculas microbicidas incluyen MBP, EDN, EPX y ECP [121]. Estos mediadores inflamatorios regulan la comunicación con otras células. Por ejemplo, regulan la activación de las células T cooperadoras mediante la liberación de IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  [191].

### 1.2.4 Basófilos

Los basófilos son células granulares presentes en la sangre periférica en escaso número. Debido a su escasez se ha dificultado su estudio y caracterización [37]. Los basófilos y células cebadas participan en el desarrollo de procesos alérgicos [97] mediante la liberación de histaminas, leucotrienos y otras moléculas contenidas en sus gránulos [43]. Los basófilos también participan en la respuesta inmune contra parásitos [200]. Por su similitud con las células cebadas, tanto en el contenido de sus gránulos como en las funciones que ejercen, los basófilos fueron considerados como células redundantes. Sin embargo, gracias al desarrollo de mutantes con deficiencias específicas en la producción de estas células se han descubierto funciones no redundantes en este linaje. Por ejemplo, los basófilos han sido reportados como los principales mediadores de la inflamación en alergias de piel crónicas mediadas por IgE [169]. Son importantes para la eliminación del parásito *Nippostrongylus brasiliensis* [207] y además son importantes productores de IL-4 una citocina moduladora de respuestas de tipo TH2 [202].

### 1.2.5 Células cebadas

Las células cebadas también llamadas mastocitos son redondas granulares y residen principalmente en mucosas [42]. Estas células se originan de precur-

sores que residen en la médula ósea [17, 34]. Participan en la eliminación de microbios y parásitos multicelulares así como en procesos alérgicos y autoinmunes [223, 13, 28]. La migración de las células cebadas a los tejidos inflamados es controlada por la expresión de la integrina  $\beta 7$  [80] y por la quimiocina CXCL5 [33]. Véase [79] para una revisión de las moléculas y mecanismos involucrados en los procesos de migración a tejidos.

Las células cebadas son activadas a través de la estimulación con c-KIT o del receptor Fc $\epsilon$ R lo cual causa la liberación del contenido de sus gránulos [89]. También participan en procesos inflamatorios y alérgicos secretando histaminas, quimiocinas (IL-8, RANTES, Eotaxina), enzimas (quimasas, triptasas), citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-3), factores de crecimiento (VEGF) y otros mediadores de la inflamación, véase [213]. Las células cebadas también regulan la producción de citocinas que sesgan el tipo de respuesta inmune. Por ejemplo, liberan IL-25, IL-33 y TSLP durante la infección por helmintos [83]. Véase [226] para una revisión de estos mecanismos.

### 1.3 Diferenciación de los GMP

En la presente sección se discuten las rutas de diferenciación observadas experimentalmente en células derivadas de GMP. Los detalles moleculares del proceso serán discutidos en la [sección 1.4](#). Actualmente no hay un consenso acerca de las rutas de diferenciación en GMPs. De hecho, se han descrito múltiples rutas para algunos linajes [93], véase la [figura 1.3](#). Esto refuerza la idea de que no hay una única ruta para la maduración celular. Por ejemplo, en el caso del origen de los macrófagos se ha descrito un progenitor bipotente con el fenotipo Kit<sup>lo</sup>CX3CR1<sup>-</sup> que da origen a macrófagos y células dendríticas [65]. Sin embargo, los macrófagos también se pueden originar de progenitores linfoides [130, 198]. Los neutrófilos se pueden derivar directamente del precursor GMP [95] a través de una serie de etapas intermedias bien caracterizadas mediante técnicas histológicas pero cuyos patrones moleculares no están bien determinados. Por otro lado, los neutrófilos también se pueden generar de progenitores que dan origen a neutrófilos y células cebadas [206]. Los eosinófilos se pueden derivar de subpoblaciones de progenitores que presentan la firma molecular IL-5R $\alpha$ <sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>c-Kit<sup>lo</sup> y expresan GATA-1 aislados de la médula ósea [95].

Arinobu y colaboradores sugieren que los basófilos se forman de los progenitores de GMP pasando por un progenitor bipotente de basófilos/mastocitos

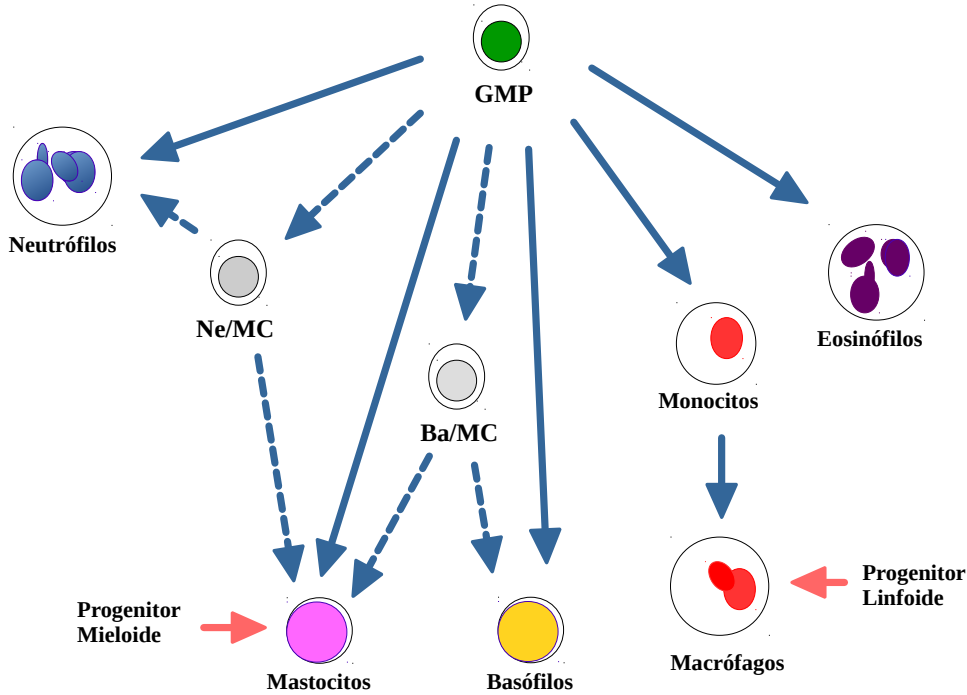


Figura 1.2: **Diferenciación de los GMP**. Esquema de las transiciones observadas en el proceso de maduración de las células derivadas de los GMP. Las flechas continuas (discontinuas) representan transiciones directas (indirectas) de la subpoblación GMP a los linajes maduros. Las flechas rojas indican transiciones desde progenitores distintos al GMP. Las subpoblaciones Ne/MC y Ba/MC corresponden a progenitores bipotenciales de neutrófilos/mastocitos y basófilos/mastocitos, respectivamente.

(Ba/MC, véase la [figura 1.3](#)). Los niveles de C/EBP $\alpha$  son importantes para esta decisión [17, 94]. Se han observado varias rutas de diferenciación para el caso de las células cebadas. Éstas se pueden originar de Progenitores Comunes Mieloides (CMP), Progenitores de Granulocitos-Monocitos (GMP) así como de progenitores bipotenciales de basófilos y mastocitos [34, 68, 95, 17, 180]. En modelos experimentales humanos también se han descrito progenitores bipotenciales. Por ejemplo, han sido observados progenitores bipotenciales con la capacidad de dar origen a basófilos/eosinófilos y basófilos/mastocitos [50, 242].



## 1.4 Regulación del compromiso celular

En esta sección se resumen los mecanismos moleculares conocidos sobre el desarrollo de las células derivadas de GMP. La revisión presente se enfoca en los sistemas experimentales murinos aunque alguna evidencia en sistemas humanos es citada en cuyo caso se hace la aclaración del modelo experimental utilizado.

**Diferenciación de los GMP.** Después de que los progenitores sanguíneos se han comprometido al linaje granulocítico-monocítico, estas células expresan una serie de moléculas claves, en general factores de transcripción (TF), cuyas interacciones regulan las decisiones de linaje subsecuentes. Los principales TFs de la determinación de las células GMP son C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  y C/EBP $\epsilon$ , PU.1, GATA-1 y GATA-2, véase [93] para una revisión. C/EBP $\alpha$  y PU.1 son requeridos para la maduración de los granulocitos [82, 134, 237] mientras que los factores GATA-1 y GATA-2 son requeridos para la correcta formación de basófilos, eosinófilos y células cebadas [85, 233] (figura 1.3).

**El punto de divergencia entre neutrófilos y monocitos.** Para la formación de los neutrófilos y monocitos son muy importantes los niveles relativos de C/EBP $\alpha$  y PU.1 [45]. Los niveles altos de expresión de C/EBP $\alpha$  sesgan la diferenciación de los GMPs hacia la producción de neutrófilos. Por otro lado, cuando PU.1 prevalece se promueve la formación del linaje de monocitos [45, 117], véase la figura 1.3. Durante el desarrollo de los neutrófilos la expresión de C/EBP $\alpha$  promueve la expresión de marcadores de este linaje como es el caso de las mieloperoxidasas (MPO), las elastasas de neutrófilos (NE), las lactoferrinas, las lisosimas, entre otras [90, 162, 227, 164, 45]. Además de la expresión de C/EBP $\alpha$  son importantes los TFs GFI-1, C/EBP $\beta$ , C/EBP $\epsilon$  para el desarrollo de los neutrófilos. C/EBP $\alpha$  es capaz de activar la expresión de GFI-1 [123]. La inducción de GFI-1 promueve la diferenciación de los granulocitos mediante la activación directa de genes como en el caso de la proteína de unión a manosa [126], regulando la estimulación mediada por citocinas como en el caso del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSFR) [48] y promoviendo la expresión de miRNAs [225]. Además, GFI-1 inhibe genes relacionados con la maduración del linaje de monocitos como M-CSFR [44]. C/EBP $\epsilon$  es otro factor de transcripción inducido por C/EBP $\alpha$  en sinergismo con el receptor G-CSFR [227]. C/EBP $\alpha$  parece ser reemplazado por C/EBP $\epsilon$  y C/EBP $\beta$  en etapas tardías de maduración en el linaje de eosinófilos y probablemente en neutrófilos, lo cual se evidencia

por el hecho de que C/EBP $\epsilon$  se encarga de inducir proteínas presentes en gránulos secundarios [54, 102, 195]. C/EBP $\epsilon$  se induce después de la expresión de C/EBP $\alpha$  durante la maduración de células MPRO hacia neutrófilos inducida por ácido transretinoico [101]. En los ratones mutantes de C/EBP $\epsilon$  hay una reducción severa de la expresión de proteínas de gránulos secundarios como lactoferrinas, gelatinasas y colagenasas de neutrófilos. Lo mismo ocurre con marcadores secundarios como MBP y con la peroxidasa X de eosinófilos (EPX) [74]. El factor de transcripción PU.1 es necesario para la correcta formación de todas las células derivadas de GMP lo que se evidencia en mutantes para este gen los cuales tienen un bloqueo en su maduración [49, 134]. En un contexto de niveles altos de C/EBP $\alpha$ , PU.1 promueve la expresión de marcadores como elastasas, lactoferrinas y proteínas de gránulos secundarios en neutrófilos y eosinófilos [164, 74]. Por otro lado, en un contexto de niveles bajos de C/EBP $\alpha$  este factor de transcripción actúa en sinergismo con PU.1, c-JUN, AML-1, Sp1 y USF [164, 74, 62, 92, 60] y es capaz de activar marcadores presentes en macrófagos como es el caso del receptor de manosa (MR), CD11b, CD11c, F4/80 [62, 92, 60] y marcadores de células cebadas como el receptor de clase MHC-II [92].

**La formación de los linajes de eosinófilos, basófilos y células cebadas.** Los factores GATA (principalmente GATA-1 y GATA-2) son importantes para el desarrollo de los eosinófilos, basófilos y células cebadas pero son dispensables para la formación de los neutrófilos y los monocitos [94, 106, 17], véase la [figura 1.3](#). De hecho, se han mapeado las regiones de unión a DNA  $\beta 1$  y  $\beta 2$  C-terminal de GATA-1/2 como regiones cruciales para la formación de estos linajes [85, 233]. Los factores GATA interactúan físicamente con otros TFs como C/EBP $\alpha$  y PU.1 [236, 238, 216, 236, 238] para promover la expresión de genes en estos linajes como es el caso de MC-CPA, IL-3R $\alpha$ , c-KIT, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ , MBP, CCR3, entre otros [241, 217, 128, 106, 141]. Aunque GATA-1 parece no ser estrictamente necesario para el desarrollo de eosinófilos *in vivo* [57] y podría ser redundante a la función de otros factores como GATA-2 [64, 210]. Iwasaki *et al* 2006, observaron que el orden de expresión del factor GATA-2 determinaba el desarrollo de basófilos o eosinófilos [94]. Sin embargo, no se sabe cómo es que este orden podría estar determinado. Poco se sabe de los determinantes que promueven el desarrollo de los basófilos, pero RUNX-1 parece ser un factor necesario para la formación de estas células [148]. Por otro lado, la expresión de C/EBP $\alpha$  determina la producción de basófilos *vs* mastocitos en progenitores bipotenciales derivados de GMPs [16, 180]. Este proceso depende de la inhibición mutua entre los

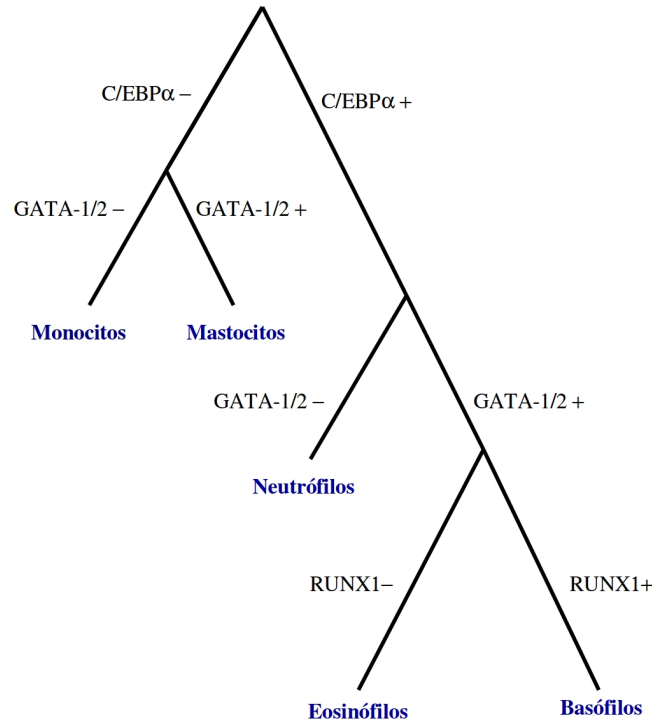


Figura 1.3: **Expresión de factores de transcripción** en los linajes derivados de GMPs. Esquema de un árbol de decisión binaria simplificado que muestra algunos factores de transcripción importantes expresados en los linajes derivados de los GMP.

factores C/EBP $\alpha$  y MITF-1.

**Señales extracelulares para la diferenciación de los granulocitos y monocitos.** Las citocinas y quimiocinas son importantes para la maduración de los GMP. En particular, los receptores de IL-5, IL-3 y GM-CSF promueven la diferenciación de basófilos, eosinófilos y mastocitos. Sin embargo, estas moléculas extracelulares no son estrictamente necesarias dado que mutantes deficientes en estos genes pueden desarrollar los linajes mencionados de forma normal [112, 157, 232, 115]. Los receptores de las citocinas IL-5, IL-3 y GM-CSF difieren en su subunidad  $\alpha$  pero comparten la misma subunidad  $\beta$  lo cual provoca redundancia parcial en sus funciones de señalización. Poco se sabe en la actualidad sobre los mecanismos moleculares que promueven

sus funciones específicas. Se ha descrito que el gen de la sintenina promueve la activación selectiva de IL-5 a través de Sox4 [2, 115]. En el modelo murino se sabe que la interleucina 5 sesga la formación y activación de los eosinófilos [230, 229, 232, 112]. Sin embargo, la estimulación con IL-5 no activa factores de transcripción claves como C/EBP $\alpha$  y correlaciona sólo débilmente con la expresión de GATA-1 y GATA-2 [29]. Colectivamente, estos datos sugieren que la señalización via IL-5 no determina la formación de eosinófilos sino que probablemente sólo promueve el crecimiento de éstas células. De la misma forma, la estimulación con IL-3 promueve el crecimiento de los basófilos y mastocitos pero no es necesaria para su desarrollo [108, 107, 197].

En la [figura 1.3](#) se muestran de una forma muy simplificada algunos de los factores de transcripción más importantes en el desarrollo de cada linaje. Como se discutió previamente, los niveles bajos de C/EBP $\alpha$  permiten la formación de mastocitos o monocitos dependiendo de la presencia o no de factores GATA, respectivamente. Por otro lado, en presencia de altos de niveles de C/EBP $\alpha$  se pueden generar los linajes de neutrófilos, eosinófilos y basófilos dependiendo de la expresión o no de factores GATA y de RUNX-1 ([figura 1.3](#)).

## 1.5 Modelos de redes

Los sistemas dinámicos son aquellos cuyos estados evolucionan o cambian en el tiempo [205]. Los modelos de redes son sistemas dinámicos que consisten en un conjunto de variables llamados nodos en los cuales los valores de estos nodos dependen entre sí [47]. Estos modelos han sido utilizados para simular el comportamiento temporal de circuitos de regulación genética en sistemas biológicos, esto se discutirá más detalladamente en la [sección 1.6](#). Los formalismos de redes pueden ser de tipo discreto o continuo según el tipo de valores de las variables, para una revisión véase [47, 98, 118, 5, 8]. Los modelos discretos asumen para simplificar el análisis que los nodos de la red sólo pueden tomar valores discretos. Estos modelos tienen la ventaja de ser sencillos y suelen ser el paso inicial en la construcción de modelos más complejos. Por el otro lado, los modelos continuos son capaces de simular con detalle la dinámica de las interacciones moleculares individuales en la red. Sin embargo, para ello es necesario medir de forma experimental parámetros cinéticos [47]. Los modelos de redes Booleanas (RB) son modelos discretos sencillos que permiten estudiar las propiedades dinámicas del sistema que es-

tán determinadas solamente por la acción de las interacciones de regulación y que no dependen de la calibración fina de parámetros. Las RB resultan convenientes por la naturaleza de la información disponible en la literatura la cual por lo general se reduce a observaciones experimentales acerca del tipo de interacción (si es positiva o negativa) y el flujo de regulación (quién regula y quién es regulado). Por otra parte, la información acerca de los parámetros cualitativos de cada interacción es escasa. Por lo anterior y debido a que en este trabajo estamos interesados en propiedades cualitativas del proceso de diferenciación de las GMP tales como los patrones de expresión moleculares celulares elegimos un modelo RB. Por lo tanto, en el resto de la discusión nos enfocamos a este tipo de formalismo.

### 1.5.1 El formalismo de RB

Una RB se puede definir como un conjunto de diferentes variables binarias numeradas  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$  y un conjunto de  $n$  funciones Booleanas  $f_{x_1}, f_{x_2}, f_{x_3}, \dots, f_{x_n}$  tales que

$$x_{i(t+1)} = f_{x_i}(x_{i,1(t)}, x_{i,2(t)}, x_{i,3(t)}, \dots, x_{i,n(t)}) \quad (1.1)$$

Donde  $x_{i,k(t)}$  es el valor del  $k$ -ésimo regulador de  $x_i$  en cierto tiempo  $t$ ,  $k \in \{1, 2, 3, \dots, n\}$ . Decimos que el vector binario  $\hat{x}(t) = (x_{1(t)}, x_{2(t)}, x_{3(t)}, \dots, x_{n(t)})$  es un estado de la red en un tiempo  $t$  determinado. Existen  $2^n$  estados.

Si denotamos  $F = (f_{x_1}, f_{x_2}, f_{x_3}, \dots, f_{x_n})$  entonces 1.1 se convierte en

$$\hat{x}_{(t+1)} = F(\hat{x}_{(t)}) \quad (1.2)$$

Es decir, al aplicar  $F$  a un estado en un tiempo dado se obtiene el estado de la red en el tiempo siguiente. A los estados  $\hat{x}_{(t)}$  y  $\hat{x}_{(t+1)}$  en 1.2 les llamamos *predecesor* y *sucesor*, respectivamente. Dado que el espacio de estados de una RB es finito las trayectorias llevadas a cabo por el sistema deben regresar a un estado previo después de una cantidad suficientemente grande de iteraciones de  $F$  [9]. Esto ocasiona ciclos en las trayectorias de la red denominados *atractores*. Los atractores son de especial interés dado que se espera que el sistema pase la mayor parte de su tiempo en esos conjuntos de estados. Estos se pueden definir de forma más formal como sigue:

**Definición:** Se denomina *atractor* al conjunto de estados que forman una trayectoria cíclica de la red. La longitud del ciclo corresponde al número

$k$  de estados pertenecientes a dicha trayectoria y si  $k = 1$  diremos que se trata de un *atractor de punto fijo* o *estado estacionario*.

**Definición:** Dado un atractor  $\hat{x}$  llamamos *cuenca de atracción de  $\hat{x}$*  al conjunto de estados cuya trayectoria converge a dicho atractor después de una cierta cantidad de iteraciones.

### 1.5.2 Un pequeño ejemplo de RB

En la [figura 1.4 A](#) se muestra un ejemplo sencillo de una red de tres nodos, donde  $(x_1, x_2, x_3) = (A, B, C)$ . En la [figura 1.4 C](#) se muestran las reglas lógicas  $f_{x_i}$  (1.1) para cada nodo. Para esta red en particular  $f_A(A_{(t)}) = A_{(t)}$ ,  $f_B(A_{(t)}, B_{(t)}) = A_{(t)} \wedge \neg B_{(t)}$  y  $f_C(A_{(t)}, B_{(t)}) = \neg A_{(t)} \wedge \neg B_{(t)}$ , donde  $\wedge$ ,  $\vee$  y  $\neg$  representan los operadores lógicos AND, OR y NOT, respectivamente. Dadas estas funciones lógicas, para cada estado específico se puede calcular su sucesor. En la [figura 1.4 C](#) se muestran todos los  $2^3$  estados posibles de la red representados como nodos de un grafo. Como se muestra en la figura, partiendo desde cualquier estado de la red el sistema describe trayectorias que convergen hacia dos atractores de punto fijo que corresponden a  $(0, 0, 1)$  y  $(1, 1, 0)$  cuyas cuencas se muestran en color rojo y verde, respectivamente [figura 1.4 C](#).

## 1.6 Modelos de redes en procesos biológicos

En un trabajo pionero publicado en 1969, Stuart Kauffman introdujo por primera vez los modelos RB aplicados a circuitos genéticos para explicar los fenotipos celulares como las soluciones de estos sistemas [99]. El modelo NK estudiado por Kauffman consiste en una RB con un número fijo  $N$  de nodos y  $K$  conexiones por nodo. Las redes con valores altos de  $K$  se asocian a una dinámica *caótica* o *desordenada* caracterizada por un gran número de atractores que contienen ciclos de periodos largos. El opuesto (pocos atractores y ciclos cortos) es observado en redes con valores bajos del parámetro  $K$  [99]. En un estudio posterior Derrida demostró analíticamente la existencia de una transición de fase entre el comportamiento ordenado y el caótico [51]. Kauffman hipotetizó que las redes biológicas debían presentar valores críticos de transición donde éstas son capaces de ser estables y robustas a perturbaciones pero a la vez cuentan con la capacidad de evolucionar y adaptarse a los cambios en el ambiente. En las últimas décadas la acumulación de datos

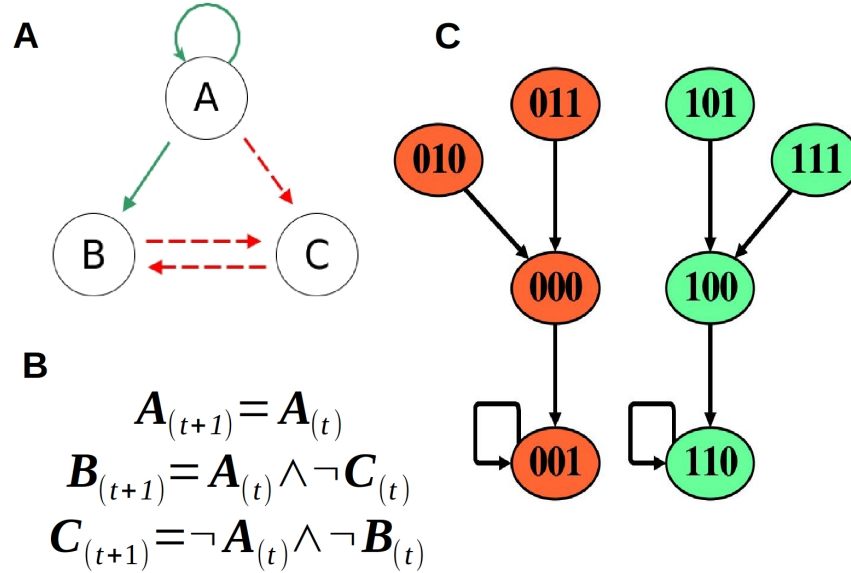


Figura 1.4: **Redes Booleanas**. (A) Ejemplo de una Red de Regulación compuesta por tres factores moleculares  $A$ ,  $B$  y  $C$  representados esquemáticamente como nodos de un grafo. Las interacciones positivas o negativas se muestran en verde y rojo, respectivamente. (B) Funciones lógicas que determinan el valor de cada nodo en un tiempo dado. (C) Estados posibles de la red,  $\hat{x} = (A, B, C)$ , así como las transiciones entre estados. Las cuencas de atracción correspondientes a  $(0, 0, 1)$  y  $(1, 1, 0)$  se muestran en rojo y verde, respectivamente. Los símbolos  $\wedge$ ,  $\vee$  y  $\neg$  representan los operadores Booleanos AND, OR y NOT, respectivamente.

sobre las interacciones moleculares de regulación celulares motivó la implementación de modelos RB aplicados a procesos biológicos específicos como el desarrollo de los patrones moleculares en los linfocitos T de mamíferos y en los segmentos corporales de *Drosophila melanogaster* [137, 7]. Por otra parte, la introducción de la teoría de grafos para describir las redes de interacción moleculares en la última década del siglo pasado permitió descubrir características topológicas como la modularidad y la distribución de la conectividad libre de escala presentes en dichas redes biológicas [185]. Maximino Aldana caracterizó la transición de fase en modelos RB con distribuciones

libre de escala [9] y en un trabajo posterior mostró evidencia de que las redes biológicas presentan valores esperados de parámetros correspondientes a la fase crítica como Kauffman había predicho [22]. Estos resultados junto con otros reportes [163] apuntan a que la teoría concuerda con los resultados experimentales y muestran que a pesar de que las RB son modelos muy simples pueden ser usados para predecir características presentes en sistemas biológicos.

Los aspectos de la teoría acerca de los modelos de redes revisada en esta sección se enfocan a las RB dado que los resultados de la presente tesis se basan en este formalismo. Sin embargo, existen diversos modelos de redes de regulación, véase [98, 118, 47] para una revisión de la literatura. Los modelos de redes basados en Sistemas de Ecuaciones Ordinarias (ODE) han sido usados también en diversos contextos biológicos. Algunos de los comportamientos dinámicos se conservan en modelos de ODEs y RBs. Por ejemplo, una red de regulación de moléculas clave en la especificación floral de *Arabidopsis thaliana* alcanza los mismos atractores en un modelo RB o en uno basado en ODE [11, 192]. Por este motivo, se ha argumentado que al menos algunas de las propiedades dinámicas de las redes de regulación dependen de las restricciones impuestas por su topología y no por la naturaleza específica de cada una de las interacciones o de sus parámetros exactos [192]. Para terminar esta sección es importante notar que otros formalismos diferentes a los modelos de redes han sido implementados para explicar patrones de expresiones temporales en la hematopoyesis, véase por ejemplo [131]. Sin embargo, estos modelos quedan fuera del alcance de este trabajo.

## 1.7 Modelos de redes en la hematopoyesis

La introducción de los modelos de redes para estudiar la hematopoyesis es relativamente reciente [100, 136, 117, 190], véase la línea del tiempo de la [figura 1.5](#). Laslo P. *et al* en 2006 usó un modelo sencillo de ODEs para estudiar la dinámica del compromiso de los GMP hacia granulocitos *versus* monocitos [117]. El sistema estudiado presenta dos atractores distintos (es biestable) consistente con lo observado en los experimentos [117]. En el mismo año nuestro grupo elaboró un modelo RB de factores de transcripción que participan en el desarrollo de las células T cooperadoras [136]. El modelo es capaz de rescatar los principales fenotipos de células T y también presenta los patrones observados en los mutantes experimentales. Un importante an-



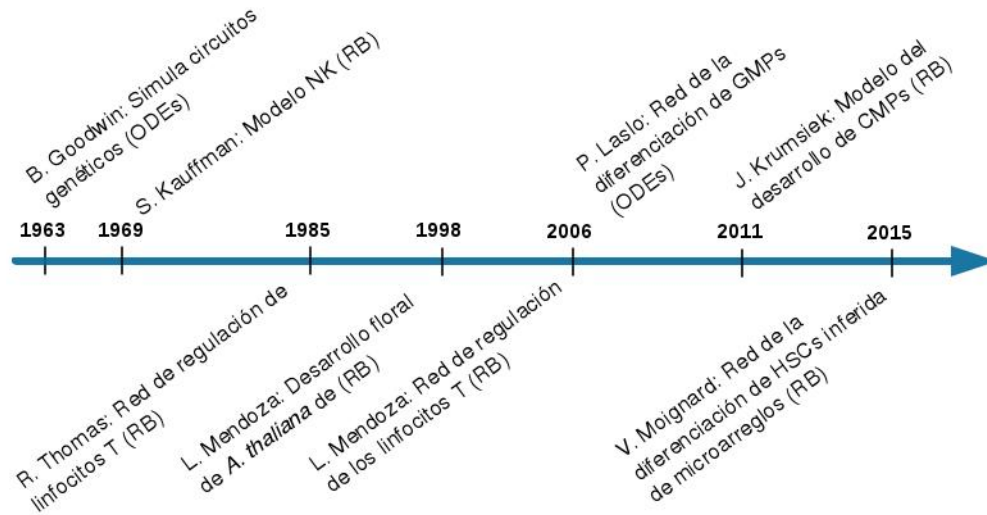


Figura 1.5: **Modelos de redes aplicados a procesos biológicos.** En la línea del tiempo se muestran sólo algunos antecedentes clave para el presente trabajo. Las abreviaciones RB y ODEs corresponden a redes Booleanas y sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias, respectivamente.

tedeciente para la presente tesis es el trabajo de Krumsiek *et al* [113]. En este se desarrolla un modelo RB aplicado al proceso de compromiso de las GMPs. Tal modelo es capaz de rescatar los principales patrones asociados a granulocitos, monocitos y linfocitos. Sin embargo, no es capaz de recuperar los patrones presentes en eosinófilos, mastocitos y basófilos, principalmente por la falta de información acerca de la regulación de factores importantes para su desarrollo. Por otro lado, las RB han sido usadas para describir la heterogeneidad de los patrones de expresión génica en el desarrollo de los linajes hematopoyéticos [27, 152]. Naldi *et al* 2010, evaluó el comportamiento de una red de moléculas importantes para el desarrollo de los linfocitos ante diferentes estímulos extracelulares [152]. En un trabajo reciente, se evaluó la perturbación sistemática de los atractores para simular posibles transiciones entre fenotipos celulares de linfocitos [132]. Moignard *et al* 2015, usó datos de microarreglos para tratar de inferir un modelo RB para simular el compromiso de las células HSC hacia progenitores comunes mieloides (CMP) o linfoideas (CLP) siendo capaz su modelo de predecir mutantes nulos en ciertos factores de transcripción importantes [144]. Las redes de regulación

también han sido usadas para evaluar transiciones temporales de los progenitores hacia linajes maduros. En particular, nuestro grupo ha estudiado las perturbaciones necesarias para observar tales transiciones en un modelo de la diferenciación de linfocitos B, T y células NK [138, 135]. Por último, Narula *et al* 2013, estudió un módulo pequeño de factores de transcripción para explicar el switch biestable en la diferenciación de las HSCs [153]. En conjunto, estos trabajos demuestran como los modelos de redes pueden ser utilizados para explicar la multiestabilidad, jerarquía, heterogeneidad y la plasticidad en la formación del tejido sanguíneo.

## 1.8 Motivación

El modelo conceptual clásico de la hematopoyesis establecido firmemente en los años noventa consideraba este proceso como irreversible y ramificado regulado estrechamente por factores de transcripción, véase la [figura 1.1](#) [53, 199]. Sin embargo, este marco conceptual a pesar de ser útil en el estudio de la hematopoyesis tiene la desventaja de que sólo puede proveer una representación estática del sistema [139]. Como se detalla en secciones previas, existen numerosos y heterogéneos datos acerca de los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación de las células derivadas de las GMP. Sin embargo, en la actualidad no está claro cómo las interacciones regulatorias se integran en una red cuya dinámica restringe el proceso de diferenciación.

Una herramienta clásica importante para el estudio de la hematopoyesis han sido los experimentos de epistasis. En éstos, se lleva a cabo una perturbación sencilla en un gen o elemento regulador y se evalúa el efecto en la presencia o ausencia en otro gen distinto. El resultado de estos ensayos es por lo general lineal, legible y explicable con argumentos de causa y efecto. Sin embargo, las relaciones no lineales son más difíciles de evaluar. Por otro lado, los experimentos de epistasis pueden provocar un sesgo en la interpretación de los resultados dado que suponen un efecto directo y jerárquico lo cual no se cumple por lo general en la realidad [18]. En esos casos, los modelos pueden servir como ventanas para observar el comportamiento dinámico del proceso como un todo [154, 18]. Otra ventaja de los modelos de redes de regulación es el hecho de que sirven para integrar información. Un modelo RB puede considerarse exitoso cuando es posible asociar claramente los atractores del modelo a los patrones experimentales observados en el proceso

biológico [193]. En este caso el modelo dinámico resultado se puede utilizar como guía experimental en experimentos de epistasis así como para intentar predecir los patrones de transición celulares en ambientes normales y en presencia de perturbaciones no lineales.

Nuestro objetivo inicial fue inferir una red de regulación al menos suficiente para estudiar los principales patrones temporales de expresión en las células derivadas de GMP [183]. Como se describe en la [sección 1.3](#) múltiples rutas de diferenciación han sido observadas experimentalmente. Sin embargo, en la actualidad no existe un consenso del número subpoblaciones de progenitores, de sus perfiles de expresión o de su heterogeneidad. Adicionalmente, tampoco se conocen los posibles patrones de transición de estas células o por qué se dan estas transiciones. Por todo lo anterior, el segundo objetivo de la presente tesis fue definir un modelo dinámico de la evolución temporal de los patrones expresión observados durante el proceso de diferenciación de los GMP. Trabajos previos han implementado modelos de redes de regulación para describir los patrones temporales de expresión en GMPs [113, 117]. Sin embargo, estos modelos no son capaces de describir los perfiles de expresión observados en las subpoblaciones de granulocitos como eosinófilos, basófilos y mastocitos, posiblemente porque son modelos muy sencillos. Por lo tanto, en esta tesis presentamos un modelo RB inferido de sistemas experimentales murinos que es suficiente para simular los patrones cualitativos de expresión en los principales fenotipos de las células derivadas de los GMP [183].

# Objetivo

## 2.1 Objetivo general

- Inferir un modelo de red de regulación basado en interacciones moleculares reportadas en el proceso de diferenciación de las células derivadas de los Progenitores de Granulocitos-Monocitos y construir un modelo que simule los principales patrones temporales de expresión observados en este sistema.

## 2.2 Objetivos particulares

- Identificar reguladores moleculares claves en el proceso de la diferenciación de los granulocitos.
- Construir un modelo de red Booleana basado en esta información.
- Analizar los patrones de las soluciones estacionarias del modelo de red.
- Validar el modelo a través de la simulación de perturbaciones (mutantes de ganancia y pérdida de función).
- Simular transiciones entre las soluciones de la red producidas por pequeñas perturbaciones.

# Hipótesis

- Una red de regulación construida con información de interacciones conocidas, directas y bien sustentadas es suficiente para elaborar un modelo dinámico red de regulación que simule la diferenciación de las células derivadas de GMP.

# Métodos

La estrategia metodológica consistió en los siguientes pasos: *i*) inferencia de la red de regulación, *ii*) definición del modelo, *iii*) comparación de los atractores del modelo con los patrones esperados y *iv*) validación del modelo mediante la comparación de las simulaciones de mutantes, perturbaciones y entornos fijos. En el paso (*iii*) en caso de no encontrar los patrones de células derivadas de GMP esperados se procedía a un reajuste del modelo regresando al paso (*i*) para la búsqueda de interacciones faltantes. Esta estrategia de inferencia de redes ha sido usada previamente en la construcción de diversos modelos (véase por ejemplo [152, 137, 234]) se conoce como inferencia *de abajo hacia arriba (bottom up)*. En la [figura 3.1](#) se muestra esquemáticamente el proceso de construcción y validación del modelo. En esta figura también se muestra que el proceso se puede continuar *ad infinitum* pasando del paso (*iv*) al paso (*i*) complementando el modelo con nuevas interacciones. Sin embargo, el objetivo del presente trabajo fue construir un modelo al menos suficiente para simular los principales patrones observados en células derivadas de GMP y por esta razón el proceso se detuvo en el paso (*iv*). En las siguientes secciones se detallan estos pasos. La implementación de todas las simulaciones de este trabajo se pueden consultar en el repositorio <https://github.com/caramirezal/RegulatoryNetworkGMPModel>.

## 3.1 Búsqueda de interacciones

Para la reconstrucción de la red de regulación ([figura 3.1](#), paso (*i*)) se utilizó un enfoque de tipo de abajo hacia arriba (bottom up) en el cual identificamos las regulaciones de interacción entre moléculas claves usando una revisión extensiva de la literatura ayudada por herramientas de minería de datos como STRING, NetPath y DAVID [96, 209, 87]. Las interacciones

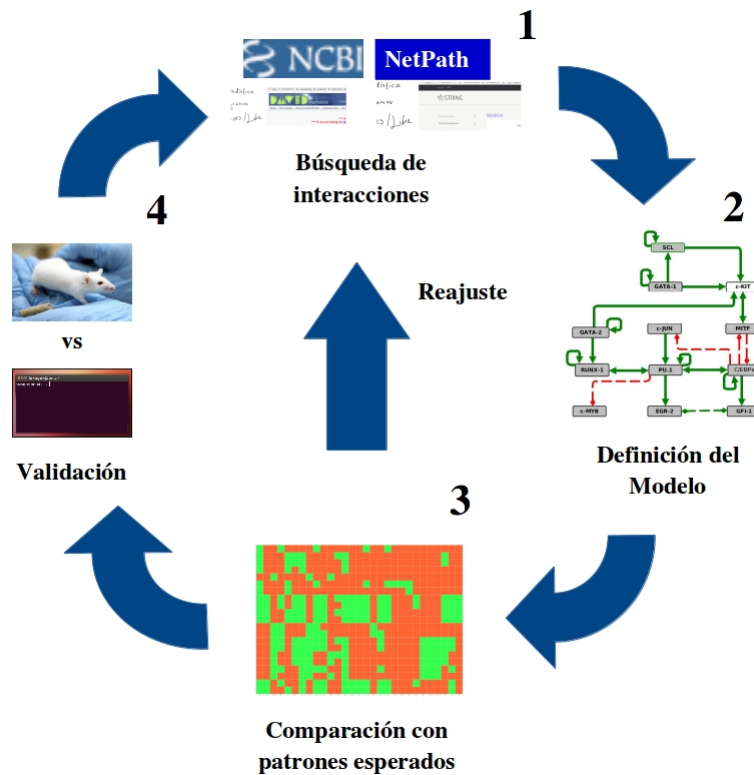


Figura 3.1: **Estrategia Metodológica**. **1.** Se hizo una búsqueda general de las interacciones reportadas en la literatura auxiliada por herramientas de minería de datos. **2.** Se definió un modelo con base a las interacciones inferidas en el paso 1. **3.** Se calcularon los atractores y se compararon con las firmas moleculares de linajes presentes en las células derivadas de GMPs. En caso de haber discrepancia se hace un reajuste volviendo al paso 1. **4.** Se validó el modelo comparando las simulaciones de perturbaciones con experimentos reportados correspondientes.

moleculares fueron obtenidas en su mayor parte del modelo experimental murino excepto en algunos casos en los cuales éstas fueron inferidas del modelo humano cuando existe coincidencia entre ambos sistemas. Tales casos se establecen de forma explícita. Se realizó una curación manual todas las interacciones para evitar la introducción de interacciones con poco soporte experimental. Por otro lado, para evaluar si el módulo compuesto por ele-

mentos reguladores clave era suficiente para simular los patrones temporales de activación observados durante la diferenciación de los GMP la red de regulación fue construida en dos fases. En la primera fase se eligieron únicamente interacciones directas y bien sustentadas experimentalmente (figura 3.1 paso 1). Es decir, se consideraron las interacciones de regulación que satisfacen al menos uno de los siguientes criterios: *i*) corroboradas por varias técnicas moleculares; *ii*) observadas en varios sistemas celulares experimentales; o *iii*) reproducidas por grupos diferentes. En la segunda fase de reajuste (figura 3.1) además de las interacciones directas consideramos interacciones para las cuales existe evidencia indirecta obtenidos de experimentos de epistasis.

## 3.2 Definición del modelo

Para definir las funciones lógicas se utilizaron las interacciones inferidas en el paso (*i*) formalizadas como una red Booleana tal y como se describe en la sección 1.5.1. Por ejemplo, C/EBP $\alpha$  es capaz de unirse a su propio promotor y promueve su expresión [40]. Por otro lado, MITF-1 también se une a una región cercana al promotor de C/EBP $\alpha$  pero funciona como un inhibidor de la transcripción de este gen [180]. Tomando en cuenta estas observaciones experimentales se define  $C/EBP\alpha = C/EBP\alpha \wedge \neg MITF-1$ . Dos modelos fueron definidos de esta forma. El primero contiene sólo interacciones directas mientras que el segundo incluye interacciones epistáticas tal y como se describe en la sección 3.1.

## 3.3 Patrones observados vs simulados

### 3.3.1 Búsqueda de atractores

Los estados estacionarios del modelo RB fueron calculados a través de una búsqueda exhaustiva comenzando desde todos los posibles estados de la red. El cálculo del estado siguiente en una RB se puede llevar a cabo mediante dos esquemas principales. El esquema *síncrono* consiste en la actualización de todos los nodos de la red al mismo tiempo. Mientras que el caso contrario se denomina *asíncrono* [70]. Los resultados de este trabajo se enfocan en el esquema asíncrono principalmente para evitar la existencia de atractores cíclicos como se discutirá en los resultados. Sin embargo, también se probó el régimen síncrono para comparar las diferencias entre ambos métodos en



cuyo caso se expresa de forma explícita. Los principales patrones experimentales presentes en las células derivadas de GMP fueron comparados con los atractores resultados de la simulaciones del modelo. Los atractores fueron etiquetados de acuerdo a la firma molecular del linaje correspondiente.

## 3.4 Validación

### 3.4.1 Mutantes

Los mutantes de ganancia (pérdida) de activación fueron simulados fijando el valor del nodo correspondiente igual a 1 (0). En este contexto se buscaron los atractores del sistema de forma exhaustiva. Este proceso se repitió para cada uno de los posibles mutantes de los nodos.

### 3.4.2 Entornos fijos

Para la simulación del efecto de estímulos extra e intra celulares algunos valores de los nodos fueron mantenidos constantes durante las simulaciones. En estas simulaciones fueron tomados como estados iniciales los atractores de la red silvestre dado que se quería evaluar cuál de estos estados se conservaban o perdían al someter al sistema a las respectivas condiciones ambientales.

### 3.4.3 Robustez de la red

Como validación del modelo se evaluó si la red poseía propiedades que se espera estén presentes en redes biológicas. De éstas, nos enfocamos en la propiedad de robustez. En esta tesis adoptamos la definición de robustez de Kitano: *"La robustez es una propiedad que permite a un sistema mantener sus funciones a pesar de las perturbaciones internas y externas"* [109]. Una perturbación se entiende como cualquier cambio en el sistema [10]. Por esto, se evaluó la robustez del modelo a través de la conservación de las trayectorias del sistema ante perturbaciones de cambios transitorios de los valores de los nodos como se describe a continuación. Se generaron 300 redes al azar con la misma cantidad de nodos (tamaño de la red) y con la misma topología (es decir, cada nodo conserva el mismo número de reguladores y además regula la misma cantidad de nodos de la red). Luego, cada red fue perturbada mediante un cambio al azar en la regla lógica (en un solo bit) de uno de los

nodos. Posteriormente, se eligieron al azar 30 estados de la red y se evaluó la distancia entre los estados sucesores antes y después de la perturbación mediante la distancia de Hamming, la cual se puede definir como el número de nodos que difieren en valor en ambos estados.

#### 3.4.4 Perturbaciones transitorias

Para simular los patrones de transición entre atractores ocasionados por perturbaciones sencillas transitorias se cambió el valor de un sólo nodo de la red en un único tiempo de actualización y luego se dejó que el sistema evolucionara hasta su convergencia a un nuevo atractor (que puede o no coincidir con el estado inicial). Esto se realizó de forma sistemática y exhaustiva para todas las posibles perturbaciones sencillas transitorias para cada atractor del modelo. En el esquema asíncrono las trayectorias de las transiciones pueden variar entre simulaciones distintas dependiendo de los nodos actualizados en un tiempo dado. Para tomar en cuenta tal variación se realizaron 100 simulaciones y se registraron todas las transiciones observadas.

# Resultados

## 4.1 Patrones moleculares esperados

En el modelo murino los Precursores de Granulocitos y Monocitos (GMP) se componen por células con el perfil  $\text{Lin}^- \text{Sca}^- \text{CD34}^+ \text{c-KIT}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^+$  y tienen el potencial de dar origen a neutrófilos ( $\text{C/EBP}\alpha^+ \text{GFI-1}^+ \text{MPO}^+ \text{NE}^+ \text{LF}^+$ ), monocitos ( $\text{PU.1}^+ \text{EGR-2}^+ \text{M-CSFR}^+$ ), basófilos ( $\text{C/EBP}\alpha^+ \text{MITF-1}^- \text{GATA-2}^+ \text{RUNX-1}^+ \text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+ \text{IL-3R}\alpha^+$ ), células cebadas ( $\text{MITF-1}^+ \text{C/EBP}\alpha^- \text{MM-CPA}^+ \text{MMCP6}^+ \text{c-KIT}^+$ ) y eosinófilos ( $\text{GATA-1}^+ \text{GATA-2}^+ \text{C/EBP}\alpha^+ \text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+ \text{CCR3}^+$ ) [6].

Los patrones descritos arriba así como las referencias que las soportan se resumen en la siguiente [tabla 4.1](#). En el caso de los neutrófilos MPO, GFI-1 y  $\text{C/EBP}\alpha$  se expresan de forma consistente pero LF y NE son marcadores variables según el estado activo/inactivo de la célula [127, 35]. Las firmas moleculares de la [tabla 4.1](#) fueron utilizadas como los patrones esperados para etiquetar los atractores de las simulaciones. Los atractores que no presentaban ninguna de las firmas representadas en esta tabla fueron denominadas como  $\text{Lin}^-$ .

Tabla 4.1: **Patrones moleculares** observados en las células derivadas de GMP. Los nodos activos (inactivos) están representados con un signo + (-).

| Subpoblación celular       | Firma Molecular  | Referencias           |
|----------------------------|--|-----------------------|
| Neutrófilos ( <b>Neu</b> ) | (MPO <sup>+</sup> LF <sup>+</sup> NE <sup>+</sup><br>C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> GFI-1 <sup>+</sup> ) o<br>(LF <sup>+</sup> C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> GFI-1 <sup>+</sup> ) | [35]<br>[45]<br>[127] |
| Eosinófilos ( <b>Eos</b> ) | GATA-1 <sup>+</sup> GATA-2 <sup>+</sup><br>C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> CCR3 <sup>+</sup><br>Fc $\gamma$ RI $\alpha$ <sup>+</sup>   | [95]                  |
| Monocitos ( <b>Mon</b> )   | MCSFR <sup>+</sup> PU.1 <sup>+</sup><br>EGR2 <sup>+</sup>  | [35]<br>[45]<br>[127] |
| Mastocitos ( <b>Mas</b> )  | MITF-1 <sup>+</sup> C/EBP $\alpha$ <sup>-</sup><br>MMCP6 <sup>+</sup> c-KIT <sup>+</sup><br>MMCPA <sup>+</sup>   | [17]                  |
| Basófilos ( <b>Bas</b> )   | C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> MITF <sup>-</sup><br>GATA-2 <sup>+</sup> RUNX-1 <sup>+</sup><br>CCR3 <sup>-</sup> IL-3R $\alpha$ <sup>+</sup>                                    | [17]<br>[94]<br>[148] |

## 4.2 Un modelo de interacciones directas

Empezamos con una versión de modelo de red que contenía únicamente interacciones directas (véase la [figura 4.1](#) y la [tabla A.1](#) del apéndice). El propósito fue evaluar si el modelo construido con interacciones conocidas, directas y bien sustentadas era capaz de simular la evolución temporal de los principales patrones de expresión de las células derivadas de GMP siguiendo un análisis como el llevado a cabo por Martínez *et al*, 2015 [132]. Además de los principales TFs, se incluyeron en esta versión marcadores de madurez de los linajes para poder interpretar los patrones resultantes en los atractores.

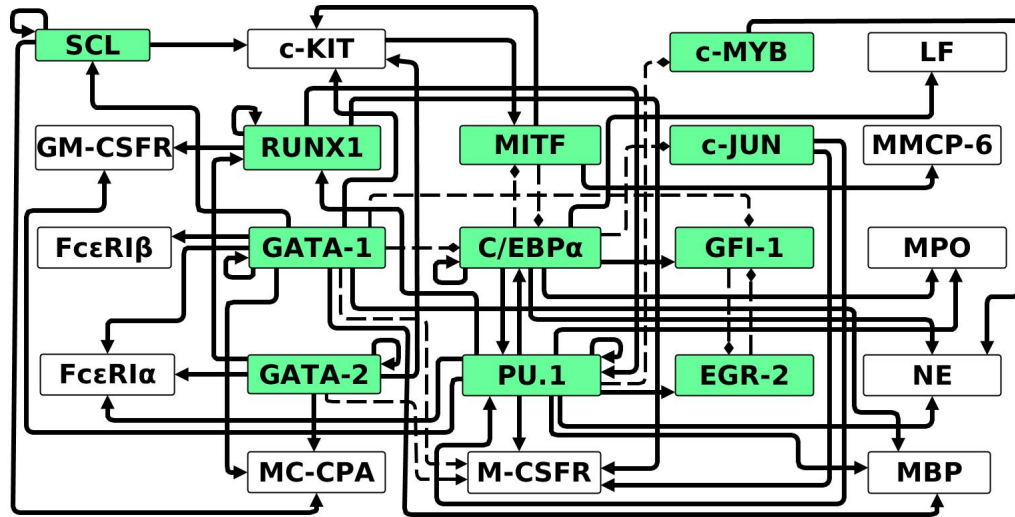


Figura 4.1: **Red de interacciones directas.** Los nodos en verde representan factores de transcripción. Las interacciones positivas (negativas) están representadas como fechas continuas (discontinuas).

La información usada para construir la red de regulación se resume en los siguientes párrafos.

C/EBP $\alpha$  regula positivamente a PU.1, GFI-1 y a sí mismo [117, 123, 214]. En combinación, estos TFs son capaces de activar marcadores de neutrófilos como LF, MPO y NE [164, 66, 102]. Por otra parte, la expresión simultánea de C/EBP $\alpha$ , PU.1, RUNX-1 y EGR-2 induce la formación del linaje de monocitos mediante la activación de marcadores de esta subpoblación celular [117, 4, 25]. GFI-1 y EGR-2 regulan el reforzamiento del compromiso hacia monocitos *versus* granulocitos, respectivamente [117], a través de una inhibición mutua directa [117]. Además, GFI-1 inhibe a PU.1 en células multipotenciales hematopoyéticas cuando éstas se estimulan con G-CSFR lo que promueve la producción de neutrófilos [44]. El gen del marcador GM-CSFR $\alpha$  es activado por PU.1 y RUNX-1 en monocitos y granulocitos [4, 174].

La expresión simultánea de GATA-1/2, PU.1 y C/EBP $\alpha$  se relaciona con la formación de eosinófilos y basófilos [94]. Los marcadores de eosinófilos son regulados de forma positiva por C/EBP $\alpha$ , PU.1, GATA-1/2 y c-JUN [160, 54]. C/EBP $\alpha/\epsilon$ , PU.1 y GATA-1 son capaces de regular de forma positiva al marcador MBP de eosinófilos en humanos [54, 1]. Además, parece probable que estas interacciones también existan en ratones dado que las se-

cuencias reguladoras del gene MBP para estos tres factores están conservadas en humanos y ratones [74]. En apoyo a esta hipótesis, la expresión artificial de C/EBP $\alpha$  y GATA-2 en células GMP de ratones incrementa la producción de mRNA del gen de MBP [94].

La autorregulación en factores de transcripción es una característica frecuente en la red de regulación. En particular, C/EBP $\alpha$ , GATA-1, GATA-2, PU.1, RUNX-1 y SCL presentan autoactivación [40, 219, 77, 133, 170, 119, 161].

Existe evidencia contradictoria acerca de la regulación de GATA-2 por GATA-1. Específicamente, GATA-1/2 son coexpresadas en las células GMP de humanos y ratones [85, 145, 181] lo cual sugiere una interacción de regulación positiva. Sin embargo, ha sido demostrado en un contexto eritroide que GATA-2 es inhibido por GATA-1 [77, 133]. Esto podría ser explicado por el hecho de que la regulación de los factores GATA es diferente en granulocitos y células eritroides [168]. Dado que nuestro modelo intenta reflejar el contexto molecular GMP se incorporó al modelo una regulación positiva de GATA-1 sobre GATA-2.

La formación de los basófilos no está bien caracterizada [46]. Sin embargo, se sabe que la activación de C/EBP $\alpha$  en un progenitor bipotencial (que da origen a mastocitos y basófilos) favorece el desarrollo de basófilos [17, 180]. GATA-2 ha sido propuesto como un marcador crítico de basófilos tanto en humanos como en ratones [19, 94]. De hecho, subpoblaciones de progenitores de basófilos expresan GATA-2 y GATA-1 como se observa en ensayos de RT PCR [94]. El orden de expresión de los factores de transcripción C/EBP $\alpha$  y GATA-1/2 ha sido propuesto como un factor clave para el origen de los basófilos pero el mecanismo molecular subyacente a estas observaciones no se conoce [94]. RUNX-1 se reconoce como un factor importante para el desarrollo de este linaje debido a que los ratones mutantes en este gen tienen un número reducido de estas células [149]. En el caso de las células cebadas, la activación de marcadores como c-KIT, MMCP6, y MMCPA requiere de la expresión de MIF-1 [177, 147]. Además, GATA-1 puede activar a c-KIT pero solamente en combinación con SCL [217, 150]. MIF-1 y C/EBP $\alpha$  se inhiben el uno al otro y favorecen la formación de células cebadas o basófilos, respectivamente [180].

La [tabla A.1](#) contiene la información detallada sobre cada interacción que incluye el tipo (positiva o negativa), la técnica molecular usada para su inferencia, la línea celular usada como modelo experimental, así como la especie a la que pertenece, y por último, el id de la referencia ya sea PubMed

o PMC.

### 4.3 Insuficiencia del primer modelo

Las interacciones directas descritas en la sección anterior fueron formalizadas usando las reglas lógicas presentes en la [tabla A.2](#) del apéndice. En la [figura 4.2](#) se muestran los atractores de esta primera versión del modelo de red. Este modelo alcanza 34 atractores de punto fijo. Los atractores están etiquetados de acuerdo a las firmas moleculares mostrados en la [tabla 4.1](#).

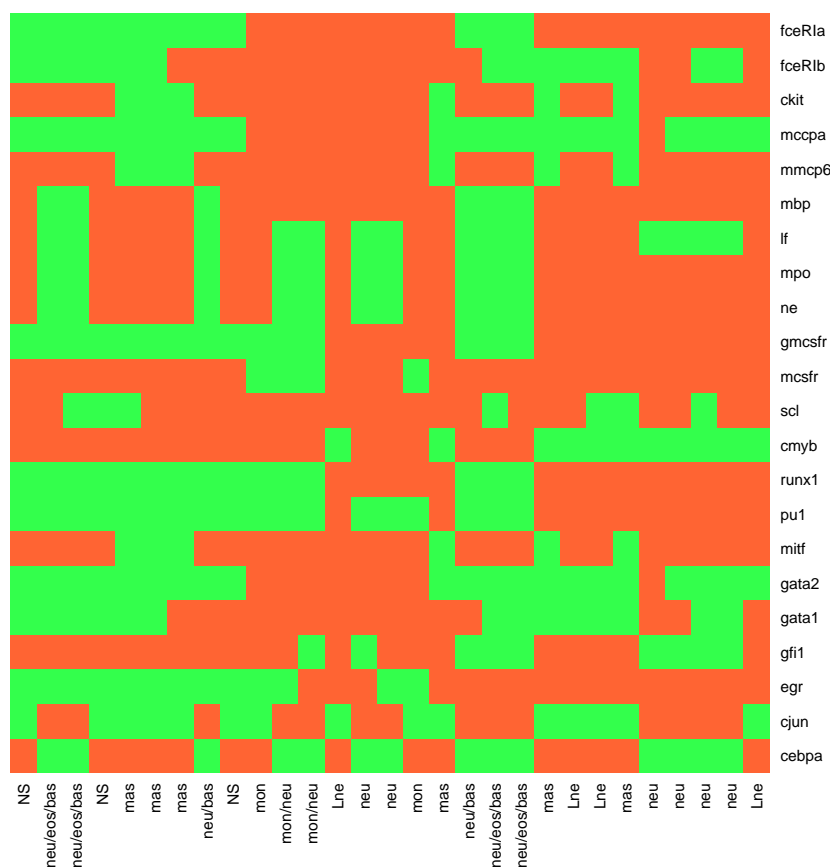


Figura 4.2: **Los atractores del modelo de red de interacciones directas.** Los nodos activos (inactivos) se muestran en verde (rojo). Los atractores están etiquetados de acuerdo a los patrones descritos en la [tabla 4.1](#).

Este modelo es insuficiente para la simulación de los patrones moleculares observados en las células derivadas de GMP por las siguientes razones: *i*) Se alcanzan patrones mezclados de expresión. Obsérvese, por ejemplo que los atractores marcados como neu/eos/bas presentan las firmas moleculares correspondientes a neutrófilos ( $C/EBP\alpha^+GFI-1^+MPO^+NE^+LF^+$ ), eosinófilos ( $GATA-1^+GATA-2^+C/EBP\alpha^+Fc\epsilon RI\alpha^+CCR3^+$ ) y basófilos ( $C/EBP\alpha^+MITF-1^-GATA-2^+RUNX-1^+Fc\epsilon RI\alpha^+IL-3R\alpha^+$ ). Existen ocho atractores con patrones mezclados de expresión los cuales presentan las etiquetas siguientes: neu/eos/bas, neu/bas, mon/neu, neu/bas y neu/eos/bas. *ii*) De forma importante, los patrones de basófilos (bas) sólo están presentes mezclados con los de eosinófilos y neutrófilos (figura 4.2). Para resolver *i* y *ii*, se tomaron en cuenta interacciones que presentan evidencia indirecta para definir un nuevo modelo. El modelo así construido se describe en la siguiente sección.

## 4.4 La red de regulación extendida

El siguiente paso fue agregar interacciones inferidas de experimentos de epistasis y que por lo tanto no son forzosamente regulaciones directas. En esta sección se describen estas interacciones adicionales.

El factor de transcripción  $C/EBP\alpha$  suprime la expresión de c-MYB [203]. EGR-2 regula negativamente a LF lo cual se deduce del hecho de que la inducción de un RNA de interferencia cuya diana es EGR-2 promueve la inducción de LF [117]. En la primera versión del modelo de red no fue posible asociar ningún atractor a los patrones moleculares presentes en basófilos. Por lo tanto, fueron agregados marcadores asociados con este linaje. Se introdujeron los receptores CCR3 y IL-3R $\alpha$ . De esta manera, se utilizó como firma molecular de basófilos el patrón experimental IL-3R $\alpha^+$ , CCR3 $^-$  así como la expresión de los factores de transcripción GATA-2 $^+$ ,  $C/EBP\alpha^+$  y RUNX-1 [103].

IL-3, IL-5 y GM-CSFR son citocinas importantes para la formación de eosinófilos, basófilos y células cebadas. En ratones, IL-5R $\alpha$  sesga la diferenciación a la producción de eosinófilos mientras que IL-3R $\alpha$  promueve la formación de basófilos y células cebadas [167, 189]. Los receptores de estas citocinas están relacionados debido a que comparten la subunidad  $\beta c$  la cual es importante en la activación de la vía JAK-STAT [84]. De estas citocinas, solamente IL-3R $\alpha$  se sabe capaz de promover la expresión de los factores de transcripción de la red GATA-2 y  $C/EBP\beta$  a través de JAK2 y STAT5



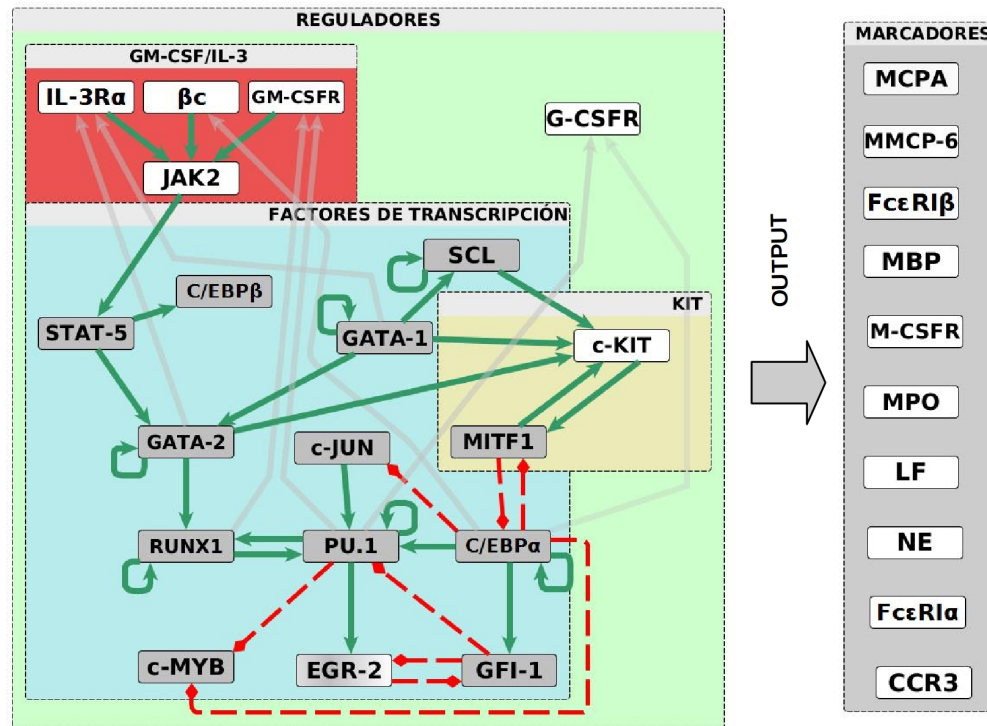


Figura 4.3: **La red de regulación extendida.** Las flechas continuas (discontinuas) representan interacciones positivas (negativas) de regulación. Los factores de transcripción se muestran como nodos de color gris. Algunas interacciones positivas (negativas) se muestran en verde (rojo) para resaltar los circuitos regulatorios. Las rutas de señalización y la red de factores de transcripción se muestran en cajas de colores. Por simplicidad, las interacciones sobre los marcadores de linajes se muestran de forma colectiva como el resultado (output) del comportamiento dinámico de la red de reguladores. Véase la *sección 4.3*.

[228, 122]. Finalmente, algunas interacciones fueron propuestas. Específicamente, se agregó una regulación positiva de GATA-1/2 hacia IL-3R $\alpha$  basada en el hecho de que el gen que codifica para este receptor tiene regiones de unión a los factores GATA [141]. MITF-1 es un importante elemento en la señalización por c-KIT y es un posible regulador de MCCPA dado que los mutantes de c-KIT no expresan este marcador [91]. También se asumió una regulación negativa de EGR-2 sobre los marcadores de neutrófilos MPO y

NE dado que este regulador ha sido reportado como un *interruptor global* que antagoniza la expresión de genes de granulocitos [117]. Los factores GATA favorecen la formación de eosinófilos, basófilos y células cebadas cuando son transducidos en células GMP y evitan la expresión de marcadores de los linajes de neutrófilos y monocitos [94]. Por lo tanto, asumimos que GATA-1/2 reprimen marcadores de neutrófilos como MPO, NE y LF. Las siguientes interacciones han sido inferidas de modelos experimentales humanos. C/EBP $\alpha$  y PU.1 activan en sinergismo la expresión del gen G-CSFR [182, 201]. GFI-1 inhibe la expresión de MBP durante la estimulación con G-CSF [126]. Por último, C/EBP $\alpha$  y PU.1 activan al promotor del gen de la cadena  $\beta c$  del receptor GM-CSFR. En la [tabla A.3](#) del apéndice se muestran las interacciones propuestas e indirectas adicionales al primer modelo.

La red extendida comprende 29 nodos y 83 interacciones tal como se muestra de forma abreviada en la [figura 4.3](#) y completa en la [figura A.1](#) del apéndice. Solamente 19 nodos son reguladores ([figura 4.3](#), izquierda), mientras que el resto corresponde a marcadores de linajes ([figura 4.3](#), derecha). Algunas interacciones entre reguladores se muestran con flechas en color para resaltar los circuitos de la red. Por otra parte, las vías de señalización molecular se muestran separadas en cajas de colores. Aunque los marcadores de linajes no son importantes para la dinámica del modelo, son importantes para poder asociar los patrones de estados estacionarios a los fenotipos celulares de linajes derivados de GMPs. Por esta razón, las interacciones de los reguladores hacia los marcadores se muestran de forma colectiva como un *output*. Las reglas lógicas del modelo extendido completo así construido se muestran en la [tabla A.4](#).

## 4.5 Atractores del modelo extendido

Se exploró el espacio de estados de la red y se encontraron 22 estados estables de punto fijo mediante un régimen de actualización asíncrono ([figura 4.4](#)). Es importante resaltar que cuando se utiliza un régimen de actualización síncrono la red alcanza cuatro atractores adicionales de longitud 2. Estos atractores se muestran en la [figura A.2](#) del apéndice y se caracterizan por la expresión alternada de EGR-2 y GFI-1. Estos ciclos pueden ser considerados como artefactos de la actualización síncrona dado que estos no se observan si se cambia al régimen asíncrono. Por el contrario, los atractores de punto fijo se conservan independientemente del régimen de actualización elegido y

coinciden con aquellos de la [figura 4.4](#). Por esta razón, decidimos utilizar una actualización asíncrona en todas las simulaciones.

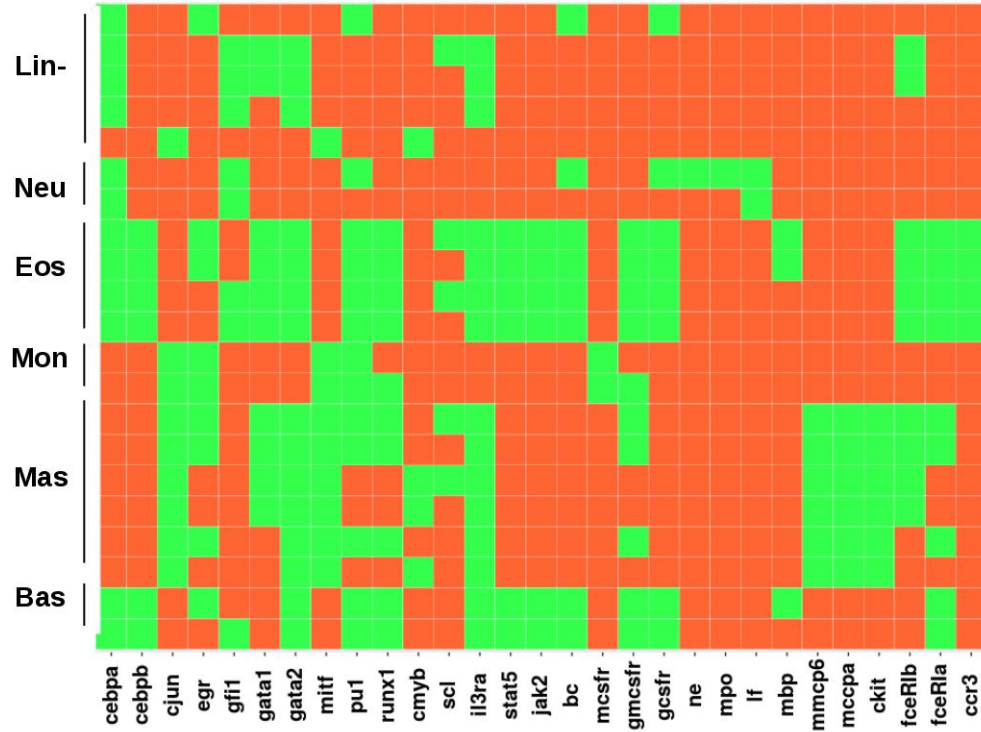


Figura 4.4: **Estados estacionarios del modelo extendido.** *Los nodos activos (inactivos) son mostrados en color verde (rojo). Los estados estacionarios se muestran como renglones agrupados en clases de acuerdo a el tipo de firma molecular de linaje como se explica en la [sección 4.1](#). Las etiquetas de la izquierda indican: linaje negativo (Lin-), neutrófilos (Neu), eosinófilos (Eos), monocitos (Mon), mastocitos (Mas) y basófilos (Bas).*

Los estados estacionarios del modelo pueden ser agrupados en clases de acuerdo a las firmas moleculares que presentan (véase [sección 4.1](#) y [tabla 4.1](#)). Los atractores que corresponden a linajes de neutrófilos expresan C/EBP $\alpha$ , GFI-1, MPO, NE y LF [127, 61, 117]. Los estados estacionarios de monocitos expresan PU.1, EGR-2 y M-CSFR [117, 127]. La clase de los eosinófilos se caracteriza por MBP, Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ , CCR3, GATA-1/2, C/EBP $\alpha$  y PU.1 [95]. La clase de los basófilos expresa C/EBP $\alpha$ , GATA-2, RUNX-1, IL-3R $\alpha$  y Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$

[17, 148]. Las células cebadas presentan c-KIT, MITF-1, MMCPA, MMCP6, IL-3R $\alpha$  y no expresan C/EBP $\alpha$  [17, 180]. Finalmente, la clase de atractores Lin $^{-}$  corresponden a aquellos que no presentan ninguna de las firmas antes mencionadas.

## 4.6 Mutantes

Se simularon todos los mutantes sencillos de pérdida así como de ganancia de función y sus atractores fueron comparados con los mutantes reportados en la literatura (véase la [tabla 4.2](#)).

Las siguientes simulaciones de mutantes coinciden con los reportes de la literatura. Los mutantes de pérdida de función de C/EBP $\alpha$  carecen de granulocitos maduros pero son capaces de producir monocitos [235]. En el mutante *In silico* correspondiente hay una ausencia de los linajes de granulocitos y, por otro lado, se alcanzan los atractores de monocitos y mastocitos ([tabla 4.2](#)). El mutante experimental de EGR-2 es capaz de generar granulocitos y monocitos [117]. El modelo predice una pérdida del linaje de basófilos lo cual no ha sido evaluado experimentalmente. El mutante GFI-1 $^{-}$  carece de neutrófilos maduros [86] lo cual se corresponde en las simulaciones donde el atractor de neutrófilos está ausente. Además, el modelo predice la pérdida de basófilos. El modelo apoya los resultados de Hirasawa *et al* 2002, quienes observaron una ausencia de eosinófilos en los mutantes de pérdida de función de GATA-1 [85]. Los mutantes de pérdida de función de MITF y c-KIT tienen una deficiencia en la producción de mastocitos tanto en los mutantes experimentales como en las simulaciones [105]. Los mutantes PU.1 $^{-}$  carecen de granulocitos maduros y monocitos [194, 171]. Por otra parte, en las simulaciones no se presentan los atractores de monocitos y eosinófilos. Para el mutante RUNX-1 $^{-}$  se observa la pérdida de basófilos [149]. Para los mutantes experimentales de IL-3R $\alpha^{-}$ ,  $\beta c^{-}$  y c-JUN $^{+}$  no se aprecian deficiencias específicas de linajes lo cual se corresponde con las simulaciones [81, 158, 231]. Por último, el mutante de ganancia de función de GATA-1 muestra un desarrollo anómalo en la producción de los linajes mieloides y monocíticos así como una eosinofilia pronunciada [240].

El modelo discrepa con los siguientes datos experimentales. El mutante de pérdida de ganancia de c-JUN tiene una deficiencia en la producción de eritroblastos aunque en el contexto de las células derivadas de GMPs no se observa una deficiencia de linaje específica aparente [59]. Sin embargo,

Tabla 4.2: **Mutantes** del modelo y experimentales. La concordancia (discordancia) de las simulaciones con los mutantes experimentales se indica con verde (rojo).

| Gen                         | Mutante <i>In Silico</i>                      | Mutante experimental  |
|-----------------------------|---|---|
| C/EBP $\alpha$ <sup>-</sup> | Sólo monocitos y mastocitos están presentes   | Se forman monocitos pero no granulocitos [235]  |
| c-JUN <sup>-</sup>          | Pérdida de monocitos                          | Apoptosis masiva de eritroblastos [59]  |
| EGR-2 <sup>-</sup>          | Pérdida de basófilos                          | Formación de monocitos en bajos niveles [117]   |
| GFI-1 <sup>-</sup>          | Pérdida de basófilos y neutrófilos            | Falta de neutrófilos maduros [86]   |
| GATA-1 <sup>-</sup>         | Pérdida de eosinófilos                        | Resultados contradictorio: Pérdida de eosinófilos [85]. Bajos niveles de eosinófilos [57] |
| GATA-2 <sup>-</sup>         | Pérdida de basófilos                          | Pérdida de mastocitos [218]   |
| MITF-1 <sup>-</sup>         | Ausencia de mastocitos                        | Bajos niveles de mastocitos [105]   |
| PU.1 <sup>-</sup>           | Pérdida de monocitos y eosinófilos            | Ausencia de granulocitos y monocitos [194, 171]   |
| RUNX-1 <sup>-</sup>         | Pérdida de monocitos, eosinófilos y basófilos | Bajos niveles de basófilos  |
| c-MYB <sup>-</sup>          | Todos los linajes están presentes             | Drástica reducción de todos los linajes hematopoyéticos [125]                             |
| SCL <sup>-</sup>            | Todos los linajes están presentes             | Ausencia total de la hematopoesis [188]   |

Tabla 4.2. **Mutantes** del modelo y experimentales (Continuación). La concordancia (discordancia) de las simulaciones con los mutantes experimentales se indica con verde (rojo).

| Gen                         | Mutante <i>In Silico</i>           | Mutante experimental  |
|-----------------------------|------------------------------------|---|
| c-KIT <sup>-</sup>          | Pérdida de mastocitos              | Deficiencia de mastocitos [78]  |
| IL-3R $\alpha$ <sup>-</sup> | Todos los linajes están presentes  | Hematopoiesis normal [81]   |
| $\beta$ c <sup>-</sup>      | Todos los linajes están presentes  | Hematopoiesis normal [158]  |
| c-JUN <sup>+</sup>          | Todos los linajes están presentes  | Producción excesiva de monocitos [231]                                |
| GATA-2 <sup>+</sup>         | Pérdida de neutrófilos y monocitos | Pérdida de mielo-monocitos y excesiva producción de eosinófilos [240] |

en las simulaciones se observa la ausencia del atractor de monocitos. Los mutantes GATA-2<sup>-</sup> presentan una pérdida específica de la producción de mastocitos [218] mientras que en las simulaciones se observa una pérdida del linaje de basófilos. Por último, los mutantes de pérdida de función de c-MYB y SCL presentan una severa deficiencia en la hematopoiesis [125, 188] mientras que en las simulaciones todos los patrones de linajes siguen presentes en los atractores.

## 4.7 Robustez del modelo

Se evaluó la robustez del modelo principalmente por los siguientes motivos: *i*) la propiedad de resiliencia o robustez es una característica propia de los sistemas biológicos y por lo tanto debería estar presente en el modelo y, *ii*) para descartar la posibilidad de que los atractores dependan de la elección arbitraria de las reglas lógicas seleccionadas. En la [figura 4.5](#) se observa la distancia de Hamming normalizada promedio entre dos estados sucesores

antes y después de efectuar una perturbación en la red mediante el cambio de un valor en la regla lógica de un nodo. Se observa que el valor promedio de distancia del modelo (representado en rojo) es menor que el cuantil de 5% de una distribución de 300 redes al azar. De modo que el modelo (extendido) aquí definido tiende a conservar las trayectorias después de haber sido perturbado en comparación con redes construidas al azar.

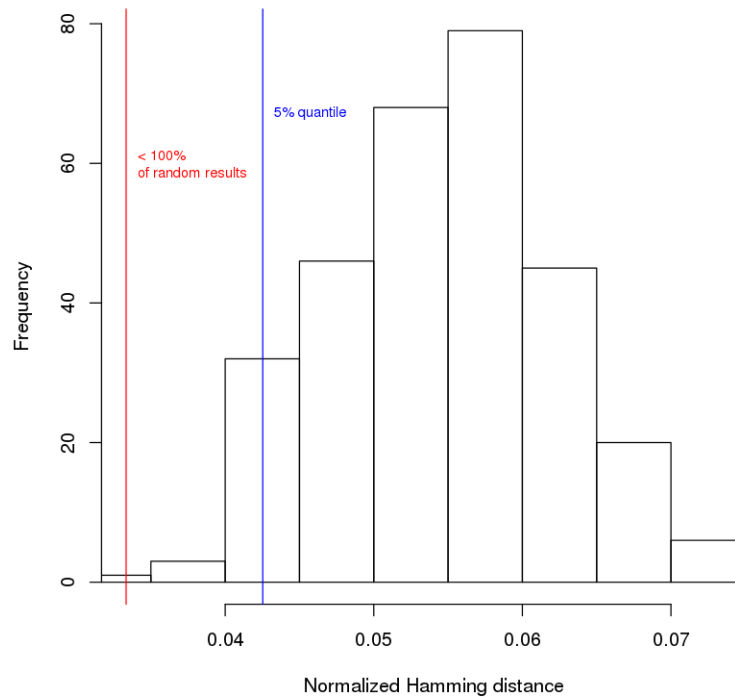


Figura 4.5: **Robustez del modelo** evaluada mediante el cambio en las funciones lógicas de cada nodo. Se muestra la distribución de las distancias de Hamming entre sucesores en 300 redes aleatorias antes y después de ser perturbadas. 30 estados iniciales fueron elegidos al azar. La línea vertical roja representa el valor asociado al modelo de red definido en la *sección 4.4* mientras que la línea azul representa el cuartil del 5%.

## 4.8 Perturbaciones deterministas

Se evaluaron las transiciones entre atractores ocasionadas por perturbaciones sencillas y transitorias mediante un régimen de actualización asíncrono (véase sección 3.4.4). Los resultados se pueden ver en la figura 4.6.

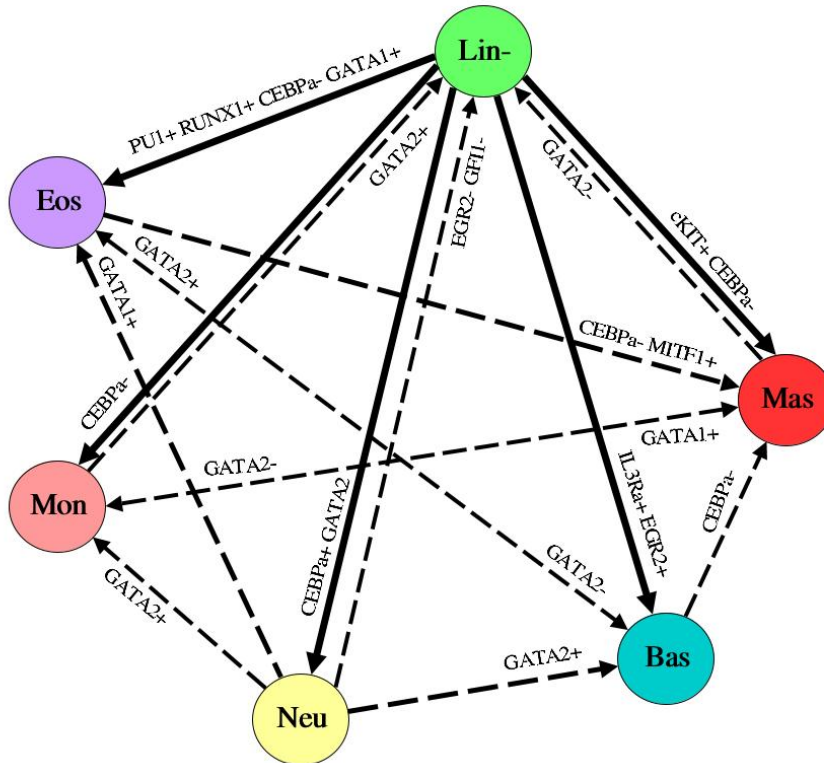


Figura 4.6: **Transiciones entre clases de atractores.** Los nodos representan las clases de atractores y las flechas transiciones posibles ocasionadas por perturbaciones sencillas transitorias. Las flechas continuas representan transiciones esperadas mientras que las flechas discontinuas representan predicciones en el modelo. Las flechas están etiquetadas según el nodo perturbado necesario para observar la transición.

Para simplificar estos patrones se muestran las transiciones entre clases. En esta figura los nodos del grafo representan clases de atractores (definidas en la sección 4.1). Las flechas representan transiciones entre clases. Se define una transición de la clase A a la clase B como la existencia de una tran-



sición de un atractor que pertenece la clase A hacia alguno de la clase B. Las flechas están etiquetadas según el nodo que se necesita perturbar para observar la transición. Por ejemplo: la clase de monocitos transita a la clase  $\text{Lin}^-$  mediante la activación del nodo de GATA-2. Las flechas continuas representan transiciones esperadas como aquellas que van de los atractores linaje negativo ( $\text{Lin}^-$ ) hacia los atractores con firmas moleculares de linajes maduros. Por otro lado, las flechas discontinuas representan transiciones que no han sido observadas experimentalmente y que por lo tanto corresponden a predicciones del modelo.

## 4.9 Entornos fijos

Tanto el contexto extracelular de citocinas como el estatus funcional intracelular son factores muy importantes en la determinación del compromiso celular. Por lo tanto, se simularon en el modelo estímulos ambientales que favorecen la producción de linajes observados de forma experimental. En la [figura 4.7](#) se muestran los resultados de las simulaciones. Los entornos fijos que favorecen a los linajes de GMPs se muestran en la parte superior. Las moléculas presentes (ausentes) en ese ambiente celular se muestran en verde (rojo). Por ejemplo, el ambiente pro neutrófilos (Neu) se caracteriza por la expresión del factor de transcripción C/EBP $\alpha$ , la baja expresión de PU.1 así como de la presencia de la citocina G-CSFR. Además de los ambientes pro linajes se incluyeron tres ambientes adicionales que incluyen: un contexto celular etiquetado como "TFs NULL" donde no hay expresión de ninguno de los factores de transcripción de la red (que corresponden nodos grises de la [figura 4.3](#)); y contextos moleculares en presencia y ausencia de todas las citocinas del modelo (M-CSFR, G-CSFR, GM-CSFR, IL-3R $\alpha$ , c-KIT, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  y Fc $\epsilon$ RI $\beta$ ).

Como se observa en la [figura 4.7](#) los resultados de las simulaciones muestran patrones esperados de atractores. Por ejemplo, el ambiente pro neutrófilo tiene como atractores de su respectiva clase. Por otra parte, el contexto libre de factores de transcripción sólo alcanza atractores de tipo linaje negativo, mientras que el ambiente sin citocinas es capaz de producir neutrófilos. Finalmente, el ambiente que expresa todas las citocinas es capaz de alcanzar atractores de mastocitos y monocitos.



Figura 4.7: **Entornos fijos**. Los cuadros verdes (rojos) representan la presencia (ausencia) de las firmas moleculares definidas en la tabla 4.1. En la parte superior se muestra la definición de los entornos fijos mostrados en las columnas, donde los nodos fijos = 1(= 0) se muestran en verde (rojo).

# Discusión

Inicialmente, se definió un modelo RB que contenía solamente interacciones directas con el objetivo de evaluar si este tipo de regulaciones conocidas entre factores claves del proceso de diferenciación eran suficientes para simular los patrones moleculares presentes en la células derivadas de GMP. Este primer modelo mostrado esquemáticamente en la [figura 4.1](#) incluye las interacciones presentes en la [tabla A.1](#) del apéndice. Las reglas lógicas definidas con estas interacciones se muestran en la [tabla A.2](#).

Como se muestra en la [figura 4.2](#), al analizar este primer modelo se observa que éste no es suficiente para recuperar como atractores todos los patrones de linajes derivados de las células GMP. En específico, el modelo no recupera las firmas moleculares correspondientes a basófilos ([figura 4.2](#)). En su lugar, se alcanzan patrones mezclados de expresión. Una de las razones de este comportamiento es el hecho de que esta red no incluye marcadores suficientes para discriminar a cada linaje de granulocitos. Por ejemplo, la firma molecular asociada al linaje de los basófilos es  $Fc\epsilon RI\alpha^+CD11b^+c-KIT^-$ . Sin embargo, dado que CD11b no está incluido en la red (dado que su regulación no es conocida) el patrón resultante  $Fc\epsilon RI\alpha^+c-KIT^-$  está presente tanto en eosinófilos y basófilos [6] y esto hace imposible diferenciar entre ambos linajes.

Para tratar de rescatar los patrones esperados se incorporaron interacciones inferidas de experimentos de epistasis. Estas interacciones adicionales al primer modelo no son necesariamente de tipo directas y se muestran en la [tabla A.3](#). De forma adicional, algunas interacciones fueron propuestas en este trabajo. El modelo así construido se muestra en la [tabla A.4](#) del apéndice.

Los atractores de este último modelo se muestran en la [figura 4.4](#). De forma importante, los estados estacionarios  $Lin^-$  no tienen activo a c-KIT a diferencia de las subpoblaciones GMPs. Esta discrepancia puede ser atribuida a que los niveles de expresión de c-KIT son relativamente bajos en contextos

de GMPs en comparación con los niveles presentes en células cebadas [17]. Por lo tanto, un modelo multivaluado pudiera ser más adecuado para tomar la expresión de este nodo en GMPs. Por otra parte, C/EBP $\alpha$  está presente en GMPs [17, 94] y es un regulador negativo indirecto de c-KIT [180]. Lo cual podría explicar esta baja expresión de c-KIT en GMPs tal y como se observa en datos transcriptómicos cuando se compara con otras poblaciones de progenitores como HSCs y MEPs [143].

Las células GMP son Lin<sup>-</sup>Sca<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>c-KIT<sup>+</sup>Fc $\gamma$ R<sup>+</sup> [6]. De estos marcadores, solamente se conocen reguladores de c-KIT. Sin embargo, como esta molécula se encuentra expresada también en células cebadas [17] no puede ser usada como marcador único para identificar la clase de GMPs. Sin embargo, se puede ver que los estados estacionarios Lin<sup>-</sup> asemejan poblaciones inmaduras por sus patrones de respuesta ante perturbaciones (véase la [sección 4.8](#)).

El patrón de expresión de MBP también resulta interesante. Tradicionalmente, se piensa que MBP es un marcador de madurez en eosinófilos [85]. Sin embargo, MBP se puede expresar también en progenitores de basófilos en ratones [17]. Esto es consistente con la expresión de MBP de los estados estacionarios eosinófilos y basófilos del modelo.

Como se mencionó en la [sección 4.2](#) hay evidencia contradictoria en cuanto al tipo de interacción de GATA-1 sobre GATA-2 [133, 77]. En el presente modelo se incorporó la interacción como positiva dado que la adición de una interacción negativa  $GATA-2 = \neg GATA-1 \wedge (GATA-2 \wedge STAT-5)$  ocasiona que los atractores presenten ya sea GATA-1 o GATA-2 de forma excluyente, lo cual contradice lo observado experimentalmente en células derivadas de GMP donde se puede observar coexpresión [85, 143, 181]. Por lo tanto, el modelo apoya la existencia de una regulación positiva de GATA-1 sobre GATA-2.

Es importante notar que dentro de la misma clase existe variabilidad en la expresión para algunos nodos. Por ejemplo, el factor de transcripción SCL es expresado en Progenitores de Granulocitos-Monocitos y en las células cebadas maduras [52, 20]. Dada la ausencia de reguladores conocidos de SCL a excepción de sí mismo es posible que la variación en el valor de este nodo se deba a interacciones no incluidas en el modelo.

Los estados estacionarios de neutrófilos que presentan PU.1 pueden ser interpretados como estados correspondientes a células maduras [15, 14]. Esto concuerda con el hecho de que estos atractores tienen activo el marcador LF conocido por ser una proteína de gránulos secundarios presente en etapas

maduras de diferenciación de neutrófilos [102].

Los cuatro atractores asociados a eosinófilos varían en la expresión de EGR-2, GFI-1 y MBP. La variación de GFI-1 ha sido observada en estudios transcriptómicos en esta subpoblación [176]. Por otra parte, la estimulación con interleucina 5 induce EGR-2 y MBP [29, 212]. Por lo tanto, estos atractores con EGR-2 y MBP activo pero GFI-1 inactivo pueden representar eosinófilos estimulados.

La variación en el nodo de GM-CSFR en la clase de monocitos concuerda con el hecho de que este receptor puede ser modulado por una amplia variedad de estímulos [32]. RUNX-1 se expresa de forma variable en subpoblaciones de monocitos, lo cual se observa en el modelo [176].

En el caso de las células cebadas la siguiente evidencia concuerda con la variabilidad encontrada en los atractores del modelo. La expresión de EGR-2 puede modularse en células cebadas mediante la estimulación con IL-33 e IgE [36]. Por otro lado, los progenitores de células cebadas tienen niveles altos de expresión de MCCA en comparación con células maduras [68]. De forma interesante, se ha observado que invariablemente GFI-1 se encuentra inactivo en cada subpoblación y de forma similar GATA-2 siempre está activo [68] lo cual se observa en el modelo. La variabilidad de los nodos GATA-1, RUNX-1, PU.1, c-MYB, GM-CSFR, Fc $\epsilon$ RI $\beta$  en mastocitos carece de evaluación experimental y puede ser considerada como predicciones del modelo.

En los atractores que corresponden a basófilos existe variabilidad en EGR-2 y MBP. De estos, solamente EGR-2 ha sido reportado su modulación en estas células cuando se estimulan con Ag-IgE [36]. Estudios transcriptómicos de células individuales usando GMPs han mostrado variabilidad en GATA-1, GATA-2, GFI-1, MITF-1 y SCL [143]. Esto coincide con el modelo. Sin embargo, en el mismo estudio RUNX-1 y PU.1 se expresan de forma uniforme lo cual no concuerda con los atractores observados lo cual sugiere la existencia de interacciones faltantes.

En teoría es posible encontrar muchos modelos RB capaces de tener atractores que presenten los patrones descritos en la [tabla 4.1](#). Por esta razón, se procedió a validar el modelo a través de los siguientes análisis: *i*) simulación de los mutantes de pérdida y ganancia de función, *ii*) evaluación de la robustez del modelo, *iii*) simulación de perturbaciones transitorias sencillas y *iv*) simulación de entornos celulares fijos. Estos análisis se describen a continuación.

El modelo coincide cualitativamente con diversos mutantes descritos, véase

la [tabla 4.2](#). En específico, no existe formación de granulocitos en los mutantes nulos de C/EBP $\alpha$  pero sí monocitos [235]. Por otro lado, las células de hígado de ratones mutantes de pérdida de función del gen de c-JUN son capaces de dar origen a granulocitos [59]. Los ratones mutantes de GFI-1 carecen de neutrófilos maduros [86]. Se pueden formar monocitos a partir de células provenientes del hígado de ratones GATA-2 $^{-}$  [218]. Un caso interesante es el mutante de EGR-2. EGR-2 ha sido reportado como parte de un circuito regulador importante que determina el compromiso hacia monocitos *versus* neutrófilos. Sin embargo, a pesar de su importancia, en las simulaciones de pérdida de función para este nodo se alcanzan atractores de monocitos. Esto coincide con la observación de que los ratones heterocigotos EGR-2 $^{+/-}$  presentan un sesgo a la producción de neutrófilos pero poseen monocitos aunque a niveles bajos [117].

Otros resultados experimentales que coinciden con el modelo son los siguientes. Los ratones mutantes en PU.1 tienen una deficiencia múltiple de linajes derivados de GMP [194, 171]. Los ratones heterocigotos en el alelo del gen de PU.1 son capaces de producir monocitos [218]. Los mutantes nulos en MITF-1 y c-KIT tienen una deficiencia específica en la producción de células cebadas [105, 78]. Los ratones mutantes en el gen de RUNX-1 no tienen desarrollo de basófilos [149]. Los mutantes del IL-3R $\alpha$  tienen una hematopoiesis normal [81]. Lo mismo se puede observar en los mutantes de la cadena  $\beta c$  [158]. Resultados contradictorios han sido observados al evaluar mutantes en GATA-1 [85, 58]. El presente modelo apoya los resultados obtenidos por [85] quienes observaron la pérdida linaje específica de eosinófilos.

También hay simulaciones de mutantes que no coinciden con resultados experimentales lo cual evidencia que el modelo necesita ser mejorado en el futuro. Por ejemplo, los mutantes nulos de SCL y c-MYB recuperan en el modelo todos los linajes de GMPs. Sin embargo, experimentalmente se puede ver que la hematopoiesis se detiene de forma temprana en los ratones mutantes de SCL. Los ratones c-MYB $^{-}$  tienen un sesgo a la producción de neutrófilos y monocitos [125, 188]. En el caso de c-MYB y SCL ambos factores parecen ser importantes para el desarrollo temprano de todas células sanguíneas por lo cual salen del contexto de las GMP estudiadas en este trabajo lo cual explica la discrepancia dado que el modelo no toma en cuenta estas etapas.

El mutante de c-JUN no alcanza el atractor de monocitos en las simulaciones contrario a lo observado experimentalmente [59]. Esto se puede explicar por el hecho de que otros TFs pertenecientes a la familia de c-JUN

como JUNB no incluidos en este modelo son redundantes a c-JUN en algunos contextos y pueden sustituir su función *In vivo* [175]. Por lo tanto, los TFs de la familia de c-JUN y sus interacciones deben ser agregados en futuras versiones del modelo.

Los mutantes nulos de GATA-2 no producen células cebadas [218] pero en las simulaciones sí. Esta discrepancia puede sugerir una dependencia positiva desde GATA-2 hacia los marcadores de mastocitos tales como MMCPA o c-KIT como ha sido sugerido por [241, 128].

Del análisis de robustez, como se observa en la [figura 4.5](#) se puede ver que el modelo es capaz de soportar cambios en las funciones lógicas cuando se le compara con redes con la misma estructura pero creadas al azar. Esto sugiere que el modelo no depende de la elección arbitraria de las funciones lógicas sino de la topología de la red [12].

Siguiendo con la validación del modelo, se simularon las transiciones entre atractores ocasionadas por perturbaciones transitorias sencillas. Las siguientes transiciones observadas en el modelo coinciden con resultados experimentales, véase la [figura 4.6](#). Como se mencionó previamente, la clase de los estados estacionarios  $Lin^-$  tiene un patrón de transición similar al de las células GMP dado que puede dar origen a los siguientes linajes: *i*) monocitos mediante una activación de PU.1 [117], *ii*) neutrófilos mediante un incremento de C/EBP $\alpha$  [44], *iii*) basófilos y eosinófilos por la estimulación con IL-3 [167, 211] y *iv*) además, la inducción de MITF-1 o c-KIT causa la diferenciación a células cebadas [220]. De forma interesante, la firma molecular C/EBP $\alpha^+$ PU.1 $^+$ GATA-1/2 $^-$  presente en un atractor de la clase  $Lin^-$  (véase el primer atractor de la [figura 4.4](#)) se observa en células GMP mediante ensayos de Western Blot y en estudios transcriptómicos [17, 94, 143].

Tradicionalmente, las transiciones del proceso de diferenciación fueron pensadas como unidireccionales desde los progenitores a las células comprometidas, véase la [figura 1.3](#). Sin embargo, en los últimos años se han reportado estudios que muestran transiciones desde linajes maduros a progenitores menos comprometidos o inclusive entre diferentes linajes maduros [76, 55]. Estas transiciones se denominan colectivamente eventos de *plasticidad*. Aunque, una definición precisa del término no existe [116].

En los modelos murinos se ha observado plasticidad en las células derivadas de GMP. Por ejemplo, las líneas celulares leucémicas comprometidas al linaje monocítico pueden ser forzadas a expresar marcadores eritroides [230]. En el contexto de los modelos de redes de regulación, la plasticidad se puede definir de forma rigurosa como un transición de una cuenca de atracción a

otra debido al efecto de una perturbación en el sistema. Las transiciones de los estados estacionarios desde linajes maduros a clases  $\text{Lin}^-$  o entre linajes maduros observados en las simulaciones (figura 4.6) pueden corresponder a la plasticidad potencial en estas células tal y como se ha visto en otros modelos RB aunque se requiere de corroboración experimental adicional [152, 132, 27].

Los estímulos extra e intracelulares, así como la presencia de citocinas, o la activación/inhibición de factores de transcripción son importantes para guiar el tipo de respuesta celular [53]. Por esta razón se analizaron los cambios en los patrones de los estados estacionarios en respuesta a los diferentes estímulos fijos definidos como sigue: proneutrófilos ( $\text{C/EBP}\alpha^+ \text{PU.1}^- \text{G-CSFR}^+$ ) [117], promonocitos ( $\text{C/EBP}\alpha^- \text{PU.1}^+ \text{M-CSFR}^+$ ) [117], promastocitos ( $\text{IL-3R}\alpha^- \text{c-KIT}^+$ ) [56, 180], proeosinófilos ( $\text{C/EBP}\alpha^+ \text{GATA-1}^+ \text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+$ ) [94] y probasófilos ( $\text{C/EBP}\alpha^+ \text{GATA-2}^+ \text{RUNX-1}^+ \text{IL3R}\alpha^+$ ) [180]. Como se observa en la figura 4.7 los ambientes fijos sesgan a la presencia de los linajes esperados. Por otra parte, se simularon los efectos de ciertos estados intracelulares. En la ausencia de la expresión de los principales TFs solamente se encuentran atractores de tipo  $\text{Lin}^-$ . Por otro lado, en el modelo tanto neutrófilos como basófilos se pueden producir en ausencia de citocinas, lo cual concuerda con modelos experimentales que sugieren que las citocinas no tienen un papel instructivo en el desarrollo sino que sólo permiten o seleccionan los linajes celulares previamente formados [187]. Sin embargo, la comunicación extracelular puede tener un papel crucial en la activación de funciones efectoras especializadas en estas células [186], por lo cual una perspectiva importante constituye la adición de factores extracelulares en futuras versiones del modelo.



**Predicciones principales**

- El modelo apoya la existencia de una serie de interacciones indirectas incluidas como hipotéticas.
- Además de las transiciones esperadas desde linajes de progenitores de Granulocitos-Monocitos se encuentran transiciones adicionales no evaluadas de forma experimental.
- El modelo apoya la variabilidad observada en GMP y la existencia de una subpoblación independiente de GMPs que da origen a mastocitos.
- Los linajes maduros se pueden formar en ausencia de citocinas en el modelo.

# Conclusiones

Un modelo de red Booleana fue construido para evaluar si la información acerca de las interacciones de factores claves de la red que participan en el proceso de diferenciación de las células GMP es suficiente para determinar los patrones de expresión observados experimentalmente. Se encontró que un modelo que contenía solamente interacciones directas bien documentadas es insuficiente para recuperar los patrones esperados. Sin embargo, fue posible inferir una red que integra interacciones posiblemente indirectas, observadas en experimentos de epistasis, que de hecho recupera los patrones observados en los fenotipos silvestres así como aquellos presentes en mutantes. Además, al perturbar el sistema se observaron patrones complejos de transiciones entre atractores que pueden ser asociados a eventos de diferenciación y plasticidad observados en células derivadas de GMP. Por lo tanto, el modelo resulta una herramienta valiosa para la elaboración de hipótesis acerca de la existencia de interacciones de regulación. De hecho, el modelo predice una serie de predicciones que pueden ser evaluadas experimentalmente.

# Apéndice

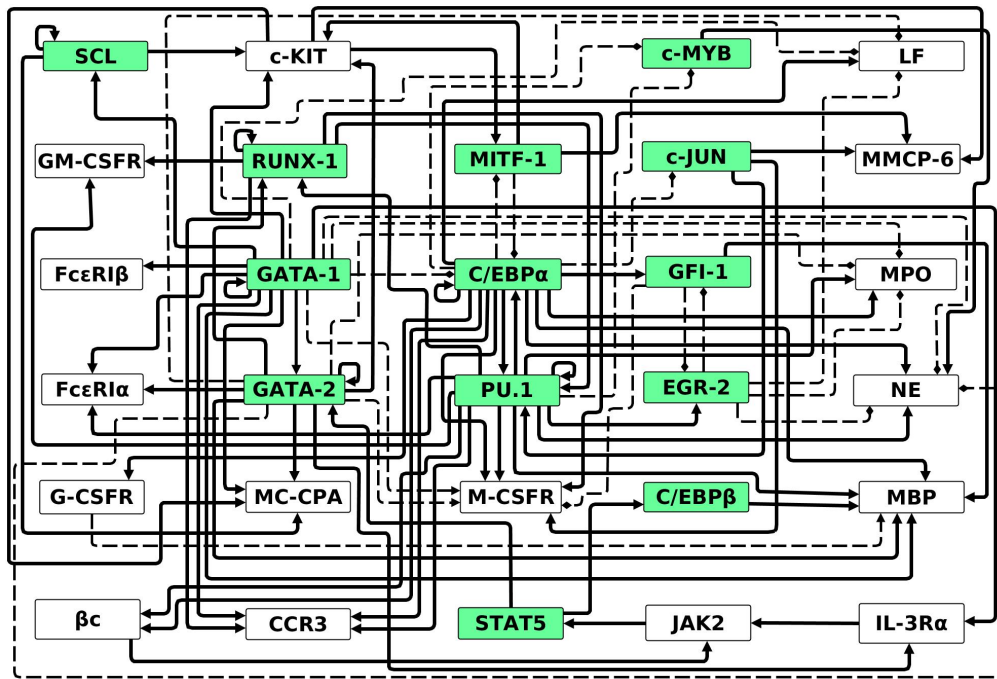


Figura A.1: **Red del modelo extendido.** Los factores de transcripción se muestran en verde. Las interacciones positivas (negativas) se muestran como flechas continuas (discontinuas).

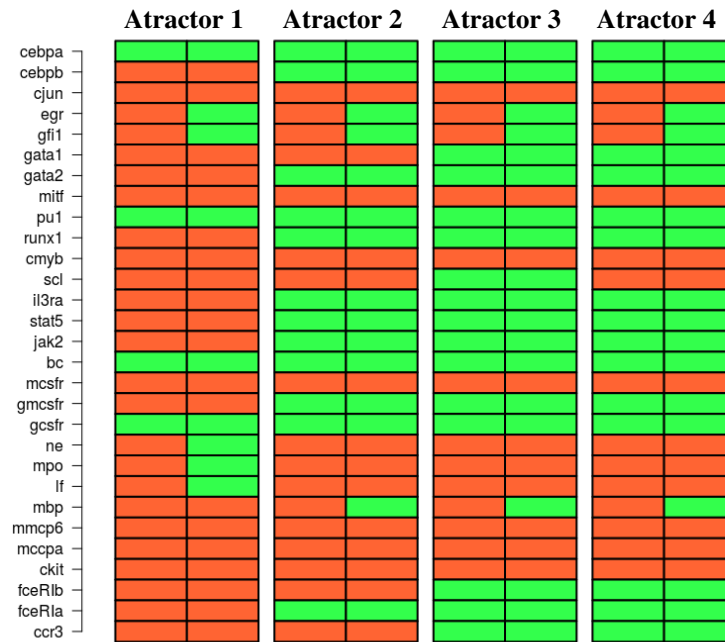


Figura A.2: **Atractores cíclicos de la red** encontrados al implementar el régimen de actualización síncrono. En verde (rojo) se presentan los nodos activos (inactivos).

Tabla A.1: **Interacciones directas incluidas en el modelo de red.** EMSA: ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética; LA: prueba de luciferasa; QPCR: reacción en cadena de polimerasa anidada; CHIP: Inmuno precipitación de la cromatina; RTPCR: reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real; NB: northern Blot; WB: western blot; FC: citometría de flujo; (continúa).

| Regulador | Interacción | Técnica molecular  | Especie       | Línea celular                | PMID     |
|-----------|-------------|--------------------|---------------|------------------------------|----------|
| cebpa     | positivo    | EMSA LA            | Humano Murino | Hep3B2 3T3                   | 2006196  |
| cebpa     | negativo    | QPCR CHIP LA       | Murino        | ratón KO                     | 21454593 |
| cjun      | negativo    | RTPCR NB WB LA     | Humano Murino | U937 HL60 293T HeLa ratón KO | 18026136 |
| ckit      | positivo    | FACS WB CHIP       | Murino        | G1EER LAD2                   | 16024808 |
| ckit      | positivo    | RTPCR ChIP EMSA FC | Humano Murino | 293T BALBc ratón LAD2 PT18   | 20833840 |
| ckit      | positivo    | NB FC EMSA LA      | Murino        | FDClP1 FMA3                  | 8695840  |
| ckit      | positivo    | CHIP               | Murino        | L8057 BMMC G1E               | 19011221 |
| cmyb      | negativo    | NB EMSA CAT        | Humano Murino | Jurkat TK 32Del              | 9292515  |
| egr       | negativo    | RTPCR LA           | Murino        | C57                          | 16923394 |
| egr       | positivo    | RTPCR WB           | Murino        | C57                          | 16923394 |
| feeR1a    | positivo    | EMSA LA            | Humano Murino | PT18 KU812                   | 11971001 |
| feeR1a    | positivo    | EMSA LA            | Humano Murino | PT18 KU812                   | 11971001 |
| feeR1a    | positivo    | EMSA LA            | Humano Murino | PT18 KU812                   | 11971001 |
| feeR1b    | positivo    | EMSA LA            | Murino        | CV1 PT18                     | 12496417 |
| gata1     | positivo    | FP LA CHIPSEQ      | Murino        | MEL 3T3 MEG                  | 21571218 |
| gata2     | positivo    | RTPCR CHIP LA      | Murino        | E11K1 TG ratón MEL 3T3 G1ME  | 12857954 |
| gata2     | positivo    | RTPCR WB CHIP      | Murino        | G1E 3T3                      | 12857954 |
| gfi1      | positivo    | RTPCR WB LA CHIP   | Humano Murino | CMV CD34                     | 16923394 |
| gfi1      | negativo    | RTPCR LA CHIP      | Murino        | C57 HPC7 3T3                 | 16923394 |
| gmcsfr    | positivo    | RTPCR QPCR CHIP    | Murino        | PUER ratón                   | 3123020  |
| gmcsfr    | positivo    | RTPCR QPCR CHIP    | Murino        | PUER ratón                   | 3123020  |
| lf        | positivo    | EMSA LA CHIP       | Murino Humano | U937 32D                     | 10845904 |
| mbp       | positivo    | EMSA               | Humano        | AML CV1                      | 12202480 |
| mbp       | positivo    | EMSA LA            | Humano        | CV1 AML JURKAT               | 12202480 |
| mbp       | positivo    | RTPCR EMSA         | Humano        | AML C57                      | 12202480 |
| mbp       | positivo    | EMSA LA            | Humano        | CV1 AML                      | 12202480 |
| mcepa     | positivo    | EMSA HGH           | Murino        | 3T3                          | 1744088  |
| mcsfr     | positivo    | LA                 | Murino        | CV1 F9                       | 9988737  |
| mcsfr     | positivo    | LA                 | Murino        | CV1 F9                       | 10411939 |
| mcsfr     | positivo    | LA                 | Murino        | CV1 F9                       | 10411939 |
| mcsfr     | positivo    | RTPCR QPCR CHIP LA | Murino        | PUER ratón CV1 F9            | 3123020  |

Table A.1 (Continuación) **Interacciones directas incluidas en el modelo de red.** *FACS: clasificación de células activadas en flujo; CAT: ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa; CIP: coimmuno precipitación; LACZ: reportero de lactosa; HGH: reportero de hormona de crecimiento humano.*

| Node  | Regulador | Interacción | Técnica molecular    | Especie       | Línea celular          | PMID     |
|-------|-----------|-------------|----------------------|---------------|------------------------|----------|
| mcsfr | runx1     | positivo    | RTPCR QPCR CHIP      | Murino        | PUER ratón             | 3123020  |
| mitf  | cebpa     | negativo    | CHIP LA              | Murino        | ratón KO               | 21454593 |
| mitf  | ekit      | positivo    | WB RTPCR             | Humano Murino | C57 HMC1               | 21273305 |
| mmcp6 | cjun      | positivo    | NB LA                | Humano Murino | IC2 MC9 3T3            | 15464728 |
| mmcp6 | mitf      | positivo    | NB LA EMSA           | Murino        | 3T3                    | 7802662  |
| mpo   | cebpa     | positivo    | EMSA CHIP            | Murino        | WEHI 32D FDCCP         | 8855267  |
| mpo   | pul       | positivo    | EMSA CHIP            | Murino        | WEHI 32D FDCCP         | 8855267  |
| ne    | cebpa     | positivo    | LA EMSA              | Murino Humano | 3T3 HL60 CV-1 32D      | 8756629  |
| ne    | cmyb      | positivo    | LA EMSA              | Murino Humano | 3T3 HL60 CV1 32D       | 8756629  |
| ne    | pul       | positivo    | LA EMSA              | Murino Humano | 3T3 HL60 CV-1 32D      | 8756629  |
| pu1   | cebpa     | positivo    | CIP EMSA CHIP NB     | Humano Murino | 293T 32D BAF3 C57 U937 | 18026136 |
| pu1   | cjun      | positivo    | CIP EMSA CHIP        | Humano Murino | 293T 32D BAF3 C57      | 18026136 |
| pu1   | gfi1      | negativo    | RTPCR CHIP EMSA      | Murino        | C57                    | 19818654 |
| pu1   | pul       | positivo    | LA CHIP EMSA CHIPSEQ | Murino        | ratón KO RAW264        | 8663022  |
| pu1   | runx1     | positivo    | RTPCR CHIP EMSA LA   | Murino        | 416B ratón KO          | 17994017 |
| runx1 | gata2     | positivo    | LA CHIP LACZ CHIPSEQ | Murino        | C57 CBA 416B           | 17823307 |
| runx1 | pul       | positivo    | LA CHIP LACZ         | Murino        | C57 CBA 416B           | 17823307 |
| runx1 | runx1     | positivo    | LA CHIP LACZ CHIPSEQ | Murino        | C57 CBA 416B           | 17823307 |
| scl   | gata1     | positivo    | CHIP LA              | Murino        | ratón KO               | 17709394 |
| scl   | scl       | positivo    | CHIP LA              | Murino        | ratón KO               | 17709394 |

Tabla A.2: **Reglas lógicas del modelo de interacciones directas.** *En este modelo sólo se incluyeron interacciones directas y bien sustentadas. Los operadores lógicos AND, OR and NOT se representan como  $\wedge$ ,  $\vee$ , and  $\neg$ , respectivamente.*

| Nodo             | Regla de actualización lógica   | Referencias             |
|------------------|---|-------------------------|
| C/EBP $\alpha$   | $C/EBP\alpha \wedge \neg \text{MITF-1}$   | [40, 180]               |
| c-JUN            | $\neg C/EBP\alpha$  | [184]                   |
| EGR-2            | $\neg \text{GFI-1} \wedge \text{PU.1}$  | [117]                   |
| GFI-1            | $C/EBP\alpha \wedge \neg \text{EGR-2}$  | [117]                   |
| GATA-1           | GATA1   | [220]                   |
| GATA-2           | $\text{GATA-1} \vee \text{GATA-2}$  | [168, 85, 144]          |
| MITF-1           | $(\neg C/EBP\alpha) \vee \text{c-KIT}$  | [120, 180]              |
| PU.1             | $\text{PU.1} \vee \text{RUNX-1} \vee (C/EBP\alpha \wedge \text{c-JUN}) \wedge \neg \text{GFI-1}$                                | [114, 30, 170, 119, 88] |
| RUNX-1           | $(\text{GATA-2} \wedge \text{PU.1}) \vee \text{RUNX-1}$   | [161]                   |
| c-MYB            | $\neg \text{PU.1}$  | [26]                    |
| SCL              | $\text{SCL} \wedge \text{GATA-1}$   | [166]                   |
| M-CSFR           | $(\text{PU.1} \wedge \text{RUNX-1}) \vee (\text{PU.1} \wedge \text{c-JUN})$<br>$\wedge \neg (\text{GATA-1} \vee \text{GATA-2})$ | [25, 4]<br>[236]        |
| GM-CSFR $\alpha$ | $\text{RUNX-1} \wedge \text{PU.1}$  | [4]                     |
| NE               | $(C/EBP\alpha \vee \text{c-MYB}) \wedge \text{PU.1}$  | [164]                   |
| MPO              | $C/EBP\alpha \wedge \text{PU.1}$  | [66]                    |
| LF               | $C/EBP\alpha$   | [102, 117]              |
| MBP              | $((C/EBP\alpha \vee \wedge (\text{GATA-1} \vee \text{GATA-2})) \wedge \text{PU.1})$   | [54, 126]               |
| MMCP6            | $\text{MITF-1} \wedge \text{c-JUN}$   | [104, 147, 146, 178]    |
| MCCPA            | GATA-2  | [241]                   |
| c-KIT            | $(\text{GATA-2} \vee (\text{SCL} \wedge \text{GATA-1})) \wedge \text{MITF-1}$   | [217, 128, 222, 222]    |



Tabla A.3: **Interacciones adicionales.** *Interacciones indirectas y propuestas agregadas a la primera versión del modelo.*

| Nodo  | Regulador | Interacción | Técnica molecular | Especie       | Línea celular                | PMID o PMCID      |
|-------|-----------|-------------|-------------------|---------------|------------------------------|-------------------|
| bc    | cebpa     | positivo    | EMSA CAT          | Humano        | U937 293T HeLa ratón KO      | 9808557           |
| bc    | pul       | positivo    | EMSA CAT          | Humano        | U937 HL60 293T HeLa ratón KO | 10453008 9808557  |
| ccr3  | gata1     | positivo    | WB EMSA GSTPD LA  | Humano        | K562                         | 21041734          |
| ccr3  | pul       | positivo    | WB EMSA GSTPD LA  | Humano        | K562                         | 21041734          |
| ccr3  | runx1     | positivo    | WB EMSA GSTPD LA  | Humano        | K562                         | 21041734          |
| cebpb | stat5     | positivo    | WB NB CHIP        | Murino        | BaF3                         | 12574125          |
| cmyb  | cebpa     | negativo    | WB EMSA CHIP      | Humano Murino | K562 32D                     | 18550858          |
| gata2 | stat5     | positivo    | FC CHIP           | Murino        | BMMC                         | 25801432          |
| gcsfr | cebpa     | positivo    | LA EMSA           | Humano        | U937                         | 9632814           |
| gcsfr | pul       | positivo    | LA EMSA           | Humano        | U937                         | 9632814           |
| jak2  | bc        | positivo    | CIP               | Humano        | TF1                          | 7935454           |
| jak2  | gmcsfr    | positivo    | CIP LA            | Murino        | BaF3                         | 8647882           |
| jak2  | il3ra     | positivo    | WB                | Murino        | BaF3                         | 9558373           |
| lf    | egr       | negativo    | RTPCR WB          | Murino        | C57                          | 16923394          |
| mbp   | cebpb     | positivo    | EMSA              | Humano        | AML HT39A JURKAT             | 12202480 12202480 |
| mbp   | gcsfr     | negativo    | RTPCR WB          | Humano Murino | HL60 32D                     | 22552881          |
| mbp   | gfi1      | negativo    | RTPCR WB          | Humano Murino | HL60 32D                     | 22552881          |
| mmcp6 | ckit      | positivo    | NB                | Murino        | IC2                          | 8605325           |
| stat5 | jak2      | positivo    | EMSA CIP WB       | Humano        | MATa                         | 9575217           |
| ccr3  | cebpa     | positivo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |
| il3ra | gata1     | positivo    | NA                | NA            | NA                           | 7858255           |
| il3ra | gata2     | positivo    | NA                | NA            | NA                           | 7858255           |
| lf    | gata2     | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |
| lf    | gata2     | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |
| mccpa | ckit      | positivo    | NA                | NA            | NA                           | PMC2119178        |
| mccpa | mitf      | positivo    | NA                | NA            | NA                           | PMC2119178        |
| mpo   | egr       | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 16923394          |
| mpo   | gata1     | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |
| mpo   | gata2     | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |
| ne    | egr       | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 16923394          |
| ne    | gata1     | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |
| ne    | gata2     | negativo    | NA                | NA            | NA                           | 17079688          |

Tabla A.4: **Modelo final.** Las reglas en verde muestran reglas que corresponden a interacciones indirectas y propuestas agregadas al primer modelo.

| Nodo             | Regla l3gica   | Referencias             |
|------------------|--|-------------------------|
| C/EBP $\alpha$   | C/EBP $\alpha$ $\wedge$ $\neg$ MITF-1  | [41, 180]               |
| C/EBP $\beta$    | STAT5  | [228]                   |
| c-JUN            | $\neg$ C/EBP $\alpha$  | [184]                   |
| EGR-2            | $\neg$ GFI-1 $\wedge$ PU.1   | [117]                   |
| GFI-1            | C/EBP $\alpha$ $\wedge$ $\neg$ EGR-2   | [117]                   |
| GATA-1           | GATA1  | [220]                   |
| GATA-2           | GATA-1 $\vee$ GATA-2 $\vee$ STAT5  | [168, 85, 143, 122]     |
| MITF-1           | ( $\neg$ C/EBP $\alpha$ ) $\vee$ c-KIT   | [120, 180]              |
| PU.1             | ( PU.1 $\vee$ RUNX-1 $\vee$ ( C/EBP $\alpha$ $\wedge$ c-JUN ) )<br>$\wedge$ $\neg$ GFI-1   | [114, 30, 170, 119, 87] |
| RUNX-1           | ( GATA-2 $\wedge$ PU.1 ) $\vee$ RUNX-1   | [161]                   |
| c-MYB            | $\neg$ ( PU.1 $\vee$ C/EBP $\alpha$ )  | [26, 203]               |
| SCL              | SCL $\wedge$ GATA-1  | [166]                   |
| IL-3R $\alpha$   | GATA-1 $\vee$ GATA-2   | [141]                   |
| STAT5            | JAK2   | [165]                   |
| JAK2             | ( IL-3R $\alpha$ $\vee$ GM-CSFR $\alpha$ ) $\wedge$ $\beta$ c  | [84]                    |
| $\beta$ c        | C/EBP $\alpha$ $\wedge$ PU.1   | [23]                    |
| M-CSFR           | ( ( PU.1 $\wedge$ RUNX-1 ) ) $\vee$ ( PU.1 $\wedge$ c-JUN ) )<br>$\wedge$ $\neg$ ( GATA-1 $\vee$ GATA-2 )                            | [25, 4]<br>[236]        |
| GM-CSFR $\alpha$ | RUNX-1 $\wedge$ PU.1   | [4]                     |
| G-CSFR           | C/EBP $\alpha$ $\wedge$ PU.1   | [182]                   |
| NE               | ( C/EBP $\alpha$ $\vee$ c-MYB ) $\wedge$ PU.1 $\wedge$ $\neg$ EGR-2<br>$\wedge$ $\neg$ ( GATA-1 $\vee$ GATA-2 )                      | [164]                   |
| MPO              | C/EBP $\alpha$ $\wedge$ PU.1 $\wedge$ $\neg$ EGR-2<br>$\wedge$ $\neg$ ( GATA-1 $\vee$ GATA-2 )                                       | [66]                    |
| LF               | C/EBP $\alpha$ $\wedge$ $\neg$ EGR-2 $\wedge$ $\neg$ ( GATA-1 $\vee$ GATA-2 )  | [102, 117]              |
| MBP              | ( C/EBP $\alpha$ $\vee$ C/EBP $\beta$ ) $\wedge$ ( GATA-1 $\vee$ GATA-2 )<br>$\wedge$ PU.1 $\wedge$ $\neg$ ( GFI-1 $\wedge$ G-CSFR ) | [54, 126]               |
| MMCP6            | MITF-1 $\wedge$ c-KIT $\wedge$ c-JUN   | [104, 147, 146, 178]    |
| MCCPA            | GATA-2 $\wedge$ MITF-1 $\wedge$ c-KIT  | [241]                   |

Tabla A.4. **Modelo final** (Continuación). Las reglas resaltadas en color verde muestran reglas que corresponden a interacciones indirectas y propuestas agregadas al primer modelo.

| Nodo   | Regla lógica  | Referencias     |
|--------|---|-----------------|
| c-KIT  | $( \text{GATA-2} \vee ( \text{SCL} \wedge \text{GATA-1} ) ) \wedge \text{MITF-1}$ | [217, 128, 222] |
| FcεRIβ | GATA-1  | [129]           |
| FcεRIα | $( \text{GATA-1} \vee \text{GATA-2} ) \wedge \text{PU.1}$                         | [159]           |
| CCR3   | $\text{C/EBP}\alpha \wedge \text{GATA-1} \wedge \text{PU.1} \wedge \text{RUNX-1}$ | [103]           |

# Bibliografía

- [1] Mechanisms of transcription in eosinophils: GATA-1, but not GATA-2, transactivates the promoter of the eosinophil granule major basic protein gene. *Blood*, 91(9):3447–58, may 1998.
- [2] Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5Ralpha interacting protein. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532):1136–8, aug 2001.
- [3] Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12):958–69, 2008.
- [4] RUNX1 regulates corepressor interactions of PU.1. *Blood*, 117(24):6498–508, jun 2011.
- [5] W. Abou-Jaoudé, P. Traynard, P. T. Monteiro, J. Saez Rodriguez, T. Helikar, D. Thieffry, and C. Chaouiya. Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Frontiers in Genetics*, 7:94, 2016.
- [6] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774):193–7, mar 2000.
- [7] R. Albert and H. G. Othmer. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in drosophila melanogaster. *Journal of theoretical biology*, 223(1):1–18, 2003.
- [8] R. Albert and J. Thakar. Boolean modeling: a logic-based dynamic approach for understanding signaling and regulatory networks and for making useful predictions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 6(5):353–369, 2014.
- [9] M. Aldana. Boolean dynamics of networks with scale-free topology. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 185(1):45–66, 2003.
- [10] M. Aldana, E. Balleza, S. Kauffman, and O. Resendiz. Robustness and evolvability in genetic regulatory networks. *Journal of theoretical biology*, 245(3):433–448, 2007.
- [11] E. R. Alvarez-Buylla, A. Chaos, M. Aldana, M. Benítez, Y. Cortes-Poza, C. Espinosa-Soto, D. a. Hartasánchez, R. B. Lotto, D. Malkin, G. J. Escalera Santos, and P. Padilla-Longoria. Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLoS one*, 3(11):e3626, jan 2008.

- [12] E. R. Alvarez-Buylla, A. Chaos, M. Aldana, M. Benítez, Y. Cortes-Poza, C. Espinosa-Soto, D. a. Hartasánchez, R. B. Lotto, D. Malkin, G. J. Escalera Santos, and P. Padilla-Longoria. Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PloS one*, 3(11):e3626, jan 2008.
- [13] K. Amin. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory medicine*, 106(1):9–14, 2012.
- [14] K. L. Anderson, K. a. Smith, H. Perkin, G. Hermanson, C. G. Anderson, D. J. Jolly, R. a. Maki, and B. E. Torbett. PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood*, 94(7):2310–8, Oct. 1999.
- [15] K. L. Anderson, K. A. Smith, F. Pio, B. E. Torbett, and R. A. Maki. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood*, 92(5):1576–85, sep 1998.
- [16] Y. Arinobu, H. Iwasaki, and K. Akashi. Origin of basophils and mast cells. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 58(November 2008):21–28, 2009.
- [17] Y. Arinobu, H. Iwasaki, M. F. Gurish, S.-i. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D. G. Tenen, K. F. Austen, and K. Akashi. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50):18105–18110, 2005.
- [18] E. Azpeitia, M. Benítez, P. Padilla-Longoria, C. Espinosa-Soto, and E. R. Alvarez-Buylla. Dynamic network-based epistasis analysis: boolean examples. *Frontiers in plant science*, 2:92, 2011.
- [19] Y. Baba, K. Maeda, T. Yashiro, E. Inage, F. Niyonsaba, M. Hara, R. Suzuki, Y. Ohtsuka, T. Shimizu, H. Ogawa, K. Okumura, and C. Nishiyama. Involvement of PU.1 in mast cell/basophil-specific function of the human IL1RL1/ST2 promoter. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 61(3):461–7, Sept. 2012.
- [20] M. Babina, Y. Schülke, L. Kirchhof, S. Guhl, R. Franke, S. Böhm, T. Zuberbier, B. M. Henz, and a. F. Gombart. The transcription factor profile of human mast cells in comparison with monocytes and granulocytes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(2):214–26, Jan. 2005.
- [21] D. F. Bainton, J. L. Ulyot, and M. G. Farquhar. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow origin and content of azurophil and specific granules. *The Journal of experimental medicine*, 134(4):907–934, 1971.
- [22] E. Balleza, E. R. Alvarez-Buylla, A. Chaos, S. Kauffman, I. Shmulevich, and M. Aldana. Critical dynamics in genetic regulatory networks: examples from four kingdoms. *PLoS One*, 3(6):e2456, 2008.

- [23] B. Baltus, T. B. van Dijk, E. Caldenhoven, E. Zanders, J. A. Raaijmakers, J.-W. J. Lammers, L. Koenderman, and R. P. de Groot. An ap-1 site in the promoter of the human il-5 $\alpha$  gene is necessary for promoter activity in eosinophilic hl60 cells. *FEBS letters*, 434(3):251–254, 1998.
- [24] C. A. Behm and K. S. Ovington. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitology today (Personal ed.)*, 16(5):202–9, may 2000.
- [25] G. Behre, a. J. Whitmarsh, M. P. Coghlan, T. Hoang, C. L. Carpenter, D. E. Zhang, R. J. Davis, and D. G. Tenen. c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, 274(8):4939–46, feb 1999.
- [26] T. Bellon, D. Perrotti, and B. Calabretta. Granulocytic differentiation of normal hematopoietic precursor cells induced by transcription factor PU.1 correlates with negative regulation of the c-myb promoter. *Blood*, 90(5):1828–39, sep 1997.
- [27] N. Bonzanni, A. Garg, K. A. Feenstra, J. Schütte, S. Kinston, D. Miranda-Saavedra, J. Heringa, I. Xenarios, and B. Göttgens. Hard-wired heterogeneity in blood stem cells revealed using a dynamic regulatory network model. *Bioinformatics*, 29(13):i80–i88, 2013.
- [28] M. A. Brown and J. K. Hatfield. Mast cells are important modifiers of autoimmune disease: with so much evidence, why is there still controversy? *Frontiers in immunology*, 3:147, 2012.
- [29] J. Byström, T. A. Wynn, J. B. Domachowske, and H. F. Rosenberg. Gene microarray analysis reveals interleukin-5–dependent transcriptional targets in mouse bone marrow. *Blood*, 103(3):868–877, 2004.
- [30] D. Cai, D. Wang, J. Keefer, C. Yeaman, K. Hensley, and A. Friedman. C/ebp $\alpha$ : Ap-1 leucine zipper heterodimers bind novel dna elements, activate the pu. 1 promoter and direct monocyte lineage commitment more potently than c/ebp $\alpha$  homodimers or ap-1. *Oncogene*, 27(19):2772–2779, 2008.
- [31] T. Calandra and T. Roger. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(10):791–800, oct 2003.
- [32] S. A. Cannistra, P. Groshek, R. Garlick, J. Miller, and J. D. Griffin. Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1):93–7, jan 1990.
- [33] B. Chandrasekar, P. C. Melby, H. M. Sarau, M. Raveendran, R. P. Perla, F. M. Marelli-Berg, N. O. Dulin, and I. S. Singh. Chemokine-cytokine cross-talk the elr+ cxc chemokine lix (cxcl5) amplifies a proinflammatory cytokine response via a phosphatidylinositol 3-kinase-nf- $\kappa$ b pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7):4675–4686, 2003.
- [34] C.-C. Chen, M. A. Grimbaldeston, M. Tsai, I. L. Weissman, and S. J. Galli. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32):11408–11413, 2005.

- [35] H. M. Chen, P. Zhang, M. T. Voso, S. Hohaus, D. a. Gonzalez, C. K. Glass, D. E. Zhang, and D. G. Tenen. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood*, 85(10):2918–28, may 1995.
- [36] K. D. Chhiba, C.-L. Hsu, S. Berdnikovs, and P. J. Bryce. Transcriptional Heterogeneity of Mast Cells and Basophils upon Activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, page 1601825, may 2017.
- [37] S. Chirumbolo. State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve. *Blood Transfus*, 10(2):148–64, 2012.
- [38] J. L. Christensen and I. L. Weissman. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25):14541–14546, 2001.
- [39] G. Christoffersson, E. Vågesjö, J. Vandooren, M. Lidén, S. Massena, R. B. Reinert, M. Brissova, A. C. Powers, G. Opdenakker, and M. Phillipson. Vegf-a recruits a proangiogenic mmp-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*, 120(23):4653–4662, 2012.
- [40] R. J. Christy, K. H. Kaestner, D. E. Geiman, and M. D. Lane. Ccaat/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3t3-l1 preadipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6):2593–2597, 1991.
- [41] R. J. Christy, K. H. Kaestner, D. E. Geiman, and M. D. Lane. Ccaat/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3t3-l1 preadipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6):2593–2597, 1991.
- [42] R. M. Crapper and J. W. Schrader. Frequency of mast cell precursors in normal tissues determined by an in vitro assay: antigen induces parallel increases in the frequency of p cell precursors and mast cells. *The Journal of Immunology*, 131(2):923–928, 1983.
- [43] C. A. Dahinden, Y. Kurimoto, A. L. De Weck, I. Lindley, B. Dewald, and M. Baggiolini. The neutrophil-activating peptide naf/nap-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *The Journal of experimental medicine*, 170(5):1787–1792, 1989.
- [44] R. Dahl, S. R. Iyer, K. S. Owens, D. D. Cuylear, and M. C. Simon. The transcriptional repressor *gfi-1* antagonizes *pu. 1* activity through protein-protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9):6473–6483, 2007.
- [45] R. Dahl, J. C. Walsh, D. Lancki, P. Laslo, S. R. Iyer, H. Singh, and M. C. Simon. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the *pu. 1*: *C/ebp $\alpha$*  ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nature immunology*, 4(10):1029–1036, 2003.
- [46] J. S. Dahlin and J. Hallgren. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Molecular immunology*, pages 1–9, Mar. 2014.

- [47] H. De Jong. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *Journal of computational biology*, 9(1):67–103, 2002.
- [48] M. de la Luz Sierra, S. Sakakibara, P. Gasperini, O. Salvucci, K. Jiang, P. J. McCormick, M. Segarra, J. Stone, D. Maric, J. Zhu, et al. The transcription factor *gfi1* regulates *g-csf* signaling and neutrophil development through the ras activator *rasgrp1*. *Blood*, 115(19):3970–3979, 2010.
- [49] R. P. DeKoter, J. C. Walsh, and H. Singh. Pu. 1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *The EMBO journal*, 17(15):4456–4468, 1998.
- [50] J. A. Denburg, S. Telizyn, H. Messner, B. Lim, N. Jamal, S. J. Ackerman, G. J. Gleich, and J. Bienenstock. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood*, 66(2):312–8, aug 1985.
- [51] B. Derrida and Y. Pomeau. Random networks of automata: a simple annealed approximation. *EPL (Europhysics Letters)*, 1(2):45, 1986.
- [52] S. Dey, D. J. Curtis, S. M. Jane, and S. J. Brandt. The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Molecular and cellular biology*, 30(9):2181–92, may 2010.
- [53] S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell*, 10(2):120–36, feb 2012.
- [54] J. Du, M. J. Stankiewicz, Y. Liu, Q. Xi, J. E. Schmitz, J. A. Lestrom-Himes, and S. J. Ackerman. Novel combinatorial interactions of *gata-1*, *pu. 1*, and *c/ebpe* isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):43481–43494, 2002.
- [55] M. DuPage and J. A. Bluestone. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nature reviews. Immunology*, 16(3):149–63, mar 2016.
- [56] a. M. Dvorak, R. a. Seder, W. E. Paul, E. S. Morgan, and S. J. Galli. Effects of interleukin-3 with or without the *c-kit* ligand, stem cell factor, on the survival and cytoplasmic granule formation of mouse basophils and mast cells in vitro. *The American journal of pathology*, 144(1):160–70, 1994.
- [57] K. D. Dyer, M. Czapiga, B. Foster, P. S. Foster, E. M. Kang, C. M. Lappas, J. M. Moser, N. Naumann, C. M. Percopo, S. J. Siegel, et al. Eosinophils from lineage-ablated  $\delta$ dbl $gata$  bone marrow progenitors: the *dbl $gata$*  enhancer in the promoter of *gata-1* is not essential for differentiation ex vivo. *The Journal of Immunology*, 179(3):1693–1699, 2007.
- [58] K. D. Dyer, M. Czapiga, B. Foster, P. S. Foster, E. M. Kang, C. M. Lappas, J. M. Moser, N. Naumann, C. M. Percopo, S. J. Siegel, et al. Eosinophils from lineage-ablated  $\delta$ dbl $gata$  bone marrow progenitors: the *dbl $gata$*  enhancer in the promoter of *gata-1* is not essential for differentiation ex vivo. *The Journal of Immunology*, 179(3):1693–1699, 2007.



- [59] R. Eferl, M. Sibilía, F. Hilberg, A. Fuchsbichler, I. Kufferath, B. Guertl, R. Zenz, E. F. Wagner, and K. Zatloukal. Functions of c-jun in liver and heart development. *The Journal of cell biology*, 145(5):1049–1061, 1999.
- [60] B. S. Egan, K. B. Lane, and V. L. Shepherd. Pu. 1 and usf are required for macrophage-specific mannose receptor promoter activity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13):9098–9107, 1999.
- [61] A. Egesten, J. Breton-Gorius, J. Guichard, U. Gullberg, and I. Olsson. The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin g, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood*, 83(10):2985–2994, 1994.
- [62] Q. Eichbaum, D. Heney, D. Raveh, M. Chung, M. Davidson, J. Epstein, and R. A. B. Ezekowitz. Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factors pu. 1 and sp1. *Blood*, 90(10):4135–4143, 1997.
- [63] M. Faurschou and N. Borregaard. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14):1317–1327, 2003.
- [64] R. Ferreira, A. Wai, R. Shimizu, N. Gillemans, R. Rottier, M. von Lindern, K. Ohneda, F. Grosveld, M. Yamamoto, and S. Philipsen. Dynamic regulation of gata factor levels is more important than their identity. *Blood*, 109(12):5481–5490, 2007.
- [65] D. K. Fogg, C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*, 311(5757):83–87, 2006.
- [66] A. M. Ford, C. A. Bennett, L. E. Healy, M. Towatari, M. F. Greaves, and T. Enver. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins pu1, c-ebp alpha,-beta, and-delta during granulocyte-lineage specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20):10838–10843, 1996.
- [67] E. F. Foxman, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *The Journal of cell biology*, 139(5):1349–1360, 1997.
- [68] C. B. Franco, C.-C. Chen, M. Drukker, I. L. Weissman, and S. J. Galli. Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell Stem Cell*, 6(4):361–368, 2010.
- [69] P. C. Fulkerson and M. E. Rothenberg. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(2):117–29, feb 2013.
- [70] A. Garg, A. Di Cara, I. Xenarios, L. Mendoza, and G. De Micheli. Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics*, 24(17):1917–1925, 2008.
- [71] B. Geering, C. Stoeckle, S. Conus, and H.-U. Simon. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in immunology*, 34(8):398–409, 2013.

- [72] F. Geissmann, S. Jung, and D. R. Littman. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1):71–82, jul 2003.
- [73] F. Ginhoux and S. Jung. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis TL - 14. *Nature Reviews Immunology*, 14 VN - r(6):392–404, 2014.
- [74] A. F. Gombart, S. H. Kwok, K. L. Anderson, Y. Yamaguchi, B. E. Torbett, and H. P. Koeffler. Regulation of neutrophil and eosinophil secondary granule gene expression by transcription factors *c/ebp $\epsilon$*  and *pu. 1*. *Blood*, 101(8):3265–3273, 2003.
- [75] S. Gordon and P. R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, 5(12):953–64, dec 2005.
- [76] T. Graf. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*, 99(9):3089–3101, 2002.
- [77] J. A. Grass, M. E. Boyer, S. Pal, J. Wu, M. J. Weiss, and E. H. Bresnick. Gata-1-dependent transcriptional repression of *gata-2* via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15):8811–8816, 2003.
- [78] M. A. Grimbaldeston, C.-C. Chen, A. M. Piliponsky, M. Tsai, S.-Y. Tam, and S. J. Galli. Mast cell-deficient *w-sash c-kit* mutant *kitw-sh/w-sh* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *The American journal of pathology*, 167(3):835–848, 2005.
- [79] M. F. Gurish and J. A. Boyce. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6):1285–1291, 2006.
- [80] M. F. Gurish, H. Tao, J. P. Abonia, A. Arya, D. S. Friend, C. M. Parker, and K. F. Austen. Intestinal mast cell progenitors require *cd49d $\beta$ 7* ( $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrin) for tissue-specific homing. *The Journal of experimental medicine*, 194(9):1243–1252, 2001.
- [81] T. Hara, M. Ichihara, M. Takagi, and A. Miyajima. Interleukin-3 (*il-3*) poor-responsive inbred mouse strains carry the identical deletion of a branch point in the *il-3* receptor  $\alpha$  subunit gene. *Blood*, 85(9):2331–2336, 1995.
- [82] V. Heath, H. C. Suh, M. Holman, K. Renn, J. M. Gooya, S. Parkin, K. D. Klarmann, M. Ortiz, P. Johnson, and J. Keller. *C/ebp $\alpha$*  deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood*, 104(6):1639–1647, 2004.
- [83] M. R. Hepworth, E. Daniłowicz-Luebert, S. Rausch, M. Metz, C. Klotz, M. Maurer, and S. Hartmann. Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17):6644–6649, 2012.

- [84] T. R. Hercus, U. Dhagat, W. L. Kan, S. E. Broughton, T. L. Nero, M. Perugini, J. J. Sandow, R. J. D'Andrea, P. G. Ekert, T. Hughes, et al. Signalling by the  $\beta c$  family of cytokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 24(3):189–201, 2013.
- [85] R. Hirasawa, R. Shimizu, S. Takahashi, M. Osawa, S. Takayanagi, Y. Kato, M. Onodera, N. Minegishi, M. Yamamoto, K. Fukao, et al. Essential and instructive roles of gata factors in eosinophil development. *The Journal of experimental medicine*, 195(11):1379–1386, 2002.
- [86] H. Hock, M. J. Hamblen, H. M. Rooke, D. Traver, R. T. Bronson, S. Cameron, and S. H. Orkin. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor *gfi-1* in neutrophil differentiation. *Immunity*, 18(1):109–120, 2003.
- [87] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1):44, 2008.
- [88] Z. Huang, L. C. Dore, Z. Li, S. H. Orkin, G. Feng, S. Lin, and J. D. Crispino. Gata-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of gata-1. *Molecular and cellular biology*, 29(18):5168–5180, 2009.
- [89] T. R. Hundley, A. M. Gilfillan, C. Tkaczyk, M. V. Andrade, D. D. Metcalfe, and M. A. Beaven. Kit and *fc̳r1* mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood*, 104(8):2410–2417, 2004.
- [90] S. Iida, R. Watanabe-Fukunaga, S. Nagata, and R. Fukunaga. Essential role of *c/ebp̳* in g-csf-induced transcriptional activation and chromatin modification of myeloid-specific genes. *Genes to Cells*, 13(4):313–327, 2008.
- [91] Y. Ishijima, S. Ohmori, A. Uenishi, and K. Ohneda. Gata transcription factors are involved in ige-dependent mast cell degranulation by enhancing the expression of phospholipase *c-̳1*. *Genes to Cells*, 17(4):285–301, 2012.
- [92] T. Ito, C. Nishiyama, N. Nakano, M. Nishiyama, Y. Usui, K. Takeda, S. Kanada, K. Fukuyama, H. Akiba, T. Tokura, et al. Roles of pu. 1 in monocyte-and mast cell-specific gene regulation: Pu. 1 transactivates *ciita* *piv* in cooperation with *ifn-̳*. *International immunology*, page dxp048, 2009.
- [93] H. Iwasaki and K. Akashi. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 26(6):726–740, 2007.
- [94] H. Iwasaki, S.-i. Mizuno, Y. Arinobu, H. Ozawa, Y. Mori, H. Shigematsu, K. Takatsu, D. G. Tenen, and K. Akashi. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes & development*, 20(21):3010–3021, 2006.
- [95] H. Iwasaki, S.-i. Mizuno, R. Mayfield, H. Shigematsu, Y. Arinobu, B. Seed, M. F. Gurish, K. Takatsu, and K. Akashi. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 201(12):1891–1897, 2005.

- [96] K. Kandasamy, S. S. Mohan, R. Raju, S. Keerthikumar, G. S. S. Kumar, A. K. Venugopal, D. Telikicherla, J. D. Navarro, S. Mathivanan, C. Pecquet, et al. Net-path: a public resource of curated signal transduction pathways. *Genome biology*, 11(1):1, 2010.
- [97] H. Karasuyama, K. Mukai, Y. Tsujimura, and K. Obata. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature Reviews Immunology*, 9(1):9–13, jan 2009.
- [98] G. Karlebach and R. Shamir. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10):770–780, 2008.
- [99] S. A. Kauffman. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of theoretical biology*, 22(3):437–467, 1969.
- [100] M. Kaufman, J. Urbain, and R. Thomas. Towards a logical analysis of the immune response. *Journal of theoretical biology*, 114(4):527–561, 1985.
- [101] A. Khanna-Gupta, T. Zibello, H. Sun, P. Gaines, and N. Berliner. Chromatin immunoprecipitation (chip) studies indicate a role for ccaat enhancer binding proteins alpha and epsilon ( $c/ebp\alpha$  and  $c/ebp\epsilon$ ) and  $cdp/cut$  in myeloid maturation-induced lactoferrin gene expression. *Blood*, 101(9):3460–3468, 2003.
- [102] A. Khanna-Gupta, T. Zibello, H. Sun, J. Lekstrom-Himes, and N. Berliner.  $C/ebp\epsilon$  mediates myeloid differentiation and is regulated by the ccaat displacement protein ( $cdp/cut$ ). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14):8000–8005, 2001.
- [103] B. S. Kim, T. G. Uhm, S. K. Lee, S.-H. Lee, J. H. Kang, C.-S. Park, and I. Y. Chung. The crucial role of  $gata-1$  in  $ccr3$  gene transcription: modulated balance by multiple  $gata$  elements in the  $ccr3$  regulatory region. *The Journal of Immunology*, 185(11):6866–6875, 2010.
- [104] D.-K. Kim and Y.-M. Lee. Requirement of  $c-jun$  transcription factor on the mouse mast cell protease-6 expression in the mast cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 431(1):71–78, 2004.
- [105] D.-K. Kim, E. Morii, H. Ogihara, Y.-M. Lee, T. Jippo, S. Adachi, K. Maeyama, H.-M. Kim, and Y. Kitamura. Different effect of various mutant  $mitf$  encoded by  $mi$ ,  $mior$ , or  $miwh$  allele on phenotype of murine mast cells. *Blood*, 93(12):4179–4186, 1999.
- [106] K. Kim, N. Suzuki, K. Ohneda, N. Minegishi, and M. Yamamoto. Fractionation of mature eosinophils in  $gata$ -reporter transgenic mice. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 220(2):127–138, 2010.
- [107] A. Kirshenbaum, J. Goff, S. W. Kessler, J. Mican, K. Zsebo, and D. Metcalfe. Effect of  $il-3$  and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from  $cd34+$  pluripotent progenitor cells. *The Journal of Immunology*, 148(3):772–777, 1992.

- [108] A. S. Kirshenbaum, J. Goff, S. Dreskin, A. Irani, L. Schwartz, and D. Metcalfe. Il-3-dependent growth of basophil-like cells and mastlike cells from human bone marrow. *The Journal of Immunology*, 142(7):2424–2429, 1989.
- [109] H. Kitano. Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11):826–837, 2004.
- [110] E. Kolaczkowska and P. Kubes. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3):159–175, 2013.
- [111] M. Kondo, I. L. Weissman, and K. Akashi. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5):661–672, 1997.
- [112] M. Kopf, F. Brombacher, P. D. Hodgkin, A. J. Ramsay, E. A. Milbourne, W. J. Dai, K. S. Ovington, C. A. Behm, G. Köhler, I. G. Young, et al. Il-5-deficient mice have a developmental defect in cd5+ b-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic t cell responses. *Immunity*, 4(1):15–24, 1996.
- [113] J. Krumsiek, C. Marr, T. Schroeder, and F. J. Theis. Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network. *PLoS one*, 6(8):e22649, 2011.
- [114] T. Kummalu and A. D. Friedman. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/ebp $\alpha$  binds and activates the promoter of the pu. 1 gene. *Journal of leukocyte biology*, 74(3):464–470, 2003.
- [115] E. Lach-Trifilieff, K. Menear, E. Schweighoffer, V. L. Tybulewicz, and C. Walker. Syk-deficient eosinophils show normal interleukin-5-mediated differentiation, maturation, and survival but no longer respond to fc $\gamma$ r activation. *Blood*, 96(7):2506–2510, 2000.
- [116] U. Lakshmipathy and C. Verfaillie. Stem cell plasticity. *Blood reviews*, 19(1):29–38, 2005.
- [117] P. Laslo, C. J. Spooner, A. Warmflash, D. W. Lancki, H.-J. Lee, R. Sciammas, B. N. Gantner, A. R. Dinner, and H. Singh. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, 126(4):755–766, 2006.
- [118] N. Le Novère. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nature Reviews Genetics*, 16(3):146–158, 2015.
- [119] M. Leddin, C. Perrod, M. Hoogenkamp, S. Ghani, S. Assi, S. Heinz, N. K. Wilson, G. Follows, J. Schönheit, L. Vockentanz, A. M. Mosammam, W. Chen, D. G. Tenen, D. R. Westhead, B. Göttgens, C. Bonifer, and F. Rosenbauer. Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood*, 117(10):2827–38, mar 2011.
- [120] Y.-N. Lee, S. Brandal, P. Noel, E. Wentzel, J. T. Mendell, M. a. McDevitt, R. Kapur, M. Carter, D. D. Metcalfe, and C. M. Takemoto. KIT signaling regulates MITF expression through miRNAs in normal and malignant mast cell proliferation. *Blood*, 117(13):3629–40, mar 2011.
- [121] O. Levy. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(5):909–925, aug 2004.

- [122] Y. Li, X. Qi, B. Liu, and H. Huang. The *stat5-gata2* pathway is critical in basophil and mast cell differentiation and maintenance. *The Journal of Immunology*, 194(9):4328–4338, 2015.
- [123] M. R. Lidonnici, A. Audia, A. R. Soliera, M. Prisco, G. Ferrari-Amorotti, T. Waldron, N. Donato, Y. Zhang, R. V. Martinez, T. L. Holyoake, et al. Expression of the transcriptional repressor *gfi-1* is regulated by *c/ebp $\alpha$*  and is involved in its proliferation and colony formation-inhibitory effects in p210bcr/abl-expressing cells. *Cancer research*, 70(20):7949–7959, 2010.
- [124] G. Lieschke, D. Grail, G. Hodgson, D. Metcalf, E. Stanley, C. Cheers, K. Fowler, S. Basu, Y. F. Zhan, and A. Dunn. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6):1737–1746, 1994.
- [125] Y. K. Lieu and E. P. Reddy. Conditional *c-myb* knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51):21689–21694, 2009.
- [126] Q. Liu and F. Dong. *Gfi-1* inhibits the expression of eosinophil major basic protein (MBP) during G-CSF-induced neutrophilic differentiation. *International Journal of Hematology*, 95(6):640–647, jun 2012.
- [127] O. Ma, S. Hong, H. Guo, G. Ghiaur, and A. D. Friedman. Granulopoiesis requires increased *C/EBP $\alpha$*  compared to monoipoiesis, correlated with elevated *Cebpa* in immature G-CSF receptor versus M-CSF receptor expressing cells. *PLoS one*, 9(4):e95784, 2014.
- [128] K. Maeda, C. Nishiyama, H. Ogawa, and K. Okumura. *GATA2* and *Sp1* positively regulate the *c-kit* promoter in mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(7):4252–60, oct 2010.
- [129] K. Maeda, C. Nishiyama, T. Tokura, Y. Akizawa, M. Nishiyama, H. Ogawa, K. Okumura, and C. Ra. Regulation of Cell Type-Specific Mouse Fc RI -Chain Gene Expression by *GATA-1* Via Four *GATA* Motifs in the Promoter. *The Journal of Immunology*, 170(1):334–340, jan 2003.
- [130] M. G. Manz, D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, and K. Akashi. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97(11):3333–3341, 2001.
- [131] E. Marco, R. L. Karp, G. Guo, P. Robson, A. H. Hart, L. Trippa, and G.-C. Yuan. Bifurcation analysis of single-cell gene expression data reveals epigenetic landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52):E5643–E5650, 2014.
- [132] M. E. Martinez-Sanchez, L. Mendoza, C. Villarreal, and E. R. Alvarez-Buylla. A Minimal Regulatory Network of Extrinsic and Intrinsic Factors Recovers Observed Patterns of CD4+ T Cell Differentiation and Plasticity. *PLOS Computational Biology*, 11(6):e1004324, jun 2015.

- [133] M. L. Martowicz, J. A. Grass, M. E. Boyer, H. Guend, and E. H. Bresnick. Dynamic gata factor interplay at a multicomponent regulatory region of the gata-2 locus. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3):1724–1732, 2005.
- [134] S. R. McKercher, B. E. Torbett, K. L. Anderson, G. W. Henkel, D. J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A. J. Feeney, G. E. Wu, C. J. Paige, et al. Targeted disruption of the pu. 1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal*, 15(20):5647, 1996.
- [135] A. Méndez and L. Mendoza. A Network Model to Describe the Terminal Differentiation of B Cells. pages 1–26, 2016.
- [136] L. Mendoza. A network model for the control of the differentiation process in th cells. *Biosystems*, 84(2):101–114, 2006.
- [137] L. Mendoza and E. R. Alvarez-Buylla. Dynamics of the genetic regulatory network for arabidopsis thaliana flower morphogenesis. *Journal of theoretical biology*, 193(2):307–319, 1998.
- [138] L. Mendoza and A. Méndez. A dynamical model of the regulatory network controlling lymphopoiesis. *Biosystems*, 137:26–33, 2015.
- [139] L. Mendoza and I. Xenarios. A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3(1):13, 2006.
- [140] A. R. Migliaccio, R. A. Rana, M. Sanchez, R. Lorenzini, L. Centurione, L. Bianchi, A. M. Vannucchi, G. Migliaccio, and S. H. Orkin. Gata-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the gata-1<sup>low</sup> mouse mutant. *The Journal of experimental medicine*, 197(3):281–296, 2003.
- [141] I. Miyajima, L. Levitt, T. Hara, M. Bedell, N. Copeland, N. Jenkins, and A. Miyajima. The murine interleukin-3 receptor alpha subunit gene: chromosomal localization, genomic structure, and promoter function. *Blood*, 85(5):1246–1253, 1995.
- [142] T. Miyazaki, G. Suzuki, and K.-i. Yamamura. The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance. *International Immunology*, 5(9):1023–1033, 1993.
- [143] V. Moignard, I. C. Macaulay, G. Swiers, F. Buettner, J. Schütte, F. J. Calero-Nieto, S. Kinston, A. Joshi, R. Hannah, F. J. Theis, et al. Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. *Nature cell biology*, 15(4):363, 2013.
- [144] V. Moignard, S. Woodhouse, L. Haghverdi, A. J. Lilly, Y. Tanaka, A. C. Wilkinson, F. Buettner, I. C. Macaulay, W. Jawaid, E. Diamanti, et al. Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements. *Nature biotechnology*, 33(3):269–276, 2015.
- [145] V. Moignard, S. Woodhouse, L. Haghverdi, A. J. Lilly, Y. Tanaka, A. C. Wilkinson, F. Buettner, I. C. Macaulay, W. Jawaid, E. Diamanti, et al. Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements. *Nature biotechnology*, 33(3):269–276, 2015.

- [146] E. Morii, K. Oboki, T. R. Kataoka, K. Igarashi, and Y. Kitamura. Interaction and cooperation of mi transcription factor (MITF) and myc-associated zinc-finger protein-related factor (MAZR) for transcription of mouse mast cell protease 6 gene. *The Journal of biological chemistry*, 277(10):8566–71, mar 2002.
- [147] E. Morii, T. Tsujimura, T. Jippo, K. Hashimoto, K. Takebayashi, K. Tsujino, S. Nomura, M. Yamamoto, and Y. Kitamura. Regulation of mouse mast cell protease 6 gene expression by transcription factor encoded by the mi locus. *Blood*, 88(7):2488–94, oct 1996.
- [148] K. Mukai, M. J. BenBarak, M. Tachibana, K. Nishida, H. Karasuyama, I. Taniuchi, and S. J. Galli. Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood*, 120(1):76–85, jul 2012.
- [149] K. Mukai, M. J. BenBarak, M. Tachibana, K. Nishida, H. Karasuyama, I. Taniuchi, and S. J. Galli. Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood*, 120(1):76–85, 2012.
- [150] V. Munugalavada, L. C. Dore, B. L. Tan, L. Hong, M. Vishnu, M. J. Weiss, and R. Kapur. Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Molecular and cellular biology*, 25(15):6747–6759, 2005.
- [151] P. J. Murray and T. A. Wynn. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11):723–737, oct 2011.
- [152] A. Naldi, J. Carneiro, C. Chaouiya, and D. Thieffry. Diversity and plasticity of th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput Biol*, 6(9):e1000912, 2010.
- [153] J. Narula, C. Williams, A. Tiwari, J. Marks-Bluth, J. E. Pimanda, and O. A. Igoshin. Mathematical model of a gene regulatory network reconciles effects of genetic perturbations on hematopoietic stem cell emergence. *Developmental biology*, 379(2):258–269, 2013.
- [154] M. Naseem, N. Philippi, a. Hussain, G. Wangorsch, N. Ahmed, and T. Dandekar. Integrated Systems View on Networking by Hormones in Arabidopsis Immunity Reveals Multiple Crosstalk for Cytokinin. *The Plant Cell*, 24(5):1793–1814, 2012.
- [155] Y. Nei, K. Obata-Ninomiya, H. Tsutsui, K. Ishiwata, M. Miyasaka, K. Matsumoto, S. Nakae, H. Kanuka, N. Inase, and H. Karasuyama. Gata-1 regulates the generation and function of basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46):18620–18625, 2013.
- [156] D. R. Neill, S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464(7293):1367–1370, 2010.
- [157] R. Nishinakamura, A. Miyajima, P. J. Mee, V. Tybulewicz, and R. Murray. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood*, 88(7):2458–2464, 1996.



- [158] R. Nishinakamura, N. Nakayama, Y. Hirabayashi, T. Inoue, D. Aud, T. Mcneil, S. Azuma, S. Yoshida, Y. Toyoda, K.-i. Aral, et al. Mice deficient for the il-3/gm-csf/il-5  $\beta$ c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while  $\beta$ il3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity*, 2(3):211–222, 1995.
- [159] C. Nishiyama, M. Hasegawa, M. Nishiyama, K. Takahashi, Y. Akizawa, T. Yokota, K. Okumura, H. Ogawa, and C. Ra. Regulation of Human Fc RI -Chain Gene Expression by Multiple Transcription Factors. *The Journal of Immunology*, 168(9):4546–4552, may 2002.
- [160] C. Nishiyama, T. Ito, M. Nishiyama, S. Masaki, K. Maeda, N. Nakano, W. Ng, K. Fukuyama, M. Yamamoto, K. Okumura, et al. Gata-1 is required for expression of fc $\epsilon$ ri on mast cells: analysis of mast cells derived from gata-1 knockdown mouse bone marrow. *International immunology*, 17(7):847–856, 2005.
- [161] W. T. Nottingham, A. Jarratt, M. Burgess, C. L. Speck, J.-F. Cheng, S. Prabhakar, E. M. Rubin, P.-S. Li, J. Sloane-Stanley, J. Kong-A-San, and M. F. T. R. de Bruijn. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood*, 110(13):4188–97, dec 2007.
- [162] I. Nuchprayoon, C. P. Simkevich, M. Luo, A. D. Friedman, and A. G. Rosmarin. Gabp cooperates with c-myb and c/ebp to activate the neutrophil elastase promoter. *Blood*, 89(12):4546–4554, 1997.
- [163] M. Nykter, N. D. Price, M. Aldana, S. A. Ramsey, S. A. Kauffman, L. E. Hood, O. Yli-Harja, and I. Shmulevich. Gene expression dynamics in the macrophage exhibit criticality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6):1897–1900, 2008.
- [164] M. Oelgeschläger, I. Nuchprayoon, B. Lüscher, and A. D. Friedman. C/ebp, c-myb, and pu. 1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Molecular and cellular biology*, 16(9):4717–4725, 1996.
- [165] N. Ogata, Y. Kikuchi, T. Kouro, M. Tomonaga, and K. Takatsu. The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor. *International archives of allergy and immunology*, 114 Suppl:24–7, oct 1997.
- [166] S. Ogilvy, R. Ferreira, S. G. Piltz, J. M. Bowen, B. Göttgens, and A. R. Green. The SCL +40 enhancer targets the midbrain together with primitive and definitive hematopoiesis and is regulated by SCL and GATA proteins. *Molecular and cellular biology*, 27(20):7206–19, oct 2007.
- [167] K. Ohmori, Y. Luo, Y. Jia, J. Nishida, Z. Wang, K. D. Bunting, D. Wang, and H. Huang. Il-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *The Journal of Immunology*, 182(5):2835–2841, 2009.

- [168] S. Ohmori, J. Takai, Y. Ishijima, M. Suzuki, T. Moriguchi, S. Philipsen, M. Yamamoto, and K. Ohneda. Regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. *Molecular and cellular biology*, 32(23):4742–55, Dec. 2012.
- [169] C. Ohnmacht, C. Schwartz, M. Panzer, I. Schiedewitz, R. Naumann, and D. Voehringer. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity*, 33(3):364–74, sep 2010.
- [170] Y. Okuno, G. Huang, F. Rosenbauer, E. K. Evans, H. S. Radomska, H. Iwasaki, K. Akashi, F. Moreau-gachelin, Y. Li, P. Zhang, and B. Go. Potential Autoregulation of Transcription Factor PU.1 by an Upstream Regulatory Element. *Molecular Cell Biology*, 25(7):2832–2845, 2005.
- [171] M. C. Olson, E. W. Scott, A. A. Hack, G. H. Su, D. G. Tenen, H. Singh, and M. C. Simon. Pu.1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity*, 3(6):703–714, 1995.
- [172] S. H. Orkin and L. I. Zon. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4):631–44, feb 2008.
- [173] M. Osawa, K.-i. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single cd34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273(5272):242, 1996.
- [174] H. L. Pahl, R. J. Scheibe, D. E. Zhang, H. M. Chen, D. L. Galson, R. a. Maki, and D. G. Tenen. The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *The Journal of biological chemistry*, 268(7):5014–20, mar 1993.
- [175] E. Passegué, W. Jochum, A. Behrens, R. Ricci, and E. F. Wagner. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nature genetics*, 30(2):158–66, feb 2002.
- [176] F. Paul, Y. Arkin, A. Giladi, D. A. Jaitin, E. Kenigsberg, H. Keren-Shaul, D. Winter, D. Lara-Astiaso, M. Gury, A. Weiner, et al. Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors. *Cell*, 163(7):1663–1677, 2015.
- [177] B. Phung, J. Sun, A. Schepsky, E. Steingrimsson, and L. Rönnstrand. C-KIT signaling depends on microphthalmia-associated transcription factor for effects on cell proliferation. *PloS one*, 6(8):e24064, jan 2011.
- [178] X. Piao and A. Bernstein. A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells. *Blood*, 87(8):3117–3123, 1996.
- [179] F. J. Pixley. Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1. *International journal of cell biology*, 2012:501962, 2012.
- [180] X. Qi, J. Hong, L. Chaves, Y. Zhuang, Y. Chen, D. Wang, J. Chabon, B. Graham, K. Ohmori, Y. Li, and H. Huang. Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP $\alpha$  and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity*, 39(1):97–110, jul 2013.

- [181] Z. Qiu, K. D. Dyer, Z. Xie, M. Rådinger, and H. F. Rosenberg. GATA transcription factors regulate the expression of the human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) gene. *The Journal of biological chemistry*, 284(19):13099–109, May 2009.
- [182] H. S. Radomska, C. S. Huettner, P. Zhang, T. Cheng, D. T. Scadden, and D. G. Tenen. Ccaat/enhancer binding protein  $\alpha$  is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Molecular and cellular biology*, 18(7):4301–4314, 1998.
- [183] C. Ramírez and L. Mendoza. Phenotypic stability and plasticity in gmp-derived cells as determined by their underlying regulatory network. *Bioinformatics*, 34(7):1174–1182, 2017.
- [184] J. Rangatia, R. K. Vangala, N. Treiber, P. Zhang, H. Radomska, D. G. Tenen, W. Hiddemann, and G. Behre. Downregulation of c-jun expression by transcription factor c/ebp $\alpha$  is critical for granulocytic lineage commitment. *Molecular and cellular biology*, 22(24):8681–8694, 2002.
- [185] E. Ravasz, A. L. Somera, D. A. Mongru, Z. N. Oltvai, and A.-L. Barabási. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *science*, 297(5586):1551–1555, 2002.
- [186] J. C. Rieckmann, R. Geiger, D. Hornburg, T. Wolf, K. Kveler, D. Jarrossay, F. Salustio, S. S. Shen-Orr, A. Lanzavecchia, M. Mann, et al. Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. *Nature immunology*, 18(5):583, 2017.
- [187] L. Robb. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, 26(47):6715–23, 2007.
- [188] L. Robb, I. Lyons, R. Li, L. Hartley, F. Köntgen, R. P. Harvey, D. Metcalf, and C. G. Begley. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15):7075–7079, 1995.
- [189] G. J. Roboz and S. Rafii. Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. *Current opinion in hematology*, 6(3):164, 1999.
- [190] I. Roeder and I. Glauche. Towards an understanding of lineage specification in hematopoietic stem cells: a mathematical model for the interaction of transcription factors gata-1 and pu. 1. *Journal of Theoretical Biology*, 241(4):852–865, 2006.
- [191] H. F. Rosenberg, K. D. Dyer, and P. S. Foster. Eosinophils: Changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(1):9–22, 2013.
- [192] Y. E. Sanchez-Corrales, E. R. Alvarez-Buylla, and L. Mendoza. The Arabidopsis thaliana flower organ specification gene regulatory network determines a robust differentiation process. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3):971–983, 2010.
- [193] I. Sánchez-Osorio, C. A. Hernández-Martínez, and A. Martínez-Antonio. Modeling asymmetric cell division in caulobacter crescentus using a boolean logic approach. In *Asymmetric Cell Division in Development, Differentiation and Cancer*, pages 1–21. Springer, 2017.

- [194] E. W. Scott, M. C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. Requirement of transcription factor pu. 1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265(5178):1573–1577, 1994.
- [195] L. Scott, C. Civin, P. Rorth, and A. Friedman. A novel temporal expression pattern of three *c/ebp* family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*, 80(7):1725–1735, 1992.
- [196] J. Seita and I. L. Weissman. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(6):640–653, 2010.
- [197] T. Shen, S. Kim, J.-s. Do, L. Wang, C. Lantz, J. F. Urban, G. Le Gros, and B. Min. T cell-derived *il-3* plays key role in parasite infection-induced basophil production but is dispensable for in vivo basophil survival. *International immunology*, 20(9):1201–1209, 2008.
- [198] H. Shigematsu, B. Reizis, H. Iwasaki, S.-i. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi, and K. Akashi. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity*, 21(1):43–53, 2004.
- [199] R. A. Shivdasani and S. Orkin. The transcriptional control of hematopoiesis [see comments]. *Blood*, 87(10):4025–4039, 1996.
- [200] M. C. Siracusa, J. G. Perrigoue, M. R. Comeau, and D. Artis. New paradigms in basophil development, regulation and function. *Immunology and cell biology*, 88(3):275–84, 2010.
- [201] L. T. Smith, S. Hohaus, D. Gonzalez, S. Dziennis, and D. Tenen. Pu. 1 (*spi-1*) and *c/ebp alpha* regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*, 88(4):1234–1247, 1996.
- [202] C. L. Sokol and R. Medzhitov. Role of basophils in the initiation of Th2 responses. *Current opinion in immunology*, 22(1):73–7, feb 2010.
- [203] A. R. Soliera, M. R. Lidonnici, G. Ferrari-Amorotti, M. Prisco, Y. Zhang, R. V. Martinez, N. J. Donato, and B. Calabretta. Transcriptional repression of *c-myb* and *gata-2* is involved in the biologic effects of *c/ebpα* in p210bcr/abl-expressing cells. *Blood*, 112(5):1942–1950, 2008.
- [204] G. J. Spangrude, S. Heimfeld, I. L. Weissman, et al. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241(4861):58–62, 1988.
- [205] S. H. Strogatz. *Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. Westview press, 2014.
- [206] T. Suda, J. Suda, and M. Ogawa. Single-cell origin of mouse hemopoietic colonies expressing multiple lineages in variable combinations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(21):6689–6693, 1983.
- [207] B. M. Sullivan, H.-E. Liang, J. K. Bando, D. Wu, L. E. Cheng, J. K. McKerrow, C. D. C. Allen, and R. M. Locksley. Genetic analysis of basophil function in vivo. *Nature immunology*, 12(6):527–35, jun 2011.

- [208] C. Summers, S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*, 31(8):318–324, 2010.
- [209] D. Szklarczyk, A. Franceschini, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, P. Minguéz, T. Doerks, M. Stark, J. Muller, P. Bork, et al. The string database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research*, 39(suppl 1):D561–D568, 2011.
- [210] S. Takahashi, R. Shimizu, N. Suwabe, T. Kuroha, K. Yoh, J. Ohta, S. Nishimura, K.-C. Lim, J. D. Engel, and M. Yamamoto. Gata factor transgenes under gata-1 locus control rescue germline gata-1 mutant deficiencies. *Blood*, 96(3):910–916, 2000.
- [211] M. Takamoto and K. Sugane. Synergism of IL-3, IL-5, and GM-CSF on eosinophil differentiation and its application for an assay of murine IL-5 as an eosinophil differentiation factor. *Immunology letters*, 45(1-2):43–6, feb 1995.
- [212] R. Temple, E. Allen, J. Fordham, S. Phipps, H. C. Schneider, K. Lindauer, I. Hayes, J. Lockey, K. Pollock, and R. Jupp. Microarray analysis of eosinophils reveals a number of candidate survival and apoptosis genes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(4):425–33, Oct. 2001.
- [213] T. C. Theoharides, K.-D. Alysandratos, A. Angelidou, D.-A. Delivanis, N. Sismanopoulos, B. Zhang, S. Asadi, M. Vasiadi, Z. Weng, A. Miniati, et al. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(1):21–33, 2012.
- [214] N. Timchenko, D. R. Wilson, L. R. Taylor, S. Abdelsayed, M. Wilde, M. Sawadogo, and G. J. Darlington. Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Molecular and cellular biology*, 15(3):1192–202, mar 1995.
- [215] P. S. Tofts, T. Chevassut, M. Cutajar, N. G. Dowell, and A. M. Peters. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 117(22):6050–6052, 2011.
- [216] Q. Tong, J. Tsai, G. Tan, G. Dalgin, and G. S. Hotamisligil. Interaction between gata and the c/ebp family of transcription factors is critical in gata-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology*, 25(2):706–715, 2005.
- [217] T. Tripic, W. Deng, Y. Cheng, Y. Zhang, C. R. Vakoc, G. D. Gregory, R. C. Hardison, and G. A. Blobel. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood*, 113(10):2191–201, mar 2009.
- [218] F.-Y. Tsai and S. H. Orkin. Transcription factor gata-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, 89(10):3636–3643, 1997.
- [219] S.-F. Tsai, E. Strauss, and S. Orkin. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor gata-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes & Development*, 5(6):919–931, 1991.

- [220] S.-F. Tsai, E. Strauss, and S. Orkin. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor gata-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes & Development*, 5(6):919–931, 1991.
- [221] Y. Tsuda, H. Takahashi, M. Kobayashi, T. Hanafusa, D. N. Herndon, and F. Suzuki. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Immunity*, 21(2):215–226, 2004.
- [222] T. Tsujimura, E. Morii, M. Nozaki, K. Hashimoto, Y. Moriyama, K. Takebayashi, T. Kondo, Y. Kanakura, and Y. Kitamura. Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood*, 88(4):1225–33, aug 1996.
- [223] M. Urb and D. C. Sheppard. The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog*, 8(4):e1002619, 2012.
- [224] R. van Furth. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *Journal of Experimental Medicine*, 128(3):415–435, sep 1968.
- [225] C. S. Velu, A. M. Baktula, and H. L. Grimes. Gfi1 regulates mir-21 and mir-196b to control myelopoiesis. *Blood*, 113(19):4720–4728, 2009.
- [226] D. Voehringer. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature Reviews Immunology*, 13(5):362–375, 2013.
- [227] Q.-f. Wang and A. D. Friedman. Ccaat/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 99(8):2776–2785, 2002.
- [228] G. Xu, M. Nagano, R. Kanezaki, T. Toki, Y. Hayashi, T. Taketani, T. Taki, T. Mitui, K. Koike, K. Kato, et al. Frequent mutations in the gata-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of down syndrome. *Blood*, 102(8):2960–2968, 2003.
- [229] Y. Yamaguchi, T. Suda, S. Ohta, K. Tominaga, Y. Miura, and T. Kasahara. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood*, 78(10):2542–2547, 1991.
- [230] Y. Yamaguchi, T. Suda, J. Suda, M. Eguchi, Y. Miura, N. Harada, A. Tominaga, and K. Takatsu. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *The Journal of experimental medicine*, 167(1):43–56, 1988.
- [231] Z. Yang, T. Kondo, C. S. Voorhorst, S. C. Nabinger, L. Ndong, F. Yin, E. M. Chan, M. Yu, O. Würstlin, C. P. Kratz, et al. Increased c-jun expression and reduced gata2 expression promote aberrant monocytic differentiation induced by activating ptpn11 mutants. *Molecular and cellular biology*, 29(16):4376–4393, 2009.
- [232] T. Yoshida, K. Ikuta, H. Sugaya, K. Maki, M. Takagi, H. Kanazawa, S. Sunaga, T. Kinashi, K. Yoshimura, J.-i. Miyazaki, et al. Defective b-1 cell development and impaired immunity against *angiostrongylus cantonensis* in il-5 $\alpha$ -deficient mice. *Immunity*, 4(5):483–494, 1996.

- [233] C. Yu, A. B. Cantor, H. Yang, C. Browne, R. A. Wells, Y. Fujiwara, and S. H. Orkin. Targeted deletion of a high-affinity gata-binding site in the gata-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 195(11):1387–1395, 2002.
- [234] J. G. Zanudo and R. Albert. Cell fate reprogramming by control of intracellular network dynamics. *PLoS computational biology*, 11(4):e1004193, 2015.
- [235] D.-E. Zhang, P. Zhang, N.-d. Wang, C. J. Hetherington, G. J. Darlington, and D. G. Tenen. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in ccaat enhancer binding protein  $\alpha$ -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2):569–574, 1997.
- [236] P. Zhang, G. Behre, J. Pan, A. Iwama, N. Wara-Aswapati, H. S. Radomska, P. E. Auron, D. G. Tenen, and Z. Sun. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: Gata proteins repress pu. 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15):8705–8710, 1999.
- [237] P. Zhang, A. Iwama, M. W. Datta, G. J. Darlington, D. C. Link, and D. G. Tenen. Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor ccaat enhancer binding protein  $\alpha$  (c/ebp $\alpha$ ) is critical for granulopoiesis. *The Journal of experimental medicine*, 188(6):1173–1184, 1998.
- [238] P. Zhang, X. Zhang, A. Iwama, C. Yu, K. A. Smith, B. U. Mueller, S. Narravula, B. E. Torbett, S. H. Orkin, and D. G. Tenen. Pu. 1 inhibits gata-1 function and erythroid differentiation by blocking gata-1 dna binding. *Blood*, 96(8):2641–2648, 2000.
- [239] Q. Zhang, Y. Xue, and Y. Song. [Expressions of cellular M-CSF and M-CSFR in hematopoietic cells]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*, 20(5):249–51, may 1999.
- [240] S.-J. Zhang, L.-Y. Ma, Q.-H. Huang, G. Li, B.-W. Gu, X.-D. Gao, J.-Y. Shi, Y.-Y. Wang, L. Gao, X. Cai, et al. Gain-of-function mutation of gata-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6):2076–2081, 2008.
- [241] L. I. Zon, M. F. Gurish, R. L. Stevens, C. Mather, D. S. Reynolds, K. F. Austen, and S. H. Orkin. GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *The Journal of biological chemistry*, 266(34):22948–53, dec 1991.
- [242] D. Zucker-Franklin. Ultrastructural evidence for the common origin of human mast cells and basophils. *Blood*, 56(3):534–40, sep 1980.

# Index

Atractor, 21  
Atractores, 41

Basófilos, 13

Células cebadas, 13  
Células linfoides, 8  
Células troncales hematopoyéticas, 8  
Cuenca de atracción, 21

Distancia de Hamming, 33

Eosinófilos, 13  
Eritrocitos, 8

Factores de transcripción, 10, 16

Granulocitos-Monocitos, 11

Mastocitos, 13  
Megacariocitos, 8  
modelo NK, 21  
Monocitos, 11  
Multipotencia, 8

Neutrófilos, 12

perturbación, 32  
Predecesor, 20  
Progenitores de Granulocitos-Monocitos, 11

Redes Booleanas, 19  
Redes de Regulación Booleanas, 21, 22  
robustez, 32

Sucesor, 20



Systems biology

# Phenotypic stability and plasticity in GMP-derived cells as determined by their underlying regulatory network

Carlos Ramírez<sup>1,2</sup> and Luis Mendoza<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx., CP04510, México

\*To whom correspondence should be addressed.

Associate Editor: Alfonso Valencia

Received on February 17, 2017; revised on October 22, 2017; editorial decision on November 11, 2017; accepted on November 23, 2017

## Abstract

**Motivation:** Blood cell formation has been recognized as a suitable system to study cellular differentiation mainly because of its experimental accessibility, and because it shows characteristics such as hierarchical and gradual bifurcated patterns of commitment, which are present in several developmental processes. Although hematopoiesis has been extensively studied and there is a wealth of molecular and cellular data about it, it is not clear how the underlying molecular regulatory networks define or restrict cellular differentiation processes. Here, we infer the molecular regulatory network that controls the differentiation of a blood cell subpopulation derived from the granulocyte-monocyte precursor (GMP), comprising monocytes, neutrophils, eosinophils, basophils and mast cells.

**Results:** We integrate published qualitative experimental data into a model to describe temporal expression patterns observed in GMP-derived cells. The model is implemented as a Boolean network, and its dynamical behavior is studied. Steady states of the network can be clearly identified with the expression profiles of monocytes, mast cells, neutrophils, basophils, and eosinophils, under wild-type and mutant backgrounds.

**Availability and implementation:** All scripts are publicly available at <https://github.com/caramirezal/RegulatoryNetworkGMPModel>

**Contact:** [lmendoza@biomedicas.unam.mx](mailto:lmendoza@biomedicas.unam.mx)

**Supplementary information:** [Supplementary data](#) are available at *Bioinformatics* online.

## 1 Introduction

A major issue in biology is to explain how specific temporal expression patterns observed in cells arise during differentiation. Blood cell formation, or hematopoiesis, is an excellent experimental model system to study differentiation processes (Doulatov *et al.*, 2012). There is a wealth of molecular and cellular data regarding hematopoiesis, and thus we face the task of integrating such information into coherent and predictive models. In particular, network modeling has been successfully used to integrate qualitative data to explain the appearance, stability, heterogeneity and plasticity of specific expression profiles in blood cell subpopulations (Bonzanni *et al.*, 2013; Collombet *et al.*, 2017; Martinez-

Sanchez *et al.*, 2015; Méndez and Mendoza, 2016; Mendoza, 2006; Naldi *et al.*, 2010).

In mice, the subpopulation known as the granulocyte-monocyte precursor (GMP) is comprised by cells with the profile  $\text{Lin}^- \text{Sca}^- \text{CD34}^+ \text{c-KIT}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^+$ , having the potential to give rise to neutrophils ( $\text{MPO}^+ \text{NE}^+ \text{LF}^+$ ), eosinophils ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+ \text{CCR3}^+ \text{c-KIT}^-$ ), basophils ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+ \text{CD11b}^+ \text{c-KIT}^-$ ), mast cells ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+ \text{MMCP6}^+ \text{c-KIT}^+$ ), and monocytes ( $\text{M-CSFR}^+$ ) (Akashi *et al.*, 2000). These cells play important roles in inflammation processes, allergic reactions, and immune responses against a wide range of pathogens (Galli *et al.*, 2011). Neutrophils and monocytes are important innate immune cell effectors because they can ingest and kill possible dangerous microorganisms, processing antigens to help mounting memory

immune responses (Dale *et al.*, 2008). Eosinophils, basophils, and mast cells are necessary for the clearance of multicellular parasites (Stone *et al.*, 2010). Finally, mast cells and basophils have clinical importance due to their predominance in the regulation of allergic reactions (Sawaguchi *et al.*, 2012).

The differentiation of GMP-derived cells is regulated by key regulatory molecules. Specifically, the transcription factors (TFs) C/EBP $\alpha$  and PU.1 are necessary for proper maturation of GMP-derived lineages (Heath *et al.*, 2004; McKercher *et al.*, 1996), while GATA-1/2 and MITF-1 are crucial for the formation of eosinophils, basophils, and mast cells (Iwasaki *et al.*, 2006; Migliaccio *et al.*, 2003; Nei *et al.*, 2013). Although it is known that these TFs, as well as other molecules, are necessary for the correct differentiation of all GMP-derived cells, there is no consensus on how these molecules determine the developmental programs for each lineage.

Previous works have implemented regulatory network models to describe the general expression patterns of monocytes and granulocytes (Krumsek *et al.*, 2011; Laslo *et al.*, 2006). However, such models are not able to describe the expression profiles observed in granulocyte subpopulations such as eosinophils, basophils and mast cells. In this work we present a regulatory network model inferred from experimental murine systems that is able to determine the basic qualitative molecular patterns of expression observed in GMP-derived cells, as well as showing plasticity.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Molecular basis of the regulatory network

For the reconstruction of the regulatory network we used a bottom-up approach, identifying regulatory interactions with an extensive literature search, as well as following annotations found in STRING, NetPath, and DAVID (Huang *et al.*, 2009; Kandasamy *et al.*, 2010; Szklarczyk *et al.*, 2011). The molecular information was mostly obtained from mice, except in cases where it is explicitly stated otherwise. We manually curated all interactions to avoid the introduction of weakly supported regulatory interactions.

We wanted to assess if a regulatory network module comprised of key elements was enough to describe the temporal patterns of activation observed during GMP differentiation. Hence, we constructed the regulatory network in two phases. In the first phase we only take into account direct, well supported interactions. Specifically, we considered regulatory interactions satisfying at least one of the following criteria: (i) corroborated by different molecular biology techniques; (ii) tested in different cell systems; or (iii) reproduced by different groups. These regulatory interactions are compiled in Supplementary Table S1, defining the network shown as Supplementary Figure S1. Furthermore, the inferred regulatory rules are shown in Supplementary Table S2. In the second phase, we considered interactions for which there is indirect evidence, and we also added some proposed interactions. The resulting network is shown in Figure 1, based upon the interactions presented in Supplementary Table S3. The logical rules for this second version model are given in Supplementary Table S4. The information used to reconstruct the regulatory network is briefly summarized in the following paragraphs. Furthermore, the reader may find a table containing more detailed information regarding each regulatory interaction in the Supplementary Material.

C/EBP $\alpha$  positively regulates PU.1, GFI-1, and itself (Laslo *et al.*, 2006; Lidonici *et al.*, 2010; Timchenko *et al.*, 1995). In combination, these TFs are able to activate neutrophil markers such as lactoferrin (LF), myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE)

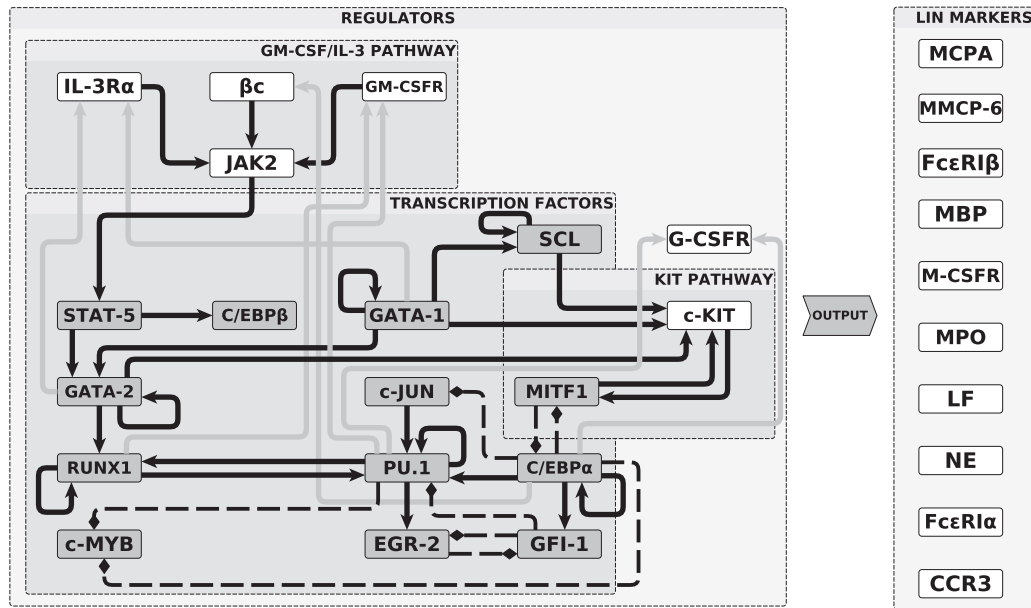
(Ford *et al.*, 1996; Khanna-gupta *et al.*, 2000; Oelgeschläger *et al.*, 1996). Furthermore, simultaneous expression of C/EBP $\alpha$ , PU.1, RUNX-1 and EGR-2 induce monocyte lineage determination by targeting monocyte markers (Behre *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2011; Laslo *et al.*, 2006). GFI-1 and EGR-2 regulate the reinforcement of commitment in the monocyte versus granulocyte decision, respectively (Laslo *et al.*, 2006); this effect is carried out by direct mutual inhibition. Additionally, GFI-1 has been shown to downregulate PU.1 during G-CSFR treatment of multipotential hematopoietic cells to skew neutrophil formation (Dahl *et al.*, 2007). The cell surface marker GM-CSFR $\alpha$  is upregulated by PU.1 and RUNX-1 in both monocyte and granulocytes (Hu *et al.*, 2011; Pahl *et al.*, 1993).

GATA-1/2, PU.1 along with C/EBP $\alpha$  expression are related to eosinophil and basophil formation (Iwasaki *et al.*, 2006). Eosinophil markers are positively regulated by C/EBP $\alpha/\epsilon$ , PU.1, GATA-1/2 and c-JUN (Du *et al.*, 2002; Nishiyama *et al.*, 2002). The regulation of the eosinophil marker MBP by C/EBP $\alpha/\beta$ , PU.1, and GATA-1, have been consistently observed in humans (Du *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 1998, 1999). Furthermore, a regulatory sequence of the MBP gene has conserved-binding sites for these three factors (Gombart *et al.*, 2003). Therefore, it seems very likely that these interactions are also present in mice. Additionally, forced expression of C/EBP $\alpha$  and GATA-2 in GMP mice cells increases MBP mRNA production (Iwasaki *et al.*, 2006).

TF autoregulation is a frequent feature in this regulatory network. In particular, C/EBP $\alpha$ , GATA-1, GATA-2, PU.1, RUNX-1 and SCL present self-activation (Christy *et al.*, 1991; Grass *et al.*, 2003; Leddin *et al.*, 2011; Martowicz *et al.*, 2005; Nottingham *et al.*, 2007; Okuno *et al.*, 2005; Tsai and Orkin, 1997).

There is contradictory evidence regarding the regulation of GATA-2 by GATA-1. Specifically, GATA-1 and GATA-2 are coexpressed in GMP cells in mice and humans (Hirasawa *et al.*, 2002; Moignard *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2009), suggesting a positive regulatory interaction. However, it has been shown in an erythroid context that GATA-2 is inhibited by GATA-1 (Grass *et al.*, 2003; Martowicz *et al.*, 2005). This could be explained by the fact that the regulation of GATA factors is different in granulocyte and erythroid cells (Ohmori *et al.*, 2012). Given that our model tries to reflect the molecular context of GMP cells, we incorporated to the model a positive regulatory interaction from GATA-1 to -2.

Basophil specification is poorly characterized (Dahlin and Hallgren, 2014). It is known that C/EBP $\alpha$  activation in a bipotential progenitor (which gives rise to mast cells and basophils) favors basophil formation (Ariobu *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2013). GATA-2 has been proposed as a critical marker of basophil formation in humans and mice (Baba *et al.*, 2012; Iwasaki *et al.*, 2006; Ohmori *et al.*, 2015). In fact, some basophil subpopulations express GATA-2 and low levels of GATA-1 as observed by northern blot assays (Zon *et al.*, 1993), and recently in single cell transcriptomic analysis (Paul *et al.*, 2015). The temporal order of expression of C/EBP $\alpha$  and GATA-2 factors has also been proposed to determine basophil formation, but the molecular mechanism underlying this phenomenon is not known (Iwasaki *et al.*, 2006). RUNX-1 is recognized as an important factor for basophil development, because RUNX-1 null mutants have reduced numbers of these cells (Mukai *et al.*, 2012). In the case of mast cells, the activation of cell markers such as c-KIT, MMCP6, and MMCPA, requires MITF-1 expression (Morii *et al.*, 1996; Phung *et al.*, 2011). Additionally, GATA-1 is able to promote c-KIT, but only in combination with SCL (Munugalavadla *et al.*, 2005; Tripic *et al.*, 2009). MITF-1 and C/EBP $\alpha$  directly inhibit the expression of each other, and their expression favor mast cell or basophil formation, respectively (Qi *et al.*, 2013).



**Fig. 1.** The Regulatory Network that controls the differentiation of GMP-derived cells. Continuous and discontinuous blunt arrows represent positive and negative regulatory interactions, respectively. Transcription factors are shown as gray nodes. Some interactions are shown as thick black arrows to highlight key regulatory circuits. For simplicity, the regulation of lineage markers are collectively represented as the output obtained from the dynamic of the network of regulators (see Section 3.1 for details, and [Supplementary Fig. S5](#) for the full network)

## 2.2 The network as a discrete dynamical system

We transformed the regulatory network into a dynamical system in the form of a Boolean network (BN), following standard procedures ([Abou-Jaoudé et al., 2016](#)). Briefly, each node in a BN is in one of two possible values: 0/OFF or 1/ON. The value of a node  $x_i$  is determined by a Boolean function  $f_i$  of the nodes regulating  $x_i$ :  $x_{i(t+1)} = f_i(x_1(t), \dots, x_k(t))$ ; where  $x_1(t), \dots, x_k(t)$  is the set of values of the  $k$  regulators of  $x_i$  at time  $t$ . The set of all  $f_i$ s of the BN model consisting of only direct interactions as well as the full BN model are shown in [Supplementary Tables S2 and S4](#), respectively. A detailed table with the description of the experimental findings underlying the Boolean functions of the models is in [Supplementary Material modelFunctions.csv](#). Additionally, the full set of equations is available as [Supplementary File GMPModel.sbml](#), in SBML qual format. The model is publicly available at <https://thecellcollective.org/#5705> ([Helikar et al., 2012](#)).

The vector  $(x_1, \dots, x_n)$  containing the state of activation of all nodes at a given time  $t$  is the network state. For  $n$  nodes, the state space is formed by  $2^n$  network states. We analyzed the behavior of the network by studying the dynamical behavior starting from all possible (i.e.  $2^{29} = 536, 870, 912$ ) initial states using asynchronous updating.

In addition to the wild-type behavior of the network, we also analyzed mutants and perturbations. The simulation of loss- and gain-of-function mutants in the model was performed by fixing node values to 0 or 1 throughout the simulation, respectively. To simulate possible transitions between steady states driven by deterministic perturbations, we flipped the value of a node and let the system evolve until it converged to an attractor. This procedure was repeated for each attractor in every node. Given that using asynchronous updating trajectories vary among simulations, we repeated the perturbation analysis 1000 times to obtain the statistical behavior.

For the simulation of the effect of fixed environments, some node values were kept constant. Since we were interested in finding the wild-type steady states that are preserved after the environment

conditions are switched, we used the wild-type attractors as initial states for the simulation of change in the environment.

Finally, we addressed whether each interaction in the network is necessary to recover the GMP patterns. We achieved this objective by systematically removing all interactions from the model, one at the time, finding the resulting steady states and comparing them with those of the original model.

## 3 Results and discussion

### 3.1 A regulatory network of direct interactions is not sufficient for recovering the main GMP-derived patterns

We started with a version of the network containing only well-documented direct interactions ([Supplementary Fig. S1](#) and [Supplementary Table S1](#)). Our purpose was to assess whether the regulatory network of TFs was able to determine the main expression patterns of GMP-derived cells, following the analysis carried out by ([Martinez-Sanchez et al., 2015](#)). We had to include, additionally to the TFs, markers of mature lineage patterns to give a biological interpretation of the steady states. Nonetheless, this small version containing only direct interactions was not able to recover all the patterns of GMP-derived cells. Specifically, basophil and monocyte patterns were not recovered ([Supplementary Fig. S2](#)). Instead, mixed patterns were found. The reason for this behavior is that this version of the model does not include sufficient nodes to discriminate among all granulocytes. Specifically, the profile of basophils is  $Fc\epsilon RI\alpha^+ CD11b^+ c-KIT^-$ , and the absence of CD11b in the network would require to identify basophils by the  $Fc\epsilon RI\alpha^+ c-KIT^-$  molecular signature. However, this is not sufficient because such patterns are also observed in eosinophils ([Akashi et al., 2000](#)).

As a next step we added interactions which have been inferred from epistatic experiments, and thus might not be direct regulatory interactions. Specifically,  $C/EBP\alpha$  suppresses the protein expression of  $c-MYB$  ([Soliera et al., 2008](#)).  $EGR-2$  downregulates LF, since the

expression of a shRNA that targets EGR-2 causes LF induction as evaluated by RT-PCR (Laslo *et al.*, 2006).

The following interactions were reported in human cell models. C/EBP $\alpha$  and PU.1 activate the G-CSFR gene promoter (Radomska *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1996). GFI-1 inhibits MBP expression during G-CSFR stimulation of granulocytes (Liu and Dong, 2012). C/EBP $\alpha$  and PU.1 synergistically activate the  $\beta$ c gene promoter.

In the first version of the network we could not associate any steady state to basophil lineages, thus we needed to add more markers associated with this lineage. Thus, we added CCR3, IL-3R $\alpha$ , and used as basophil signature the experimentally observed profile expression IL-3R $\alpha^+$ , CCR3 $-$  along with GATA-2 $^+$ , C/EBP $\alpha^+$ , and RUNX-1 transcriptions factors. CCR3 is an important eosinophil marker not expressed in basophils, which is activated by GATA-1, PU.1 and RUNX-1 (Kim *et al.*, 2010).

IL-3, IL-5 and GM-CSFR are important cytokines for eosinophil, basophil, and mast cell formation. In mice, IL-5R $\alpha$  skews eosinophil formation, while IL-3R $\alpha$  promotes basophil and mast cell proliferation (Ohmori *et al.*, 2009; Roboz and Rafii, 1999). The receptors of these cytokines are related because they share a common  $\beta$  chain ( $\beta$ c) subunit that activates the JAK-STAT pathway (Hercus *et al.*, 2013). Of these, only IL-3R $\alpha$  is known to signal the core of TFs of the network, activating GATA-2 or C/EBP $\beta$  gene via JAK2-STAT5 transducers (Li *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2003).

Finally, we propose some interactions. Specifically, we added a GATA-1/2 positive regulation to IL-3R $\alpha$  based in the fact that the IL3-R $\alpha$  gene promoter region has potential-binding sites for GATA factors (Miyajima *et al.*, 1995). KIT signaling by MITF-1 and c-KIT could be important for MCCA expression since c-KIT null mutation cause downregulation of this marker Ishijima *et al.* (2012). We also assumed a negative regulation of EGR-2 on MPO and NE neutrophil markers, since this regulator has been reported to globally turn down the granulocyte gene expression program (Laslo *et al.*, 2006). GATA factors favor eosinophil, basophil and mast cell formation when they are transduced into GMP cells, decreasing neutrophil and monocyte markers expression (Iwasaki *et al.*, 2006). Hence, we assumed that GATA-1 and -2 downregulate neutrophil markers such as MPO, NE and LF. Readers may find more details on the proposed functions in the [Supplementary Material modelFunctions.csv](#).

### 3.2 The regulatory network

The final network comprises 29 nodes and 83 regulatory interactions among them, as shown in abbreviated form in Figure 1 and shown in full in the [Supplementary Figure S5](#). Only 19 nodes are regulators (Fig. 1, left) and the rest are lineage markers (Fig. 1, right). Although the markers are not important for the dynamics of the model, they are important to associate steady-state patterns to GMP phenotypes.

The network consist of a core of TFs made of RUNX1, MITF-1, c-JUN, c-MYB, GATA-1, GATA-2, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , SCL, GFI-1, PU.1, STAT5 and EGR-2. Subsets of this module have been previously studied in Krumsiek *et al.* (2011) and Laslo *et al.* (2006). We included MITF-1, an important transducer of the c-KIT pathway. A negative regulatory feedback is formed between C/EBP $\alpha$  and MITF-1. This circuit is important to determine basophil versus mast cell commitment Qiu *et al.* (2009). We also added part of the GM-CSF and IL-3 signaling pathways. These two routes share the  $\beta$ c subunit, JAK2 and STAT-5 transducers. STAT-5 positively regulates GATA-2 and C/EBP $\alpha$ . These interactions are important since they link the core of TF with extracellular IL-3 and GM-CSFR pathways.

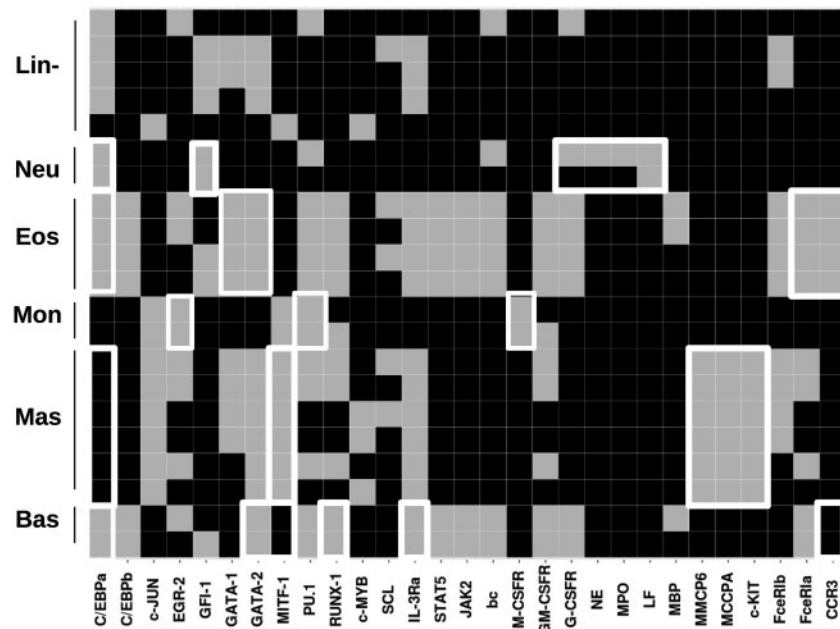
### 3.3 The steady states of the BN match expression patterns found in GMP-derived cells

We explored the state space of the network as a dynamical system and found 22 fixed point steady states using asynchronous updating (Fig. 2). In addition, four cyclic attractors of length 2 were found when using synchronous updating simulation, characterized by alternative EGR-2 and GFI-1 expression (see the [Supplementary Material attractors.txt](#)). These cycles can be considered an artifact of the synchronous updating since they are not observed in asynchronous regime. Indeed, only fixed points attractors were found in the asynchronous exhaustive search. Fixed point attractors are the same in both updating schemes and they coincide with the steady states shown in Figure 2 (compare with the fixed points in [attractors.txt](#)). Therefore, we chose asynchronous updating for all simulations. Finally, since all steady states in this model are fixed points, we use the terms *attractor* and *steady state* interchangeably in the rest of this work (Boeing, 2016; Strogatz, 2014).

The steady states of the model can be grouped into classes, according to their associated cellular phenotype (see [Supplementary Table S5](#) and Fig. 2). The steady states that comprise the neutrophil class express C/EBP $\alpha$ , GFI-1, MPO, NE and LF (Egesten *et al.*, 1994; Laslo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2014). Monocyte steady states express PU.1, EGR-2, and M-CSFR (Laslo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2014). The eosinophil class is characterized by MBP, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ , CCR3, GATA-1/2, C/EBP $\alpha$  and PU.1 (Iwasaki *et al.*, 2005). The class of basophils expresses C/EBP $\alpha$ , GATA-2, RUNX-1, IL-3R $\alpha$  and Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  (Arinobu *et al.*, 2005; Mukai *et al.*, 2012). Finally, the mast cells class expresses c-KIT, MITF-1, MMCPA, MMCP6, IL-3R $\alpha$  and does not express C/EBP $\alpha$  (Arinobu *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2013). The above mentioned molecular signatures are highlighted in Figure 2 for each class.

GMP cells are Lin $^-$  Sca $^-$  CD34 $^+$ c-KIT $^+$ Fc $\gamma$ R $^+$  (Akashi *et al.*, 2000). Of these markers, only regulatory interactions of c-KIT are known. But since this molecule is also expressed in mast cells (Arinobu *et al.*, 2005), we could not use it as a unique pattern signature to identify the GMP class. However, we noted that Lin $^-$  steady states resemble immature subpopulations, as evidenced by their response to perturbations (see Section 3.5). Importantly, Lin $^-$  steady states do not have an activated c-KIT although GMP subpopulations do. This difference could be attributed to the nature of the Boolean model. A node is in an "OFF" state to represent either total absence or low activity. Now, c-KIT is expressed at high levels only in mast cells (Arinobu *et al.*, 2005). Thus an inactive c-KIT node in Lin $^-$  steady states means that the expression of c-KIT is low; namely, below a certain arbitrary threshold. Furthermore, C/EBP $\alpha$  is present in GMPs (Arinobu *et al.*, 2005; Iwasaki *et al.*, 2006), and is a negative regulator of c-KIT; thus keeping c-KIT at low levels. Low expression of c-KIT in GMP cells are also observed in single cell transcriptomic measures when compared with HSC and erythroid progenitors (Moignard *et al.*, 2013). Another interesting expression pattern is that of MBP node, which is traditionally thought as a protein maker of mature eosinophil cells (Hirasawa *et al.*, 2002). However, MBP can be expressed in basophils progenitors in mice (Arinobu *et al.*, 2005). This is consistent with MBP expression in eosinophil and basophil steady states of the model.

As stated in Section 2.1, there is contradictory evidence regarding the sign of the interaction of GATA-1 over GATA-2 (Grass *et al.*, 2003; Martowicz *et al.*, 2005). Although we decided to incorporate a positive interaction in our model, we explored the implications of using a negative interaction instead. We did this by using the following rule: GATA-2 = NOT GATA-1 AND (GATA-2 AND



**Fig. 2.** Steady states of the BN model. Active and inactive nodes are depicted as gray and black boxes, respectively. Steady states, shown in rows, are grouped in classes according to the cellular phenotype they represent, as explained in Section 3.2. Labels at the left indicate: lineage negative (Lin-), neutrophils (Neu), eosinophils (Eos), monocytes (Mon), mast cells (Mas), and basophils (Bas). Lineage signatures as given in [Supplementary Table S5](#) are highlighted using white borders

STAT-5). In this case, all GMP phenotypes are recovered (see [Supplementary Material attractors.csv](#)). However, in this variant of the model the expression of GATA-1 and GATA-2 is mutually exclusive, which is in direct contradiction with the experimental evidence ([Moignard et al., 2013](#); [Hirasawa et al., 2002](#); [Qiu et al., 2009](#)). Therefore, our model suggests that GATA-1 is a positive regulator of GATA-2.

It is important to note that some nodes show variability in steady states comprising a single class. Namely, the SCL TF has only been observed to be expressed in Granulocytes-Monocytes progenitors and mature mast cells ([Babina et al., 2005](#); [Dey et al., 2010](#)). Given the absence of known regulators of SCL, other than itself, it is possible that the variation of the state of this node among stationary states is due to missing regulatory interactions.

The expression of PU.1 has been linked to neutrophil maturation ([Anderson et al., 1998, 1999](#)). Hence, neutrophil steady states with an active PU.1 can be interpreted as mature neutrophil stages. This stage also presents an active LF node, which is a known secondary granule protein marker of neutrophil maturation ([Khanna-gupta et al., 2000](#)).

The four steady states associated to eosinophils vary in EGR-2, GFI-1 and MBP. In a single-cell transcriptomic study there was evidence of variability in GFI-1 levels ([Paul et al., 2015](#)). At the other hand, interleukin-5 stimulation has been observed to induce EGR-2 and MBP ([Byström et al., 2004](#); [Temple et al., 2001](#)). Therefore, steady states which have active EGR-2 and MBP, but inactive GFI-1 can be associated to stimulated eosinophil stages.

Variation of GM-CSFR node values in the monocyte class agrees with the fact that this receptor can be modulated by a wide variety of stimuli ([Cannistra et al., 1990](#)). Furthermore, our model describes variable levels of RUNX-1 in monocytes, which has been reported to be expressed in this lineage ([Paul et al., 2015](#)).

In the case of the mast cell class, a subpopulation of these cells expressing EGR-2 was observed when stimulated with IL-33 or

Ag-IgE cross-linking ([Chhiba et al., 2017](#)). In a similar study, individual mast cells progenitors were found to have higher levels of MCPPA with respect to mature cells ([Franco et al., 2010](#)). Interestingly, they found GFI-1 and GATA-2 invariably downregulated and upregulated, respectively; in agreement with the steady states of our model. Variability of GATA-1, RUNX-1, PU.1, c-MYB, GM-CSFR, FcεRI $\alpha$  and FcεRI $\beta$  in mast cells requires further assessment.

Regarding the set of steady states associated to basophils, there is a variation in the states of EGR-2 and MBP. Of these, only EGR-2 has been found to be modulated in these cells by Ag-IgE stimulation ([Chhiba et al., 2017](#)).

Single-cell gene expression experiments have found variability in GATA-1, GATA-2, GFI-1, MITF-1 and SCL in GMPs ([Moignard et al., 2013](#)). This is in agreement with the variability in the steady states of our model. However, in the same study RUNX-1 and PU.1 were uniformly expressed in GMPs, which do not agree with our model, suggesting the possibility of missing interactions.

### 3.4 Analysis of mutants and perturbations

We simulated all the loss- and gain-of-function single mutants in the network (see [Supplementary Material attractors.txt](#)), and compared the obtained steady states with reported experimental results in the literature ([Supplementary Table S6](#)). The model qualitatively agrees with a series of experimentally described mutants. Specifically, there is no formation of granulocytes, but monocytes can be found in C/EBP $\alpha$  null mutant mice ([Zhang et al., 1997](#)). Donor liver progenitor cells from c-JUN mutant mice can reconstitute granulocytes of irradiated recipients ([Eferl et al., 1999](#)). GFI-1 mice mutants lack normal neutrophils ([Hock et al., 2003](#)). Monocytes can be derived from liver cells from GATA-2 $^{-/-}$  mice ([Tsai and Orkin, 1997](#)). EGR-2 has been reported to be part of an important regulatory circuit that determines monocyte versus neutrophil commitment experimentally. Note that in our mutant simulations monocytes' pattern is still

found in EGR-2 null mutants. This is in accordance with the observation that EGR-2<sup>+/-</sup> heterozygous mice have a skew to neutrophil differentiation, although they still have monocytes at lower levels (Laslo *et al.*, 2006).

There is a multiple deficiency in GMP-derived lineages in PU.1<sup>-/-</sup> mice (Olson *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1994). Mice heterozygous for the GATA-2 allele still produce monocytes (Tsai and Orkin, 1997). MITF and c-KIT null mutants have a deficiency of mast cell production (Grimbaldeston, 2005; Kim *et al.*, 1999). Finally, RUNX-1 mice mutants have no basophil development (Mukai *et al.*, 2012). IL-3 Receptor  $\alpha$  null mutants have normal hematopoiesis (Hara *et al.*, 1995). The same result is observed in  $\beta c$  mutants (Nishinakamura *et al.*, 1995). Contradictory results have been obtained while evaluating GATA-1<sup>-/-</sup> mutants (Dyer *et al.*, 2007; Hirasawa *et al.*, 2002). The model supports results from (Hirasawa *et al.*, 2002) who observed an eosinophil lineage-specific development deficiency.

There are also some mutant simulations that do not quite agree with experimental results, pointing to aspects of the network model to be improved. Specifically, SCL and c-MYB null mutants in the model recover all lineage steady states, but experimentally these null mutants are reported to have deficiencies in the production of some lineages (Lieu and Reddy, 2009; Robb *et al.*, 1995). c-MYB and SCL null mutants seem to cause deficiencies during early hematopoiesis stages, which is beyond the scope of this model bounded to the GMP differentiation process. Therefore, more complete models of hematopoiesis are necessary to recover these mutants. c-JUN model mutant does not reach the monocyte attractor, but the experimental mutants do (Eferl *et al.*, 1999). This can be explained by the fact that other TFs—like JUNB—not taken into account in this network are redundant to c-JUN in some contexts and can substitute its function *in vivo* (Passegué *et al.*, 2002). Thus, the JUN family of TFs and their regulation must be added in future versions of the model.

Experiments show that GATA-2 null mutants do not have mast cells (Tsai and Orkin, 1997), but the simulation of this mutant does (Supplementary Material *attractors.csv*, and Supplementary Table S6). This discrepancy might suggest a stronger positive dependency of GATA-2 on mast cells markers such as MMCPA or c-KIT, as has been suggested elsewhere (Maeda *et al.*, 2010; Zon *et al.*, 1991).

Finally, a systematic deletion of network interactions showed that 46 interactions in the network are necessary to maintain wild-type steady states (see the Supplementary Material *removed Interactions.csv*). We analyzed for each removed interaction the number of missing wild-type stationary states, and the total of missing GMP patterns, or classes. For example, deletion of the positive regulation of GATA-2 over M-CSFR causes the disappearance of three wild-type steady states, all belonging to only one GMP class. Removal of any of the other 37 interactions did not cause disappearance of any steady state with respect to the wild-type model. Therefore, we conclude that the model is relatively robust to the deletion of a single regulatory interaction.

### 3.5 Transitions between steady states resemble GMP-derived cells plasticity

We tested the transitions between steady states derived by single transient perturbations. Results are shown in the Supplementary Figure S3, and they are labeled with some of the node perturbations that cause the transition. A full list of perturbations is given in the Supplementary Material *steadyStateTransitions.csv*.

The following transitions observed in the model agree with experiments. As mentioned earlier, the Lin<sup>-</sup> steady states class has a pattern of transitions similar to GMP cells since it can give rise to

monocytes by PU.1 upregulation (Laslo *et al.*, 2006), neutrophils by increasing C/EBP $\alpha$  levels (Dahl *et al.*, 2007), basophil and eosinophils by IL-3 stimulation (Ohmori *et al.*, 2009; Takamoto and Sugane, 1995). Lastly, c-KIT or MITF-1 induction causes Lin<sup>-</sup> differentiation to mast cells (Tsai *et al.*, 1991). Interestingly, the transcriptional factor signature C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup>PU.1<sup>+</sup>GATA-1/2<sup>-</sup> is observed in GMP cells by western blot bulk assays, and also using single cell transcriptomics (Arinobu *et al.*, 2005; Iwasaki *et al.*, 2006; Moignard *et al.*, 2013). This molecular signature was found in one Lin<sup>-</sup> stationary state, which is shown as the first attractor in Figure 2, and is tagged as Lne (Lineage negative) in the Supplementary Material *steadyStatesTransitions.csv*. This attractor, when perturbed, can give rise to monocytes and granulocyte patterns but it can not transit to mast cells steady states (see transitions from the Lne steady state and compare it with those of Lne 1–4 steady states. This transition pattern is consistent with experimental evidence showing that mast cells are originated by non-GMP Lin<sup>-</sup> subpopulations (Chen *et al.*, 2005).

Traditionally, transitions between subpopulations were thought to be directional, from progenitors to more committed cells. However, in the last years there have been reports documenting transitions from mature lineages to less committed progenitors, or even between different lineages (DuPage and Bluestone, 2016; Graf, 2002). These transitions have been collectively called *plasticity* events. Nonetheless, a precise definition of the term is still lacking (Lakshminpathy and Verfaillie, 2005). In murine models, plasticity in GMP-derived cells has been observed. For example, monocyte committed leukemia cell lines can be forced to express erythroid markers (Yamaguchi *et al.*, 1998). In the context of regulatory network models, plasticity may be rigorously defined as a transition from one basin of attraction to another due to the effect of a perturbation in the system. Transitions between steady states from mature lineages to Lin<sup>-</sup> classes or between mature lineages patterns observed in the simulations (Supplementary Fig. S3) could correspond to potential plasticity predicted by the model as observed in other BRN models (Bonzanni *et al.*, 2013; Martinez-Sanchez *et al.*, 2015; Naldi *et al.*, 2010).

Extra- and intra-cellular environmental clues (such as cytokines and TFs) are important for guiding the type of cellular response (Doulatov *et al.*, 2012). Hence, we analyzed the change in steady-state patterns in response to different fixed extracellular environments defined as follows: pro neutrophil (C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> PU.1<sup>+</sup> G-CSFR<sup>+</sup>) (Laslo *et al.*, 2006), pro monocyte (C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> PU.1<sup>+</sup> M-CSFR<sup>+</sup>) (Laslo *et al.*, 2006), pro mast cell (IL-3R $\alpha$ <sup>-</sup> c-KIT<sup>+</sup>) (Dvorak *et al.*, 1994; Qi *et al.*, 2013), pro eosinophil (C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup>GATA-1<sup>+</sup>Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ <sup>+</sup>) (Iwasaki *et al.*, 2006) and pro basophil (C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup>GATA-2<sup>+</sup>RUNX-1<sup>+</sup>IL3R $\alpha$ <sup>+</sup>) (Qi *et al.*, 2013), see methods. We found that a fixed environment skews the appearance of molecular patterns to its expected phenotype (Supplementary Fig. S4). Additionally, we simulated the effect of certain intracellular states. In the absence of the main TFs expression only Lin<sup>-</sup> are found, but neutrophils and basophils are still found in the absence of cytokine receptors expression. This is in accordance with a permissive function for cytokines versus an instructive role for TFs as some reports have pointed out (Robb, 2007).

## 4 Conclusions

We used a BN model to test whether the available information regarding interactions of key elements of the network involved in GMP differentiation were sufficient to determine the expression

patterns observed in cells derived from the Granulocyte-Monocyte Progenitors. We found that a model containing only direct, well-recognized regulatory interactions was insufficient to recover the observed expression patterns. Nonetheless, we were able to infer a regulatory network that includes indirect experimental evidence that *does* recover the observed patterns in wild-type and mutant cells. Furthermore, by systematically perturbing the system we found complex patterns of transitions between steady states classes that can be associated to commitment transitions, as well as plasticity events observed in GMP-derived cells. Therefore, our model is a valuable tool for the elaboration of hypothesis regarding the existence, or not, of certain regulatory interactions. Indeed, our model provides experimentalist with a set of regulatory interactions that need to be further studied in the process of GMP differentiation.

## Acknowledgement

We want to thank Akram Méndez, and Mauricio Pérez for their valuable comments during the preparation of this manuscript. Carlos Ramírez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received the CONACYT studentship 444522. L.M. acknowledges the sabbatical scholarships from PASPA-DGAPA-UNAM and CONACYT. 251420.

*Conflict of Interest:* none declared.

## References

- Abou-Jaoudé, W. *et al.* (2016) Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Front. Genet.*, **7**, 94.
- Akashi, K. *et al.* (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, **404**, 193–197.
- Anderson, K.L. *et al.* (1998) Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood*, **92**, 1576–1585.
- Anderson, K.L. *et al.* (1999) PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood*, **94**, 2310–2318.
- Arinobu, Y. *et al.* (2005) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18105–18110.
- Baba, Y. *et al.* (2012) GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J. Biol. Chem.*, **287**, 32689–32696.
- Babina, M. *et al.* (2005) The transcription factor profile of human mast cells in comparison with monocytes and granulocytes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 214–226.
- Behre, G. *et al.* (1999) c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4939–4946.
- Boeing, G. (2016) Visual analysis of nonlinear dynamical systems: chaos, fractals, self-similarity and the limits of prediction. *Systems*, **4**, 37.
- Bonzanni, N. *et al.* (2013) Hard-wired heterogeneity in blood stem cells revealed using a dynamic regulatory network model. *Bioinformatics*, **29**, i80–i88.
- Byström, J. *et al.* (2003) Gene microarray analysis reveals interleukin-5-dependent transcriptional targets in mouse bone marrow. *Blood*, **103**, 868–877.
- Cannistra, S.A. *et al.* (1990) Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 93–97.
- Chen, C.-C. *et al.* (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11408–11413.
- Chhiba, K.D. *et al.* (2017) Transcriptional heterogeneity of mast cells and basophils upon activation. *J. Immunol.*, **198**, 4868–4878.
- Christy, R.J. *et al.* (1991) CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad USA*, **88**, 2593–2597.
- Collombet, S. *et al.* (2017) Logical modeling of lymphoid and myeloid cell specification and transdifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 5792–5799.
- Dahl, R. *et al.* (2007) The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.*, **282**, 6473–6483.
- Dahlin, J.S., and Hallgren, J. (2014) Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Mol. Immunol.*, **63**, 1–9.
- Dale, D.C. *et al.* (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, **112**, 935–945.
- Dey, S. *et al.* (2010) The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 2181–2192.
- Doulatov, S. *et al.* (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, **10**, 120–136.
- Du, J. *et al.* (2002) Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBP isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43481–43494.
- DuPage, M. and Bluestone, J.A. (2016) Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 149–163.
- Dvorak, A. M. *et al.* (1994) Effects of interleukin-3 with or without the c-kit ligand, stem cell factor, on the survival and cytoplasmic granule formation of mouse basophils and mast cells in vitro. *Am. J. Pathol.*, **144**, 160–170.
- Dyer, K.D. *et al.* (2007) Eosinophils from lineage-ablated dblGATA bone marrow progenitors: the dblGATA enhancer in the promoter of GATA-1 is not essential for differentiation ex vivo. *J. Immunol.*, **179**, 1693–1699.
- Eferl, R. *et al.* (1999) Functions of c-Jun in liver and heart development. *J. Cell Biol.*, **145**, 1049–1061.
- Egesten, A. *et al.* (1994) The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin g, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood*, **83**, 2985–2994.
- Ford, A.M. *et al.* (1996) Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins. **93**, 10838–10843.
- Franco, C.B. *et al.* (2010) Short article distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Stem Cell*, **6**, 361–368.
- Galli, S.J. *et al.* (2011) Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.*, **12**, 1035–1044.
- Gombart, A.F. *et al.* (2003) Regulation of neutrophil and eosinophil secondary granule gene expression by transcription factors C/EBP and PU. *Blood*, **101**, 3265–3273.
- Graf, T. (2002) Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*, **99**, 3089–3101.
- Grass, J. a. *et al.* (2003) GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8811–8816.
- Grimbaldeston, M.A. *et al.* (2005) Mast cell-deficient W-shash c-kit mutant KitW-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol.*, **167**, 835–848.
- Hara, T. *et al.* (1995) Interleukin-3 (IL-3) poor-responsive inbred mouse strains carry the identical deletion of a branch point in the IL-3 receptor. *Blood*, **3**, 2331–2336.
- Heath, V. *et al.* (2004) C/EBPalpha deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood*, **104**, 1639–1647.
- Helikar, T. *et al.* (2012) The Cell Collective: toward an open and collaborative approach to systems biology. *BMC Syst. Biol.*, **6**, 96.
- Hercus, T.R. *et al.* (2013) Signalling by the  $\beta$  family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **24**, 189–201.
- Hirasawa, R. *et al.* (2002) Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J. Exp. Med.*, **195**, 1379–1386.
- Hock, H. *et al.* (2003) Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity*, **18**, 109–120.
- Hu, Z. *et al.* (2011) RUNX1 regulates corepressor interactions of PU.1. *Blood*, **117**, 6498–6508.
- Huang, Z. *et al.* (2009) GATA-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of GATA-1 GATA-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of GATA-1. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5168–5180.

- Ishijima, Y. *et al.* (2012) GATA transcription factors are involved in IgE-dependent mast cell degranulation by enhancing the expression of phospholipase C-1. *Genes Cells* **17**, 285–301.
- Iwasaki, H. *et al.* (2005) Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J. Exp. Med.*, **201**, 1891–1897.
- Iwasaki, H. *et al.* (2006) The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev.* **20**, 3010–3021.
- Kandasamy, K. *et al.* (2010) NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways. *Genome Biol.*, **11**, R3.
- Khanna-Gupta, A. *et al.* (2000) Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation. **95**, 3734–3741.
- Kim, B.S. *et al.* (2010) The crucial role of GATA-1 in CCR3 gene transcription: modulated balance by multiple GATA elements in the CCR3 regulatory region. *J. Immunol.*, **185**, 6866–6875.
- Kim, D.-K. *et al.* (1999) Different effect of various mutant MITF encoded by mi, Mi(or), or Mi(wh) allele on phenotype of murine mast cells. *Blood*, **93**, 4179–4186.
- Krumsiek, J. *et al.* (2011) Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network. *PLoS One*, **6**, e22649.
- Lakshmipathy, U. and Verfaillie, C. (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev.*, **19**, 29–38.
- Laslo, P. *et al.* (2006) Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, **126**, 755–766.
- Leddin, M. *et al.* (2011) Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood*, **117**, 2827–2838.
- Li, Y. *et al.* (2015) The STAT5-GATA2 pathway is critical in basophil and mast cell differentiation and maintenance. *J. Immunol.*, **194**, 4328–4338.
- Lidonnici, M.R. *et al.* (2010) Expression of the transcriptional repressor Gfi-1 is regulated by C/EBP[alpha] and is involved in its proliferation and colony formation-inhibitory effects in p210BCR/ABL-expressing cells. *Cancer Res.*, **70**, 7949–7959.
- Lieu, Y.K. and Reddy, E.P. (2009) Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21689–21694.
- Liu, Q., and Dong, F. (2012) Gfi-1 inhibits the expression of eosinophil major basic protein (MBP) during G-CSF-induced neutrophilic differentiation. *Int. J. Hematol.*, **95**, 640–647.
- Ma, O. *et al.* (2014) Granulopoiesis requires increased C/EBP $\alpha$  compared to monopoiesis, correlated with elevated cebpa in immature G-CSF receptor versus M-CSF receptor expressing cells. *PLoS One*, **9**, e95784.
- Maeda, K. *et al.* (2010) GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J. Immunol.*, **185**, 4252–4260.
- Martinez-Sanchez, M.E. *et al.* (2015) A minimal regulatory network of extrinsic and intrinsic factors recovers observed patterns of CD4+ T cell differentiation and plasticity. *PLoS Comput. Biol.*, **11**, e1004324.
- Martowicz, M.L. *et al.* (2005) Dynamic GATA factor interplay at a multicomponent regulatory region of the GATA-2 locus. *J. Biol. Chem.*, **280**, 1724–1732.
- McKercher, S.R. *et al.* (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.*, **15**, 5647–5658.
- Méndez, A., and Mendoza, L. (2016) A network model to describe the terminal differentiation of B cells. *PLoS Comput. Biol.*, **12**, e1004696.
- Mendoza, L. (2006) A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Bio. Syst.*, **84**, 101–114.
- Migliaccio, A. R. *et al.* (2003) GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1low mouse mutant. *J. Exp. Med.*, **197**, 281–296.
- Miyajima, J. *et al.* (1995) The murine interleukin-3 receptor alpha subunit gene: chromosomal localization, genomic structure, and promoter function. *Blood*, **85**, 1246–1253.
- Moignard, V. *et al.* (2013) Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. *Nat. Cell Biol.*, **15**, 363–372.
- Morii, E. *et al.* (1996) Regulation of mouse mast cell protease 6 gene expression by transcription factor encoded by the mi locus. *Blood*, **88**, 2488–2494.
- Mukai, K. *et al.* (2012) Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood*, **120**, 76–85.
- Munugalavadda, V. *et al.* (2005) Repression of c-Kit and its downstream substrates by GATA-1 Inhibits Cell proliferation during erythroid maturation repression of c-Kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 6747–6759.
- Naldi, A. *et al.* (2010) Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000912.
- Nei, Y. *et al.* (2013) GATA-1 regulates the generation and function of basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1–6.
- Nishinakamura, R. *et al.* (1995) Mice deficient for the il-3/gm-csf/il-5  $\beta$ c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while  $\beta$ il3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity*, **2**, 211–222.
- Nishiyama, C. *et al.* (2002) Regulation of human Fc RI-chain gene expression by multiple transcription factors. *J. Immunol.*, **168**, 4546–4552.
- Nottingham, W.T. *et al.* (2007) Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood*, **110**, 4188–4197.
- Oelgeschlager, M. *et al.* (1996) C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4717–4725.
- Ohmori, K. *et al.* (2009) IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *J. Immunol.*, **182**, 2835–2841.
- Ohmori, S. *et al.* (2012) Regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. *Mol. Cell Biol.*, **32**, 4742–4755.
- Ohmori, S. *et al.* (2015) GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow. *Blood*, **125**, 3306–3315.
- Okuno, Y. *et al.* (2005) Potential autoregulation of transcription factor PU. 1 by an upstream regulatory element. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 2832–2845.
- Olson, M.C. *et al.* (1995) PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity*, **3**, 703–714.
- Pahl, H.L. *et al.* (1993) The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5014–5020.
- Passagué, E. *et al.* (2002) JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat. Genet.*, **30**, 158–166.
- Paul, F. *et al.* (2015) transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors. *Cell*, **163**, 1663–1677.
- Phung, B. *et al.* (2011) C-KIT signaling depends on microphthalmia-associated transcription factor for effects on cell proliferation. *PLoS One*, **6**, e24064.
- Qi, X. *et al.* (2013) Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP $\alpha$  and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity*, **39**, 97–110.
- Qiu, Z. *et al.* (2009) GATA transcription factors regulate the expression of the human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) gene. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13099–13109.
- Radomska, H.S. *et al.* (1998) CCAAT/Enhancer binding protein  $\alpha$  is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4301–4314.
- Robb, L. (2007) Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, **26**, 6715–6723.
- Robb, L. *et al.* (1995) Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7075–7079.
- Roboz, G.J., and Rafii, S. (1999) Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. *Curr. Opin. Hematol.*, **6**, 164–168.
- Sawaguchi, M. *et al.* (2012) Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.*, **188**, 1809–1818.
- Scott, E. *et al.* (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, **265**, 1573–1577.
- Smith, L.T. *et al.* (1996) PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*, **88**, 1234–1247.
- Soliera, A.R. *et al.* (2008) Transcriptional repression of c-Myb and GATA-2 is involved in the biologic effects of C/EBPalpha in p210BCR/ABL-expressing cells. *Blood*, **112**, 1942–1950.



- Stone, K.D. *et al.* (2010) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, S73–S80.
- Strogatz, S.H. (2014). *Nonlinear Dynamics and Chaos: With Applications to Physics, Biology, Chemistry, and Engineering*. Westview Press, USA.
- Szklarczyk, D. *et al.* (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D561–D568.
- Takamoto, M. and Sugane, K. (1995) Synergism of IL-3, IL-5, and GM-CSF on eosinophil differentiation and its application for an assay of murine IL-5 as an eosinophil differentiation factor. *Immunol. Lett.*, **45**, 43–46.
- Temple, R. *et al.* (2001) Microarray analysis of eosinophils reveals a number of candidate survival and apoptosis genes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **25**, 425–433.
- Timchenko, N. *et al.* (1995) Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1192–1202.
- Tripic, T. *et al.* (2009) SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood*, **113**, 2191–2201.
- Tsai, F.-Y. and Orkin, S.H. (1997) Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, **89**, 3636–3643.
- Tsai, M. *et al.* (1991) Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6382–6386.
- Xu, G. *et al.* (2003) Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*, **102**, 2960–2968.
- Yamaguchi, Y. *et al.* (1998) Mechanisms of transcription in eosinophils: GATA-1, but not GATA-2, transactivates the promoter of the eosinophil granule major basic protein gene. *Blood*, **91**, 3447–3458.
- Yamaguchi, Y. *et al.* (1999) C/EBPbeta and GATA-1 synergistically regulate activity of the eosinophil granule major basic protein promoter: implication for C/EBPbeta activity in eosinophil gene expression. *Blood*, **94**, 1429–1439.
- Zhang, D.E. *et al.* (1997) Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 569–574.
- Zon, L.I. *et al.* (1991) GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22948–22953.
- Zon, L.I. *et al.* (1993) Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*, **81**, 3234–3241.



# Chapter 9

## The SQUAD Method for the Qualitative Modeling of Regulatory Networks

Akram Méndez, Carlos Ramírez, Mauricio Pérez Martínez, and Luis Mendoza

### Abstract

The wealth of molecular information provided by high-throughput technologies has enhanced the efforts dedicated to the reconstruction of regulatory networks in diverse biological systems. This information, however, has proven to be insufficient for the construction of quantitative models due to the absence of sufficiently accurate measurements of kinetic constants. As a result, there have been efforts to develop methodologies that permit the use of qualitative information about patterns of expression to infer the regulatory networks that generate such patterns. One of these approaches is the SQUAD method, which approximates a Boolean network with the use of a set of ordinary differential equations. The main benefit of the SQUAD method over purely Boolean approaches is the possibility of evaluating the effect of continuous external signals, which are pervasive in biological phenomena. A brief description and code on how to implement this method can be found at the following link: <https://github.com/caramirezal/SQUADBookChapter>.

**Key words** Regulatory networks, Network modeling, Cell fate, Expression pattern

---

### 1 Introduction

One of the challenges in biology is to understand the relationship between genotype and phenotype. The phenotype of a cell emerges from the complex interactions between molecules, the genome, and environmental cues that act in a nonlinear manner. Understanding how these interactions act in concert to regulate cellular phenotypes requires an integrative view of the processes that control cell fate decisions. The advent of the “omics” era has contributed to the study of the genotype–phenotype relationship, as new molecular biology methods and high-throughput technologies allow the identification and mapping of an increasing number of molecules and their interactions, thus offering valuable information regarding the regulatory networks involved in biological processes.

Knowledge of the connectivity of regulatory networks, while valuable, only provides a static view of the complex spatiotemporal behavior observed in any biological phenomenon [1]. Therefore, it is necessary to develop and employ mathematical models to understand the functionality and dynamical properties of regulatory networks. This allows us to understand questions related to the number, nature, and stability of the possible patterns of activation, the role of specific molecules and interactions in the establishment of such patterns, as well as the effects of external stimuli or permanent perturbations such as gain- and loss-of-function mutations. This information could eventually be used to devise control mechanisms with the aim of driving the system to a desired state [2, 3].

Network-based modeling approaches have been shown to be valuable tools to integrate biological information to understand the dynamical behavior observed in multiple cellular processes [4–10]. For example, the establishment of molecular patterns in floral morphogenesis of both wild-type and mutants in *Arabidopsis thaliana* [11, 12], the phenotype stability and plasticity of T helper lymphocytes and other blood cell subpopulations in mammals [6, 13, 14], the cell cycle in yeast or mammals [7, 15, 16], and apoptosis [17].

There are several approaches for modeling regulatory networks (for reviews on qualitative modeling approaches, see [18–21]). In particular, logical models are used to describe systems with a finite number of possible states. In contrast, ODE-based models are able to describe systems with a possibly infinite number of states [22, 23]. As a result, logical approaches are well suited for qualitative descriptions, while ODE-based models are more appropriate for quantitative descriptions.

When dealing with biological problems, it is often convenient to start with a simple model describing a few basic characteristics, and then gradually transform the model into a more refined and complex one. In the case of a regulatory network, one basic characteristic is the number and nature of the steady states of activation or expression generated by the system. In some cases, steady states have been shown to be largely insensitive to the precise values of parameters [24], or even the formalism chosen [5] to find them. In such cases, qualitative modeling can be implemented as a first approximation to model regulatory networks [19].

One approach to make a qualitative model more realistic is to incorporate continuous variables, so as to provide the model with the capacity of describing graded variations. There are several methods to transform Boolean networks into continuous dynamical systems. All of them rely on the general principle of interpolating or replacing the discrete functions by continuous mappings defined in the  $[0, 1]$  closed interval [25]. Interpolation functions can be linear [26], continuous logical extensions [27],

polynomial approximations [28], or polynomial composed with Hill or exponential functions [1, 3] (see [25] for a comparative study). In this chapter, we describe the Standardized Qualitative Dynamical Systems (SQUAD) method, which is used to formalize regulatory networks as a continuous dynamical system focusing on their qualitative behavior rather than on their detailed kinetic parameters [1, 12].

The SQUAD method can be used to either automatically transform a Boolean network model to a continuous system of ordinary differential equations (ODEs), or to directly define a continuous model from the available information regarding the interactions among the components of a regulatory network. In this way, the modeler can simulate a regulatory network based mostly on the network architecture by making a few basic assumptions regarding the response of the nodes to their regulators, or, alternatively, to construct more elaborated models based on known regulatory mechanisms obtained from experimental data.

In the next section, we briefly describe how to define a Boolean model, and then we show how to transform it into a continuous model using the SQUAD method. Finally, we show how to analyze the dynamical behavior of regulatory networks to identify its steady states, as well as how to study the effect of diverse perturbations.

---

## 2 Methods

### 2.1 *Reconstruction of the Regulatory Network*

To construct a regulatory network model, it is necessary to identify the key molecules involved in the control of a biological process of interest (genes, proteins, molecular complexes, etc.), as well as the regulatory relationships among them (activating or inhibitory). This is done by integrating available experimental data regarding the function of the components of the network under different experimental conditions, such as gain- or loss-of-function mutants, epistasis analysis, and known expression patterns, for instance [18, 21]. While it is very important to have the most comprehensive data possible on the list of molecular markers that are present or absent under a given condition, it is also absolutely necessary to have a notion about the flux of information among the nodes to be included into the network model. That is, besides knowing that markers  $A$  and  $B$  are co-expressed, it is necessary to know if  $A$  regulates  $B$ ,  $B$  regulates  $A$ , another node regulates both  $A$  and  $B$ , or even if there is no regulatory relationship between  $A$  and  $B$ .

While a detailed discussion on the different network inference methods is beyond the scope of this work, we refer the interested reader to some relevant literature on the topic [29–31]. Most of these methods rely on the estimation of the probability of dependency measures between gene expression values (Pearson correlation, mutual information, and Bayesian) [29]. In general,

these methods are not well suited to infer the specific combinations of regulators that turn a particular gene *ON* or *OFF*. More importantly, such methodologies are very inefficient at inferring the presence of regulatory circuits [29]. As a result, most of the published Boolean models were inferred manually, using carefully selected experiments reported in the literature.

The proposed molecules and interactions forming a regulatory network can be incorporated into a table of interactions summarizing its architecture. Once we have a static representation of the regulatory network, it is necessary to postulate a set of logical rules or functions controlling the activation of the nodes of the network and simulate its dynamical behavior to qualitatively analyze the temporal expression profiles that can be attained under multiple conditions.

## 2.2 Definition of the Discrete Model

A deterministic Boolean model is the simplest formalism that can be used to study regulatory networks as dynamical systems. Despite their conceptual simplicity, Boolean networks show a non-linear behavior resulting in interesting and nonintuitive dynamical properties such as multistability, cyclic trajectories, and robustness against perturbations [13, 32–34]. In Boolean models, the nodes of a regulatory network are represented by binary variables, i.e., they can attain one of two possible levels of activity (*ON/OFF*) at any given time (Fig. 1a). Also, regulatory interactions are formalized by means of Boolean functions that can be described by logic rules or truth tables (Fig. 1b). The Boolean function assigned to a node determines its value of activity at the next time step depending on the values of their regulators at a given time. Formally,

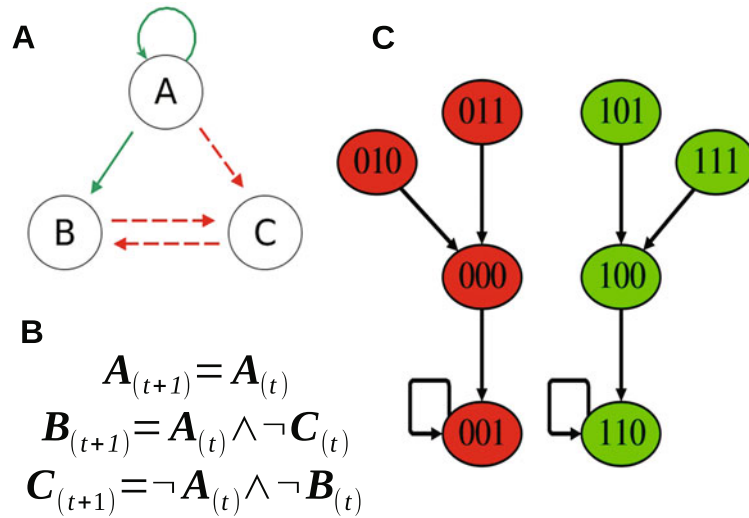
$$x_k(t+1) = f_k(x_{k,1}(t), x_{k,2}(t), x_{k,3}(t), \dots, x_{k,r}(t)) \quad (1)$$

Where  $k$  represents the index of a node with  $r$  input regulators. The variables  $x_{k,1}(t), \dots, x_{k,r}(t)$  represent the set of values of the regulators of the node  $x_k$  at time  $t$ , and  $f_k$  is the Boolean function defining the activation of the node at time  $t+1$ . For example, the node  $B$  in Fig. 1a has two regulators, given that nodes  $A$  and  $C$  activate and inhibit  $B$ , respectively. These interactions can be translated into a logical form to represent the regulatory mechanisms that control the activation levels of node  $B$ . Thus, node  $B$  becomes active only when its activator (node  $A$ ) is present and if its inhibitor (node  $C$ ) is absent (Fig. 1b). For each node, representing molecules or molecular complexes in the network, it is possible to formulate a logical rule summarizing the regulatory mechanisms behind each interaction, which can then be used to construct a dynamical model of the regulatory network. In the

network shown in Fig. 1, the Boolean function for the node  $B$  is given by

$$B(t + 1) = f_B(A(t), C(t)) = A(t) \wedge \neg C(t) \quad (2)$$

Where the symbols  $\wedge$  and  $\neg$  represent the logic functions AND and NOT, respectively. It is important to note that any logical rule can be expressed in terms of the Boolean operators AND, OR, and NOT, see Table 1.



**Fig. 1** Boolean networks. (a) A regulatory network comprising three factors A, B, and C, depicted as nodes in the graph. Activations and inhibitions are represented as green and red arrows, respectively. Every node has an associated state, which can be either 0/OFF/false or 1/ON/true. (b) Logic rules can be used to represent regulatory interactions in the regulatory network. (c) Dynamical behavior of the synchronous Boolean network model. In this case, nodes represent states of the network which are labeled by the binary values of the nodes A, B, and C, in that order. States are colored according to the attractor they converge to

**Table 1**  
**The logic rules describing the response of a node to its regulators expressed with the logic operators  $\wedge$  (AND),  $\vee$  (OR), and  $\neg$  (NOT) can be transformed into a continuous form with the use of their equivalent fuzzy logic functions**

| Boolean operator | Fuzzy logic function |
|------------------|----------------------|
| $A \wedge B$     | $\min(A, B)$         |
| $A \vee B$       | $\max(A, B)$         |
| $\neg A$         | $1 - A$              |

If  $n$  is the number of nodes of the regulatory network, we call any binary vector  $\hat{x} = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$  a state of the network. In a Boolean system, there exist  $2^n$  possible states, this set of configurations is called the phase space [18]. Equation (1) determines the transition of the network through the phase space, where successive states of the network are determined by the present state of the system. Therefore, we can rewrite the system of Boolean equations, if  $F = (f_1, f_2, f_3, \dots, f_n)$ , then Eq. (1) becomes

$$\hat{x}_{t+1} = F(\hat{x}_t). \quad (3)$$

where  $\hat{x}_t$  and  $\hat{x}_{t+1}$  are the predecessor and successor states in the dynamics of the network.

The updating of the values of the nodes can be done in different ways, the simplest of which is the *synchronous* updating scheme, in which all nodes are updated at the same time. Otherwise, if nodes of the network are updated in a different order, the Boolean network is said to be *asynchronous* [35]. We will focus in the rest of the chapter on the synchronous updating [35, 36]. The dynamics of the Boolean network can be represented as a transition diagram (Fig. 1c), in which the phase space is drawn along with all the possible transitions between network states. The dynamical behavior of a Boolean network starting from an initial state  $x_0$  can be easily seen by just following the arrows until the system converges to a closed cycle, i.e., a set of states that repeats consecutively for more than one time step during a trajectory.

Cycles are called *attractors* (i.e., solutions of the network) and capture the long-term behavior of the system [18, 21, 37]. If an attractor contains only one network state, it is called a *fixed point* attractor, otherwise it is referred as a *cyclic* attractor [37].

The network in Fig. 1 possesses two fixed point attractors. There are two sets of network states, shown as red and green nodes, each set of states converges to one of the fixed point attractors (Fig. 1c). The set of all network states that converge to a specific attractor is known as its basin of attraction. In the example of Fig. 1, the set of states  $S = \{010, 011, 000, 001\}$ , shown in red, correspond to the basin of the attractor 001. Because the system once in an attractor will remain in it, attractors are interpreted as patterns of activation associated with specific stable phenotypes [32, 38].

Boolean networks have the advantage that the entire phase space can be explored, so as to find all the possible attractors of the system. This is very useful because it permits understanding all possible phenotypes allowed by a given network model. Although the computation time of search scales very fast with the number of nodes of the network, there are algorithms that search for attractors in large networks comprising hundreds to several thousands of nodes [1, 39].

### 2.3 Construction of a Continuous Model Using SQUAD

For most biological systems, relatively few quantitative data is available regarding the kinetics and stoichiometry of biochemical reactions. Nonetheless, there is a wealth of qualitative data regarding the molecular interactions, and the effect of genetic mutations on the establishment of particular cell phenotypes. Qualitative data also offer valuable functional information about the regulation of some biological processes. The available information has limited the development of dynamical models of regulatory networks to only a small number of well-characterized systems [19].

To overcome these restrictions, and thus facilitate the systematic construction of regulatory network models, the SQUAD method was developed to simulate a dynamical system without the need for detailed kinetic parameters [40]. Instead, the method relies mostly on the connectivity of the regulatory network, i.e., the flow of information among the nodes, as well as on the rules describing the regulatory mechanisms among the molecules they represent. The method approximates a Boolean network with the use of a set of ordinary differential equations. Importantly, a continuous approximation of a Boolean system allows the construction of complex dynamical models even in the absence of quantitative information regarding the precise molecular regulatory mechanisms of the biological system.

The continuous system describes the rate of change of activation of a node  $x_k$  with the following ODE:

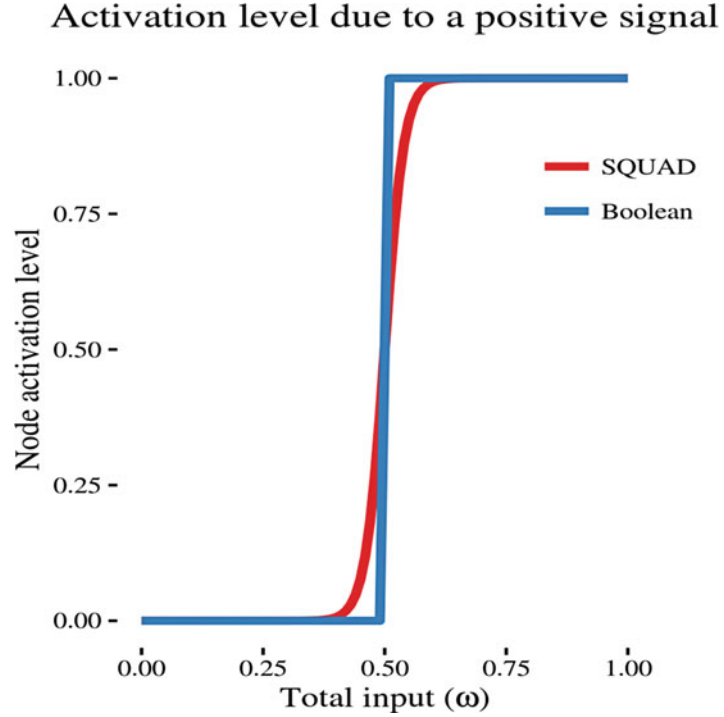
$$\frac{dx_k}{dt} = \frac{-e^{0.5h_k} + e^{-h_k(\omega_k-0.5)}}{(1 - e^{0.5h_k})(1 + e^{-h_k(\omega_k-0.5)})} - \gamma_k x_k \quad (4)$$

Where  $0 < h_k, \gamma_k$  and  $0 \leq x_k, \omega_k \leq 1$ . The nonlinear function on the right-hand side of the differential equation defines a sigmoid curve constrained in the interval  $[0, 1]$ . The parameter  $h_k$  determines the steepness of the sigmoid, for high  $h_k$  values the sigmoid function approaches the step function characteristic of Boolean models (Fig. 2).

The parameter  $\gamma_k$  is the decay rate for the node  $x_k$ . Although its specific numerical value may vary according to the necessities of the modeler and depends on the biological system under study, it has been found that the attractors of a model are rather robust to variations in the variation of this parameter [4, 41].

The total regulatory input of a node is represented by the variable  $\omega_k$ . In the first implementation of the SQUAD method,  $\omega_k$  was defined as a weighted sum of positive regulations multiplied by a weighted sum of negative regulators [40, 42]. This approach permitted the automatic creation of a dynamical system based exclusively on the topology of the network. While the instant transformation of a diagrammatic representation into a dynamical system was a very convenient feature, the chosen definition of  $\omega_k$  had two assumptions: First, that any positive regulator is strong enough to activate its target in the absence of inhibitors;





**Fig. 2** Discrete versus continuous models. Response to a positive input in a discrete Boolean context (blue), and the continuous SQUAD version (red). The parameters  $h$  in SQUAD can be modified resulting in a steeper or shallower sigmoid

and second, that any negative regulator is stronger than any combination of positive regulators. These assumptions, however, are very strong and they are not necessarily true for most biological systems.

A new SQUAD version was proposed in [12] with the aim to relax the assumptions mentioned above. In this second version,  $\omega_k$  is defined in terms of an interpolated Boolean function with the use of fuzzy logic operators [27] (Table 1). The first thing to do is to define the regulatory input of a node  $x_k$  as a Boolean function  $f_k$  of its regulators, just as in the case of the Boolean networks described in the previous section. It can be shown that any  $f_k$  can be rewritten in the following form:

$$f_k(x_1, \dots, x_r) = \bigvee_{i=1}^n (x_1 \wedge x_2 \dots \wedge x_l) \wedge (\neg x_{l+1} \wedge \neg x_{l+2} \wedge \dots \wedge \neg x_r) \quad (5)$$

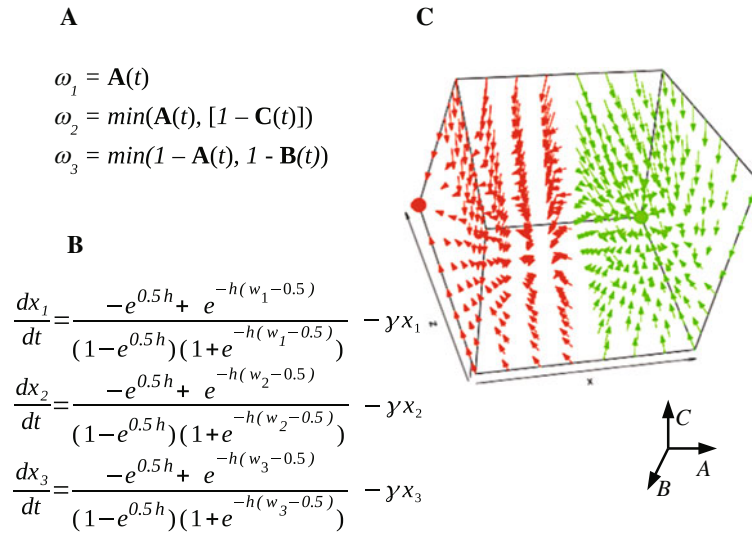
where  $r$  denotes the total number of regulators of the node  $x_k$  and  $l$  represents the positive regulators of the node  $x_k$ , whereas the

remaining  $r - l$  nodes indicate negative regulators of such node. This equation states that any Boolean function can be represented as a disjunction of  $n$  Boolean input configurations ( $2^r$  in total), conforming the set of states of the regulators that result in a value of  $f_k$  of  $1/ON$ . Then, the Boolean function can be interpolated by using fuzzy logic operators [1, 40], see Table 1, thus defining  $\omega_k$  as

$$\omega_k(x_1, \dots, x_r) = \max_{i=1}^n(\min(x_1, \dots, x_l, 1 - x_{l+1}, \dots, 1 - x_r)) \quad (6)$$

where, as in Eq. (5), the fuzzy logic rule for each  $x_k$  node is constructed according to its  $x_r$  regulators, of which  $l$  input nodes are positive regulators and the remaining  $r - l$  nodes correspond to negative regulators. An example of how to translate a Boolean model into its continuous fuzzy logic form is shown in Fig. 3. This methodology thus provides a straightforward manner to translate a Boolean model into a continuous model in the form of a set of ODEs.

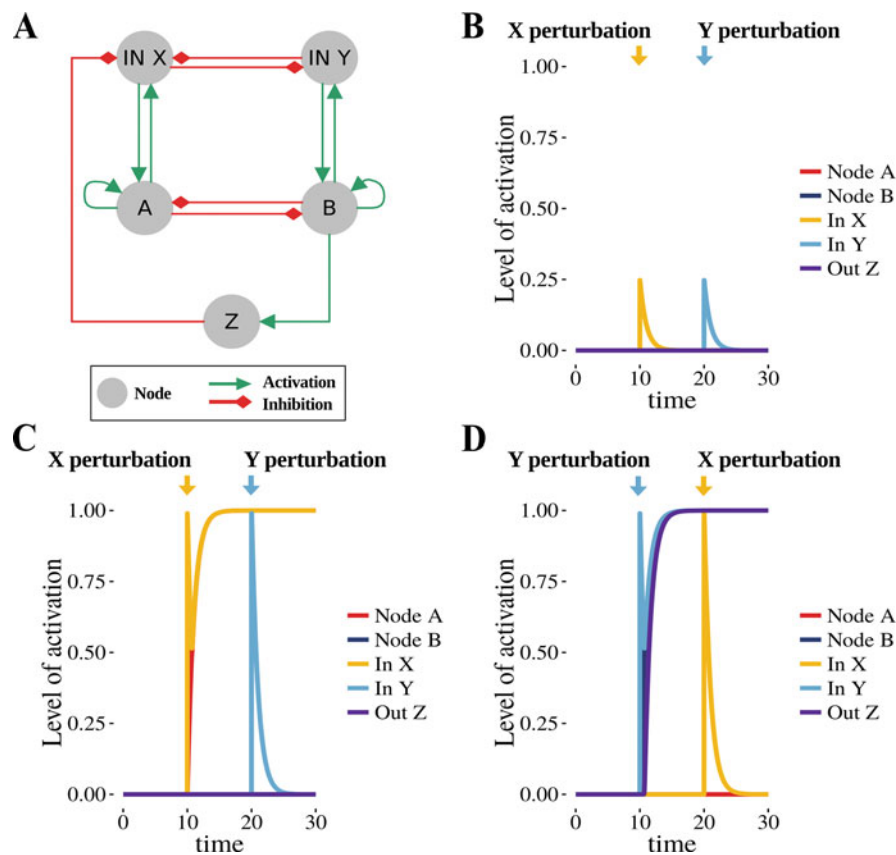
Given that the SQUAD method approximates a Boolean model, there is a close correspondence between the steady states



**Fig. 3** SQUAD method. Example of the SQUAD methodology applied to the regulatory network given in Fig. 1. (a) Determination of the parameter  $\omega_k$  summarizing the regulation for each node in terms of fuzzy logic operators. (b) Definition of the continuous dynamical system in the form of a set of ODEs. The parameters  $h$  and  $\gamma$  are set to 50 and 1, respectively. (c) Dynamical behavior of the regulatory network as simulated by the continuous model. Attractors are shown as red and green dots

found in Boolean discrete models and the steady states found in the continuous model. Notice, however, that SQUAD may find (usually unstable) steady states, or cyclic behaviors not recovered in the Boolean system [12, 43]. As in the discrete Boolean model the phase space is split into attractor basins. This can be seen in Fig. 3c, where the dynamics of the continuous model analogous to the regulatory network given in Fig. 1 are shown. The phase space is split into two basins, observed as green and red partitions, according to the convergence to the corresponding attractors  $(A, B, C) = (0, 0, 1)$  and  $(1, 1, 0)$ , that coincides with that of the discrete model.

The ability of SQUAD to incorporate graded signals makes it a suitable tool to study the effect of extracellular signals on the establishment of expression patterns during differentiation processes [12, 44]. Figure 4 shows the difference in effect between small and large perturbations on the steady state configurations



**Fig. 4** Effects of node perturbations on the dynamics of a regulatory network. (a) Regulatory network module. (b) Small perturbations are given to node X and Y, they are absorbed by the system and vanish. (c)–(d). Larger perturbations cause permanent network state transitions. (c) If X is perturbed first, the network transitions to a state in which node Z is inactive. (d) If the order of stimuli is inverted, the node Z becomes active

attained by a regulatory network. Also, it is possible to observe the effect of the order of such external signals. In this example, when the regulatory network represented in Fig. 4 is perturbed by a small increase of inputs X and Y, the perturbations are absorbed by the system (Fig. 4b). However, with stronger perturbations there is a transition to another network state, and thus the effect on the system is permanent (Fig. 4c). Moreover, the long-term behavior of the network depends on the order in which the perturbations are given (Fig. 4c, d). The interested reader may find in <https://github.com/caramirezal/SQUADBookChapter> the implementation of this example in the programming language R.

---

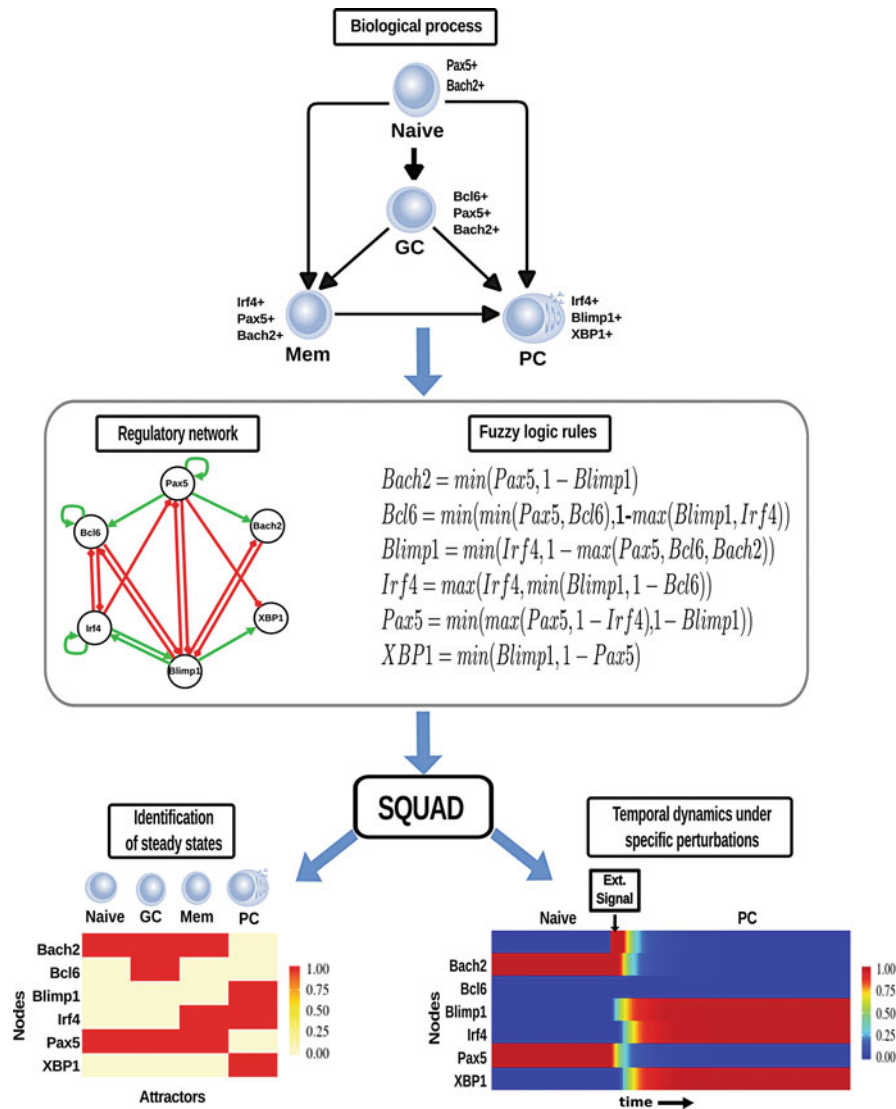
### 3 Modeling Biological Networks Using SQUAD

In this section, we describe the construction of a model of a particular biological process, so as to give a clearer view of the steps needed to make use of SQUAD. Specifically, we will focus on the regulatory network controlling terminal B cell differentiation, see [45]. A brief description of the model is provided in R language at <https://github.com/caramirezal/SQUADBookChapter/>. The model is also available in a standard SBMLqual format in The Cell Collective platform, see “B cell differentiation” model at <https://cellcollective.org/>.

B cells are the main effectors of humoral immune response in vertebrates, which is responsible for the recognition of foreign agents by the production of highly specific antibodies. Terminal B cell differentiation is achieved by the concerted action of several transcription factors in response to antigen recognition and extracellular signals provided by other blood cell types, like T-helper cells, dendritic cells, etc. This process of cell differentiation is characterized by the transition from a progenitor cell type (Naive B cell) into specialized cell types such as germinal center B cells (GC) and memory B cells (Mem), responsible for the editing and improvement of antibodies and its subsequent differentiation into antibody-producing plasma cells (PC) in response to antigen recognition [46].

The wealth of published experimental data regarding the molecules and signals involved in the control of B cell differentiation allowed us to reconstruct a regulatory network that incorporates several molecules known to be necessary for the control of the differentiation process, namely, Bach2, Bcl6, Blimp1, Irf4, and Pax5, see Fig. 5.

The information regarding the regulatory mechanisms controlling the activation of each node can be expressed in the form of logical rules. For example, it is known that Pax5 is regulated



**Fig. 5** Modeling B cell differentiation using SQUAD. Based on available information from a biological process, it is possible to infer a regulatory network taking into account the information flow among molecules (nodes), by activations (green arrows) and inhibitions (red arrows) between them. The regulatory mechanisms are incorporated to the network as logical rules. The system is translated into a set of ODEs, and the dynamical behavior is analyzed. The basic analysis consists in the identification of steady states, under wild-type and simulated mutations, as well as the analysis of the response of the system to certain signals

by itself and by low levels of Irf4 [47, 48], and also that Pax5 is negatively regulated by Blimp1 [49, 50]. This information can be expressed in the form of logical rules as follows:

$$Pax5(t + 1) = (Pax5(t) \vee \neg Irf4(t)) \wedge \neg Blimp1(t) \quad (7)$$

This expression, in turn, can be expressed in fuzzy logic terms as

**Table 2**  
**The logic rules summarizing the regulatory interactions in the B cell differentiation network expressed by the use of the logic operators and their translation into fuzzy logic functions**

| Node   | Description   | Logical rule   | Fuzzy logic function   |
|--------|---|--|--|
| Bach2  | Bach2 is activated by Pax5 if the supressor Blimp1 is absent  | Pax5 <b>AND</b><br><b>NOT</b><br>Blimp1  | $\min(\text{Pax5}, 1 - \text{Blimp1})$                                 |
| Bcl6   | Bcl6 regulates its own expression and is activated by Pax5 only if their repressors Blimp1 and Irf4 are inactive  | Pax5 <b>AND</b><br>Bcl6 <b>AND</b><br><b>NOT</b><br>(Blimp1 <b>OR</b><br>Irf4) | $\min(\text{Pax5}, \text{Bcl6}, 1 - \max(\text{Blimp1}, \text{Irf4}))$ |
| Blimp1 | Blimp1 is activated by Irf4 if all its inhibitors, Pax5, Bcl6, and Bach2, are absent                              | Irf4 <b>AND</b><br><b>NOT</b> (Pax5<br><b>OR</b> Bcl6 <b>OR</b><br>Bach2)      | $\min(\text{Irf4}, 1 - \max(\text{Pax5}, \text{Bcl6}, \text{Bach2}))$  |
| Irf4   | Irf4 regulates its own activation and is positively regulated by Blimp1 if its inhibitor Bcl6 is inactive         | Irf4 <b>OR</b><br>(Blimp1<br><b>AND</b> <b>NOT</b><br>Bcl6)                    | $\max(\text{Irf4}, \min(\text{Blimp1}, 1 - \text{Bcl6}))$              |
| Pax5   | Pax5 positively regulates its own expression and is maintained by low levels of Irf4. Pax5 is repressed by Blimp1 | (Pax5 <b>OR</b><br><b>NOT</b> Irf4)<br><b>AND</b> <b>NOT</b><br>Blimp1         | $\min(\max(\text{Pax5}, 1 - \text{Irf4}), 1 - \text{Blimp1})$          |
| XBPI   | XBPI is activated by Blimp1 and repressed by Pax5   | Blimp1 <b>AND</b><br><b>NOT</b> Pax5   | $\min(\text{Blimp1}, 1 - \text{Pax5})$                                 |

$$Pax5(t + 1) = \min(\max(Pax5(t), 1 - Irf4(t)), 1 - Blimp1(t)) \quad (8)$$

The complete set of logical rules summarizing the regulatory mechanisms controlling the activation of each node is presented in Table 2.

Once the complete set of fuzzy logic rules is established, they can be inserted as the corresponding  $\omega$ s in the skeleton Eq. (4). That is, for the equation  $dPax5/dt$  the corresponding  $\omega_{Pax5}$  is  $\min(\max(Pax5(t), 1 - Irf4(t)), 1 - Blimp1(t))$ . Then, once the complete set of ODEs is determined, the resulting system is numerically integrated by sampling a large number of random initial states. The asymptotic solutions of the system of ODEs can then be compared with the known activation patterns characterizing each of the aforementioned B cell phenotypes.

Specifically, the method allowed the identification of attractors corresponding to the reported activation patterns of Naive, GC, Mem, and PC B cell phenotypes. Additionally, the SQUAD method was used to study the temporal response of the regulatory network to external stimuli with varying levels of intensity to simulate the effect of relevant biological signals and to evaluate the effect of multiple perturbations such as gain- and loss-of-function mutations.

The model was able to recapitulate the dynamical behavior of the set of key molecules involved in the differentiation of B cells [45]. Moreover, the model allowed the prediction of regulatory interactions that are necessary for the correct specification of multiple cell types during terminal B cell differentiation. Furthermore, the model gave theoretical support for the instructive role of cytokines involved in this differentiation process. And finally, the model explained the mechanism underlying the dynamical robustness of the PC attractor, a property that closely resembles the stability of the terminally differentiated plasma cells.

---

## 4 Summary and Outlook

There is a large variety of network modeling approaches; the selection of a particular methodology mostly depends on the available information and the kind of question one is seeking to answer. Specifically, the SQUAD method allows the construction of qualitative dynamical models of regulatory networks by making use of available experimental information where there is a lack of kinetic parameters. This method was developed to analyze the nature and number of the stationary states found in a regulatory network under different scenarios, such as gain- and loss-of-function mutants, or the presence of external stimuli.

Despite the usefulness of the SQUAD method, there is ample room for improvement. For example, some future refinements might incorporate stochastic effects on the concentration of molecules by adding noise to the nodes. Also, it would be desirable to include modifications that permit the transformation of multivalued discrete systems into ODE systems. These and other modifications might be re-implemented in the form of a user-friendly software package to facilitate the construction and exchange of models. Moreover, a long-term desirable goal would be to seek integration of SQUAD with other methods and platforms that complement it, such as GINsim [51], BoolNet [52], MaBoSS [53], JIMENA [54], and The Cell Collective [55].

---

## 5 Conclusions

SQUAD was developed to provide a flexible methodology to develop continuous models of regulatory networks, whenever only qualitative information is available. It can also be used as an initial tool for understanding the qualitative behavior of a network before embarking in the use of more refined, complex, and time-consuming modeling techniques. The successful use of SQUAD to understand the dynamical behavior of different biological systems shows its value as a tool of first choice for modelers.

In agreement with this, a comparative study carried out in [56] found SQUAD to be computationally more efficient than Odefy and CellNetAnalyzer tools [28, 57]. Recently, the group of Thomas Dandekar and colleagues implemented an optimization algorithm using RBDD Boolean representation methods and developed a tool called JIMENA to simulate regulatory networks. They found that with their optimization procedure the method performs as efficiently as SQUAD (old version) [54]. Although comparisons with the new version of SQUAD has not been carried out, in our hands we have been able to analyze regulatory networks comprising more than 80 nodes efficiently [14].

SQUAD was developed for qualitative modeling, thus it would not be an ideal tool for use in those systems with extensive presence of cooperative binding or allosteric regulation, where the kinetic details are of importance to determine the behavior of the system [58, 59]. Only very general molecular mechanisms are able to be included in the SQUAD equations; details of such mechanisms cannot be incorporated into the equations. The SQUAD method focuses on the modeling on system characteristics derived by the flux of information of the regulatory circuits, rather than in the details of molecular mechanisms.

SQUAD was developed to better understand the role of regulatory networks in the process of cellular differentiation. The flexibility and performance of the methodology, however, has allowed it to be used as a general tool in the analysis of the dynamical properties of regulatory networks. Its main strength is its capacity to analyze graded signals whenever the available information allows only for the construction of Boolean regulatory network models. Due to the large diversity of biological systems, modeling methods must be continuously created and modified to make the best possible use of all the available experimental information.

---

## Acknowledgements

Akram Méndez thanks Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. Mauricio Pérez Martínez thanks Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM. Carlos Ramírez thanks



Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. Luis Mendoza acknowledges the sabbatical scholarships from PASPA-DGAPA-UNAM and CONACYT 251420.

## References

- Garg A, Xenarios I, Mendoza L, DeMicheli G (2007) An efficient method for dynamic analysis of gene regulatory networks and in silico gene perturbation experiments. In: Speed T., Huang H. (eds) *Research in computational molecular biology. RECOMB 2007. Lecture Notes in Computer Science*, vol 4453. Springer, Berlin, pp 62–76
- Zañudo JG, Albert R (2015) Cell fate reprogramming by control of intracellular network dynamics. *PLoS Comput Biol* 11(4): e1004193
- Karl S, Dandekar T (2015) Convergence behaviour and control in non-linear biological networks. *Scientific Reports* 5
- Martínez-Sosa P, Mendoza L (2013) The regulatory network that controls the differentiation of t lymphocytes. *Biosystems* 113(2):96–103
- Álvarez-Buylla ER, Chaos Á, Aldana M, Benítez M, Cortes-Poza Y, Espinosa-Soto C, Hartasánchez DA, Lotto RB, Malkin D, Santos GJE et al (2008) Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *Plos One* 3(11):e3626
- Martinez-Sanchez ME, Mendoza L, Villarreal C, Alvarez-Buylla ER (2015) A minimal regulatory network of extrinsic and intrinsic factors recovers observed patterns of cd4+ t cell differentiation and plasticity. *PLoS Comput Biol* 11(6):e1004324
- Fauré A, Naldi A, Chaouiya C, Thieffry D (2006) Dynamical analysis of a generic boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics* 22(14):e124–e131
- Remy E, Rebouissou S, Chaouiya C, Zinovyev A, Radvanyi F, Calzone L (2015) A modeling approach to explain mutually exclusive and co-occurring genetic alterations in bladder tumorigenesis. *Cancer Res* 75(19):4042–4052
- Naldi A, Carneiro J, Chaouiya C, Thieffry D (2010) Diversity and plasticity of th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput Biol* 6(9):e1000912
- Calzone L, Tournier L, Fourquet S, Thieffry D, Zhivotovsky B, Barillot E, Zinovyev A (2010) Mathematical modelling of cell-fate decision in response to death receptor engagement. *PLoS Comput Biol* 6(3):e1000702
- Mendoza L, Alvarez-Buylla ER (1998) Dynamics of the genetic regulatory network for arabidopsis thaliana flower morphogenesis. *J Theor Biol* 193(2):307–319
- Sanchez-Corrales YE, Alvarez-Buylla ER, Mendoza L (2010) The arabidopsis thaliana flower organ specification gene regulatory network determines a robust differentiation process. *J Theor Biol* 264(3):971–983
- Mendoza L (2006) A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Biosystems* 84(2):101–114
- Mendoza L, Méndez A (2015) A dynamical model of the regulatory network controlling lymphopoiesis. *Biosystems* 137:26–33
- Li F, Long T, Lu Y, Ouyang Q, Tang C (2004) The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(14):4781–4786
- Davidich MI, Bornholdt S (2008) Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. *PloS One* 3(2):e1672
- Schlatter R, Schmic K, Vizcarra IA, Scheurich P, Sauter T, Borner C, Ederer M, Merfort I, Sawodny O (2009) On/off and beyond-a boolean model of apoptosis. *PLoS Comput Biol* 5(12):e1000595
- Karlebach G, Shamir R (2008) Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10):770–780
- Le Novère N (2015) Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nat Rev Genet* 16(3):146–158
- Abou-Jaoudé W, Traynard P, Monteiro PT, Saez Rodriguez J, Helikar T, Thieffry D, Chaouiya C (2016) Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Front Genet* 7:94
- Albert R, Thakar J (2014) Boolean modeling: a logic-based dynamic approach for understanding signaling and regulatory networks and for making useful predictions. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 6(5):353–369
- De Jong H (2002) Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J Comput Biol* 9(1):67–103

23. Vijesh N, Chakrabarti SK, Sreekumar J et al (2013) Modeling of gene regulatory networks: a review. *J Biomed Sci Eng* 6(02):223
24. Gutenkunst RN, Waterfall JJ, Casey FP, Brown KS, Myers CR, Sethna JP (2007) Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models. *PLoS Comput Biol* 3(10):e189
25. Wittmann DM, Krumsiek J, Saez-Rodriguez J, Lauffenburger DA, Klamt S, Theis FJ (2009) Transforming boolean models to continuous models: methodology and application to t-cell receptor signaling. *BMC Syst Biol* 3(1):1
26. Glass L, Kauffman SA (1973) The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks. *J Theor Biol* 39(1):103–129
27. Zadeh L (1965) Fuzzy sets. *Inf Control* 8(3):338–353
28. Krumsiek J, Pölsterl S, Wittmann DM, Theis FJ (2010) Odepy-from discrete to continuous models. *BMC Bioinf* 11(1):1
29. Villaverde AF, Banga JR (2014) Reverse engineering and identification in systems biology: strategies, perspectives and challenges. *J R Soc Interface* 11(91):20130505
30. Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A (2005) Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* 37(4):382–390
31. Hecker M, Lambeck S, Toepfer S, Van Someren E, Guthke R (2009) Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models—a review. *Biosystems* 96(1):86–103
32. Kauffman SA (1969) Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theor Biol* 22(3):437–467
33. Derrida B, Pomeau Y (1986) Random networks of automata: a simple annealed approximation. *Europhys Lett* 1(2):45
34. Thieffry D (2007) Dynamical roles of biological regulatory circuits. *Brief in Bioinf* 8(4):220–225
35. Garg A, Di Cara A, Xenarios I, Mendoza L, De Micheli G (2008) Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics* 24(17):1917–1925
36. Bornholdt S (2008) Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *J R Soc Interface* 5(Suppl 1):S85–S94
37. Aldana M (2003) Boolean dynamics of networks with scale-free topology. *Phys D* 185(1):45–66
38. Huang S, Eichler G, Bar-Yam Y, Ingber DE (2005) Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys Rev Lett* 94(12):128701
39. Dubrova E, Teslenko M (2011) A sat-based algorithm for finding attractors in synchronous boolean networks. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinf* 8(5):1393–1399
40. Mendoza L, Xenarios I (2006) A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theor Biol Med Model* 3(1):1
41. Sankar M, Osmond KS, Rolcik J, Gujas B, Tarkowska D, Strnad M, Xenarios I, Hardtke CS (2011) A qualitative continuous model of cellular auxin and brassinosteroid signaling and their crosstalk. *Bioinformatics* 27(10):1404–1412
42. Di Cara A, Garg A, De Micheli G, Xenarios I, Mendoza L (2007) Dynamic simulation of regulatory networks using squad. *BMC Bioinf* 8(1):1
43. Ortiz-Gutiérrez E, García-Cruz K, Azpeitia E, Castillo A, de la Paz Sánchez M, Álvarez-Buylla ER (2015) A dynamic gene regulatory network model that recovers the cyclic behavior of arabidopsis thaliana cell cycle. *PLoS Comput Biol* 11(9):e1004486
44. Mendoza L, Pardo F (2010) A robust model to describe the differentiation of T-helper cells. *Theory Biosci* 129(4):283–293
45. Méndez A, Mendoza L (2016) A network model to describe the terminal differentiation of b cells. *PLoS Comput Biol* 12(1):e1004696
46. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15(3):160–171
47. O’Riordan M, Grosschedl R (1999) Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 11(1):21–31
48. Decker T, di Magliano MP, McManus S, Sun Q, Bonifer C, Tagoh H, Busslinger M (2009) Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity* 30(4):508–520
49. Mora-López F, Reales E, Brieva JA, Campos-Caro A (2007) Human bsap and blimp1 conform an autoregulatory feedback loop. *Blood* 110(9):3150–3157
50. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K (2002) Blimp-1-dependent repression of pax-5 is required for differentiation of b cells to immunoglobulin m-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 22(13):4771–4780

51. Chaouiya C, Naldi A, Thieffry D (2012) Logical modelling of gene regulatory networks with GINsim. In: *Bacterial molecular networks: methods and protocols*. Springer, New York, pp 463–479
52. Müssel C, Hopfensitz M, Kestler HA (2010) Boolnet—an R package for generation, reconstruction and analysis of boolean networks. *Bioinformatics* 26(10):1378–1380
53. Stoll G, Viara E, Barillot E, Calzone L (2012) Continuous time boolean modeling for biological signaling: application of gillespie algorithm. *BMC Syst Biol* 6(1):116
54. Karl S, Dandekar T (2013) Jimena: efficient computing and system state identification for genetic regulatory networks. *BMC Bioinf* 14(1):1
55. Helikar T, Kowal B, McClenathan S, Bruckner M, Rowley T, Madrahimov A, Wicks B, Shrestha M, Limbu K, Rogers JA (2012) The cell collective: toward an open and collaborative approach to systems biology. *BMC Syst Biol* 6(1):96
56. Schlatter R, Philippi N, Wangorsch G, Pick R, Sawodny O, Borner C, Timmer J, Ederer M, Dandekar T (2012) Integration of boolean models exemplified on hepatocyte signal transduction. *Brief Bioinf* 13(3):365–376
57. Klamt S, Saez-Rodriguez J, Gilles ED (2007) Structural and functional analysis of cellular networks with cellnetanalyzer. *BMC Syst Biol* 1(1):1
58. Kahlem P, DiCara A, Durot M, Hancock JM, Klipp E, Schächter V, Segal E, Xenarios I, Birney E, Mendoza L (2011) Strengths and weaknesses of selected modeling methods used in systems biology. In: *Systems and computational biology-bioinformatics and computational modeling*. InTech, Rijeka
59. Kutejova E, Briscoe J, Kicheva A (2009) Temporal dynamics of patterning by morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* 19(4):315–322