Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Caracterización cuantitativa de señales intracelulares de calcio

Sigaut, Lorena

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Sigaut, Lorena. (2011). Caracterización cuantitativa de señales intracelulares de calcio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Sigaut, Lorena. "Caracterización cuantitativa de señales intracelulares de calcio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Caracterización cuantitativa de señales intracelulares de calcio

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Física

por Lic. Lorena Sigaut

Director de Tesis: Dra. Silvina Ponce Dawson
Lugar de Trabajo: Departamento de Física

Febrero 2011

A mis padres

y a Néstor

Resumen

Las señales de calcio son utilizadas por una enorme variedad de células para regular procesos tan distintos como la fertilización o la muerte celular, entre muchos otros. La versatilidad del ión calcio como agente señalizador se basa en la gran diversidad de comportamientos que su concentración puede desplegar dentro de las células. Desentrañar la compleja trama de mecanismos que determinan dichos comportamientos es un enorme desafío que requiere la combinación de estrategias múltiples tanto experimentales como de modelado. En particular, el amplio rango de escalas espaciales y temporales involucradas no puede ser abarcado con un único tipo de experimentos y es entonces que la elaboración de modelos que permitan conectar observaciones dispares se vuelve indispensable. Por otro lado, para que los modelos puedan cumplir este rol es necesario contar con estimaciones confiables, idealmente obtenidas *in situ*, de algunas de las cantidades que caracterizan a los fenómenos físicos y químicos involucrados en las señales. El objetivo de esta Tesis ha sido avanzar en la obtención de estas estimaciones realistas realizando experimentos ópticos y desarrollando el marco teórico necesario para extraer información cuantitativa de los mismos.

Una de las propiedades pobremente caracterizadas es la tasa a la que el calcio se transporta dentro de las células. Existen distintas técnicas ópticas para estimar coeficientes de difusión, entre las que se encuentran la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) o la recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP). La aplicación de las mismas al caso del calcio no es totalmente directa, ya que este ión no sólo difunde al entrar al citosol a través de canales específicos, sino que también reacciona con distintas sustancias (“buffers”) que poseen las células. Para describir este tipo de transporte es posible definir coeficientes efectivos, que contienen información sobre la difusión y las reacciones. Estudios preliminares habían mostrado la existencia de más de un coeficiente de este tipo. Una de las contribuciones de esta Tesis ha sido estudiar de forma detallada la información que es posible extraer a partir de experimentos de FCS en donde la sustancia observada difunde y reacciona. En particular, se demostró que las técnicas de FCS y FRAP brindan información sobre coeficientes distintos, que puede ser combinada para inferir tasas de reacción y de difusión libre. Se realizó este estudio teórico para el caso en que la sustancia de

interés está marcada fluorescentemente y cuando existen moléculas marcadas y no marcadas en el mismo sistema. Parte de los resultados fueron aplicados para explicar las diferencias observadas en experimentos de FCS y FRAP, realizados para determinar el coeficiente de difusión del producto del gen bicoid en embriones de moscas *Drosophila melanogaster*, una sustancia fundamental para el establecimiento del eje dorsoventral en este organismo.

La aplicación de técnicas ópticas para estudiar el transporte de calcio en células presenta dificultades adicionales. En primer lugar, la observación de la distribución del calcio se hace de modo indirecto, mediante fluoróforos que reaccionan con este ión y cambian sus propiedades espectrales como por ejemplo, aumentar notablemente la fluorescencia al ligar calcio. Es decir, la sustancia observable (indicador ligado a calcio) está permanentemente transformándose en otra. Por otro lado, para poder inferir a partir de ella la distribución de calcio libre es necesario conocer propiedades del indicador que típicamente no son provistas por quienes lo comercializan, como por ejemplo, los coeficientes de difusión. Otra de las contribuciones de esta Tesis ha sido establecer las bases para la determinación de los coeficientes de difusión y tasas de reacción del calcio y sus fluoróforos, en células. Para tal fin se hicieron, en primer lugar, experimentos de FCS en distintos tipos de soluciones conteniendo calcio e indicador. Se trabajó simultáneamente en los desarrollos teóricos necesarios para el análisis de los mismos. De su aplicación se pudieron determinar coeficientes de difusión y parámetros de reacción en solución. Entre los experimentos se realizó un subconjunto conteniendo calcio, indicador y un “buffer” adicional. A partir del estudio detallado de estos últimos se elaboró una propuesta de cómo obtener estos coeficientes en células intactas donde las propiedades de los “buffers” presentes son desconocidas.

La versatilidad de las señales intracelulares de calcio depende, entre otras cosas, de la distribución espacial y de la cinética de los canales a través de los cuales los iones ingresan al citosol. Entre éstos, los receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3R) constituyen una de las vías más importantes para este ingreso. Estos canales se encuentran en la membrana del retículo endoplasmático organizados en cúmulos que se supone son de unos 100 nm de lado y que están, a su vez, separados por algunos milímetros entre sí. Los canales se abren cuando ligan calcio e IP_3R el que, en condiciones fisiológicas, es sintetizado a partir de elementos presentes en la mem-

brana plasmática cuando la célula recibe una señal. La distribución inhomogénea de los canales junto con el efecto del calcio liberado sobre la probabilidad de apertura se combinan para dar lugar a una jerarquía de señales que van desde las muy localizadas hasta las ondas que viajan por toda la célula. Contar con información cuantitativa sobre la geometría de los cúmulos y sobre la cinética de los canales *in situ* es fundamental para entender la variedad de señales que pueden evocarse. Experimentalmente es posible observar las señales usando los fluoróforos antes mencionados e induciendo la apertura de los canales con IP_3, que es introducido en la célula en forma enjaulada y posteriormente fotoliberado con luz ultravioleta. Otra de las contribuciones del presente trabajo de Tesis ha sido el diseño e implementación de una adaptación relativamente barata de un microscopio confocal Olympus FV1000 para realizar este tipo de experimentos. La habilidad del sistema para fotolizar compuestos enjaulados fue comprobada en distintas situaciones experimentales. Por otro lado, la potencia que llega a la muestra y el tamaño de la zona iluminada fueron cuantificados. Finalmente, en el trabajo se ha mostrado también que con esta adaptación es posible generar un estímulo preciso y controlado de IP_3 simultáneamente a la obtención de imágenes confocales de señales de calcio, registrando y caracterizando a las mismas en ovocitos de *Xenopus Laevis*.

Palabras claves: dinámica de calcio, receptores de IP_3, procesos de difusión y reacción, espectroscopía de correlación de la fluorescencia, microscopía confocal.

Quantitative characterization of intracellular calcium signaling

Abstract

Calcium signals are used by an enormous variety of cells to regulate processes as diverse as fertilization or cell death, among others. The versatility of calcium as a signaling agent is based on the great diversity of behaviors that its concentration can display inside cells. Unveiling the complex network of mechanisms that determine these behaviors is an enormous challenge that requires the combination of multiple strategies which include experiments and modeling. In particular, the wide range of spatial and temporal scales involved can not be covered with a single type of experiment, so that the development of models that can connect different observations becomes unavoidable. On the other hand, for models to fulfill this role is necessary to have reliable estimates, ideally obtained *in situ*, of some of the quantities that characterize the physical and chemical phenomena involved in the signals. The aim of this Thesis has been to advance in obtaining these realistic estimates by performing optical experiments and developing the theoretical framework necessary to extract quantitative information from them.

One poorly characterized property is the rate of calcium transport inside cells. There are several optical techniques to estimate diffusion coefficients, among them, Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Applying these techniques to the case of calcium is not entirely straightforward, since this ion not only diffuses, when it enters the cytosol through specific channels, but also reacts with various substances (“ buffers”) inside cells. Effective coefficients can be defined to describe this type of transport, which contain information on the diffusion and reaction parameters. Preliminary studies had shown the existence of more than one of these coefficients. One contribution of this Thesis has been a detailed study of the information that can be obtained from FCS experiments in which the particles observed diffuse and react. In parti-

cular, it was proved that FCS and FRAP provide information about different coefficients which can be combined to infer reaction and free diffusion rates. A theoretical study was done for the case in which the molecule of interest is fluorescently labeled and when there are fluorescently labeled and unlabeled molecules in the same system. Part of the results were applied to explain the differences observed in FCS and FRAP experiments, performed to determine the diffusion coefficient of bicoid in *Drosophila melanogaster* embryos, an essential substance for the formation of the dorsoventral axis in this organism.

The application of optical techniques to study calcium transport in cells offers additional difficulties. First of all, the observation of the calcium distribution is indirect, by means of fluorophores that react with this ion and change their spectral properties upon binding (*e.g.* increasing their fluorescence when they are bound to calcium). Thus, the observable particle (indicator bound to calcium) is permanently transforming into another. On the other hand, to infer the distribution of free calcium it is necessary to know indicator properties that are not usually provided by the vendor, for example, diffusion coefficients. Another contribution of this Thesis has been to establish the basis for the determination of diffusion coefficients and reaction rates of calcium and fluorophores in cells. To this aim, firstly, FCS experiments in different types of solutions containing calcium and indicator were performed. At the same time, the theoretical framework for the analysis of the results was developed. Applying this theory, diffusion coefficients and reaction parameters could be determined for the experiments in solution. Among the experiments, a subset containing calcium indicator and an additional buffer was performed. From a detailed study of the latter, a proposal was made on how to obtain these coefficients and parameters in intact cells where the properties of the endogenous buffers are unknown.

The versatility of intracellular calcium signals depends, among other things, on the spatial distribution and kinetics of the channels through which the ions enter the cytosol. Among them, the inositol (1,4,5)-triphosphate receptors (IP_3R) are one of the most important ways for this entry. These channels are located on the membrane of the endoplasmic reticulum, organized in clusters of about 100 nm in side which are separated by a few millimeters. These channels become open when they bind calcium and IP_3 which, under physiological conditions, is synthesized from elements present in the plasma membrane upon the arrival of a signal. The inho-

mogeneous distribution of the channels together with the effect of the free calcium on the open probability are combined to give rise to a hierarchy of signals, ranging from very localized ones to waves that travel throughout the cell. Having quantitative information on the clusters geometry and channels kinetics it in situ is essential for understanding the variety of signals that can be evoked. Experimentally, it is possible to observe these signals using the fluorophores mentioned before and inducing the opening of IP_3 receptor/channels by introducing a caged form of IP_3 into the cell and then fotoreleasing it with ultraviolet light. Another contribution of this Thesis has been the design and implementation of a relatively inexpensive adaptation of an Olympus FV1000 confocal microscope to perform such experiments. The system's ability to photolyze caged compounds was tested in different experimental situations. The power that reaches the sample and the size of the illuminated area were also quantified. Finally, in this work it has also been demostrated that with the modified microscope it is possible to generate a precise and controlled IP_3 stimulus, simultaneously with the confocal imaging of the evoked calcium signals. This has been proved by recording and characterizing such images in *Xenopus laevis* oocytes.

Keywords: calcium dynamics, IP_3 receptors, diffusion and reaction processes, fluorescence correlation spectroscopy, confocal microscopy.

Índice general

1. Introducción **3**

1.1. Señales de calcio mediadas por IP_3 y su relevancia . . . 3

1.1.1. La maquinaria celular para el control de la concentración de calcio . . . 4

1.1.2. Dinámica del Receptor de IP_3 . . . 6

1.1.3. Señales de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis* . . . 7

1.2. Observación de señales de calcio . . . 8

1.2.1. Indicadores de calcio . . . 8

1.2.2. Fotólisis de compuestos enjaulados . . . 10

1.2.3. Microscopía confocal . . . 11

1.3. Dinámica del calcio intracelular y procesos de reacción–difusión . . . 13

1.3.1. Procesos de reacción-difusión . . . 13

1.3.2. Estimación de la difusión efectiva del calcio usando sustancias radioactivas 15

1.3.3. Transporte en presencia de trampas y difusión efectiva . . . 16

1.4. Cuantificación de la difusión por métodos ópticos . . . 17

1.4.1. Marcación de compuestos para su observación . . . 17

1.4.2. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS) . . . 18

1.4.3. Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) . . . 22

1.5. Esquema de la Tesis . . . 23

2. Difusión en presencia de trampas. Coeficientes efectivos y su cuantificación mediante FCS y FRAP **25**

2.1. Modelo completo de FCS para partículas fluorescentes que difunden y reaccionan con trampas . . . 26

2.1.1. Cálculo de autovalores y autovectores . . . 27

2.1.2. Expresiones de autocorrelación para el modelo completo . . . 28

2.2. Modelo aproximado para tiempos largos . . . 29

2.2.1. Coeficientes efectivos de difusión . . . 29

2.2.2. Función de correlación del modelo aproximado . . . 30

2.2.3. Límites de aplicación del modelo . . . 32

2.3. Comparación entre el modelo completo y el modelo aproximado . . . 34

2.3.1. Incorporación de ruido . . . 35

2.3.2. Resultados . . . 37

2.4. Información que se puede obtener aplicando el modelo aproximado 40
2.4.1. Información que se extrae en un experimento de FCS 40
2.4.2. Experimentos de FCS a diferentes concentraciones 42
2.5. Combinando la información de experimentos de FRAP y FCS 43

3. Cuantificación de coeficientes de difusión por métodos ópticos en presencia de partículas no marcadas 45
3.1. Caso partículas marcadas y no marcadas 46
3.1.1. Función de correlación para partículas marcadas y no marcadas 48
3.1.2. Coeficientes efectivos de difusión 49
3.1.3. Función de correlación para tiempos largos 50
3.2. Aplicación del modelo al sistema de Bicoid 52
3.2.1. Sistema biológico y su relevancia 52
3.2.2. Aplicación del modelo al sistema de Bicoid 53
3.2.3. Estimación de parámetros de la reacción del Bicoid con trampas 56

4. Cuantificación de la difusión del calcio por métodos ópticos 63
4.1. Teoría de FCS para un sistema conteniendo calcio y un indicador 64
4.1.1. Función de autocorrelación 64
4.1.2. Modelo aproximado para tiempos largos 65
4.2. Teoría de FCS para un sistema conteniendo calcio, indicador y quelante. 66
4.2.1. Coeficientes de difusión efectivos 68
4.2.2. Función de autocorrelación 72
4.3. Experimentos de FCS en solución. Materiales y métodos. 73
4.3.1. Adquisición de datos 73
4.3.2. Cálculo de la autocorrelación de la fluorescencia experimental 74
4.3.3. Ajuste de las autocorrelaciones experimentales 74
4.4. Experimentos de FCS en soluciones con calcio y Fluo 4 75
4.4.1. Obtención de parámetros de ajuste y estimación de coeficientes de difusión. 78
4.4.2. Estimación de parámetros de reacción y concentraciones. 82
4.5. Experimentos de FCS en soluciones con calcio, Fluo 4 y EGTA. 83
4.5.1. Obtención de parámetros de ajuste y estimación de coeficientes de difusión. 85
4.5.2. Estimación de parámetros de reacción y concentraciones. 90
4.6. Propuesta de aplicación del modelo a mediciones de FCS en ovocitos 91

5. Señales intracelulares de calcio, modificación de un microscopio comercial confocal para su observación 95
5.1. El microscopio confocal Olympus FV1000 96
5.2. Adaptación del FV1000 para la fotólisis de compuestos enjaulados 97
5.3. Caracterización del sistema de fotólisis 104
5.3.1. Potencia UV y atenuadores 104
5.3.2. Tamaño del haz de iluminación 105
5.4. Prueba de funcionamiento usando calcio enjaulado 105

6. Observación de señales de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis* **109**
6.1. Obtención de señales de calcio en el FV1000 110
6.1.1. Acondicionamiento del laboratorio para tratamiento de ovocitos 110
6.1.2. Preparación de los ovocitos 111
6.1.3. Adquisición y procesamiento de imágenes 113
6.2. Observación y caracterización de señales usando Fluo 4 Dextran 116
6.3. Observación de señales desde el retículo y perspectivas futuras 119

7. Conclusiones **125**

A. Apéndice **133**

Agradecimientos **135**

Bibliografía **136**

1

Introducción

El calcio es utilizado como agente señalizador para regular diferentes procesos en una enorme variedad de células. Una completa descripción de estas señales requiere un conocimiento detallado de la magnitud y cinética del flujo de calcio que ingresa al citosol y de su posterior distribución espacial y temporal. Combinando la realización de experimentos ópticos que permitan caracterizar cuantitativamente el transporte de calcio con el modelado matemático, se avanza hacia una descripción abarcadora de las señales intracelulares de calcio, determinando de qué modo la presencia de distintas sustancias modulan las señales.

1.1. Señales de calcio mediadas por IP_3 y su relevancia

Las señales de calcio son utilizadas por muchos tipos celulares para iniciar procesos tan diversos como la contracción muscular, la división o la muerte celular, entre otros [Berridge et al., 1998]. La información transmitida por el calcio está codificada en la distribución espacio-temporal de su concentración dentro de la célula. Por esta razón es de interés estudiar los meca-

nismos que determinan y modulan dicha distribución. Las señales se construyen con el paso del calcio desde el medio extracelular o desde reservorios internos, hacia el citosol a través de canales específicos. Entre los canales involucrados los receptores de IP_3 cumplen un rol fundamental en muchos casos.

1.1.1. La maquinaria celular para el control de la concentración de calcio

Las células tienen una gran variedad de mecanismos que actúan en diferentes niveles, que controlan la concentración intracelular de Ca^{2+}. Todos ellos diseñados para asegurar la presencia de Ca^{2+} en cantidades suficientes como para que pueda llevar a cabo sus funciones, evitando exposiciones prolongadas de altas concentraciones dado que resultan tóxicas y pueden llevar a la muerte celular. La concentración intracelular típica de Ca^{2+} está alrededor de 0.1 μM, mientras que la extracelular es de aproximadamente $1\ \mathrm{mM}$. Dentro de la célula, existen reservorios internos que acumulan Ca^{2+}, como por ejemplo mitocondrias, el retículo sarcoplasmático (SR) y el retículo endoplasmático (ER) que presenta concentraciones del orden de $1\ \mathrm{mM}$.

El influjo de iones de calcio al citoplasma se produce básicamente por dos vías: a través de la apertura de canales situados en la membrana plasmática que separa el medio extracelular del intracelular o mediante la liberación desde los reservorios internos. Existen varios tipos de canales en la membrana plasmática: en algunos la apertura es controlada por la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana (importantes en la generación de oscilaciones rápidas en células cardíacas y en los mecanismos de comunicación neuronal en la célula pre-sináptica), en otros por la unión de un ligando externo (como los receptores de NMDA presentes en sinapsis de algunas neuronas), y en otros es incluso controlada por estímulos mecánicos. Con respecto a la liberación desde reservorios internos, ésta se produce principalmente a través de dos tipos de canales ubicados en la membrana de los retículos sarco y/o endoplasmático: los receptores de rianodina y los receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3R). Los receptores de rianodina juegan un papel importante en la contracción del músculo cardíaco. Los receptores de IP_3 se encuentran predominantemente en células no musculares y, en particular, son los responsables de la liberación desde el retículo endoplasmático en ovocitos [Choe and Ehrlich, 2006; Foskett et al., 2007; Busa et al., 1985; Lechleiter and Clapham, 1992].

Para remover el calcio citosólico existen proteínas especializadas que bombean calcio hacia el exterior de la célula o reinsertándolo en los reservorios internos. Ambos métodos requieren un gasto de energía ya que implican el transporte de una sustancia contra su gradiente de concen-

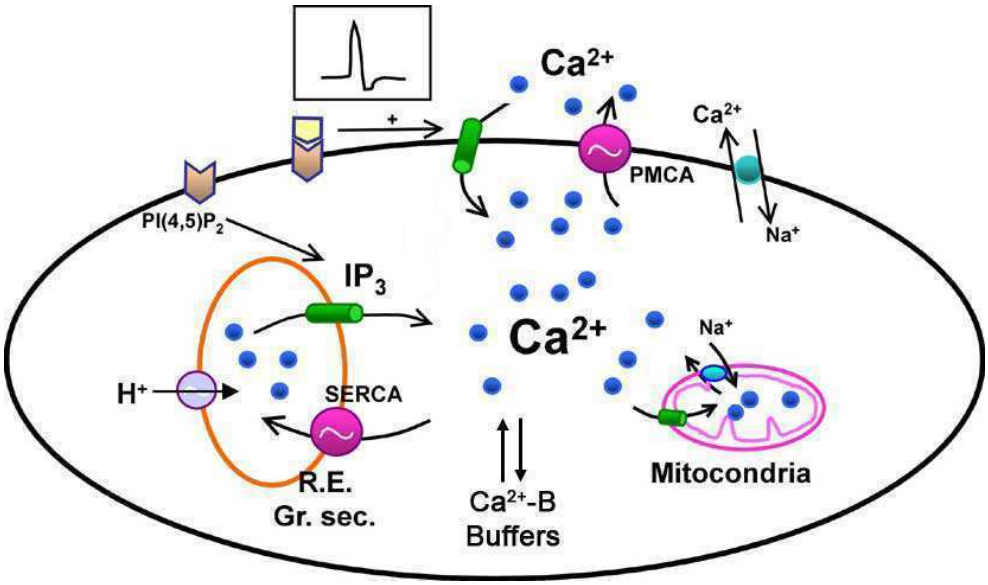


Figura 1.1: Diagrama de alguno de los mecanismos involucrados en el control de la concentración de calcio citosólico. Entrada de calcio al citosol: desde los depósitos intracelulares (RE) mediante IP_3 o abriendo canales de calcio de la membrana plasmática, bien por despolarización, por la unión de un ligando externo o por estímulos mecánicos. Remoción de calcio del citosol: mediante bombas o intercambiadores de la membrana plasmática (PMCA, Na^+-Ca^{2+}) o mediante bombas de los depósitos (SERCA). El rellenado de los depósitos requiere la presencia de protones (H^+) en su interior. Otras organelas como las mitocondrias también pueden captar calcio.

tración. Ejemplos del primer tipo son el intercambiador Na^+-Ca^{2+}, que usa la energía electroquímica almacenada en el gradiente de sodio a expensas de la entrada de iones Na^+ o la Ca^{2+}–ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), que consume energía entregada por la hidrólisis de moléculas de ATP. En ovocitos el mecanismo más importante lo constituye la Ca^{2+}–ATPasa del retículo endoplasmático, o bomba *SERCA* por sus siglas en inglés, que recaptura iones de Ca^{2+} presentes en el citosol hacia el retículo endoplasmático [Keener and Sneyd, 1998; Berridge et al., 1998].

Pero la forma más rápida de reducir la concentración citosólica de Ca^{2+} es proporcionada por sustancias llamadas "buffers", que son grandes proteínas que ligan Ca^{2+} y están presentes en la mayoría de los tipos de células. Estos buffers de calcio atrapan Ca^{2+} con diferentes afinidades y cinéticas, se estima que el 99 % del calcio citoplasmático total se encuentra ligado a buffers. Estas sustancias controlan tanto la concentración de Ca^{2+} como su escala espacial de difusión. Proteínas de este tipo también están presentes dentro de los reservorios internos. En la figura 1.1 se esquematizan sólo algunos de los mecanismos involucrados en el control de la concentración de calcio citosólico.

1.1.2. Dinámica del Receptor de IP_3

La dinámica de los receptores de IP_3 aislados ha sido (y continúa siendo) estudiada en forma experimental usando distintas técnicas. Dado el difícil acceso a la región celular en donde se encuentran estos receptores, muchas observaciones se han realizado en bicapas lipídicas reconstituidas [Bezprozvanny et al., 1991; Watras et al., 1991]. Se han obtenido también registros electrofisiológicos de canal único usando la técnica de "patch-clamp" en núcleos aislados de ovocitos de *Xenopus laevis* [Mak et al., 2000, 1998].

En todos estos experimentos se estudia la corriente eléctrica que fluye a través de los canales cuando se fijan las concentraciones de IP_3 y de Ca^{2+}. Básicamente se ha observado que la apertura de estos canales es un proceso estocástico. Se ha estudiado la probabilidad estacionaria de apertura y se ha visto que tanto el IP_3 como el Ca^{2+} funcionan como moduladores de la misma. Se ha demostrado que es necesaria la presencia de IP_3 para que el canal pueda abrirse. También resulta relevante la concentración del calcio tanto en el lado citosólico del canal, como del lado luminal (es decir, la concentración de calcio dentro del retículo endoplasmático). De hecho, se determinó que la concentración de calcio en el citosol juega un papel dual: a bajas concentraciones promueve la apertura del canal, mientras que a altas concentraciones la inhibe [Bezprozvanny

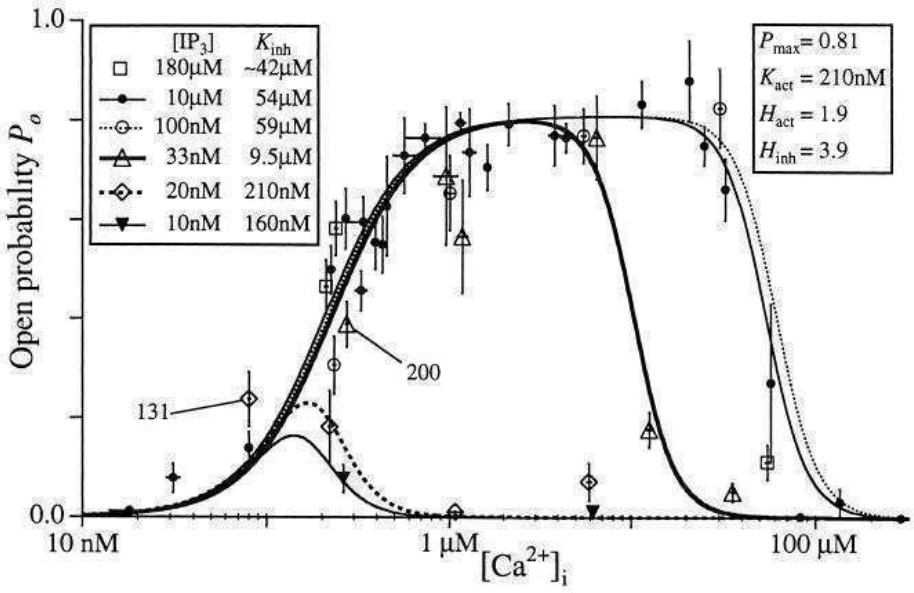


Figura 1.2: Probabilidad de apertura del receptor de IP_3 en función de la concentración de calcio citosólico para diferentes concentraciones de IP_3, Mak *et al*, 1999.

et al., 1991; Watras et al., 1991], ver figura 1.2. Este último aspecto juega un papel esencial en el hecho que el citosol se comporte como un medio excitable ya que, a bajas concentraciones la presencia de calcio puede inducir la liberación de más calcio, generándose un ciclo de realimentación positiva. Este mecanismo no lineal de regulación se manifiesta en un fenómeno conocido como “liberación de calcio inducida por calcio” (CICR, por sus iniciales en inglés).

1.1.3. Señales de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*

El estudio de la dinámica espacio-temporal del calcio se realiza principalmente en miocitos y ovocitos. Los ovocitos de *Xenopus laevis*, una especie de rana originaria de África, además son usados como un sistema ventajoso en varias investigaciones experimentales biológicas. Se caracterizan por poseer un gran tamaño, teniendo un diámetro medio del orden del milímetro, lo cual permite observar un amplio repertorio de señales macroscópicas. La variedad de señales observadas en ovocitos inmaduros, es consecuencia del hecho de que el calcio involucrado en las mismas es liberado desde reservorios internos a través de canales que están distribuidos de forma espacialmente inhomogénea.

En este tipo de células, los receptores de IP_3 son los responsables de la liberación desde el retículo endoplasmático [Choe and Ehrlich, 2006; Foskett et al., 2007; Busa et al., 1985; Lechlei-

ter and Clapham, 1992]. Diversos estudios han permitido concluir que, en algunas regiones del ovocito inmaduro de *Xenopus laevis*, los receptores de IP_3 están organizados en conglomerados o clusters de aproximadamente 50 nm de lado [Swillens et al., 1999] separados entre sí por entre 2 y 3 μm. Los mismos están principalmente concentrados en una región delgada (de unos 6 μm de ancho) cercana a la membrana plasmática [Callamaras and Parker, 1999].

Jerarquía de eventos

El hecho de que la probabilidad de apertura de los receptores de IP_3 es modulada por la concentración de calcio, hace del citosol un medio excitable en lo que se refiere a la propagación de las señales de calcio. El flujo de Ca^{2+} desde un canal abierto favorece la apertura de más canales, y dependiendo de la cantidad de IP_3 presente en el citosol, se observan distintos tipos de eventos [Berridge et al., 1998; Parker et al., 1996a; Sun et al., 1998]. Todos estos eventos se construyen a partir de "eventos elementales" que involucran la liberación desde un solo canal abierto ("blips"). Estos eventos elementales son difíciles de observar experimentalmente, en ellos la retroalimentación se mantiene restringida a canales dentro de un cluster de modo que los sitios de liberación individuales funcionan autónomamente.

Frente a concentraciones moderadas de IP_3, aparecen eventos un poco más extensos ("puffs"), que involucran la apertura coordinada de múltiples canales que forman un conglomerado o cluster. Estos eventos resultan más fáciles de visualizar [Parker et al., 1996b]. Para mayores concentraciones de IP_3 se observan ondas globales que se propagan de un modo saltatorio mediante el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR). Esta jerarquía de eventos se esquematiza en la figura 1.3.

1.2. Observación de señales de calcio

1.2.1. Indicadores de calcio

Para el estudio de señales de calcio por métodos ópticos, se emplean indicadores de calcio. Estos indicadores son sustancias que ligan calcio similarmente a como lo hacen los buffers, pero que poseen la propiedad de modificar su espectro de emisión de luz dependiendo de si tienen o no iones de Ca^{2+} ligados. Si se introduce una cierta cantidad de indicador en el citosol de la célula a estudiar y se ilumina el medio intracelular con luz láser focalizada de longitud de onda

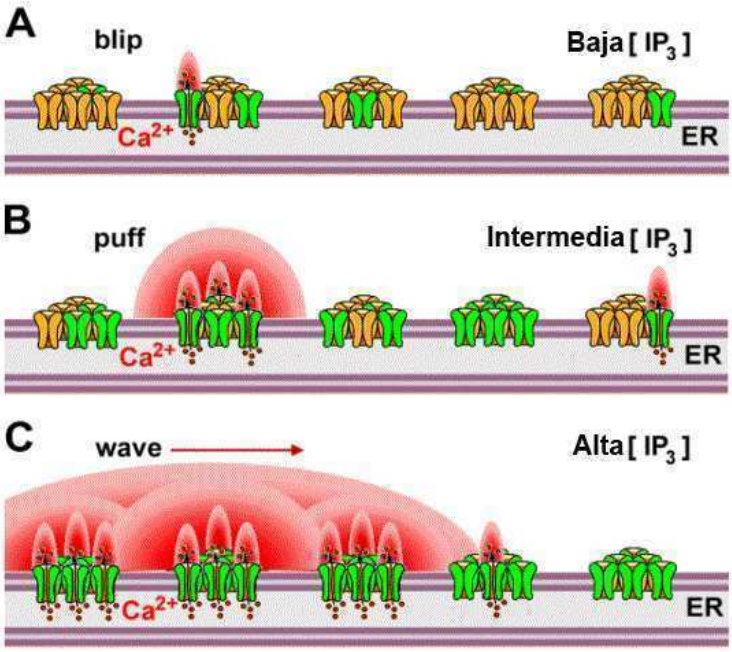


Figura 1.3: Esquema que muestra la actividad de canales y conglomerados o clusters de canales modulados por IP_3, en presencia de concentraciones crecientes de dicha sustancia. (A) Para bajas concentraciones, pocos receptores ligan IP_3, entonces la retroalimentación debida al calcio liberado por un solo canal está restringida a ese canal, produciendo una señal de calcio pequeña y localizada (blip). (B) Para concentraciones intermedias de IP_3, el calcio liberado a través de la apertura espontánea de un canal causa la apertura de muchos otros canales dentro del mismo cluster y origina un puff, pero no logra activar clusters adyacentes. (C) Altas concentraciones de IP_3 provocan ondas de propagación de calcio mediante el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR).

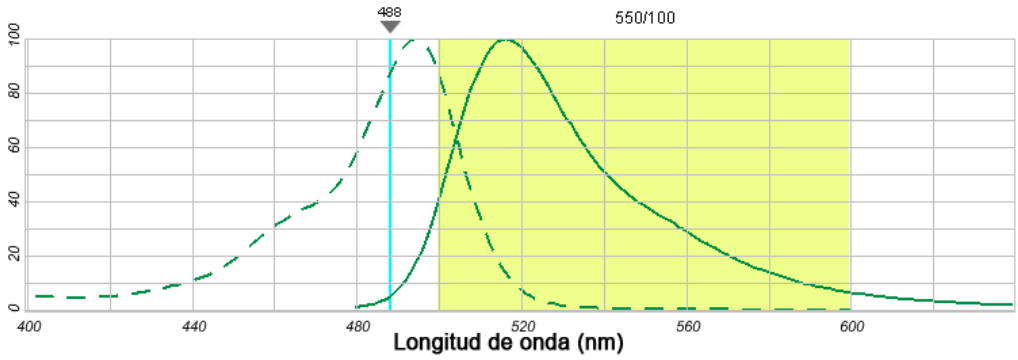


Figura 1.4: Espectro de excitación y emisión del indicador de calcio Fluo 4 (Invitrogen–Molecular Probes) con calcio ligado. El espectro de emisión del indicador sin calcio ligado es prácticamente nulo. Indicado con una línea vertical se especifica la línea láser utilizada. El sombreado indica el rango de longitudes de onda sugerido para su detección.

dentro del espectro de absorción del indicador, recogiendo la señal lumínica emitida por esta sustancia es posible seguir la evolución de la cantidad de calcio ligada al indicador dentro del medio intracelular, con una resolución espacial del orden del micrón y temporal de milisegundos. Esta técnica es esencialmente no invasiva, excepto por la presencia del indicador fluorescente.

Como ejemplo, se presenta en la figura 1.4, el espectro de absorción y emisión del indicador Fluo 4 (Invitrogen-Molecular Probes), cuando presenta calcio ligado. El Fluo 4 pertenece a la clase de indicador estudiado en este trabajo: el espectro de emisión del indicador sin calcio ligado es prácticamente nulo; al ligar calcio y ser excitado con fotones de longitudes de onda dentro de su espectro de absorción, el indicador fluoresce emitiendo fotones dentro del espectro de emisión del indicador. La relación entre la concentración de calcio libre y la ligada al indicador es no lineal, especialmente en las zonas de altas concentraciones [Nuccitelli, 1994].

Dado que en este tipo de estudios se registra la dinámica del indicador ligado a calcio, hay que tener especial cuidado al extraer información acerca de la dinámica espacio-temporal del calcio libre, ya que se verán involucrados parámetros físicos del indicador, como las constantes de la reacción y su coeficiente de difusión.

1.2.2. Fotólisis de compuestos enjaulados

La fotólisis de compuestos enjaulados es una técnica que usa moléculas especialmente diseñadas para generar cambios rápidos en la concentración de sustancias [Adams and Tsien, 1993;

Callaway and Yuste, 2002; Kaplan, 1990], y resulta esencial para la observación de señales de calcio mediadas por IP_3. Esta técnica se basa en el uso de moléculas biológicamente activas que se sintetizan con un grupo fotosensible (jaula o "cage"), que los hace inactivos. Al ser expuesta a luz, por lo general en el rango ultravioleta, se transforma o se corta la unión con la jaula y la molécula se activa. De esta forma, la fotólisis de compuestos enjaulados, permite generar estímulos controlados y reproducibles, ideales para estudiar fenómenos fisiológicos que dependen de cambios bruscos en la concentración. Además, se puede utilizar en combinación con indicadores fluorescentes (que en general son excitados por fotones de longitud de onda más larga) para observar las consecuencias de los estímulos.

Entre los diversos compuestos enjaulados está actualmente disponible en el mercado una forma enjaulada de IP_3 que ha demostrado ser muy útil para obtener señales intracelulares de calcio mediadas por IP_3 en una gran variedad de células [Callamaras and Parker, 1998], en particular, en ovocitos. En estas ultimas, la forma enjaulada debe introducirse junto con el indicador de calcio. Mediante un corto pulso de luz ultravioleta, se desenjaula el IP_3 aumentando las probabilidades de liberación de calcio a través de los receptores de IP_3 y simultáneamente se registra el calcio ligado al indicador.

1.2.3. Microscopía confocal

Para la observación de las señales de calcio en ovocitos, se emplea la microscopía láser confocal. La microscopía láser confocal es una nueva técnica de observación que está logrando excelentes resultados en diversas ramas de la ciencia (medicina, biología, materiales, geología, etc.) La observación de especímenes ha estado limitada, porque éstos tienen grosores variables y trasmiten y reflejan la luz de manera no uniforme. Las áreas fuera del plano focal degradan la imagen haciéndola borrosa, disminuyendo el contraste y la resolución, dificultando así la observación de las estructuras que componen un espécimen. La ventajas que ofrece la microscopía confocal frente a la microscopía óptica tradicional son imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución lateral y axial. Esta técnica posibilita la obtención de "secciones ópticas" de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional.

Aunque el principio de la microscopía confocal fue patentado hace varios años (Minsk, 1957) y los primeros microscopios basados en esta técnica que demostraron su validez fueron descritos por Petran et al. en 1968 , su gran aceptación y desarrollo no ha tenido lugar hasta hace unos pocos años con el desarrollo del láser [Wilson and Sheppard, 1984; Pawley, 2006].

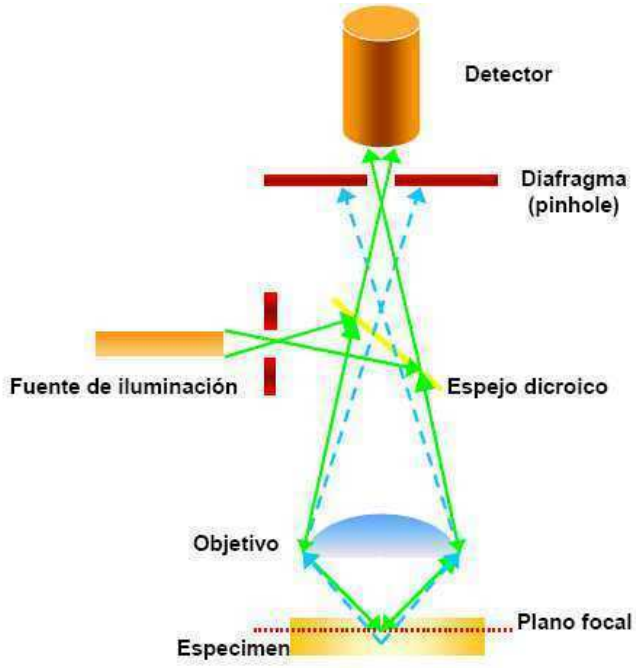


Figura 1.5: Esquema del principio de la microscopía confocal. La luz procedente de los puntos fuera del plano focal es eliminada por el diafragma o pinhole.

La microscopía confocal emplea un láser enfocado que ilumina un punto o región de la muestra a la vez. La señal emitida por la región iluminada vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través de un espejo dicroico y es enfocada en un detector (en general un fotomultiplicador (PMT) o fotodiodo de avalancha). Un pequeño diafragma o "pinhole" es colocado delante del detector para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco. La luz recolectada de la muestra, que proviene del plano focal del objetivo, es reenfocada y transmitida por el pinhole sin ninguna pérdida. En cambio, la luz dispersada o emitida por los puntos que se encuentran fuera del plano de la imagen es atenuada o bloqueada completamente, ver figura1.5. De esta manera, se obtiene una imagen de alto contraste y definición de un punto en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco. Para poder generar una imagen completa del plano, el microscopio realiza un barrido o escaneo punto a punto en el plano X-Y moviendo la dirección del láser a los distintos puntos de la muestra. En cada uno de esos puntos el PMT detecta la fluorescencia emitida (filtrada por el pinhole) y le asigna una intensidad de píxel (generalmente de 8 bit = valores de 0 a 255). Utilizando la intensidad de cada píxel se reconstruye una imagen digital.

Esta técnica es ideal para la observación de especimenes de gran tamaño, como el ovocito. Si bien la región donde se encuentran los receptores es relativamente delgada ($\sim 6\ \mu\mathrm{m}$) comparada

con su tamaño, el uso de la microscopía confocal permite tener imágenes definidas de los eventos de calcio. En el caso de las señales de calcio, se emplea el modo de barrido de una línea, que registra la intensidad de la fluorescencia realizando sucesivos barridos sobre una misma línea definida en la región de interés del ovocito. Se elige adquirir la fluorescencia en una línea en lugar de una imagen ya que, si bien se pierde cierta resolución espacial, la resolución temporal resulta significativamente mayor.

1.3. Dinámica del calcio intracelular y procesos de reacción–difusión

Cuando el calcio ingresa al citosol además de difundir reacciona con los buffers endógenos presentes. Como se mencionó antes, hay otros mecanismos que también afectan la concentración de calcio citosólico, como las bombas. Éstas actúan en una escala temporal más lenta que los buffers por lo que no se considerarán en esta sección. Acá nos concentramos en la dinámica del calcio en presencia de buffers exclusivamente. Se cree que prácticamente el $99\,\%$ del calcio citosólico se encuentra ligado a buffers endógenos. Los buffers de calcio atrapan y liberan Ca^{2+} con diferentes afinidades y cinéticas. La caracterización de la capacidad buffer de la célula es de suma importancia para entender las señales de calcio, porque los buffers no sólo reducen la concentración de calcio libre en el citosol, sino que también afectan la distribución espacial y el comportamiento temporal de las señales. Dado que los buffers difunden más lentamente que el calcio, su interacción con este ión reduce efectivamente su movilidad limitando su rango espacial de acción. Se cree que la información se encuentra guardada en la distribución espacio temporal del calcio. Para entender las señales de calcio libre es necesario caracterizar cuantitativamente la concentración y cinética de los buffers endógenos que están presentes en cada tipo de célula y la forma en que su presencia reduce la tasa de transporte del calcio.

1.3.1. Procesos de reacción-difusión

La interacción del Ca^{2+} con los buffers puede ser descripta mediante reacciones de la forma:

$$Ca^{2+} + B_i \underset{k_{on,i}}{\overset{k_{off,i}}{\rightleftarrows}} CaB_i, \tag{1.1}$$

donde $k_{on,i}$ y $k_{off,i}$ son las constantes cinéticas de asociación y disociación para la reacción del buffer B_i con Ca^{2+} y CaB_i es el buffer B_i ligado a Ca^{2+}. Si se considera que a $t = 0$ la concentración total de cada buffer, $[B_i](t = 0) + [CaB_i](t = 0)$, está uniformemente distribuida en el espacio, $B_{tot,i} \equiv [B_i](t = 0) + [CaB_i](t = 0)$; y que las formas libre y ligada del buffer, B_i y CaB_i, respectivamente, difunden a la misma tasa, $D_{B,i}$, se puede mostrar que $[B_i] + [CaB_i] = B_{tot,i}$ para todo tiempo y posición del espacio. De esta forma, se pueden considerar las ecuaciones de evolución de $[Ca^{2+}](\mathbf{x}, t)$ y de una sola variable por buffer, por ejemplo $[CaB_i](\mathbf{x}, t)$. Las ecuaciones de evolución para el sistema pueden escribirse como:

$$\frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} = D_{Ca}\nabla^2[Ca^{2+}] + \sum_i(-k_{on,i}[Ca^{2+}](B_{tot,i} - [CaB_i]) + k_{off,i}[CaB_i]), \quad (1.2)$$

$$\frac{\partial[CaB_i]}{\partial t} = D_{B,i}\nabla^2[CaB_i] - (-k_{on,i}[Ca^{2+}](B_{tot,i} - [CaB_i]) + k_{off,i}[CaB_i]), \quad (1.3)$$

donde la sumatoria recorre todos los buffers que afectan la dinámica del calcio citosólico y D_{Ca} es el coeficiente de difusión libre para Ca^{2+}. Para poder resolver el sistema completo dado por las Ecs. (1.2)-(1.3), se necesita un conocimiento completo de los parámetros cinéticos y las concentraciones. Desafortunadamente, esta información está muy pobremente caracterizada.

Aproximación de Buffers Rápidos

Las Ecs. (1.2)-(1.3) representan la descripción del sistema de reacción–difusión calcio–buffers. Diferentes reducciones analíticas de este modelo matemático completo han sido derivadas en diferentes regímenes límite. En particular, la Aproximación de Buffers Rápidos (RBA) se basa en la hipótesis de que no todos los procesos ocurren en la misma escala temporal: las reacciones con los buffers son los procesos más rápidos durante la evolución. De este modo, se puede considerar que los buffers y el Ca^{2+} están localmente en equilibrio químico, en cada punto del espacio:

$$B_{eq,i} = \frac{K_{d,i}B_{tot,i}}{K_{d,i} + Ca_{eq}} \quad (1.4)$$

donde Ca_{eq} y $B_{eq,i}$ son las concentraciones de calcio y buffer i libre en el equilibrio, y $K_{d,i}$ es la constante de disociación de la reacción Ca^{2+}- buffer i definida como $K_{d,i} = k_{off,i}/k_{on,i}$.

En presencia de buffers rápidos, las ecuaciones completas de reacción difusión que describen el transporte del Ca^{2+} Ecs. (1.2)-(1.3) se pueden reducir a una única ecuación de transporte para la concentración de calcio libre, usando la aproximación de buffers rápidos. La ecuación reducida puede reescribirse como una ecuación de reacción-difusión con un coeficiente de difusión

dependiente de la concentración [Sneyd et al., 1998]:

$$D_{RBA} = \frac{D_{Ca} + \sum_i \frac{B_{eq,i}^2}{B_{tot,i} K_{d,i}} D_{B,i}}{1 + \sum_i \frac{B_{eq,i}^2}{B_{tot,i} K_{d,i}}} \tag{1.5}$$

La validez de esta aproximación fue estudiada en muchos trabajos, entre ellos Smith et al. [1996]; Strier et al. [2003]. Sin embargo, aún siendo simplificadas, las ecuaciones reducidas requieren conocimiento detallado de procesos y parámetros que están pobremente caracterizados.

1.3.2. Estimación de la difusión efectiva del calcio usando sustancias radioactivas

En Allbritton et al. [1992] se estudió el coeficiente de difusión del calcio en extracto citosólico de ovocitos de *Xenopus laevis*, empleando calcio radioactivo $^{45}Ca^{2+}$. El calcio radioactivo se colocó en la parte superior de un tubo delgado que contenía el extracto citosólico, dejándolo difundir por varios períodos de tiempo. El tubo fue congelado y cortado en finas rodajas, determinándose la concentración de calcio radioactivo en cada sección, a partir de la cual infirieron el coeficiente de difusión del calcio. El experimento fue repetido varias veces agregando al extracto citosólico diferentes cantidades de calcio no radioactivo y dejándolo equilibrar con el medio antes de agregar el calcio radioactivo. En ese trabajo se observó que el valor del coeficiente de difusión del calcio medido dependía de la concentración de calcio agregado al extracto: a medida que se agregaba calcio al medio, mayor era el coeficiente de difusión medido. Se determinó que el coeficiente de difusión para el calcio aumentaba de 13 a 65 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ cuando la concentración de calcio libre se elevaba de 90 nM a 1 $\mu\mathrm{M}$. En Allbritton et al. [1992] proponen que la disminución del coeficiente de difusión del calcio en condiciones fisiológicas (baja concentración de calcio $\sim$ 90 nM) es resultado de su unión a buffers móviles e inmóviles presentes en el extracto. La tasa de transporte neta del calcio es, análogamente a lo encontrado en la aproximación de buffers rápidos (Ec. 1.5), un promedio pesado entre la difusión libre del ión y la de los buffers que depende de cuanto calcio se encuentra ligado a estos últimos. Al aumentar la concentración de calcio, menor resulta la proporción de concentración de calcio ligado a buffers y así aumenta el "coeficiente de difusión efectivo", ya que el calcio libre difunde más rápidamente que los buffers y que el calcio ligado a ellos. Como mostramos más adelante, no existe un único coeficiente de difusión efectivo, por lo que es necesario tener sumo cuidado al interpretar los resultados experimentales que determinan dichos coeficientes

1.3.3. Transporte en presencia de trampas y difusión efectiva

Además del calcio, las células utilizan el movimiento de moléculas mensajeras para transmitir información que se utiliza para regular una gran variedad de procesos, mediante diferentes mecanismos. En muchos casos, tanto en bacterias como en células eucariotas, el movimiento de las moléculas no se produce por difusión, sino por mecanismos de transporte activo con la participación del citoesqueleto [Alberts et al., 2007]. Sin embargo, incluso en el caso de difusión, es poco probable que el movimiento sea puramente difusivo. Además de las restricciones de movilidad debido a la aglomeración macromolecular [Ellis, 2001], la difusión de los mensajeros suele verse afectada por su interacción con otras sustancias que disminuyen la velocidad de las partículas en el medio. En ese sentido, estas moléculas actúan como trampas. El transporte que resulta de la combinación de difusión y las reacciones con las trampas se suele describir en términos de un coeficiente de difusión efectivo que depende de la concentración de las especies involucradas. Los coeficientes de difusión de estos mensajeros imponen restricciones sobre el rango y tiempos característicos de la propagación de la señal, y por lo tanto afectan el rendimiento global de los procesos biológicos que dependen de estos mensajeros.

Coeficientes efectivos de difusión

En Pando et al. [2006] se estudió el caso de un medio con partículas libres P_f y trampas S que difunden y reaccionan entre sí de acuerdo a un esquema bi-molecular (como el presentado en el caso del calcio y el buffer), asumiendo que las partículas ligadas P_b difunden a la misma tasa que la trampa. Si en ese medio coexisten partículas que están marcadas (superíndice t) y que no están marcadas (superíndice u), las poblaciones se dividen en dos grupos: P_f^t y P_f^u para partículas libres, y P_b^t y P_b^u para partículas ligadas. Se mostró en Pando et al. [2006], que hay dos coeficientes de difusión efectivos diferentes que describen la difusión de las partículas en esta situación. Uno de ellos, D_t, regula la dependencia temporal del desplazamiento medio cuadrático de una sola partícula marcada que difunde en un medio de trampas en equilibrio con partículas sin marcar. D_t también describe la propagación de una bola de partículas marcadas en un medio sin marcar. El otro coeficiente, D_u, regula la evolución de una bola de partículas sin marcar en el mismo medio. Estos coeficientes se escriben como:

$$D_t = \frac{D_f + (S_{eq}/K_d)D_S}{1 + S_{eq}/K_d} \tag{1.6}$$

$$D_u = \frac{D_f + [S_{eq}^2/(K_d S_{tot})]D_S}{1 + S_{eq}^2/(K_d S_{tot})}. \tag{1.7}$$

donde D_f y D_S son los coeficientes de difusión de la partícula libre y la trampa respectivamente, K_d la constante de disociación, S_{eq} la concentración de trampas libres en el equilibrio y S_{tot} la concentración total de trampas. Nótese que D_u coincide con el coeficiente efectivo obtenido a partir de la aproximación de buffers rápidos, Ec. 1.5.

En la mayoría de los casos, las trampas difunden más lentamente que las partículas libres de modo que $D_t/D_u \leq 1$. Dependiendo de los parámetros de la reacción entre trampas y partículas, esta relación puede ser arbitrariamente pequeña. Los mensajes son transmitidos generalmente por moléculas que se han activado por una modificación covalente después de la traducción (siendo la fosforilación la más común). Dado que en cada tiempo, sólo una fracción de las moléculas se activa, se puede pensar a las moléculas activas como marcadas, difundiendo en un medio con partículas sin marcar (moléculas no activas). Esto indica la necesidad de ser sumamente cuidadoso al interpretar los resultados de experimentos que usan partículas marcadas para obtener tasas de transporte. La determinación de D_t y D_u podría ser clave para comprender la propagación de la señal cuantitativamente.

1.4. Cuantificación de la difusión por métodos ópticos

1.4.1. Marcación de compuestos para su observación

Para estudiar mediante métodos ópticos la difusión de sustancias es necesario poder marcarlas fluorescentemente. Si la sustancia de interés es una proteína, existen técnicas de fusión que permiten unir la proteína de interés a una proteína fluorescente, como por ejemplo GFP o YFP. Existe una gran variedad de proteínas fluorescentes disponible en el mercado y, gracias a los avances en la tecnología de fusión, es posible marcar fluorescentemente una amplia gama de proteínas biológicamente relevantes [Stepanenko et al., 2008; Chudakov et al., 2005]. Otra forma de marcar fluorescentemente a una partícula es unir químicamente un fluoróforo a un grupo específico funcional de la molécula de interés. Este fluoróforo puede ser una pequeña molécula fluorescente o una partícula “quantum dot”, que son nanocristales semiconductores que emiten luz en una variedad de colores [Walling et al., 2009; Keppler et al., 2003; Smith, 2007]. A menos que se trate de una sonda específicamente diseñada, como por ejemplo las sondas de Ca^{2+}, en general, estas partículas o proteínas marcadas no cambian su fluorescencia al unirse a un sustrato

que actúe como trampa; permanecen fluorescentes a no ser que se fotoblanqueen [1].

1.4.2. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS)

La Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia, o FCS por sus iniciales en inglés, es una poderosa herramienta que permite determinar de manera no invasiva concentraciones locales, coeficientes de difusión, cambios conformacionales y reacciones fotoquímicas de moléculas fluorescentes en condiciones fisiológicas. FCS es una técnica basada en la medición de la autocorrelación de las fluctuaciones de la intensidad de la fluorescencia $F(t)$ en un volumen de detección del orden del femtolitro, generado usualmente por un haz de láser enfocado y detección confocal [Magde et al., 1972; Elson, 2001; Kim and Schwille, 2003; Krichevsky and Bonnet, 2002; Grünwald et al., 2005]. La distribución de intensidad del sistema de iluminación y detección confocal es comúnmente aproximado por una gaussiana en tres dimensiones:

$$I(\mathbf{r}) = I(0)e^{-\frac{2r^2}{w_r^2}}e^{-\frac{2z^2}{w_z^2}}, \tag{1.8}$$

donde $I(0)$ es la intensidad de la iluminación en $\mathbf{r} = 0$; (r, z) son la coordenadas cilíndricas con z la coordenada espacial a lo largo de la dirección de propagación del haz y r la coordenada radial en el plano perpendicular a dicha dirección; w_z y w_r son los tamaños de la cintura del haz a lo largo de z y r respectivamente, en general, $w_z > w_r$. Las fluctuaciones estadísticas de la fluorescencia alrededor del equilibrio se analizan calculando la función de autocorrelación definida por:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau)\rangle}{\langle F(t)\rangle^2}, \tag{1.9}$$

donde $\langle F(t)\rangle$ es el promedio temporal de la fluorescencia en el volumen de detección y $\delta F(t)$ es la desviación en cada tiempo t, de la fluorescencia con respecto a este valor promedio.

Difusión de partículas libres

En un caso de m especies de partículas marcadas fluorescentemente, la amplitud de la fluorescencia esta dada por:

$$F(t) = \int I(\mathbf{r}) \sum_{i=1}^{m} (Q_i[C_i](\mathbf{r}, t))d^3r, \tag{1.10}$$

[1] pérdida irreversible de la fluorescencia de un fluoróforo debido a daños químicos producidos por los fotones.

donde $[C_i](\mathbf{r}, t)$ es la concentración de partículas de especie i a tiempo t y en el punto $\mathbf{r}$. El parámetro Q_i, es el producto de la eficiencia de detección, eficiencia cuántica y la sección eficaz de absorción, característico de cada especie fluorescente i.

Si las diferentes especies de partículas difunden libremente con coeficiente de difusión D_i, sin interactuar entre sí, la función de autocorrelación dada por la Ec. (1.9) se puede calcular analíticamente:

$$G(\tau) = \sum_{i=1}^{m} \frac{Go_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2 \tau_{Di}}}}, \tag{1.11}$$

donde $w = w_z/w_r$ y τ_{Di} es el tiempo característico de difusión de la especie i a través del volumen de detección, que depende del coeficiente de difusión de las partículas, D_i, de la forma:

$$\tau_{Di} = \frac{w_r^2}{4D_i} \tag{1.12}$$

El valor de los pesos, Go_i, es inversamente proporcional a la concentración total de partículas fluorescentes de especie i, $P_{tot,i}$, y se escribe:

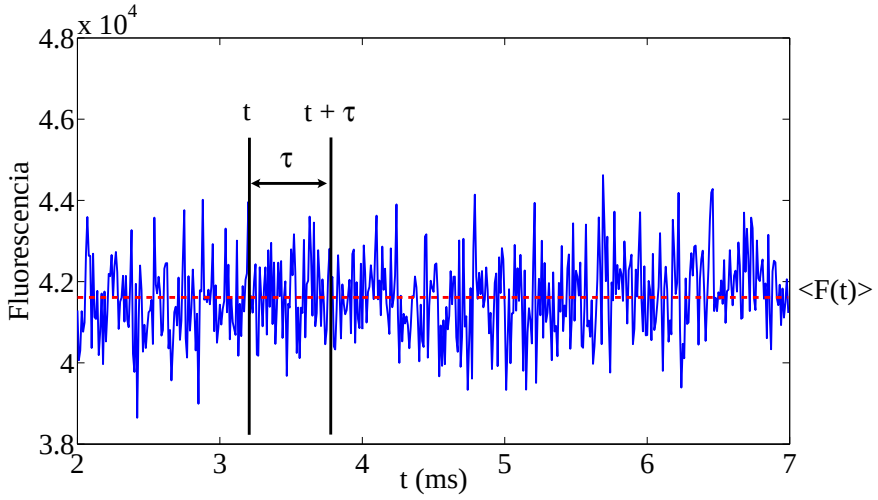
$$Go_i = \frac{1}{V_{ef} P_{tot,i}} \tag{1.13}$$

donde V_{ef} es el volumen confocal efectivo definido como:

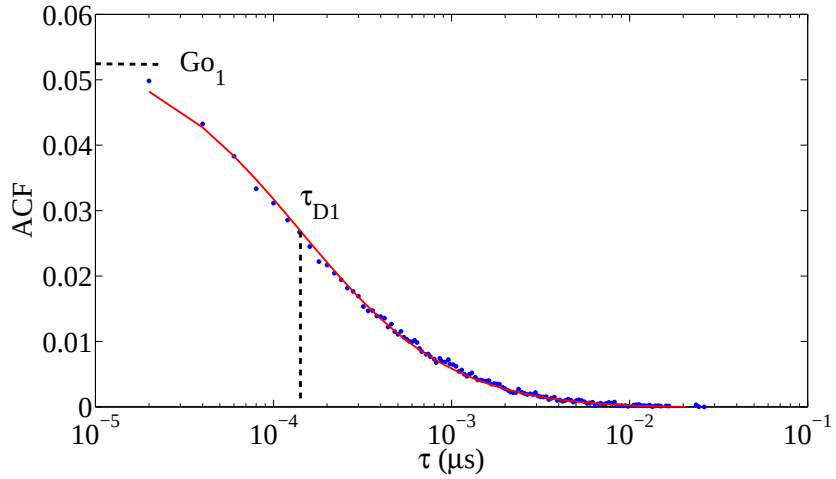
$$V_{ef} = \pi^{3/2} w_r^2 w_z. \tag{1.14}$$

A modo de ejemplo, se ilustra en la figura 1.6 el caso de difusión libre de TMR-dextran (Invitrogen-Molecular Probes) en agua. TMR-dextran está formada por la unión de TMR, una pequeña molécula fluorescente, a un dextrano de peso molecular 10000. En la figura 1.6(a) se observa un tramo de la serie temporal de la fluorescencia adquirida en un experimento de FCS que se realizó en el microscopio confocal modelo Fluo View 1000 de la firma Olympus del Laboratorio de Microscopía y Microespectroscopía. Allí se pueden apreciar las fluctuaciones de la intensidad alrededor del valor de equilibrio. La curva de autocorrelación experimental, figura 1.6(b), se obtiene restando el valor medio de la fluorescencia a la serie temporal y calculando la autocorrelación según Ec. (1.9). Para extraer información de los experimentos, la curva de autocorrelación obtenida experimentalmente debe ser ajustada por un modelo adecuado de autocorrelación, en este caso el de difusión libre de una sola especie, Ec. (1.11) especificando $m = 1$. Dos parámetros pueden ser determinados a partir de su ajuste: el valor de la correlación a $\tau = 0$, Go_1, y el tiempo característico τ_{D1}, que puede interpretarse como el tiempo de residencia medio de las partículas fluorescentes en el volumen de detección. Previamente, se debe realizar una

calibración para determinar los parámetros geométricos del volumen de detección, que consiste en realizar un experimento de FCS de difusión libre con una muestra de coeficiente de difusión conocido. Una vez conocidos w_r y w_z, se pueden estimar los valores de D_1 y P_{tot} a partir de τ_{D1} y Go_1 respectivamente.



(a) Serie temporal de la fluorescencia



(b) Función de autocorrelación, datos experimentales (puntos), ajuste (línea contínua)

Figura 1.6: Datos experimentales obtenidos en solución 50 nM TMR-dextran* en agua, empleando la técnica FCS en microscopio confocal Fluo View 1000 Olympus. * Invitrogen-Molecular Probes

FCS en procesos de reacción- difusión

En el caso general de un sistema de muchos componentes químicos que difunden e interactúan químicamente entre sí, las fluctuaciones estadísticas alrededor del equilibrio, provienen no sólo de la difusión de partículas que entran y salen del volumen de detección, sino también de las fluctuaciones químicas debidas a la asociación y disociación de moléculas [Magde et al., 1972].

Con el fin de encontrar una expresión general para la función de correlación, se deben plantear las ecuaciones de reacción-difusión. La solución de estas ecuaciones linealizadas alrededor del equilibrio, se puede expresar en el espacio de Fourier y puede ser escrita en término de las ramas de autovalores, $\lambda(\mathbf{q})$, y autovectores, $\chi(\mathbf{q})$, donde $\mathbf{q}$ es la variable conjugada en el espacio de Fourier de la coordenada espacial, $\mathbf{r}$. En el caso de un sistema de m componentes químicos que difunden e interactúan químicamente entre sí, la autocorrelación definida en Ec. (1.9) con la fluorescencia dada por la Ec. (1.10) puede ser escrita en términos de los autovalores y autovectores del problema de reacción-difusión linealizado. Si la longitud de correlación es mucho más chica que la distancia entre dos partículas fluorescentes, es posible asumir que las fluctuaciones en las concentraciones de las especies fluorescentes δC_i, satisfacen $\langle \delta C_j(\mathbf{r},0)\delta C_k(\mathbf{r}',0)\rangle = C_{eq,j}\delta_{jk}\delta(\mathbf{r}-\mathbf{r}')$, $1 \leq j,k \leq m$. En ese caso, $G(\tau)$ puede ser escrita como Krichevsky and Bonnet [2002]:

$$G(\tau) \;=\; \frac{1}{(2\pi)^3\left(\sum_{i=1}^{m} Q_i C_{eq,i}\right)^2} \times \int d^3q \;\; \hat{I}(\mathbf{q}) \;\; \sum_{j,k=1}^{m} Q_j Q_k \; C_{eq,j} \sum_{s=1}^{m} \chi_{ks} \; e^{\lambda_s \tau} \; \chi^{-1}_{sj} \tag{1.15}$$

donde

$$\hat{I}(\mathbf{q}) \equiv e^{-\dfrac{w_r^2 q_r^2}{4} - \dfrac{w_z^2 q_z^2}{4}} \tag{1.16}$$

con q_r y q_z las variables conjugadas en el espacio de Fourier de r y z, respectivamente, $C_{eq,i}$ es la concentración en equilibrio del componente i y λ_s y χ son los autovalores y la matriz con los autovectores del problema linealizado.

Los coeficientes de los procesos de reacción-difusión, como los coeficientes de difusión y constantes de reacción, determinan la forma de la función de correlación. En principio, a partir de expresiones para la función de correlación, es posible obtener los valores de los coeficientes. Pero a veces la presencia de dos o más procesos puede resultar confusa y no siempre se puede obtener información fidedigna y confiable acerca de estos coeficientes. Además no siempre

se cuenta con una expresión analítica de la función de correlación, razón por la cual se usan aproximaciones validas en diferentes regímenes. Es por eso que cada caso en particular se debe analizar cuidadosamente para obtener datos confiables acerca de los procesos que causan las fluctuaciones estudiadas en este tipo de técnica.

1.4.3. Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP)

La recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueado, o FRAP por sus iniciales en inglés, es otra técnica óptica muy usada para la determinación de coeficientes de difusión y el estudio de interacciones de proteínas en células. Existe una extensa lista de bibliografía sobre el tema entre los cuales se destacan Axelrod et al. [1976]; Jacobson and Wojcieszyn [1984]; Gribbon and Hardingham [1998]; Braeckmans et al. [2003]; Sprague and McNally [2005]; a continuación se presenta muy brevemente los conceptos de FRAP necesarios para este trabajo.

La técnica de FRAP se basa en medir la recuperación de la fluorescencia en un volumen, luego de haber fotoblanqueado al marcador fluorescente. La forma en que se recupera la fluorescencia está relacionada con los procesos de difusión y/o reacción a los que está sujeto el marcador. La curva de recuperación puede ser descripta de la siguiente forma:

$$f(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_\infty - F_0} \tag{1.17}$$

donde $F(t)$ es la fluorescencia en el volumen de detección, F_0 es la fluorescencia inmediatamente después de fotoblanquear y F_∞ es la fluorescencia a tiempos largos. En la figura 1.7, se muestra una curva de recuperación típica de FRAP.

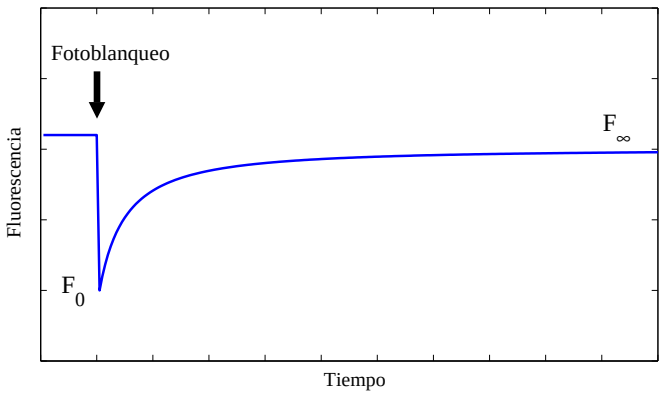


Figura 1.7: Curva de recuperación característica de la fluorescencia en un experimento de FRAP.

FRAP en procesos de reacción–difusion

En FRAP la situación inicial de equilibrio es perturbada al fotoblanquear una región y se mide la recuperación de la fluorescencia, que en definitiva es la difusión de partículas marcadas en una región de partículas sin marcar. Es de esperar que el coeficiente de difusión que rija su comportamiento sea D_t. De hecho, en el caso de partículas marcadas en presencia de trampas, se demostró en Sprague et al. [2004], que cuando la reacción ocurre en una escala temporal más rápida que la difusión libre, los experimentos de FRAP dan información acerca del coeficiente de difusión efectivo, D_t.

1.5. Esquema de la Tesis

El objetivo de esta Tesis es avanzar en la obtención de estimaciones realistas del transporte y tasas de reacción del calcio con su indicador y con buffers, realizando experimentos ópticos y desarrollando el marco teórico necesario para extraer información cuantitativa de los mismos, con el fin de lograr una mayor entendimiento de las señales de calcio. La organización de la Tesis se describe a continuación.

En el Capítulo 2 se estudia en forma detallada la información que es posible extraer a partir de experimentos de FCS en donde la sustancia de interés marcada fluorescentemente, difunde y reacciona. En particular, se demuestra que las técnicas de FCS y FRAP brindan información sobre coeficientes distintos, que puede ser combinada para inferir tasas de reacción y de difusión libre.

En el Capítulo 3 se realiza el estudio teórico para el caso en que coexisten moléculas marcadas y no marcadas en el mismo sistema. Los resultados son aplicados para explicar las diferencias observadas en experimentos de FCS y FRAP, realizados para determinar el coeficiente de difusión del producto del gen bicoid en embriones de moscas *Drosophila melanogaster*, una sustancia fundamental para el establecimiento del eje dorsoventral en este organismo.

En el Capítulo 4 se estudia la aplicación de FCS para inferir propiedades de transporte e interacciones del calcio. Para tal fin se investigan los coeficientes efectivos de difusión que se obtienen en un sistema donde hay partículas que interactúan con dos tipos de trampa, aplicándose al caso particular del calcio identificando una de las trampas con el indicador y la otra con un buffer no fluorescente. Se presentan datos experimentales en solución empleando un indicador de

calcio, que corroboran la existencia de dichos coeficientes. Se propone un método para estimar la difusión del calcio y la capacidad buffer en ovocitos a partir de experimentos de FCS.

En el Capítulo 5 se presenta el diseño e implementación de una adaptación de un microscopio confocal Olympus FV1000 para realizar la fotólisis de compuestos enjaulados mediante luz ultravioleta. Esta adaptación resulta esencial para la observación de señales de calcio mediadas por IP_3. Se caracteriza el sistema y se comprueba su capacidad para fotolizar compuestos enjaulados.

En el Capítulo 6 se muestra la habilidad del sistema presentado en el Capítulo 5, para generar estímulos precisos y controlados de IP_3 simultáneamente a la obtención de imágenes confocales en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se presenta el método de obtención de las señales de calcio y se muestran diferentes registros de señales de calcio en ovocitos.

Por último, en el Capítulo 7 se sintetizan los resultados de la Tesis, se presentan sus conclusiones generales y se discuten sus aplicaciones y las líneas de investigación que quedan planteadas a partir de la misma.

2

Difusión en presencia de trampas. Coeficientes efectivos y su cuantificación mediante FCS y FRAP

En este capítulo se estudia la función de correlación que se obtiene mediante FCS cuando coexisten procesos de difusión y reacción. Se describe el caso de partículas fluorescentes difundiendo en un medio homogéneo con trampas, que presentan cierta probabilidad por unidad de tiempo de atrapar o liberar a una partícula de acuerdo a un esquema de reacción bi-molecular. Se presenta la expresión integral de la función de correlación para este caso. Mediante la aproximación a tiempo largos se obtiene una expresión analítica de la función de correlación, que es función de coeficientes efectivos de difusión. Se estudia la validez de dicha aproximación y se compara con el modelo integral. Este modelo aproximado brinda una expresión analítica que puede ser usada para obtener parámetros de reacción - difusión, ajustando datos experimentales con el modelo aproximado. Se discute la información que puede ser obtenida empleando el modelo aproximado en experimentos de FCS y además en combinación con experimentos de

FRAP.

2.1. Modelo completo de FCS para partículas fluorescentes que difunden y reaccionan con trampas

A continuación se estudiará el comportamiento de la función de correlación cuando coexisten procesos de difusión y reacción. En particular, se describe el caso en que partículas fluorescentes difunden en un medio homogéneo con trampas, que presentan cierta probabilidad por unidad de tiempo de atrapar o liberar a una partícula. El modelo simple, más realista, que incorpora trampas y partículas, es el que reacciona de acuerdo al esquema:

$$P_f + S \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\longleftrightarrow}} P_b \tag{2.1}$$

donde k_{on} y k_{off} son las constantes cinéticas de la reacción. En el esquema (2.1) S representa las trampas libres, P_f representa a las partículas libres y P_b representa a las partículas atrapadas (ligadas a trampas). El coeficiente de difusión de las trampas es D_S y el de la partículas libres es D_f. Como en general las trampas son moléculas mucho más grandes que las partículas, se asume que el coeficiente de difusión de las partículas ligadas es igual a la de la trampa libre, D_S.

En el caso en que las partículas marcadas fluorescentemente difundan e interactúen con trampas de acuerdo al esquema (2.1), la intensidad de la fluorescencia está dada por:

$$F(t) = \int QI(\mathbf{r}) \left([P_f](\mathbf{r},t) + [P_b](\mathbf{r},t)\right) d^3r, \tag{2.2}$$

donde $[P_b]$ y $[P_f]$ son la concentración de partículas ligadas y libres respectivamente, $I(\mathbf{r})$ es la distribución de intensidades definida en la Ec. 1.8 y Q es el producto de la eficiencia de detección, eficiencia cuántica y la sección eficaz de absorción de la partícula fluorescente. Está implícito en la Ec. (2.2) que las trampas libres, S, no son fluorescentes y que el brillo de las partículas no se ve afectado al estar ligadas a las trampas, es por eso que el factor Q es común a ambos términos. Las trampas se consideran macromoléculas que están distribuidas uniformemente en el espacio y que son lo suficiente grandes como para que su coeficiente de difusión, D_S, no cambie al ligar la partícula. Las partículas también se suponen uniformemente distribuidas. Partículas y trampas están en equilibrio, de forma que las concentraciones promedio sean las dadas por las concentraciones en equilibrio, P_{feq}, P_{beq} y S_{eq}:

$$P_{feq} S_{eq} = K_d P_{beq}, \tag{2.3}$$

donde K_d es la constante de disociación definida como $K_d = k_{off}/k_{on}$. La concentración total de partículas $P_{tot} = \langle[P_f]\rangle + \langle[P_b]\rangle = P_{feq} + P_{beq}$. En FCS se observan las fluctuaciones alrededor del equilibrio. Para determinar la dependencia espacio-temporal de estas fluctuaciones, las ecuaciones de evolución de las concentraciones $[P_f]$, $[P_b]$ y $[S]$:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[P_f]}{\partial t} &= D_f\nabla^2[P_f] - k_{on}[P_f][S] + k_{off}[P_b], \\
\frac{\partial[P_b]}{\partial t} &= D_S\nabla^2[P_b] + k_{on}[P_f][S] - k_{off}[P_b], \\
\frac{\partial[S]}{\partial t} &= D_S\nabla^2[S] - k_{on}[P_f][S] + k_{off}[P_b],
\end{aligned} \tag{2.4}$$

son linealizadas alrededor de la solución de equilibrio Ec. (2.3).

2.1.1. Cálculo de autovalores y autovectores

Para calcular la función de correlación, $G(\tau)$, dada por la Ec. (1.9), se linealizan las Ecs. (2.4) alrededor del equilibrio Ec. (2.3). Definiendo $\Delta P \equiv P_f - P_{feq}$, $\Delta B \equiv P_b - P_{beq}$ y $\Delta S = S - S_{eq}$, e introduciendo el tiempo adimensional $T \equiv k_{off}t$ y espacio $\xi = \sqrt{k_{off}/D_f}\ \mathbf{r}$, las ecuaciones linealizadas resultan:

$$\begin{aligned}
\begin{pmatrix} \frac{\partial\Delta P}{\partial T} \\ \frac{\partial\Delta B}{\partial T} \\ \frac{\partial\Delta S}{\partial T} \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} \nabla_\xi^2 - a & 1 & -c \\ a & \tilde{D}\nabla_\xi^2 - 1 & c \\ -a & 1 & \tilde{D}\nabla_\xi^2 - c \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta P \\ \Delta B \\ \Delta S \end{pmatrix} \\
&+ \frac{\Delta P\ \Delta S}{K_d} \begin{pmatrix} -1 \\ 1 \\ -1 \end{pmatrix},
\end{aligned} \tag{2.5}$$

donde $\tilde{D} = D_S/D_f$, $a = S_{eq}/K_d$ y $c = P_{feq}/K_d$. Aplicando la transformada de Fourier a estas ecuaciones se obtiene:

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial\hat{F}_q}{\partial T} \\ \frac{\partial\hat{B}_q}{\partial T} \\ \frac{\partial\hat{S}_q}{\partial T} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\tilde{q}^2 - a & 1 & -c \\ a & -\tilde{D}\tilde{q}^2 - 1 & c \\ -a & 1 & -\tilde{D}\tilde{q}^2 - c \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{F}_q \\ \hat{B}_q \\ \hat{S}_q \end{pmatrix} \tag{2.6}$$

donde $\tilde{q}$ es la norma del vector de onda adimensional, $\tilde{q} = |\tilde{\mathbf{q}}|$, y $\hat{A}_q(t) = (2\pi)^{-\frac{3}{2}}\int_{-\infty}^{+\infty}\Delta A(\mathbf{r},t)e^{-i\tilde{\mathbf{q}}\cdot\xi}d^3\xi$ para $A = P, B, S$. Las ramas de los autovalores (adimensio-

nales), $\tilde{\lambda}_s(\tilde{\mathbf{q}})$, de la Ec. (2.6) son:

$$\begin{aligned}
\tilde{\lambda}_1 &= -\tilde{D}\tilde{q}^2, \\
\tilde{\lambda}_2 &= -\frac{1}{2}\left[a+h+\left(\tilde{D}+1\right)\tilde{q}^2\right] + \frac{1}{2}\sqrt{\left(\tilde{D}-1\right)^2\tilde{q}^4 + 2\tilde{q}^2\left(\tilde{D}-1\right)(h-a)+(a+h)^2}, \\
\tilde{\lambda}_3 &= -\frac{1}{2}\left[a+h+\left(\tilde{D}+1\right)\tilde{q}^2\right] - \frac{1}{2}\sqrt{\left(\tilde{D}-1\right)^2\tilde{q}^4 + 2\tilde{q}^2\left(\tilde{D}-1\right)(h-a)+(a+h)^2},
\end{aligned} \tag{2.7}$$

donde $h = 1 + c = S_{tot}/S_{eq}$ y la correspondiente matriz de autovectores, $\chi(q)$ es:

$$\chi = \begin{pmatrix} 0 & -\left(h+\tilde{D}\tilde{q}^2+\tilde{\lambda}_2\right) & -\left(h+\tilde{D}\tilde{q}^2+\tilde{\lambda}_3\right) \\ h-1 & -a & -a \\ 1 & a & a \end{pmatrix}. \tag{2.8}$$

2.1.2. Expresiones de autocorrelación para el modelo completo

Insertando las Ecs. (2.7) en (2.8) como función de $\tilde{\mathbf{q}}$ en la Ec. (1.15) se obtiene la función de autocorrelación como la suma de tres contribuciones, que corresponde cada una a una rama de autovalores:

$$G(\tau) = G_S(\tau) + G_1(\tau) + G_2(\tau), \tag{2.9}$$

$$G_S(\tau) = \frac{Go_S}{\left(1+\dfrac{\tau}{\tau_{DS}}\right)\sqrt{1+\dfrac{\tau}{w^2\tau_{DS}}}}, \tag{2.10}$$

$$G_1(\tau) = \frac{P_{feq}}{4hk_{off}P_{tot}^2}\int \frac{d^3\mathbf{q}}{(2\pi)^3}\hat{I}(\mathbf{q})e^{\tilde{\lambda}_2\tau k_{off}} \times \left(2\nu + \sqrt{\cdot} + \frac{\nu^2-(D_S-D_f)^2q^4}{\sqrt{\cdot}}\right), \tag{2.11}$$

$$G_2(\tau) = \frac{P_{feq}}{4hk_{off}P_{tot}^2}\int \frac{d^3\mathbf{q}}{(2\pi)^3}\hat{I}(\mathbf{q})e^{\tilde{\lambda}_3\tau k_{off}} \times \left(2\nu - \sqrt{\cdot} - \frac{\nu^2-(D_S-D_f)^2q^4}{\sqrt{\cdot}}\right), \tag{2.12}$$

donde los términos G_1 y G_2 están escritos función del vector de onda con dimensiones, $\mathbf{q} = \tilde{\mathbf{q}}\sqrt{k_{off}/D_f}$, $\nu = k_{off}(a+h)$ y $\sqrt{\cdot} = \sqrt{(D_S-D_f)^2q^4 + 2q^2(D_S-D_f)k_{off}(h-a)+\nu^2}$. $\hat{I}(\mathbf{q})$ es la transformada de Fourier de la distribución de intensidad del sistema, Ec. 1.16.

2.2. Modelo aproximado para tiempos largos

La autocorrelación dada por las Ecs. (2.9–2.12) se debe comparar con la obtenida experimentalmente para determinar los parámetros que rigen el transporte de las partículas de interés, en particular el coeficiente de difusión. Con este fin es necesario tener una expresión más simple, es decir analítica de las integrales involucradas en las Ecs. (2.9–2.12). Notar que el término correspondiente al primer autovalor, G_S, puede ser integrado analíticamente. Sin embargo, en general, no es posible encontrar una expresión analítica para G_1 y G_2 aunque se puede obtener una expresión analítica bajo ciertas aproximaciones [Bismuto et al., 2001; Lamb et al., 2000].

2.2.1. Coeficientes efectivos de difusión

La principal cantidad de interés en los experimentos de FCS es la función de autocorrelación, $G(\tau)$, la dependencia temporal de la misma está determinada por los autovalores del problema lineal. Estos autovalores (Ec. 2.7) son negativos y su norma son funciones crecientes del vector de onda al cuadrado, q^2. Las componentes de mayores longitudes de onda, son las que decaen más lentamente. Inspeccionando las ramas de autovalores (Ec. (2.7)) se observa al recuperar dimensiones, que el primer autovalor $\lambda_1 = D_S q^2$ está directamente relacionado con el coeficiente de difusión de las trampas. Los otros dos autovalores no son directamente proporcionales a q^2. Pero, en el límite de $\mathbf{q}$ pequeño, que corresponde a los modos más relevantes en el límite de tiempos largos, pueden ser aproximados como:

$$\begin{aligned} \lambda_2 &\approx -\frac{hD_f + aD_S}{a+h} q^2, \\ \lambda_3 &\approx -(a+h)k_{off} - \frac{aD_f + hD_S}{a+h} q^2, \end{aligned} \tag{2.13}$$

donde $a = S_{eq}/K_d$ y $h = S_{tot}/S_{eq}$, se dan las expresiones de los autovalores recuperando las dimensiones. Mientras que λ_2 describe un comportamiento puramente difusivo a $\mathbf{q}$ pequeño, λ_3 incluye un decaimiento exponencial, proporcional a k_{off}, superpuesto a la difusión. Los correspondientes coeficientes de difusión asociados son:

$$D_{ef1} = \frac{D_f + (a/h)D_S}{1 + (a/h)}, \tag{2.14}$$

$$D_{ef2} = \frac{(a/h)D_f + D_S}{1 + (a/h)}. \tag{2.15}$$

D_{ef1} coincide con el coeficiente de difusión, D_u, dado por la Ec. (1.7).

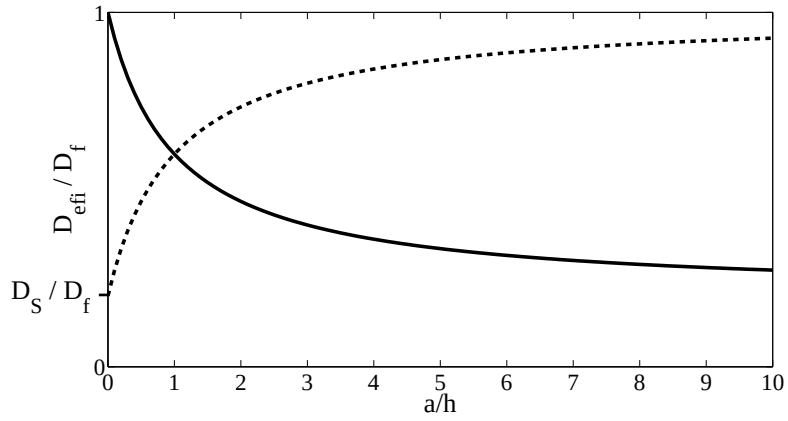


Figura 2.1: Cociente entre D_{ef1} y D_f (línea continua) y cociente entre D_{ef2} y D_f (línea punteada) en función de a/h.

En la figura 2.1 se muestra el gráfico de los coeficientes adimensionales D_{ef1}/D_f y D_{ef2}/D_f en función de $a/h = S_{eq}^2/(S_{tot}K_d)$. Como se puede observar, los coeficientes efectivos de difusión son iguales para $a/h = 1$, es decir, para $S_{eq}^2 = (S_{tot}K_d)$, y $D_{ef2} > D_{ef1}$ cuando $a/h > 1$. Los valores que pueden tomar los coeficientes de difusión efectivos se encuentran entre el coeficiente de difusión de la trampa y el de la partícula libre ($D_S \leq D_{efi} \leq D_f$), y la suma de ambos coeficientes efectivos siempre es $D_f + D_S$.

2.2.2. Función de correlación del modelo aproximado

En el caso general no es posible encontrar una expresión analítica para G_1 y G_2. Sin embargo, es posible hacerlo en el límite de $\mathbf{q}$ pequeño. Introduciendo una expansión en términos de potencias de q^2 y quedándose a orden $\mathcal{O}(q^2)$ en los exponentes, se obtiene:

$$G_1(\tau) = v_o \int \frac{d^3\mathbf{q}}{(2\pi)^3} \hat{I}(\mathbf{q}) e^{-D_{ef1}\tau q^2} \left(1 + \mathcal{O}(q^4)\right), \tag{2.16}$$

$$G_2(\tau) = e^{-\nu\tau} \int \frac{d^3\mathbf{q}}{(2\pi)^3} \hat{I}(\mathbf{q}) e^{-D_{ef2}\tau q^2} \mathcal{O}(q^4), \tag{2.17}$$

donde $v_o = \dfrac{P_{feq}}{P_{tot}^2} \dfrac{(a+h)}{h}$. La Ec. (2.16) puede ser integrada exactamente si se desprecian términos de orden $\mathcal{O}(q^4)$ o mayores, si se combina con la Ec. (2.10) lleva a la ecuación Ec. (2.18). Nótese en la Ec. (2.17) que el termino principal en G_2 es $\mathcal{O}(q^4)$.

Integrando las Ecs. 2.17 a orden q^2,se obtiene:

$$G(\tau) = \frac{Go_S}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{DS}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{DS}}}} + \frac{Go_u}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{Du}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{Du}}}}, \tag{2.18}$$

donde $\tau_{DS} = w_r^2/(4D_S)$, $\tau_{Du} = w_r^2/(4D_u)$ y Go_S y Go_u estan dados por:

$$Go_S = \frac{P_{beq}^2}{V_{ef}P_{tot}^2 S_{tot}}, \tag{2.19}$$

$$Go_u = \frac{1}{V_{ef}P_{tot}} - \frac{P_{beq}^2}{V_{ef}P_{tot}^2 S_{tot}}, \tag{2.20}$$

donde V_{ef} es el volumen efectivo y dado que $D_{ef1} = D_u$ a partir de ahora se mantendrá esta última notación. Este modelo aproximado tiene dos términos en la función de autocorrelación, se observa en la Ec. (2.18) que se pierde la información de D_{ef2} a este nivel de aproximación. Los dos términos que quedan tienen la misma dependencia temporal que la función de autocorrelación en el caso de difusión pura Ec. (1.11) para $m = 2$ componentes. El primer término tiene el tiempo característico $\tau_{DS} = w_r^2/(4D_S)$ que corresponde al tiempo característico de difusión de la trampa en el volumen de detección. El segundo término tiene el tiempo característico $\tau_{Du} = w_r^2/(4D_u)$ asociado al coeficiente de difusión efectivo colectivo, D_u, the Ec. (1.7) que depende de los coeficientes de difusión de las partículas y trampas y de los parámetros de la reacción. Si no hubiera trampas, $D_u = D_f$, y el primer término de la Ec. (2.18) fuese cero, se recuperaría la función de autocorrelación de partículas difundiendo libremente, Ec. (1.11) y su valor a $\tau = 0$ sería proporcional al número de partículas. En el límite en donde todas las partículas se encuentran atrapadas por las trampas, la función de correlación también tendría la forma de la Ec. (1.11) pero con el coeficiente $D_u \approx D_S$.

Estos cálculos muestran que, mientras valga la aproximación de $\mathbf{q}$ pequeño, la función de autocorrelación presenta dos "componentes": uno que depende del coeficiente de difusión de la trampa D_S y el otro que depende del coeficiente efectivo de difusión colectivo D_u de la Ec. (1.7). Dada la función de autocorrelación obtenida de los experimentos, la contribución de los dos componentes podrá ser separada siempre y cuando D_S y D_u sean suficientemente diferentes (que difieran en por lo menos un factor 2 [Meseth et al., 1999]). Esto es válido, en particular, para el caso de trampas inmóviles, $D_S = 0$, en donde la primer componente desaparece. Si las dos componentes pueden ser separadas, ajustando la función de autocorrelación experimental con la Ec. (2.18) se obtienen cuatro parámetros: Go_S, Go_u, τ_{DS} y τ_{Du}. De los tiempos característicos se pueden estimar los coeficientes de difusión D_S y D_u, previa calibración de los parámetros geométricos del volumen de detección.

2.2.3. Límites de aplicación del modelo

A continuación se analizarán los límites de aplicación de la aproximación de $\mathbf{q}$ pequeño dada por la Ec. (2.18). Como se vio en la sección anterior, la función de correlación sin aproximaciones es la suma de tres componentes, G_S, G_1 y G_2, cada una correspondiente a una rama de autovalores, λ_1, λ_2 y λ_3, del problema linealizado. La primer componente, G_S, asociada a $\lambda_1 = -D_S q^2$ o equivalentemente, al coeficiente de difusión de las trampas, D_S, puede ser integrada analíticamente. Como ambos integrandos en las expresiones de G_1 y G_2 contienen funciones exponenciales decrecientes de q^2, es posible definir un valor de corte, q_c^2, de forma tal que la diferencia entre calcular la integral sobre todos los valores de $\mathbf{q}$ y para $q^2 \leq q_c^2$, sea despreciable. Este valor de corte es una función decreciente de τ, existe un valor τ_{min} para el cual $q_c^2(\tau_{min})$ es lo suficientemente chico como para que la aproximación que conduce a la Ec. (2.18) sea válida para todo $\tau \geq \tau_{min}$.

Como uno de los propósitos de los experimentos de FCS es extraer tiempos característicos de los cuales se puedan derivar propiedades de transporte, se quiere establecer el rango de valores de los parámetros para los cuales $\tau_{min} < \tau_{DS}, \tau_{Du}$ de forma tal que τ_{DS} y τ_{Du} puedan ser estimados confiablemente del ajuste de la función de autocorrelación experimental con el modelo Ec. (2.18).

Para estudiar bajo qué condiciones es válida la aproximación, se analiza el siguiente orden en la expansión de $\mathbf{q}$, es decir, se estudia hasta orden $\mathcal{O}(q^4)$ tanto en el exponente, que corresponde a λ_2, como en los términos multiplicativos. En esta expansión, G_1 y G_2 resultan:

$$G_1(\tau) = \int \frac{d^3\mathbf{q}}{(2\pi)^3}\,\hat{I}(\mathbf{q})\left(v_o e^{-D_u\tau q^2+\nu\gamma\tau q^4} - v_1 q^4 e^{-D_u\tau q^2}\right), \tag{2.21}$$

$$G_2(\tau) = e^{-\nu\tau}\int \frac{d^3\mathbf{q}}{(2\pi)^3}\hat{I}(\mathbf{q}) v_1 q^4 e^{-D_{ef2}\tau q^2}, \tag{2.22}$$

donde D_u y D_{ef2} están dados por las Ecs. 2.14y 2.15, $v_1 = v_o\gamma$ y $\gamma = \dfrac{ah}{(a+h)^2}\dfrac{(D_f - D_S)^2}{\nu^2}$. Para despreciar el $\mathcal{O}(q^4)$ en el exponente y en el factor multiplicativo en G_1 se debe cumplir:

$$q^2 \ll \frac{D_u}{\nu\gamma} \tag{2.23}$$

$$q^2 \ll \sqrt{\frac{v_o}{v_1}} \tag{2.24}$$

y para despreciar el $\mathcal{O}(q^4)$ en G_2 se requiere que:

$$q^4 \ll \frac{v_o}{v_1} e^{\nu\tau} e^{(D_{ef2}-D_u)\tau q^2}. \tag{2.25}$$

Nótese que si los $\mathcal{O}(q^4)$ se pueden despreciar para G_1, entonces solamente es necesario pedir que $\nu + (D_{ef2} - D_u)q^2 > 0$ para garantizar que el $\mathcal{O}(q^4)$ pueda ser despreciado en G_2. Se observa que esta última condición sobre $\mathbf{q}$ se cumple automáticamente si $D_{ef2} \geq D_u$ pero si $D_{ef2} < D_u$, además de satisfacer las condiciones en la Eq 2.23, $\mathbf{q}$ debe satisfacer la relación:

$$q^2 \leq \frac{\nu}{(D_u - D_{ef2})}. \tag{2.26}$$

Como se puede observar, en la figura 2.1 los coeficientes efectivos de difusión son iguales para $a/h = 1$, es decir, para $S_{eq}^2 = S_{tot}K_d$, y $D_{ef2} > D_u$ cuando $a/h > 1$.

Como se mencionó con anterioridad, existe un valor de corte, q_c^2, que depende de τ. Si el valor de corte, q_c^2, satisface las relaciones (2.23)– (2.25), la aproximación de $\mathbf{q}$ pequeño será valida. Este valor de corte depende además de parámetros geométricos del volumen de detección y de parámetros de reacción– difusión. Debido a la simetría del volumen confocal, es posible definir dos valores de corte, uno en la dirección de z, q_{cz}^2, y otro en la dirección perpendicular, q_{cr}^2.

$$q_{cr}^2 = \frac{10}{\frac{w_r^2}{4} + D_{ef,i}\tau}, \quad q_{cz}^2 = \frac{10}{\frac{w_z^2}{4} + D_{ef,i}\tau}, \tag{2.27}$$

donde $D_{ef,i} = min(D_u, D_{ef2})$. Dado que $w_z > w_r$, entonces $q_{cz}^2 < q_{cr}^2$, basta pedir que $q_c^2 = q_{cr}^2$ satisfaga las condiciones conditions (2.23)– (2.26). Como q_c^2 decrece con τ, siempre existe un valor mínimo, τ_{min}, tal que si $\tau > \tau_{min}$, las relaciones (2.23)– (2.26) se mantengan. En particular, es conveniente establecer las condiciones sobre los parámetros de forma tal que τ_{min} sea lo suficientemente chico como para que el modelo aproximado (Ec. (2.18)) sea válido para casi todos los τ. Reemplazando $q_c^2(\tau)$ en las Ecs. (2.23)– (2.26) y definiendo $\alpha = \frac{\sqrt{a/h}}{(1+a/h)}\frac{(D_f - D_S)}{D_u}$ se obtiene que las condiciones (2.23) y (2.24) son equivalentes a:

$$\tau \gg \quad 10\ \tau_{reac}\alpha - \tau_{Du} \quad \equiv to_1, \tag{2.28}$$

$$\tau \gg \quad 10\ \tau_{reac}\alpha^2 - \tau_{Du} \quad \equiv to_2, \tag{2.29}$$

donde se define el tiempo característico de la reacción como:

$$\tau_{reac} = \frac{1}{\nu} = \frac{1}{k_{off}(a+h)} \tag{2.30}$$

Si $a/h \geq 1$ (*i.e.* $D_{ef2} \geq D_u$) la condición (2.25) se satisface automáticamente bajo las condiciones (2.29), pero si $a/h < 1$ (*i.e.* $D_{ef2} < D_u$), la condición (2.26) se debe satisfacer, esto es equivalente a:

$$\tau > 10\ \tau_{reac}\frac{(1-a/h)}{(1+a/h)}\frac{(D_f - D_S)}{D_{ef2}} - \tau_{Def2} \equiv to_3 \tag{2.31}$$

donde $\tau_{Def2} = w_r^2/(4D_{ef2})$ es el tiempo característico medio de residencia de las partículas con D_{ef2} en el volumen confocal.

Por lo tanto, la aproximación Ec. (2.18) se mantiene para $\tau \gg \tau_{min} \equiv \max(to_1, to_2, to_3)$. Como $D_S < D_u$, los dos tiempos característicos del modelo satisfacen $\tau_{DS} > \tau_{Du}$. Entonces el modelo aproximado puede ser utilizado para ajustar curvas experimentales y obtener tiempos característicos confiables si $\tau_{min} \ll \tau_{Du}$. Estas inegualdades se escriben como:

$$\begin{aligned} \frac{5\tau_{reac}}{\tau_{Df}} \frac{\sqrt{\Omega}}{(1+\Omega)} \frac{(\Phi-1)}{\Phi} &\ll 1, \qquad if\ \tau_{min} = to_1 \\ \frac{5\tau_{reac}}{\tau_{Df}} \frac{\Omega}{(1+\Omega)} \frac{(\Phi-1)^2}{\Phi(\Omega+\Phi)} &\ll 1 \qquad if\ \tau_{min} = to_2 \\ \frac{5\tau_{reac}}{\tau_{Df}} \frac{(1-\Omega)}{(1+\Omega)} \frac{(\Phi-1)}{\Phi} &\leq 1 \qquad if\ \tau_{min} = to_3 \end{aligned} \tag{2.32}$$

donde $\Omega = a/h$, $\Phi = D_f/D_S$ y $\tau_{Df} = \frac{w_r^2}{4D_f}$. Como $\Omega \geq 0$ y $\Phi > 1$, todos los factores que multiplican $5\tau_{reac}/\tau_{Df}$ en las Ecs. (2.32) son menores o iguales a uno. Entonces, sin importar cuál to_i sea el mayor, se puede concluir que la expresión aproximada de la función de autocorrelación Ec. (2.18) es válida cuando la reacción se produce más rápidamente que la difusión de las partículas libres en el volumen de detección, es decir cuando se cumple:

$$\tau_{reac} = \frac{1}{k_{off} + k_{on}(P_{feq} + S_{eq})} \ll \tau_{Df} = \frac{w_r^2}{4D_f}, \tag{2.33}$$

Nótese que aún cuando $\tau_{reac} \approx \tau_{Df}$, las Ecs. (2.32) pueden ser satisfechas por diferentes combinaciones de parámetros, tales como $\Phi \approx 1$, $\Omega \ll 1$ o $\Omega \gg 1$.

2.3. Comparación entre el modelo completo y el modelo aproximado

A fin de comprobar que estas estimaciones son correctas y comprobar qué tan bien se pueden inferir otros parámetros además de los tiempos característicos usando la Ec. (2.18), se analizaron alrededor de 330 casos que se encuentran dentro del rango de validez del modelo. Se descartaron casos donde $D_f/D_S \leq 2$, con el fin de poder asumir que el coeficiente de difusión de la partícula ligada a la trampa, D_{Pb}, es el mismo que el de la trampa, D_S, con un error menor al $4\,\%$. El rango de valores de parámetros explorados se listan en la tabla 2.1. Para cada conjunto de valores de los parámetros, se computó la función de correlación dada por el modelo completo

Tabla 2.1: Tabla con el rango de valores explorado

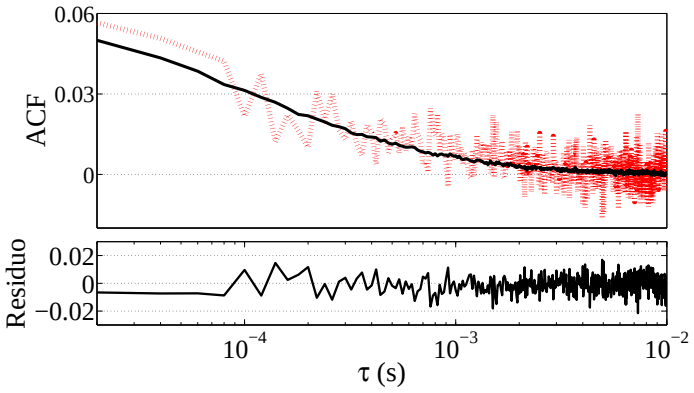
Parametro	Rango	Unidad
P_{tot}	[50 – 200]	nM
S_{tot}	[500 – 100000]	nM
k_{off}	[1000 – 5000]	s^{-1}
K_d	[57 – 400000]	nM
D_f	[10 – 100]	$\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$
D_S	[0.1 – 25]	$\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$

(Ecs. (2.9)– (2.12)) que se expresa en términos de integrales. Para hacer esto, se usó la función de Matlab *dblquad* que emplea el método de cuadratura adaptativo de Simpson para evaluar las dobles integrales. Las funciones de correlación calculadas con el modelo completo fueron tratadas como si fuesen curvas experimentales y ajustadas con el modelo aproximado, Ec. (2.18), para determinar qué tan bien se recuperan los parámetros de reacción - difusión empleando este modelo. El ajuste de mínimos cuadrados no lineal se realizó con la función de Matlab *nlinfit*. Cuatro parámetros se obtiene del ajuste, D_S, Go_S, D_u y Go_u, que luego son comparados con los valores esperados. Se calcularon lo errores relativos promedio para cada parámetro.

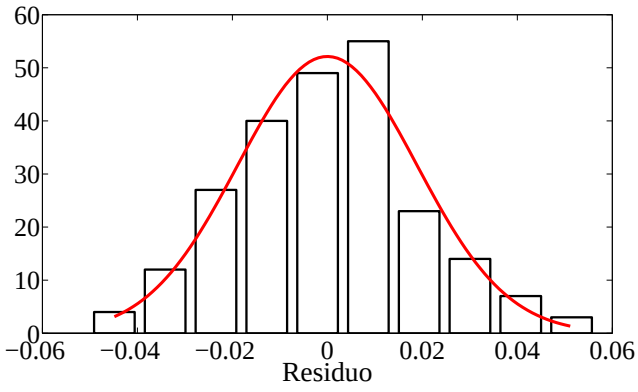
2.3.1. Incorporación de ruido

Para corroborar que el modelo presentado permite recuperar valores de parámetros confiables aún en condiciones experimentales, se realizaron pruebas incorporando ruido a la función de correlación del modelo completo. Para simular el ruido experimental, se agrega a la función de correlación del modelo completo ruido al azar con distribución gaussiana de valor medio cero y desviación estándar σ igual a 0.025. Luego se realiza el promedio de 234 curvas calculadas con este ruido incorporado.

Esta forma de añadir ruido proviene del análisis de experimentos típicos de FCS. Con el fin de estimar la magnitud del ruido, se realizaron experimentos de FCS en una solución acuosa 50 nM de TMR-dextran (Invitrogen-Molecular Probes), empleando una frecuencia de muestreo de 50 kHz. Los experimentos fueron realizados en un microscopio confocal FV1000 de Olympus. La serie temporal de la fluorescencia se dividió en 234 segmentos, cada uno de ellos con 2×10^{15} puntos experimentales. Para cada segmento se calculó la autocorrelación y el residuo,



(a)



(b)

Figura 2.2: Mediciones de FCS en solución acuosa 50 nM de TMR-dextran (a) *arriba* Función de autocorrelación experimental obtenida para uno de los 234 segmentos de 2×10^{15} puntos analizados (línea de puntos) y función de autocorrelación promedio de las 234 curvas (línea continua), *abajo* Residuo, definido como la resta entre la función de autocorrelación de un segmento y la curva promedio. (b) Histograma de los residuos para el tiempo de correlación τ = 20 μs y en línea continua el ajuste Gaussiano con $\sigma \sim 0.019$.

definido como la resta de la ACF de cada segmento y la curva promedio de las 234 ACF. A modo de ejemplo, en la figura 2.2(a) se grafica la función de correlación promedio y una de las 234 funciones de autocorrelación, junto con su correspondiente residuo. Para cada tiempo de correlación se grafica el histograma de los residuos y se ajusta por una gaussiana obteniéndose la desviación estándar σ para cada histograma. El valor de σ fue menor a 0.02 en todos los casos analizados. En la figura 2.2(b) se presenta un histograma representativo, con $\sigma \sim 0.019$.

2.3.2. Resultados

En algunos casos, la contribución del primer autovalor (primer término de la Ec. (2.18)) a la función de correlación era despreciable frente a la contribución del segundo autovalor (segundo término de la Ec. (2.18)). Estos casos eran mejor ajustados por el modelo de una componente, en este caso, la Ec. (2.18) sin el primer término. El criterio para decidir si se debe incluir uno o dos términos en el modelo aproximado fue el siguiente: si los valores de D_S y D_u obtenidos del ajuste por dos componentes era tal que diferían en menos de un 10 % o si $D_S \leq 0.01\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ o $D_u \geq 200\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, entonces se usaba el modelo de una componente correspondiente al término del coeficiente de difusión efectivo. También se empleó una componente, en lugar de dos, si la bondad del ajuste (dada por el chi-cuadrado) con una componente era similar o mejor que con dos componentes.

Como ejemplo, en la figura 2.3 se muestra un caso representativo obtenido para $D_f = 10\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $D_S = 0{,}1\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $P_{tot} = 200$ nM, $P_{tot} = 200$ nM, $S_{tot} = 500$ nM, $P_{beq} = 160$ nM y $k_{off} = 1000\ \mathrm{s}^{-1}$. En la figura 2.3(a) se comparan las funciones de autocorrelación teórica (obtenida con el modelo integral completo Ec. (2.9)) y el ajuste obtenido con el modelo aproximado considerando en la Ec. (2.18) los dos término o solamente el término que corresponde al coeficiente de difusión efectivo. Los residuos, definidos como la diferencia entre entre la curva teórica y el ajuste, se muestran en la figura 2.3(c). Como se puede apreciar, en este caso es necesario incluir ambas componentes en el modelo aproximado. En la figura 2.3(b) se grafican cada uno de los tres términos del modelo completo, Ecs. (2.10)– (2.12), como se puede observar, la componente correspondiente al tercer autovalor es prácticamente nula. En el mismo gráfico se muestran las contribuciones de los dos términos del modelo aproximado. Los parámetros obtenidos del ajuste y sus respectivos valores teóricos se listan en la tabla 2.2. En este ejemplo, el criterio de selección indica que se requiere usar el modelo de dos componentes. Los diferentes parámetros se recuperaron con errores relativos menores al 20 $\%$. El mismo ejemplo

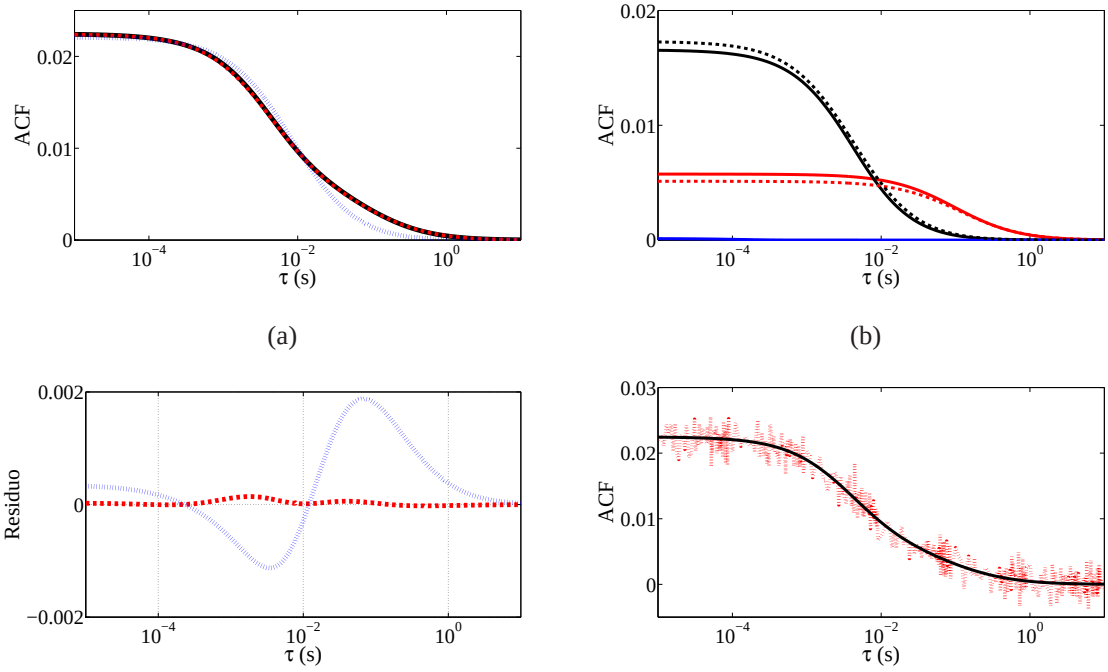


Figura 2.3: (a) Función de autocorrelación del modelo completo (línea continua negra), modelo aproximado de dos componentes (línea de rayas roja)y modelo aproximado de una componente (línea de puntos azul), en función del tiempo de correlación τ. (c) Residuos entre el modelo completo y el modelo aproximado de dos componentes (línea de rayas roja) y de un componente (línea de puntos azul). (b) Función de autocorrelación del modelo completo, contribuciones del primer, segundo y tercer autovalor (línea continua negra, roja y azul, respectivamente). Términos correspondientes al primer y segundo autovalor en el modelo aproximado (línea de rayas negra y roja, respectivamente). (d) Función de autocorrelación del modelo completo con ruido incorporado (línea de puntos roja) y ajuste por el modelo de dos componentes (línea continua negra). Curvas obtenidas en un caso representativo con $D_f = 10\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $D_S = 0{,}1\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $P_{tot} = 200$ nM, $P_{tot} = 200$ nM, $S_{tot} = 500$ nM, $P_{beq} = 160$ nM y $k_{off} = 1000\ \mathrm{s}^{-1}$.

Tabla 2.2: Parámetros obtenidos del ajuste de los datos del modelo completo por el modelo aproximado de una o dos componentes, correspondiente al ejemplo mostrado en la figura 2.3. Se muestran los valores teóricos exactos, los valores recuperados con el ajuste y el error relativo, en el caso sin agregarle error a la curva ajustada e incorporándole ruido. En cada caso se presenta el valor de Chi-cuadrado del ajuste.

Modelo aproximado – 2 componentes					
		Sin ruido		Con ruido	
	Valor exacto	Valor del ajuste	Error relativo	Valor del ajuste	Error relativo
D_S (μm^2/s)	0.100	0.087	13 %	0.089	11 %
Go_S	0.00575	0.00512	11 %	0.00498	13 %
D_u (μm^2/s)	2.76	2.34	15 %	2.42	12 %
Go_u	0.0167	0.0173	-4 %	0.0175	-5 %
Chi-cuadrado		0.00011		0.00012	

Modelo aproximado – 1 componente					
		Sin ruido		Con ruido	
	Valor exacto	Valor del ajuste	Error relativo	Valor del ajuste	Error relativo
D_u (μm^2/s)	2.76	1.17	58 %	1.25	55 %
Go_u	0.0167	0.0221	-32 %	0.0221	-32 %
Chi-cuadrado		0.34		0.40	

presentado en la figura 2.3 se analiza añadiendo ruido, en la figura 2.3(d) se grafica la función de autocorrelación del modelo completo con ruido incorporado y el ajuste por el modelo aproximado de dos componentes. Los parámetros de este ajuste se presentan en la tabla 2.2. Como se puede apreciar, inclusive cuando se agrega ruido a la curva, se pueden recuperar los parámetros del modelo con niveles de error similar.

La Fig 2.4 muestra los histogramas de los errores relativos absolutos para los diferentes parámetros obtenidos del ajuste de los 330 casos, empleando el modelo aproximado de una o dos componentes según el criterio explicado anteriormente. La Fig 2.4(a) muestra los histogramas para los casos ajustados con el modelo de una componente, de los 284 casos analizados,

solamente el 6 % y el 7 % presenta errores relativos mayores que el 15 % en la determinación de D_u y Go_u, y sus errores relativos promedio son 7 % y 4 %, respectivamente. En los 46 casos analizados con el modelo de dos componentes, figura 2.4(b), el coeficiente de difusión efectivo, D_u, fue recuperado con errores relativos menores a 15 % y Go_u, con errores menores a 7 % . Sus errores relativos promedio son 8 % y 2 %, respectivamente. En general, el error en determinar D_S y Go_S es mayor que el error en determinar D_u y Go_u. De hecho, el error relativo promedio para D_S y Go_S es 27 % y 22 %, respectivamente, y el máximo error relativo encontrado en los casos analizados fue de 68 % y 53 %, pero solamente el 17 % y 7 % de los casos presentan errores relativos mayores que 50 % en determinar D_S y Go_S, respectivamente.

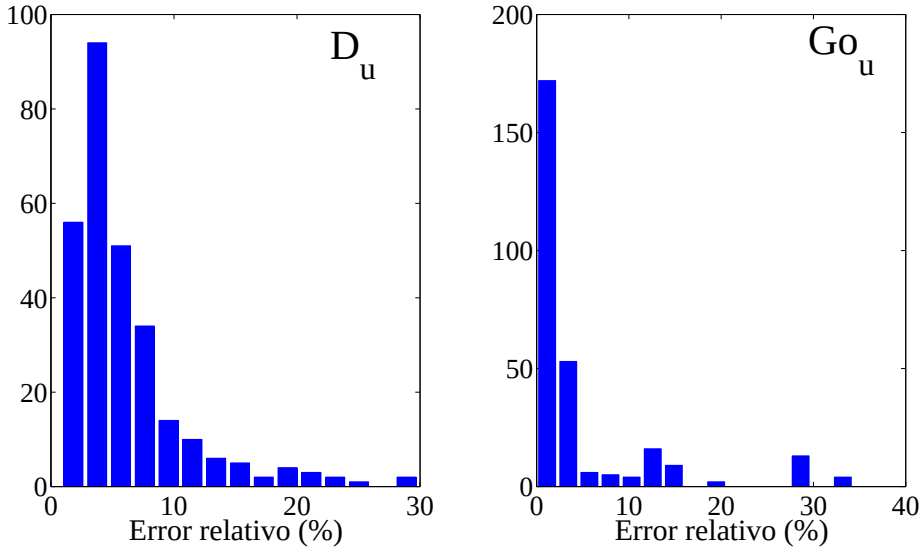
En todos los casos, todos los parámetros obtenidos al ajustar con el modelo aproximado (una o dos componentes) tienen error relativo promedio menor que 30 %. En los casos analizados, el tiempo característico de difusión τ_{Df} era entre 4 y 40 veces más grande que el tiempo característico de reacción τ_{reac}. Inclusive cuando $\tau_{reac} \approx \tau_{Df}$ el modelo aproximado puede ser usado siempre y cuando se satisfagan las Ecs. (2.32).

2.4. Información que se puede obtener aplicando el modelo aproximado

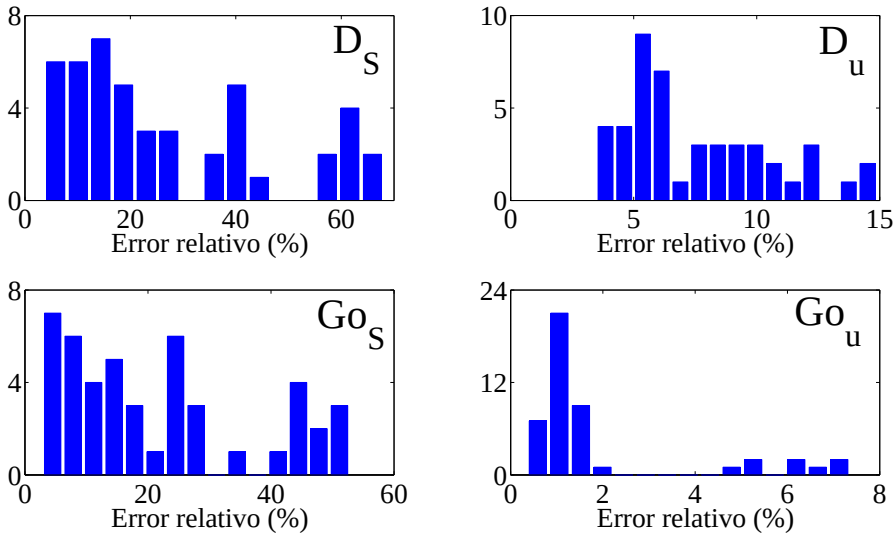
2.4.1. Información que se extrae en un experimento de FCS

Si la función de correlación experimental se puede ajustar usando las dos componentes en el modelo aproximado Ec. (2.18), en un experimento de FCS se obtienen los valores estimados de D_S, D_u, Go_S y Go_u. Dado que $G(\tau = 0)$ es inversamente proporcional al número total de partículas fluorescentes en el volumen de detección, la concentración total de partículas fluorescentes se puede estimar como $P_{tot} = 1/(V_{ef} Go_{tot})$ con $Go_{tot} = G(\tau = 0) = Go_S + Go_u$. Si el coeficiente de difusión de las partículas libres D_f es conocido *a priori*, el número total de trampas, la fracción de partículas ligadas y libres y la constante de disociación de las trampas pueden ser inferidas a partir de los parámetros de ajuste:

$$\begin{aligned} S_{tot} &= \frac{1}{V_{ef} Go_{tot}^2} \frac{1}{Go_S} \left[Go_S + Go_u \frac{(D_f - D_u)}{(D_f - D_S)} \right]^2, \\ K_d &= \frac{1}{V_{ef} Go_{tot}^2} \frac{Go_u^2}{Go_S} \frac{(D_f - D_u)(D_u - D_S)}{(D_f - D_S)^2}. \end{aligned} \tag{2.34}$$



(a) Parámetros de ajuste del modelo de una componente



(b) Parámetros de ajuste del modelo de dos componentes

Figura 2.4: Histogramas de los errores relativos absolutos para los parámetros de ajuste del modelo aproximado con una (a) o dos (b) componentes.

Si en cambio se conoce de antemano K_d o la concentración total de trampas, S_{tot}, el coeficiente de difusión de partículas libres puede ser estimado. Por ejemplo, si K_d es conocido, se puede reescribir la Ec. (2.19) en términos de P_{feq}, P_{beq} y K_d, y:

$$\begin{aligned} P_{feq} &= \frac{Go_u}{2V_{ef}Go_{tot}^2} + \sqrt{\left(\frac{Go_u}{2V_{ef}Go_{tot}^2}\right)^2 - \frac{K_d Go_S}{V_{ef}Go_{tot}^2}}, \\ P_{beq} &= P_{tot} - P_{feq}. \end{aligned} \tag{2.35}$$

Usando estas concentraciones, D_f es estimado como:

$$D_f = D_u + \frac{P_{beq}}{P_{feq}} \frac{K_d}{(P_{feq} + K_d)} (D_u - D_S). \tag{2.36}$$

Por lo tanto, es necesario conocer *a priori* el valor de un parámetro de reacción o de transporte a fin de estimar los cinco parámetros de interés de un único experimento de FCS.

2.4.2. Experimentos de FCS a diferentes concentraciones

Si los experimentos de FCS se pudiesen repetir variando el número de partículas marcadas fluorescentemente y manteniendo el resto de las condiciones sin modificar, entonces sería posible inferir el coeficiente de difusión D_f y las variables de reacción de la serie de experimentos, sin tener conocimiento de alguno de los valores de los parámetros de reacción-difusión. En principio, variar el número de partículas fluorescentes en un sistema, no afectaría a la concentración de las trampas, la constante de disociación o a los valores de los coeficientes de difusión de las trampas ni de las partículas libres. El número mínimo de condiciones diferentes en las que se debería realizar el experimento de FCS serían dos, en cuyo caso el coeficiente de difusión D_f, por ejemplo, podría calcularse como:

$$\begin{aligned} D_f &= \frac{\sqrt{Go_S^{(2)}}}{\left(\sqrt{Go_S^{(2)}} - \sqrt{Go_S^{(1)}}\right)} \frac{\left(Go_S^{(1)} D_S + Go_u^{(1)} D_u^{(1)}\right)}{Go_{tot}^{(1)}} \\ &- \frac{\sqrt{Go_S^{(1)}}}{\left(\sqrt{Go_S^{(2)}} - \sqrt{Go_S^{(1)}}\right)} \frac{\left(Go_S^{(2)} D_S + Go_u^{(2)} D_u^{(2)}\right)}{Go_{tot}^{(2)}}, \end{aligned} \tag{2.37}$$

donde los superíndices identifican el experimento realizado con concentración total de partículas fluorescentes $P_{tot}^{(i)}$. Por supuesto que si se pudiese realizar una serie de experimentos para varios valores de P_{tot}, resultaría mejor para extraer la información acerca de D_f, junto con los parámetros de la reacción.

2.5. Combinando la información de experimentos de FRAP y FCS

Hasta ahora se han mostrado las propiedades de transporte que pueden inferirse a partir de experimentos FCS. Más concretamente, se ha demostrado que, para un sistema en el cual las partículas fluorescentes difunden y reaccionan con trampas de acuerdo al esquema (2.1), FCS da el valor del coeficiente de difusión D_u, que se define en la Ec. (1.7). Aún así, este es un coeficiente efectivo que combina parámetros que caracterizan el transporte con parámetros asociados a la reacción. Sería conveniente extraer información sobre cada uno de estos procesos por separado. Como se ha mencionado en Pando et al. [2006], en el límite de reacciones rápidas, los experimentos de FRAP dan el coeficiente de difusión efectivo de partículas marcadas, es decir, D_t, tal como se define en la Ec. (1.6). Por lo tanto, realizando experimentos de FCS y FRAP se puede esperar obtener información más allá de los coeficientes de difusión efectiva, más concretamente sobre algunas de las cinco incógnitas que caracterizan el sistema en estudio: D_f, D_S, P_{tot}, S_{tot} y K_d, a partir de los cuales el resto de los parámetros, con la excepción de k_{off}, se pueden derivar.

Combinando la información de experimentos de FRAP y FCS

Los experimentos de FCS y FRAP se realizan empleando concentraciones de partículas fluorescentes muy diferentes. Mientras FCS requiere concentraciones muy bajas ($\sim$ nM) con el fin de detectar las fluctuaciones de fluorescencia, FRAP necesita concentraciones mucho más altas ($\sim$ μM), de modo que la curva de recuperación de la fluorescencia se pueda construir adecuadamente. Si se tiene un sistema de partículas fluorescentes y trampas que difunden y reaccionan de acuerdo al esquema (2.1), en el cual la concentración de partículas marcadas fluorescentemente P_{tot} puede modificarse, se podrían llevar a cabo: un experimento de FCS a una concentración de partículas $P_{tot} = P_{tot}^{FCS}$ y un experimento de FRAP a $P_{tot} = P_{tot}^{FRAP}$. En principio, la constante de disociación de la reacción partículas-trampa y la concentración de las trampas no cambian al variar la concentración de partículas fluorescentes P_{tot}. Suponiendo que los tiempos de reacción son mucho más cortos que la difusión Ec. (2.33), la función de correlación para FCS se puede aproximar por la Ec. (2.18) y el experimento de FRAP da el coeficiente efectivo de difusión, D_t, de la Ec. (1.6). Como resultado se tendrán los valores de D_S, $D_u(P_{tot}^{FCS})$, P_{tot}^{FCS} y $D_t(P_{tot}^{FRAP})$. La relación entre la fluorescencia medida y el número de partículas fluorescentes se puede estimar en experimentos de FCS mediante la Ec. (2.2):

$\langle F^{FCS}\rangle = \int QI(\mathbf{r})\langle [P_f](\mathbf{r},t) + [P_b](\mathbf{r},t)\rangle d^3r = P_{tot}\int QI(\mathbf{r})d^3r \equiv \theta P_{tot}$, donde $\langle F^{FCS}\rangle$ es la amplitud de fluorescencia media en el volumen de detección del experimento de FCS. Si el experimento de FRAP se puede realizar empleando el mismo volumen de detección, entonces podemos estimar P_{tot}^{FRAP} como $P_{tot}^{FRAP} = \theta\langle F^{FRAP}\rangle$. De esta forma, combinando la información de FRAP y FCS obtenemos D_S, P_{tot}^{FCS} y P_{tot}^{FRAP}. También se cuenta con expresiones para $Go_S(P_{tot}^{FCS})$, $Go_u(P_{tot}^{FCS})$ (Ecs. (2.19) y (2.20)), $D_u(P_{tot}^{FCS})$ (Ec. (1.7)) y $D_t(P_{tot}^{FRAP})$ (Ec. (1.6)) de las cuales es posible inferir todas las variables de reacción (es decir, S_{tot}, K_d, fracción de partículas libres y atrapadas) y el coeficiente de difusión libre D_f.

Por otra parte, si el experimento de FRAP pudiese llevarse a cabo a la misma concentración de partículas fluorescentes que en FCS, no habría información suficiente para extraer todos los parámetros de reacción y de transporte. De hecho, el coeficiente de difusión efectivo medido por FRAP en las mismas condiciones que en el FCS, proporciona la misma información que se puede obtener utilizando Go_S y D_u, de forma que D_f, S_{tot} y K_d no se podrían estimar sin conocer de antemano el valor de alguno de ellos.

3

Cuantificación de coeficientes de difusión por métodos ópticos en presencia de partículas no marcadas

Al marcar fluorescentemente partículas o compuestos, es muy común que una parte de estas partículas no resulten marcadas. Esto sucede, tanto al marcar el compuesto de interés uniendo químicamente una molécula fluorescente [Walling et al., 2009; Keppler et al., 2003; Smith, 2007], como en la técnica de fusión de proteínas a proteínas fluorescentes [Stepanenko et al., 2008; Chudakov et al., 2005], en donde no sólo está presente la proteína de interés marcada fluorescentemente sino también la proteína endógena (que produce el sistema biológico) sin marcar. Hay que tener especial cuidado en la interpretación de los resultados al estudiar procesos de difusión y reacción por métodos ópticos en un sistema donde coexisten moléculas endógenas sin marcar y las molécula modificadas. En este capítulo, se estudia la aplicación de FCS a un sistema de partículas marcadas y no marcadas que presentan la misma funcionalidad, y reaccionan con trampas de la misma forma. El modelo se aplica al sistema del bicoid, donde se reinterpretarán

los resultados obtenidos por diversos grupos que investigan su dinámica.

3.1. Caso partículas marcadas y no marcadas

En este caso hay un solo tipo de trampa, S, no fluorescente y un solo tipo de partícula, que puede estar marcada fluorescentemente, P^t, o no marcada, P^u. Las partículas, tanto marcadas como no marcadas, tienen el mismo coeficiente de difusión libre, D_f y reaccionan con las trampas de la misma forma. O sea, las constantes cinéticas de la reacción (k_{on} y k_{off}) son las mismas para ambas clases de partículas. Suponemos que el estado de fluorescencia no se modifica a lo largo del tiempo y que la fluorescencia de las partículas no cambia al ligarse a las trampas, si una partícula marcada se liga a una trampa, permanece marcada. Nuevamente consideramos que el peso molecular de las trampas es mucho mayor al de las partículas marcadas y no marcadas, considerando al coeficiente de difusión de las partículas ligadas igual a D_S, el coeficiente de difusión de las trampas libres. El esquema de la reacción en este caso será:

$$P_f^t + S \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\longleftrightarrow}} P_b^t \tag{3.1}$$

$$P_f^u + S \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\longleftrightarrow}} P_b^u \tag{3.2}$$

En la notación usada, el subíndice indica si la partícula está libre (f) o ligada (b) y el supraíndice, si está marcada (t) o no marcada (u). Las ecuaciones de evolución de las concentraciones serán:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial[P_f^t]}{\partial t} &= D_f\nabla^2[P_f^t] - k_{on}[P_f^t]\,[S] + k_{off}[P_b^t] \\
\frac{\partial[P_b^t]}{\partial t} &= D_S\nabla^2[P_b^t] + k_{on}[P_f^t]\,[S] - k_{off}[P_b^t] \\
\frac{\partial[S]}{\partial t} &= D_S\nabla^2[S] - k_{on}[P_f^t]\,[S] + k_{off}[P_b^t] - k_{on}[P_f^u]\,[S] + k_{off}[P_b^u] \\
\frac{\partial[P_f^u]}{\partial t} &= D_f\nabla^2[P_f^u] - k_{on}[P_f^u]\,[S] + k_{off}[P_b^u] \\
\frac{\partial[P_b^u]}{\partial t} &= D_S\nabla^2[P_b^u] + k_{on}[P_f^u]\,[S] - k_{off}[P_b^u]
\end{aligned}$$

Siguiendo con el procedimiento de capítulos anteriores, se realiza un cambio de variables

alrededor del equilibrio y se adimensionalizan empleando:

$$\begin{aligned} T &= k_{off} t \\ \xi &= \sqrt{\frac{k_{off}}{D_f}}\, \mathbf{x}. \end{aligned}$$

Las concentraciones en el equilibrio están dadas por:

$$\begin{aligned} P^t_{feq} S_{eq} &= K_d P^t_{beq} \\ P^u_{feq} S_{eq} &= K_d P^u_{beq}. \end{aligned} \tag{3.3}$$

Las concentraciones totales de trampas S_{tot} y de partículas marcadas P^t_{tot}, sin marcar P^u_{tot}, y totales P_{tot} están dadas por:

$$\begin{aligned} S_{tot} &= S + P^t_b + P^u_b \\ P^t_{tot} &= P^t_f + P^t_b \\ P^u_{tot} &= P^u_f + P^u_b \\ P_{tot} &= P^t_f + P^t_b + P^u_f + P^u_b \end{aligned} \tag{3.4}$$

respectivamente, y en este caso importará la fracción de partículas marcadas definida como $f = P^t_{tot}/P_{tot}$.

Aplicando la transformada de Fourier al sistema linealizado alrededor del equilibrio, se obtiene:

$$\begin{pmatrix} -\tilde{q}^2 - a & 1 & -c^t & 0 & 0 \\ a & -\tilde{D}\tilde{q}^2 - 1 & c^t & 0 & 0 \\ -a & 1 & -\tilde{D}\tilde{q}^2 - c^t - c^u & -a & 1 \\ 0 & 0 & -c^u & -\tilde{q}^2 - a & 1 \\ 0 & 0 & c^u & a & -\tilde{D}\tilde{q}^2 - 1 \end{pmatrix} \tag{3.5}$$

donde $\tilde{q}$ es la norma del vector de onda adimensional, $\tilde{q} = |\tilde{\mathbf{q}}|$ y se definieron las constantes $\tilde{D} = \dfrac{D_S}{D_f}$, $a = \dfrac{S_{eq}}{K_d}$, $c^t = \dfrac{P^t_{feq}}{K_d}$ y $c^u = \dfrac{P^u_{feq}}{K_d}$. Notar que considerando $h = 1 + c^t + c^u = \dfrac{S_{tot}}{S_{eq}}$, entonces a y h quedan definidos como en el caso de todas las partículas marcadas presentado en el Capítulo 2.

Los autovalores de la matriz definida en Ec. 3.5 resultan:

$$\begin{aligned}
\lambda_1 &= -\tilde{D}\tilde{q}^2 \\
\lambda_2 &= -\frac{1}{2}(a+h+(1+\tilde{D})\tilde{q}^2) + \frac{1}{2}\sqrt{(\tilde{D}-1)^2\tilde{q}^4 + 2(\tilde{D}-1)(h-a)\tilde{q}^2 + (a+h)^2} \\
\lambda_3 &= -\frac{1}{2}(a+h+(1+\tilde{D})\tilde{q}^2) - \frac{1}{2}\sqrt{(\tilde{D}-1)^2\tilde{q}^4 + 2(\tilde{D}-1)(h-a)\tilde{q}^2 + (a+h)^2} \\
\lambda_4 &= -\frac{1}{2}(a+1+(1+\tilde{D})\tilde{q}^2) + \frac{1}{2}\sqrt{(\tilde{D}-1)^2\tilde{q}^4 + 2(\tilde{D}-1)(1-a)\tilde{q}^2 + (a+1)^2} \\
\lambda_5 &= -\frac{1}{2}(a+1+(1+\tilde{D})\tilde{q}^2) - \frac{1}{2}\sqrt{(\tilde{D}-1)^2\tilde{q}^4 + 2(\tilde{D}-1)(1-a)\tilde{q}^2 + (a+1)^2}
\end{aligned}$$

Para calcular la función de correlación es necesario conocer la matriz de autovectores asociada a la matriz de la Ec. 3.5. χ es la matriz de los autovectores en columnas:

$$\chi = \begin{pmatrix}
0 & (c^t/c^u) & (c^t/c^u) & -1 & -1 \\
c^t & (c^t/c^u)\phi_2 & (c^t/c^u)\phi_3 & -\phi_4 & -\phi_5 \\
1 & -(c^t+c^u)/c^t \;\; \phi_2 & -(c^t+c^u)/c^t \;\; \phi_3 & 0 & 0 \\
0 & 1 & 1 & 1 & 1 \\
c^u & \phi_2 & \phi_3 & \phi_4 & \phi_5
\end{pmatrix}$$

donde

$$\begin{aligned}
\phi_2 &= (a+\tilde{q}^2+\lambda_2)/h \\
\phi_3 &= (a+\tilde{q}^2+\lambda_3)/h \\
\phi_4 &= (a+\tilde{q}^2+\lambda_4) \\
\phi_5 &= (a+\tilde{q}^2+\lambda_5)
\end{aligned}$$

3.1.1. Función de correlación para partículas marcadas y no marcadas

Para calcular la correlación se emplea la expresión de la Ec. 1.15, en donde se considera el brillo de cada especie, en este caso las únicas que poseen fluorescencia son P_f^t y P_b^t. Asignando:

$$\begin{aligned}
C_1 &= P_{feq}^t \qquad y \qquad Q_1 = Q \\
C_2 &= P_{beq}^t \qquad y \qquad Q_2 = Q \\
C_3 &= S_{eq} \qquad y \qquad Q_3 = 0 \\
C_4 &= P_{feq}^u \qquad y \qquad Q_4 = 0 \\
C_5 &= P_{beq}^u \qquad y \qquad Q_5 = 0
\end{aligned}$$

y usando los autovalores y autovectores con dimensiones, la función de correlación se escribirá como suma de 5 términos, cada uno de ellos expresado como:

$$G_i(\tau) = \frac{1}{(2\pi)^3}\int d^3q \hat{I}(\mathbf{q}) g_i(\mathbf{q},\tau)$$

donde $\hat{I}(\mathbf{q})$ es la transformada de Fourier de la distribución de intensidad del sistema, Ec. 1.16. Sin ninguna otra aproximación, los integrandos de la función de correlación g_i son:

$$\begin{aligned}
g_1(\mathbf{q},\tau) &= \frac{P^t_{beq}c^t}{h(P^t_{tot})^2}e^{\lambda_1\tau} \\
g_2(\mathbf{q},\tau) &= \frac{P^t_{feq}}{4k_{off}h(P^t_{tot})^2}\frac{c^t}{(h-1)}\left[2\nu+\sqrt{*1}+\frac{(\nu-(D_f-D_S)^2q^4}{\sqrt{*1}}\right]e^{\lambda_2\tau} \\
g_3(\mathbf{q},\tau) &= \frac{P^t_{feq}}{4k_{off}h(P^t_{tot})^2}\frac{c^t}{(h-1)}\left[2\nu-\sqrt{*1}-\frac{(\nu-(D_f-D_S)^2q^4}{\sqrt{*1}}\right]e^{\lambda_3\tau} \\
g_4(\mathbf{q},\tau) &= \frac{P^t_{feq}}{4k_{off}(P^t_{tot})^2}\frac{c^u}{(h-1)}\left[2\nu_1+\sqrt{*2}+\frac{(\nu_1-(D_f-D_S)^2q^4}{\sqrt{*2}}\right]e^{\lambda_4\tau} \\
g_5(\mathbf{q},\tau) &= \frac{P^t_{feq}}{4k_{off}(P^t_{tot})^2}\frac{c^u}{(h-1)}\left[2\nu_1-\sqrt{*2}-\frac{(\nu_1-(D_f-D_S)^2q^4}{\sqrt{*2}}\right]e^{\lambda_5\tau}
\end{aligned}$$

Con q la norma del vector de onda $\mathbf{q}$ con dimensiones y

$$\begin{aligned}
\nu &= k_{off}(a+h) \\
\nu_1 &= k_{off}(a+1) \\
\sqrt{*1} &= \sqrt{(D_f-D_S)^2q^4+2(D_f-D_S)(a-h)/(a+h)\nu q^2+\nu^2} \\
\sqrt{*2} &= \sqrt{(D_f-D_S)^2q^4+2(D_f-D_S)(a-1)/(a+1)\nu_1 q^2+\nu_1^2}.
\end{aligned}$$

3.1.2. Coeficientes efectivos de difusión

Recuperando dimensiones y aproximando a orden q^2 los autovalores resultan:

$$\begin{aligned}
\lambda_1 &= -D_S q^2 \\
\lambda_2 &\approx -D_{ef1}q^2 \\
\lambda_3 &\approx -\nu - D_{ef2}q^2 \\
\lambda_4 &\approx -D_{ef3}q^2 \\
\lambda_5 &\approx -\nu_1 - D_{ef4}q^2
\end{aligned}$$

donde definimos los coeficientes efectivos de difusión:

$$D_{ef1} = \frac{D_f + (a/h)D_S}{1 + (a/h)} \tag{3.6}$$

$$D_{ef2} = \frac{(a/h)D_f + D_S}{1 + (a/h)} \tag{3.7}$$

$$D_{ef3} = \frac{D_f + aD_S}{1 + a} \tag{3.8}$$

$$D_{ef4} = \frac{aD_f + D_S}{1 + a} \tag{3.9}$$

Al igual que en el caso de todas las partículas marcadas, uno de los autovalores está asociado con la difusión de la trampa y es exacto; también se recuperan en la aproximación a orden q^2 los dos coeficientes de difusión efectivos D_{ef1} y D_{ef2} del Capítulo 2 (Ecs. 2.14 y 2.15). Al haber partículas no marcadas, aparecen dos nuevos coeficientes de difusión efectivos D_{ef3} y D_{ef4}. D_{ef3} tiene la misma expresión que el coeficiente de difusión efectivo encontrado en el caso de un experimento de FRAP con partículas todas marcadas D_t, Ec. 1.6. D_{ef4} presenta el mismo factor que D_{ef3} pero en lugar de estar multiplicando a D_S, está multiplicando a D_f.

3.1.3. Función de correlación para tiempos largos

En este caso, la función de correlación aproximada a orden q^2 tiene tres términos:

$$G(\tau) = \frac{Go_S}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{DS}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2\tau_{DS}}}} + \frac{Go_u}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Du}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2\tau_{Du}}}} + \frac{Go_t}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Dt}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2\tau_{Dt}}}} \tag{3.10}$$

definiendo el peso correspondiente a cada término como:

$$\begin{aligned} Go_S &= \frac{(P^t_{beq})^2}{V_{ef}S_{tot}(P^t_{tot})^2} \\ Go_u &= \frac{P^t_{feq}}{V_{ef}(P^t_{tot})^2} f\frac{(a+h)}{h} \\ Go_t &= \frac{(1-f)}{V_{ef}(P^t_{tot})} \end{aligned} \tag{3.11}$$

donde P^t_{tot} es la cantidad total de partículas marcadas y f la fracción de partículas fluorescentes.

Los tiempos característicos asociados a cada coeficiente de difusión son:

$$\tau_{DS} = \frac{w_r^2}{4D_S} \tag{3.12}$$

$$\tau_{Du} = \frac{w_r^2}{4D_u} \qquad D_u = \frac{D_f + (a/h)D_S}{1 + (a/h)} \tag{3.13}$$

$$\tau_{Dt} = \frac{w_r^2}{4D_t} \qquad D_t = \frac{D_f + aD_S}{1 + a} \tag{3.14}$$

$$\tag{3.15}$$

En la aproximación a orden q^2 no hay contribución de los autovalores λ_3 y λ_5. Solamente las ramas de autovalores que se aproximan a cero cuando $\mathbf{q} \to 0$ contribuyen a $G(\tau)$, esto hace que no haya ningún factor exponencial en la función de correlación. El primer término en la Ec. 3.10, se resuelve exactamente y es el asociado al coeficiente de difusión de la trampa; el segundo término está asociado al coeficiente de difusión encontrado en el caso con partículas todas marcadas, y el tercero corresponde al asociado al coeficiente de difusión efectivo de FRAP en el caso de todas las partículas marcadas. Nótese que si no hay partículas sin marcar, $f = 1$, este último término se anula y se recupera la solución para partículas siempre fluorescentes encontrada en el Capítulo 2. El valor del coeficiente D_t será siempre menor o igual al valor de D_u, de hecho la relación que cumplen es $D_S \leq D_t \leq D_u \leq D_f$.

En total, el sistema de partículas descripto en este capítulo tiene 12 incógnitas: los coeficientes de difusión D_S, D_f, la constante de disociación K_d, y las concentraciones de las diferentes especies P_{tot}, P^t_{tot}, P^u_{tot}, S_{tot}, S_{eq}, P^t_{feq}, P^t_{beq}, P^u_{feq}, P^u_{beq}. En cuanto a las ecuaciones, hay 4 ecuaciones de conservación de trampas y partículas totales (Ec. 3.4), dos ecuaciones de equilibrio de las reacciones (Ec. 3.3) y 6 ecuaciones que provienen de la definición de los parámetros de ajuste del modelo, D_S, D_t,D_u y sus respectivos pesos Go_S, Go_t y Go_u. Esto da un total de 12 ecuaciones con 12 incógnitas, por lo que uno podría esperar, idealmente, recuperarlas todas a partir de un experimento de FCS de este tipo. Sin embargo no todas las ecuaciones son independientes entre sí por lo que es necesario contar con datos adicionales para obtener todas las cantidades desconocidas. Se puede elegir usar la información de D_t, D_u o Go_u, y suponer conocido el D_f, S_{tot} o K_d para poder estimar todas las incógnitas, a menos que se repita el experimento a diferentes concentraciones de partículas marcadas, por ejemplo.

En la sección siguiente presentamos una aplicación particular de esta forma de proceder para extraer información sobre algunos de los parámetros involucrados en un problema de gran relevancia bioló gica, la embriogénesis.

3.2. Aplicación del modelo al sistema de Bicoid

3.2.1. Sistema biológico y su relevancia

Uno de los mayores enigmas en la biología del desarrollo es cómo las células embrionarias indiferenciadas son capaces de adoptar diferentes destinos celulares dependiendo de su posición en el embrión. Se conoce la existencia de moléculas capaces de dictar a estas células un destino, mediante gradientes de su concentración. A este tipo de moléculas se lo denomina morfógeno. Uno de los más conocidos es el factor de transcripción Bicoid (Bcd), estudiado especialmente en moscas *Drosophila melanogaster*. Sabiendo ya la causa por la que las células embrionarias son capaces de adoptar destinos diferentes el interés se ha volcado en descubrir cómo se forma el gradiente que hace posible este fenómeno.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la formación del gradiente Bcd es un modelo basado en la difusión de este producto, que se conoce con el nombre de SDD (síntesis, difusión y degradación de Bcd). Este modelo supone que el mRNA Bcd no cursa ningún tipo de transporte y queda confinado en el polo anterior del embrión de *D. melanogaster*. Es la traducción de ese mRNA y la posterior difusión del producto lo que formaría el gradiente Bcd, permaneciendo más concentrado en el polo anterior que en el posterior. Este modelo, así como otros modelos propuestos, depende fuertemente de la velocidad de difusión del Bcd en el embrión. Es por eso que han surgido en los últimos años, muchos trabajos basados en métodos ópticos para determinar la difusión del Bcd en el embrión.

Diversos experimentos de FRAP realizados con Bcd marcado fluorescentemente han dado como resultado valores del coeficiente de difusión menores a 1 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$. La velocidad de difusión estimada de esta forma no es lo suficientemente alta como para establecer el gradiente tan rápidamente como de hecho se establece, entrando en conflicto con el modelo SDD. Recientes experimentos de FCS en el embrión, han dado como resultado coeficientes de difusión mayores, que sostienen el modelo SDD. Ha surgido una gran controversia debido a estas diferencias en la estimación del coeficiente de difusión del Bcd y su repercusión en la validez de modelos.

En este trabajo no se busca validar o refutar el modelo SDD, pero sí entender y explicar la diferencia en las estimaciones del coeficiente de difusión del Bcd. La explicación que aquí proponemos está basada en nuestro modelo que determina, entre otras cosas, cómo los coeficientes que se obtienen por FCS dependen de los parámetros biofísicos del problema. Esto nos permite no sólo explicar las diferencias observadas sino también inferir varios parámetros de interés en

el caso de Bicoid.

3.2.2. Aplicación del modelo al sistema de Bicoid

Los resultados experimentales de FCS que vamos a analizar corresponden a los presentados en Abu-Arish et al. [2010] obtenidos en embriones de *Drosophila melanogaster*. En estos experimentos se usan embriones que expresan Bcd fusionado con la proteína fluorescente egfp. Los autores muestran que la proteína marcada es funcional, es decir, se comporta dentro del embrión como el Bcd sin marcar. Teniendo en cuenta que la egfp necesita un tiempo de maduración antes de poder emitir luz, suponemos que los experimentos pueden ser interpretados utilizando el modelo de partículas marcadas y no marcadas introducido en este capítulo.

El embrión de *Drosophila melanogaster* sufre sucesivos ciclos de mitosis e interfase en donde los núcleos se dividen. En la interfase los núcleos están bien diferenciados del citoplasma y el Bcd se encuentra en mayor concentración dentro de los núcleos. Durante la fase de mitosis del ciclo celular la membrana que rodea al núcleo se desensambla y no queda determinada la separación entre citoplasma y núcleos, mezclándose los contenidos de los mismo. La concentración de Bcd en el citoplasma durante la interfase aumenta levemente con respecto a la mitosis. Los experimentos de Abu-Arish et al. [2010] fueron realizados empleando la técnica FCS en el citoplasma cortical del embrión durante la interfase. Los autores buscan ajustar la función de autocorrelación obtenida mediante expresiones de la forma:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{1}{N}\left(1+\frac{B}{1-B}e^{-\tau/\tau_B}\right)\times \\ &\quad \sum_{j=1}^{n}\frac{F_j}{\left(1+\left(\frac{\tau}{\tau_j}\right)^{\alpha_j}\right)\sqrt{1+\left(\frac{\tau}{w^2\tau_j}\right)^{\alpha_j}}}, \end{aligned} \tag{3.16}$$

con n, el número de componentes consideradas, ($n = 1, 2, 3$), w_r y w_z parámetros que caracterizan el tamaño del volumen de detección y que se obtienen a partir de calibraciones ($w_r = (0.40 \pm 0.03)$ μm, $w_z = (2 \pm 0.5)$ μm en los experimentos acá analizados) y el resto de los parámetros a ser ajustados a partir de las observaciones o fijados en base a otras consideraciones. En particular, B y τ_B caracterizan propiedades del fluoróforo que los autores suponen conocidas de antemano, siendo sus valores $B = 0.2$ y $\tau_B = 0.22$ ms para el subconjunto de ajustes que se considera en esta Tesis. Los parámetros α_j, por otro lado, son o bien considerados fijos ($\alpha_j = 1$) o ajustados para abarcar también casos de difusión anómala, los que corresponden a $\alpha_j \neq 1$. Sin embargo, los ajustes de Abu-Arish et al. [2010] dan $\alpha_j \approx 1$. Por lo tanto, sólo se consideran los resultados

de Abu-Arish et al. [2010] en los que se fija *a priori* $\alpha_j = 1$ para todos los j. En la Ec. (3.16) N es el número medio de partículas fluorescentes en el volumen de detección y los varios τ_j son los tiempos de residencia promedio en dicho volumen de las componentes consideradas. Estos últimos siempre son determinados a partir del ajuste de la función de autocorrelación experimental y permiten estimar coeficientes de difusión mediante la relación $D_j = w_r^2/(4\tau_j)$. Debido a limitaciones experimentales, el valor de N es estimado en experimentos separados (hechos en el núcleo) por lo que la incerteza en esta cantidad es bastante grande. En la tabla 3.1 se presentan los datos obtenidos en Abu-Arish et al. [2010] a partir de los ajustes. En la misma tabla, se presenta el coeficiente de difusión estimado a partir de experimentos de FRAP realizados en Gregor et al. [2007], empleando la proteína fusionada Bcd-egfp durante la fase de mitosis.

Todos los tiempos de residencia obtenidos en Abu-Arish et al. [2010] son mucho mayores que el característico del fluoróforo, τ_B. Esto implica que el factor que multiplica a la sumatoria en (3.16) es aproximadamente igual a $1/N$ para $\tau \geq \tau_j$. Por lo tanto, es de esperar que un ajuste hecho con la función (3.16) donde el prefactor fuera reemplazado por $1/N$ daría aproximadamente los mismos valores de tiempos de residencia. Ahora bien, una expresión de este tipo para la función de autocorrelación tiene la misma forma que las aproximaciones obtenidas en esta Tesis Ec. 3.10. La mayor diferencia radica en que las aproximaciones obtenidas en esta Tesis permiten relacionar las cantidades inferidas a partir del ajuste de los experimentos con parámetros biofísicos de un modelo del proceso en estudio. A continuación se interpretarán los valores de la tabla 3.1 en función de las expresiones obtenidas en el marco del modelo propuesto en este capítulo para inferir varias cantidades de interés. Debe notarse que en esta tabla se dan las fracciones, F_i, con la que cada componente contribuye a la función de autocorrelación, en lugar de los pesos, Go_i, de la Ec. 3.10, debido a las incertezas en la determinación de N. La relación entre estas cantidades es:

$$F_i = \frac{Go_i}{Go_{tot}} 100\,\% \tag{3.17}$$

donde $Go_{tot} = \Sigma Go_i$.

Para analizar los resultados de los experimentos de Abu-Arish et al. [2010] se supone que en el embrión hay Bcd marcado y sin marcar y que puede estar reaccionando con sustancias que actúan como trampas. Por lo tanto, se utilizará la expresión analítica de la Ec. 3.10 para interpretar los datos de la tabla 3.1. En esta tabla se listan los resultados obtenidos en Abu-Arish et al. [2010] a partir de ajustes usando $n = 2$ y $n = 3$ componentes. En el caso $n = 3$ se identifica al menor coeficiente de difusión (D_1) con el de la trampa, D_S, al mayor (D_3) con D_u y al restante (D_2) con D_t (dado que $D_S < D_t < D_u$). En el caso de 2 componentes, se supone que $D_S \approx 0$

Tabla 3.1: Datos de experimentos de FCS y FRAP realizados en el embrión de *Drosophila melanogaster* empleando Bcd fusionado con la proteína fluorescente egfp y NLS-egfp.

Mediciones de FCS en citoplasma durante la interfase Abu-Arish et al. [2010]	
Bcd-egfp	
Parámetros de ajuste con n =3 componentes	
Coeficiente de difusión	Peso
D_1 = (0.095 $\pm$ 0.037) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_1 = (5 $\pm$ 2) %
D_2 = (1.6 $\pm$ 0.5) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_2 = (32 $\pm$ 6) %
D_3 = (14 $\pm$ 2) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_3 = (63 $\pm$ 8) %
Parámetros de ajuste con n =2 componentes	
Coeficiente de difusión	Peso
D_1 = (0.38 $\pm$ 0.03) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_1 = (18 $\pm$ 1) %
D_2 = (8.9 $\pm$ 0.4) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_2 = (82 $\pm$ 1) %
NLS-egfp	
Parámetros de ajuste con n =2 componentes	
Coeficiente de difusión	Peso
D_1 = (1.0 $\pm$ 0.1) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_1 = (11 $\pm$ 1) %
D_2 = (26.5 $\pm$ 0.9) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	F_2 = (89 $\pm$ 1) %
Medición de FRAP durante mitosis	
Bcd-egfp	
D_{FRAP} = [0.37 - 1] $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Abu-Arish et al. [2010]
D_{FRAP} = (0.30 $\pm$ 0.09) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Gregor et al. [2007]

y que los coeficientes, D_1 y D_2, corresponden a D_t y D_u, respectivamente. Como se aprecia en el ajuste de 3 componentes, $D_S \ll D_t, D_u$ ($\sim 0.1\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$) y contribuye tan sólo en un 5 % a la correlación total. Por lo tanto es razonable pensar que el ajuste de dos componentes corresponde al límite del ajuste con $n = 3$ en un caso en que es posible despreciar la contribución del término asociado a D_S frente a la de los términos asociados a D_t y D_u. En la tabla 3.1 se incluyen también los valores del coeficiente de difusión obtenidos por FRAP en el citoplasma durante mitosis. Como se discutió en el Capítulo 1, el coeficiente que se estima con esta técnica FRAP es D_t. Teniendo en cuenta que la variación en la concentración citoplasmática de Bcd-egfp observada en mitosis y en interfase es de alrededor del 20 % Gregor et al. [2007], es de esperar que el valor de D_t no varíe demasiado entre ambas situaciones si suponemos que el tipo de trampas presentes no varía. El rango de valores de D_t obtenidos en las mediciones de FRAP (realizadas durante la mitosis), $D_t^{FRAP} = [0.21 – 1]\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, concuerda con los valores obtenidos por FCS (en experimentos hechos durante interfase) que mediante el modelo propuesto ´ se interpretan como correspondientes a D_t, $D_t^{FCS} = [0.38 – 1.6]\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$. Esto muestra la plausibilidad del modelo desarrollado en este capítulo. De acuerdo a éste, se puede decir que la diferencia de estimaciones del coeficiente de difusión del Bcd medidas en FCS, Abu-Arish et al. [2010], y FRAP, Gregor et al. [2007], es totalmente compatible con el hecho de que ambas técnicas dan información sobre distintos tipos de coeficientes de difusión efectivos.

3.2.3. Estimación de parámetros de la reacción del Bicoid con trampas

Empleando el modelo propuesto en este capítulo, no solamente se pueden explicar satisfactoriamente las diferencias en los coeficientes de difusión medidos, sino que también se pueden estimar parámetros referidos a la reacción de Bcd con las posibles trampas. Para determinar todos los parámetros de interés es necesario contar con información adicional. En particular, es posible hacerlo si se conoce el coeficiente de difusión libre de Bcd-egfp, D_{Bcd} (al que identificamos con D_f en nuestro modelo). En Abu-Arish et al. [2010] se presentan resultados de experimentos de FCS realizados con la proteína NLS-egfp, los que se han incluido en la tabla 3.1. Como se menciona en el trabajo de Abu-Arish *et al*, la NLS-egfp debería moverse principalmente de forma libre dentro del citoplasma, aun cuando pudiera interactuar con factores de transporte nuclear. Por lo tanto, se espera que los experimentos hechos con NLS-egfp dan información sobre el coeficiente de difusión libre de Bcd-egfp, D_{Bcd}. Pero antes de utilizar estos nuevos resultados es necesario hacer ciertas consideraciones sobre los coeficientes de difusión. En primer lugar,

tenemos en cuenta la ecuación de Stokes-Einstein que relaciona el coeficiente de difusión, D, de una molécula con su radio hidrodinámico, R_H:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}, \tag{3.18}$$

donde k es la constante de Boltzman, T la temperatura y η la viscosidad del medio. En el caso de proteínas globulares, el radio hidrodinámico se puede expresar en términos de la densidad molecular ρ y el peso molecular de la proteína (MW):

$$R_H = \left(\frac{3}{4\pi\rho}MW\right)^{1/3}. \tag{3.19}$$

Como la densidad de las proteínas globulares no varía demasiado y es del orden de 0.7 g ml^{-1} [Jackson, 2006], se puede estimar el cociente de los coeficientes de difusión para dos proteínas en un mismo medio y a la misma temperatura empleando las Ecs. 3.18 y 3.19:

$$\frac{D_{Bcd-egfp}}{D_{NLS-egfp}} = \left(\frac{MW_{NLS-egfp}}{MW_{Bcd-egfp}}\right)^{1/3}. \tag{3.20}$$

De los experimentos de Abu-Arish et al. [2010] realizados con NLS-egfp (tabla 3.1), se obtiene $D_{NLS-egfp} = (26.5 \pm 0.9)\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, y como $MW_{Bcd-egfp} = 80$ kDa y $MW_{NLS-egfp} = 30$ kDa, una estimación del coeficiente de difusión libre del Bcd es: $D_{Bcd} \sim 18.7\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$. Los valores de coeficientes efectivos de difusión deben ser menores o iguales a D_{Bcd}, lo que se cumple en el caso de estudio.

Usando la estimación de D_{Bcd} y los coeficientes efectivos de difusión del ajuste de los datos experimentales del Bcd, se pueden obtener las cantidades adimensionales S_{eq}/K_d y S_{eq}/S_{tot}. En el caso del ajuste por 2 componentes, S_{eq}/K_d = 49 y para 3 componentes S_{eq}/K_d = 12. Las diferencias entre estos valores se deben a que para el ajuste de 3 componentes $D_t \sim 1.6\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, mientras que para el ajuste de dos componentes es $D_t \sim 0.38\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$. El factor 4 en la estimación de D_t es el que se traslada al cociente S_{eq}/K_d. A partir del valor de S_{eq}/K_d se puede calcular la fracción de partículas (Bcd) libres, que resulta ser 2 % y 8 %, para 2 y 3 componentes, respectivamente. Esto indica que la cantidad de Bcd libre es muy chica. La fracción de trampas libres, S_{eq}/S_{tot}, estimada usando el ajuste de 2 y 3 componentes es 2.3 % y 3.1 %, respectivamente. En ambos casos esto indica que, de acuerdo al modelo desarrollado en este capítulo, prácticamente todo lo que está actuando como trampa tiene ligado Bcd.

Por otro lado, a partir del peso relativo de la componente correspondiente a D_t, (F_1 para $n = 2$ y $F_2 = 2$ para $n = 3$), se puede estimar la fracción de partículas fluorescentes, f, sin

Tabla 3.2: Estimaciones de parámetros de las posibles trampas del Bcd inferidos a partir del modelo propuesto.

	Ajuste 2 componentes	Ajuste 3 componentes
S_{eq}/[Bcd-egfp]	0.028	0.043
K_d/[Bcd-egfp]	5.8 10^{-4}	0.0038
S_{tot}/[Bcd-egfp]	1.2	1.4
S_{eq}/[Bcd]$_{tot}$	0.023	0.030
K_d/[Bcd]$_{tot}$	4.7 10^{-4}	0.0026
S_{tot}/[Bcd]$_{tot}$	1.00	0.95

necesidad de hacer uso del valor, $D_f = D_{Bcd}$. En el caso $n = 2$ la fracción es 82 % y para 3 componentes es 68 %.

La información obtenida hasta este punto se puede reescribir y obtener a partir de ella el cociente entre los parámetros de la trampa, S_{eq}, K_d y S_{tot}, y la concentración total de partículas fluorescentes [Bcd-egfp] (al que se identifica con $P^t_{tot} = fP_{tot}$ en el modelo desarrollado en este capítulo). También es posible obtener los cocientes con la concentración total de Bcd, [Bcd]$_{tot}$ = [Bcd]+[Bcd-egfp] (al que se identifica con P_{tot}). Los resultados se presentan en la tabla 3.2.

Si se estima la concentración de Bcd en el embrión, es posible inferir S_{eq}, K_d y S_{tot} a partir de los cocientes. En Abu-Arish et al. [2010] infieren un rango de concentraciones de Bcd-egfp en el núcleo, [Bcd-egfp]^{nuc} = [19– 140] nM mientras que los experimentos de FCS fueron realizados en el citoplasma durante la interfase. En Gregor et al. [2007] se estima que las concentraciones de Bcd en citoplasma, núcleo y durante la mitosis están relacionadas de acuerdo a:

$$\frac{[Bcd-egfp]^{nuc}}{[Bcd-egfp]^{cito}} \sim 4$$
$$\frac{[Bcd-egfp]^{mito}}{[Bcd-egfp]^{cito}} \sim 1{,}2$$

Usando la relación de concentración de Bcd-egfp entre el núcleo y el citoplasma se obtiene el rango de concentraciones en el citoplasma: [Bcd-egfp]^{cito} = [5– 35] nM. Empleando este rango se infiere un rango de parámetros de las posibles trampas, los mismo se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Estimaciones de parámetros de las posibles trampas del Bcd inferidos a partir del modelo propuesto y la estimación de la concentración de Bcd-egfp en el embrión.

	Ajuste 2 componentes	Ajuste 3 componentes
S_{eq}	[0.14 – 0.99] nM	[0.22 – 1.5] nM
K_d	[0.003 – 0.02] nM	[0.02- 0.13] nM
S_{tot}	[6 – 43] nM	[7 – 49] nM

Diferencias entre mediciones de FRAP y FCS e implicancias para la formación del gradiente de Bicoid.

Considerando que los experimentos de FCS fueron realizados en el citoplasma durante la interfase, mientras que los experimentos de FRAP fueron realizados durante la fase de mitosis, existe una leve diferencia en concentraciones del Bcd-egfp que fue medida en Gregor et al. [2007]. Es de esperar que haya otras diferencias, como por ejemplo la concentración de trampas. Durante la interfase, período en donde el citoplasma está diferenciado de los núcleos, estos últimos presentan una mayor concentración de Bcd. Es probable que algo análogo suceda con la concentración total de trampas. Durante la mitosis, la membrana que rodea los núcleos se desensambla y el contenido de éstos se mezcla con el citoplasma, resultando en una concentración de Bcd-egfp un poco mayor que en el citoplasma durante la mitosis. Si bien inobservable experimentalmente, es de esperar que la variación de la concentración total de Bcd sea igual a la de Bcd-egfp. Teniendo en cuenta que las concentraciones observadas son bastante homogéneas dentro de cada compartimiento (núcleo o citoplasma), es razonable suponer que la variación en $[\text{Bcd}]_{tot}$ sea debida únicamente a un cambio en el volumen accesible al pasar de medir en citoplasma durante la interfase a medir durante la mitosis. Si se supone además que hay un mismo tipo de trampas en el núcleo y en el citoplasma (caracterizadas por un mismo valor de K_d en el modelo aquí propuesto), la concentración total de trampas debería modificarse de la misma forma que la concentración total de Bcd. Para investigar esta posibilidad, se estima el cociente $S_{tot}^{mito}/S_{tot}^{cito}$ a partir de la información que se obtiene de los experimentos de FCS y FRAP, aplicando el modelo propuesto en este capítulo. Para tal fin, se reescribe el cociente en función de

parámetros del modelo:

$$\frac{S_{tot}^{mito}}{S_{tot}^{cito}} = \frac{a^{cito}}{a^{mito}} \frac{[Bcd]_{tot}^{mito}}{[Bcd]_{tot}^{cito}} \frac{\frac{Kd}{[Bcd]_{tot}^{mito}} + \frac{1}{(1+a^{mito})}}{\frac{Kd}{[Bcd]_{tot}^{cito}} + \frac{1}{(1+a^{cito})}} \tag{3.21}$$

en donde a^{cito} y a^{mito} se estiman a partir del valor de D_t obtenido en FCS y FRAP respectivamente. Utilizando el valor Kd/$[Bcd]_{tot}^{cito}$ de la tabla 3.2 se calcula:

$$\frac{Kd}{[Bcd]_{tot}^{mito}} = \frac{Kd}{[Bcd]_{tot}^{cito}} \frac{[Bcd]_{tot}^{cito}}{[Bcd]_{tot}^{mito}} \tag{3.22}$$

en donde el cociente $[Bcd]_{tot}^{mito}$/$[Bcd]_{tot}^{cito}$ se considera igual al cociente $[Bcd\text{-}egfp]^{mito}$/$[Bcd\text{-}egfp]^{cito}$$\sim$1.2 (Ec. 3.21). Usando D_t^{FRAP} dentro del rango [0.21 -1] $\mu m^2/s$ y los datos del ajuste de 2 y 3 componentes de FCS, el rango de valores que el cociente $S_{tot}^{mito}/S_{tot}^{cito}$ puede tomar es [1.23 - 1.14] y [1.7 - 1.26], respectivamente. Estos valores son similares a los de [Bcd-egfp] estimados en Gregor et al. [2007]. Esto es una muestra más de la plausibilidad del modelo acá propuesto para interpretar los resultados sobre la difusión de Bcd medidos por FRAP y FCS.

En resumen, los experimentos de FCS muestran de forma inequívoca que el Bcd no difunde libremente dentro del citoplasma. Los experimentos de FCS y de FRAP dan entonces información sobre coeficientes efectivos de difusión que pueden resultar muy distintos entre sí dependiendo de las propiedades de la interacción entre Bcd y sus "trampas" y de sus concentraciones. En esta sección se ha presentado un modelo biofísico minimal que tiene en cuenta los procesos involucrados en el transporte de Bcd en el citoplasma. Utilizando los resultados experimentales de FCS y FRAP se estimaron los parámetros característicos de este modelo. De acuerdo a estos, los coeficientes efectivos, D_u y D_t, pueden ser muy distintos entre sí lo que explica las divergencias en las estimaciones del transporte citoplasmático de Bcd obtenidas con FRAP y FCS. Es necesario remarcar que los coeficientes efectivos dependen, entre otras cosas, de la concentración de Bcd. Dado que la misma presenta un gradiente espacial, la tasa de transporte efectiva de Bcd depende de la región dentro del embrión y del tiempo transcurrido desde el momento en que el gradiente empieza a formarse. La estimación del tiempo que debe transcurrir hasta el establecimiento de dicho gradiente no puede hacerse entonces en base a un único coeficiente de difusión. Lo más correcto es hacerlo en base al modelo biofísico minimal acá presentado donde Bcd difunde y reacciona. De todos modos, teniendo en cuenta que de acuerdo a los cálculos presentados la constante de disociación de las trampas es pequeña, es de esperar que las mismas pronto saturen al irse produciendo Bcd en el polo anterior y que, una vez saturadas, las nuevas

moléculas de Bcd difundan casi libremente estableciendo rápidamente el gradiente en la zona anterior.

4

Cuantificación de la difusión del calcio por métodos ópticos

En el estudio de las señales intracelulares de calcio por métodos ópticos usualmente se emplean indicadores que aumentan la intensidad de su fluorescencia al ligar iones de calcio. Dado que en este tipo de estudios se registra la dinámica del indicador ligado a calcio, para extraer información acerca de la dinámica espacio-temporal del calcio libre es necesario contar con estimaciones realistas de los parámetros físicos del indicador, en particular, de las constantes de la reacción y de su coeficiente de difusión. Por otro lado, en las células el calcio no difunde libremente, sino que reacciona también con diversas sustancias (“buffers”) que modifican su concentración y su transporte. Estos buffers compiten con el indicador por el calcio y es de interés también determinar sus propiedades. Un conocimiento de la capacidad buffer de la célula permitirá estimar la corriente de calcio que subyace a la imagen de una señal usando un indicador como los antes mencionados. En este capítulo se estudia la aplicación de FCS para obtener algunas de estas cantidades y se la implementa experimentalmente en soluciones de calcio, indicador y buffer.

Con este objetivo se hace primero un estudio teórico de los coeficientes efectivos de difusión y de la función de autocorrelación que se obtendría en experimentos de FCS en un sistema con calcio y un indicador y en otro donde hay además una trampa adicional (buffer) de calcio. Se presentan a continuación datos experimentales en solución empleando un indicador de calcio, que corroboran la existencia de dichos coeficientes y que permiten inferir parámetros biofísicos de interés tanto en el caso en que no hay presente una trampa adicional como cuando sí la hay. Basado en el análisis de este último caso se propone un método para estimar coeficientes de difusión y capacidad buffer en ovocitos a partir de experimentos de FCS.

4.1. Teoría de FCS para un sistema conteniendo calcio y un indicador

4.1.1. Función de autocorrelación

El calcio y sus indicadores cumplen con un esquema de reacción bi-molecular como el presentado en la Ec. 2.1. Por otro lado, dado que el peso molecular de los indicadores es mucho mayor que el de los iones es posible suponer que la difusión del indicador no se ve modificada al ligar al ión. Por lo tanto, las ecuaciones que rigen la evolución de las concentraciones en este caso son las mismas que las planteadas en el Capítulo 2 y se pueden usar los autovalores y autovectores ya encontrados, identificando al calcio (Ca) con las partículas y a su indicador con la trampa ($F4$). Para calcular la correlación se emplea la expresión de la Ec. 1.15, en donde se considera el brillo de cada especie. En este caso suponemos que la única sustancia fluorescente es el indicador ligado a calcio, $CaF4$:

$$\begin{aligned} C_1 &= Ca_{eq} \qquad y \qquad Q_1 = 0 \\ C_2 &= CaF4_{eq} \qquad y \qquad Q_2 = Q \\ C_3 &= F4_{eq} \qquad y \qquad Q_3 = 0 \end{aligned}$$

donde Ca_{eq}, $CaF4_{eq}$ y $F4_{eq}$ son las concentraciones en equilibrio que cumplen:

$$Ca_{eq}F4_{eq} \;=\; K_{dF4}CaF4_{eq}, \tag{4.1}$$

donde K_{dF4} es la constante de disociación, definida como el cociente de las tasas de disociación y asociación de la reacción k_{offF4}/k_{onF4}. La función de correlación se escribe como suma de 3

términos $G(\tau) = G_1(\tau) + G_2(\tau) + G_3(\tau)$, cada uno de la forma:

$$G_i(\tau) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3q \hat{I}(\mathbf{q}) g_i(q,\tau)$$

donde los integrandos, g_i, se escriben en función de la norma del vector de onda q y τ como:

$$\begin{aligned} g_1(\tau,q) &= \frac{1}{CaF4_{eq}} \frac{(1+h)}{h} e^{\lambda_1 \tau} \\ g_2(\tau,q) &= \frac{1}{2hCaF4_{eq}} \left[1 + \frac{(a-h)}{(a+h)} \frac{\nu_{F4}}{\sqrt{\cdot}} + \frac{(D_{Ca} - D_{F4})q^2}{\sqrt{\cdot}} \right] e^{\lambda_2 \tau} \\ g_3(\tau,q) &= \frac{1}{2hCaF4_{eq}} \left[-1 - \frac{(a-h)}{(a+h)} \frac{\nu_{F4}}{\sqrt{\cdot}} + \frac{(D_{Ca} - D_{F4})q^2}{\sqrt{\cdot}} \right] e^{\lambda_3 \tau} \end{aligned}$$

con $\sqrt{\cdot} = \sqrt{(D_{Ca} - D_{F4})^2 q^4 + 2\frac{(a-h)}{(a+h)}(D_{Ca} - D_{F4})\nu_{F4}\, q^2 + \nu_{F4}^2}$, D_{Ca} y D_{F4} los coeficientes de difusión libres del calcio y de su indicador, respectivamente, y ν_{F4} definido como:

$$\nu_{F4} = k_{offF4}(a+h). \tag{4.2}$$

En este caso $a = \frac{F4_{eq}}{K_{dF4}}$ y $h = \frac{F4_{tot}}{F4_{eq}}$. Nótese que si bien los autovalores y autovectores son los mismos que en el caso de partículas siempre fluorescentes del Capítulo 2, los pesos de cada término en la función de correlación son diferentes debido al cambio en el brillo de las diferentes especies.

4.1.2. Modelo aproximado para tiempos largos

Si se aplica la aproximación a orden q^2 en la expansión, la correlación se escribe como:

$$\begin{aligned} G(\tau) = & \frac{Go_{F4}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_{F4}}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2 \tau_{D_{F4}}}}} + \frac{Go_{ef1}^{Ca-F4}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_{ef1}^{Ca-F4}}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2 \tau_{D_{ef1}^{Ca-F4}}}}} + \\ & + \frac{Go_{ef2}^{Ca-F4}\, e^{-\nu_{F4}\tau}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_{ef2}^{Ca-F4}}}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2 \tau_{D_{ef2}^{Ca-F4}}}}} \end{aligned} \tag{4.3}$$

con los pesos:

$$Go_{F4} = \frac{1}{V_{ef} F4_{tot}} \tag{4.4}$$

$$Go_{ef1}^{Ca-F4} = \frac{1}{V_{ef} CaF4_{eq}} \frac{a}{h(a+h)} \tag{4.5}$$

$$Go_{ef2}^{Ca-F4} = \frac{1}{V_{ef} CaF4_{eq}} \frac{1}{(a+h)} \tag{4.6}$$

y los tiempos característicos y coeficientes de difusión efectivos definidos como:

$$\tau_{D_{F4}} = \frac{w_r^2}{4D_{F4}} \tag{4.7}$$

$$\tau_{D_{ef1}^{Ca-F4}} = \frac{w_r^2}{4D_{ef1}^{Ca-F4}}, \qquad D_{ef1}^{Ca-F4} = \frac{D_{Ca} + x_F D_{F4}}{1 + x_F} \tag{4.8}$$

$$\tau_{D_{ef2}^{Ca-F4}} = \frac{w_r^2}{4D_{ef2}^{Ca-F4}}, \qquad D_{ef2}^{Ca-F4} = \frac{x_F D_{Ca} + D_{F4}}{1 + x_F} \tag{4.9}$$

con $x_F \equiv a/h = F4_{eq}^2/(K_{dF4}F4_{tot})$.

A diferencia del caso de partículas siempre fluorescentes estudiado en el Capítulo 2, en este caso no se anula el tercer término correspondiente al autovalor que no tiende a cero cuando $\mathbf{q}$ tiende a cero. Es por eso que aparece el factor exponencial en el último término de la función de autocorrelación. Nótese que al igual que en el caso de partículas siempre fluorescentes, la suma de los pesos Go, es inversamente proporcional a la concentración de partículas fluorescentes, que en este caso corresponde a:

$$Go_{tot} = \frac{1}{V_{ef} CaF4_{eq}}. \tag{4.10}$$

En total, el sistema analizado en esta sección tiene 9 incógnitas: los coeficientes de difusión libres, D_{Ca}, D_{F4}, las constantes de la reacción K_{dF4}, k_{offF4} y las concentraciones de las diferentes especies Ca_{tot}, $F4_{tot}$, Ca_{eq}, $F4_{eq}$, $CaF4_{eq}$. En cuanto a las ecuaciones, hay 2 ecuaciones de conservación (una para el indicador y otra para el calcio), la ecuación de equilibrio de la reacción (4.1) y 7 ecuaciones que provienen de la definición de los parámetros de ajuste del modelo, D_{F4}, D_{ef1}^{Ca-F4},D_{ef2}^{Ca-F4} y sus respectivos pesos Go_{F4}, Go_{ef1}^{Ca-F4}, Go_{ef2}^{Ca-F4} y ν_{F4}. En total serían 10 ecuaciones y 9 incógnitas. Sin embargo se puede mostrar que una de las ecuaciones del ajuste del modelo, D_{ef1}^{Ca-F4}, D_{ef2}^{Ca-F4} o Go_{ef1}^{Ca-F4}, es dependiente de las otras. A diferencia del caso de partículas siempre fluorescentes, no es necesario suponer conocido *a priori* el valor de D_{Ca}, $F4_{tot}$ o K_{dF4} para, idealmente, poder estimar el resto de las incógnitas a partir de la función de autocorrelación. Además el ajuste permitiría obtener información acerca de k_{offF4} que es un parámetro de reacción pobremente caracterizado.

4.2. Teoría de FCS para un sistema conteniendo calcio, indicador y quelante.

Hasta ahora se estudiaron diferentes casos de interacciones, pero siempre con un solo tipo de trampa. En general, y en particular en el caso del calcio, es de esperar la presencia de más

de un compuesto que actúe como trampa. Se estudiará en esta sección cómo se modifican los coeficientes de difusión efectivos ante la presencia de dos tipos de trampas diferentes. Se considera, en particular, el caso del calcio, su indicador fluorescente, Fluo 4 y un buffer llamado EGTA. El EGTA es un quelante de calcio que reacciona con éste de acuerdo a un esquema de reacción bimolecular como el de la Ec. 2.1 con tasas de asociación y disociación, k_{onE} y k_{offE}, respectivamente. Llamaremos $K_{dE} = k_{offE}/k_{onE}$ a la constante de disociación. En el caso de los buffers de calcio en general, y en el del EGTA, en particular, es posible suponer que la difusión libre no se ve modificada al ligar calcio. En esta sección trabajaremos entonces con los siguientes esquemas de reacción

$$Ca + F4 \underset{k_{onF4}}{\overset{k_{offF4}}{\rightleftarrows}} CaF4 \tag{4.11}$$

$$Ca + E \underset{k_{onE}}{\overset{k_{offE}}{\rightleftarrows}} CaE \tag{4.12}$$

donde con E y CaE denotamos al quelante en su forma libre y en su forma con calcio ligado respectivamente, y consideraremos las siguientes ecuaciones de evolución para las concentraciones de los compuestos intervinientes:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial [Ca]}{\partial t} &= D_{Ca}\nabla^2[Ca] - k_{onF4}[Ca]\,[F4] + k_{offF4}[CaF4] - k_{onE}[Ca]\,[E] + k_{offE}[CaE] \\
\frac{\partial [F4]}{\partial t} &= D_{F4}\nabla^2[F4] - k_{onF4}[Ca]\,[F4] + k_{offF4}[CaF4] \\
\frac{\partial [CaF4]}{\partial t} &= D_{F4}\nabla^2[CaF4] + k_{onF4}[Ca]\,[F4] - k_{offF4}[CaF4] \\
\frac{\partial [E]}{\partial t} &= D_{E}\nabla^2[E] - k_{onE}[Ca]\,[E] + k_{offE}[CaE] \\
\frac{\partial [CaE]}{\partial t} &= D_{E}\nabla^2[CaE] + k_{onE}[Ca]\,[E] - k_{offE}[CaE]
\end{aligned}$$

donde D_E es el coeficiente de difusión libre del EGTA.

Siguiendo el mismo procedimiento que en capítulos anteriores, se linealizan las ecuaciones de evolución alrededor del equilibrio. En el caso del EGTA, las concentraciones en el equilibrio satisfacen: $Ca_{eq}\; E_{eq} \;=\; K_{dE}\; CaE_{eq}$. Utilizando las constantes referentes al indicador de calcio para adimensionalizar las ecuaciones:

$$\begin{aligned}
T &= k_{offF4}\, t \\
\xi &= \sqrt{\frac{k_{offF4}}{D_{Ca}}}\, x
\end{aligned}$$

y pasando al espacio de Fourier, la matriz que caracteriza la evolución del problema linealizado en función de la norma del vector de onda adimensional $\tilde{q}$ resulta:

$$A = \begin{pmatrix} -\tilde{q}^2 - a - a_E & 1 & -c & k_E & -c_E \\ a & -\frac{D_{F4}}{D_{Ca}}\tilde{q}^2 - 1 & c & 0 & 0 \\ -a & 1 & -\frac{D_{F4}}{D_{Ca}}\tilde{q}^2 - c & 0 & 0 \\ a_E & 0 & 0 & -\frac{D_E}{D_{Ca}}\tilde{q}^2 - k_E & c_E \\ -a_E & 0 & 0 & k_e & -\frac{D_E}{D_{Ca}}\tilde{q}^2 - c_E \end{pmatrix} \quad (4.13)$$

donde $a = \frac{F4_{eq}}{K_{dF4}}$ y $c = \frac{Ca_{eq}}{K_{dF4}}$, $k_E = \frac{k_{offE}}{k_{offF}}$, $a_E = \frac{E_{eq}}{K_{dE}}k_E$ y $c_E = \frac{Ca_{eq}}{K_{dE}}k_E$.

4.2.1. Coeficientes de difusión efectivos

En este caso hay 5 autovalores. Dos de ellos corresponden a la difusión libre del Fluo 4 y del EGTA y se escriben, sin realizar otras aproximaciones, como:

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= -D_{F4}q^2 \\ \lambda_2 &= -D_E q^2 \end{aligned}$$

Los restantes autovalores, en la expansión a orden q^2, se escriben de la forma:

$$\lambda_3 = -D_{ef1}q^2 \quad (4.14)$$

$$\lambda_4 = -\nu_{ef2} - D_{ef2}q^2 \quad (4.15)$$

$$\lambda_5 = -\nu_{ef3} - D_{ef3}q^2 \quad (4.16)$$

donde D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3} son números positivos a los que llamamos coeficientes efectivos de difusión y q es la norma del vector de onda con dimensiones. En particular, es posible obtener una expresión analítica sencilla para el primero de ellos:

$$D_{ef1} = \frac{D_{Ca} + x_F D_{F4} + x_E D_E}{1 + x_F + x_E}, \quad (4.17)$$

con $x_F = F4_{eq}^2/(K_{dF4}F4_{tot})$ y $x_E = E_{eq}^2/(K_{dE}E_{tot})$. Este coeficiente es el mismo que el coeficiente efectivo de la aproximación de buffers rápidos (RBA) presentada en la Eq 1.5 y corresponde al coeficiente efectivo 2.14 en el caso de más de una trampa. Las expresiones analíticas de D_{ef2}, D_{ef3}, ν_{ef2} y ν_{ef3}, son realmente largas, el procedimiento para obtenerlas se presenta en el Apéndice. Cabe mencionar que los coeficientes efectivos D_{ef2} y D_{ef3}, a diferencia de

D_{ef1}, dependen del cociente $k_E = k_{offE}/k_{offF4}$. Además, se cumplen las siguientes relaciones: $D_{ef1} + D_{ef2} + D_{ef3} = D_{Ca} + D_{F4} + D_E$ y $\nu_{ef2} + \nu_{ef3} = \nu_{F4} + \nu_E$ donde ν_{F4} y ν_E son los argumentos de las exponenciales en el caso de la difusión de calcio en presencia de Fluo 4 y de EGTA separadamente, ν_{F4} definida en (4.2) y $\nu_E = k_{offE}(E_{eq}/Kd_E + E_{tot}/E_{eq})$.

A modo de ilustración se muestran en la figura 4.1 los gráficos de los cocientes con D_{Ca} de los coeficientes de difusión efectivos definidos en (4.14)–(4.16) en función de la concentración total de calcio, para un caso particular. Los parámetros elegidos son cercanos a valores esperados de la reacción Ca–Fluo 4–EGTA, en los casos en los que hay estimaciones previas de los mismos (ver tabla 4.5). Se grafican los cocientes porque el comportamiento de los coeficientes efectivos no cambia cualitativamente al cambiar el valor de D_{Ca}. En la mencionada figura se varía el valor del cociente de tasas de disociación, k_E, modificando los valores de k_{offF4} y k_{offE}. Cabe aclarar que D_{ef2} y D_{ef3}, dependen de k_E y no de los valores de las tasas de disociación de cada trampa por separado. Como se observa en los gráficos de la figura 4.1, D_{ef1} es la misma función de Ca_{tot} en todos los casos, mientras que D_{ef2} y D_{ef3} presentan cambios cualitativos con k_E. También se grafican en esa figura el cociente de los coeficientes efectivos provenientes del modelo de una sola trampa, considerando la reacción Ca–Fluo 4 (D_{ef1}^{Ca-F4} y D_{ef2}^{Ca-F4} definidos en (4.8)–(4.9)) y la reacción Ca–EGTA (D_{ef1}^{Ca-E} y D_{ef2}^{Ca-E} como en (4.8)–(4.9) pero teniendo en cuenta los parámetros de reacción y concentraciones del EGTA). Es conveniente comparar los coeficientes efectivos de la reacción de dos trampas con el caso de una trampa para poder saber en qué condiciones el análisis de la reacción de tres compuestos se puede reducir al de dos. En la figura 4.1 se observa que para $k_E \ll 1$, D_{ef2} es indistinguible de D_{ef2}^{Ca-F4} para todo el rango de concentraciones, Ca_{tot}, considerado, mientras que es indistinguible de D_{ef2}^{Ca-E} para $k_E \gg 1$.

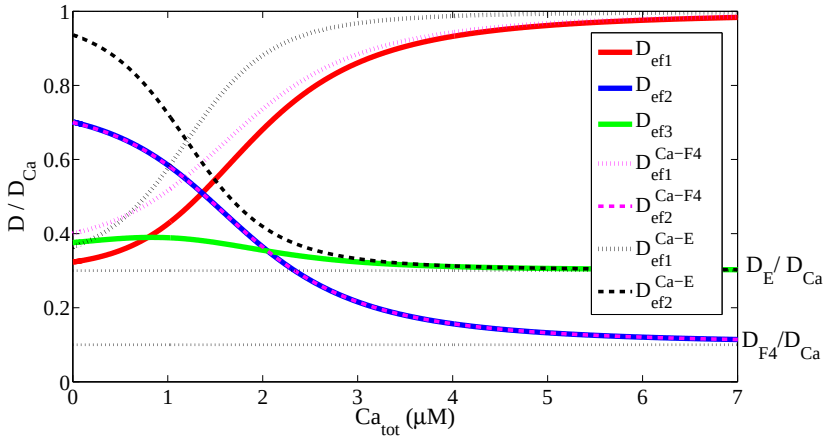
Por otro lado, la posibilidad de describir los coeficientes en el caso de 2 trampas en términos de los obtenidos para una sola de ellas también depende de las concentraciones relativas de los compuestos involucrados. En particular, si las concentraciones totales de quelante y de calcio se encuentran en exceso en comparación al indicador Fluo 4 (como es de esperar que suceda en una célula intacta al inyectar pequeñas cantidades de indicador) resulta:

$$x_F = \frac{F4_{eq}^2}{K_{dF4}F4_{tot}} \ll \frac{E_{eq}^2}{K_{dE}E_{tot}} \tag{4.18}$$

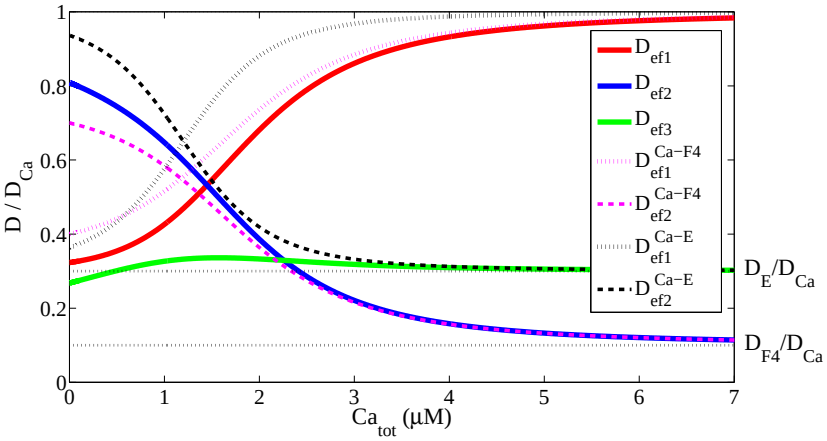
de donde se desprende que:

$$D_{ef1} = \frac{D_{Ca} + x_E D_E + x_F D_{F4}}{1 + x_E + x_F} \approx \frac{D_{Ca} + x_E D_E}{1 + x_E} = D_{ef1}^{Ca-E}. \tag{4.19}$$

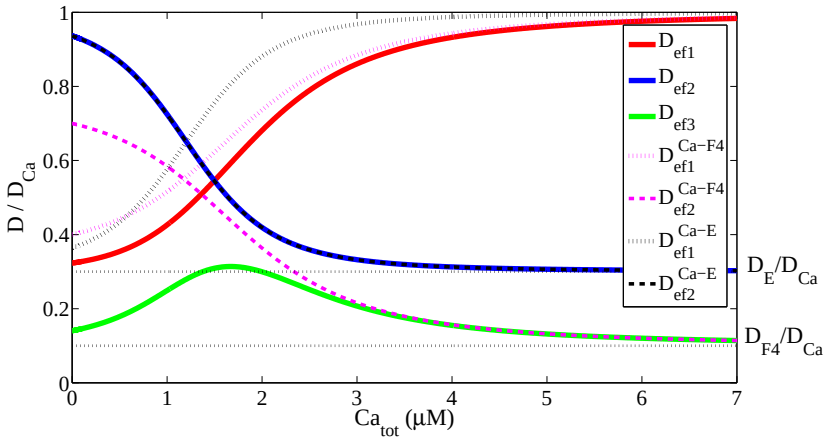
Esto se puede observar en la figura 4.2 donde se presentan gráficos similares a los de la figura 4.1 pero para un caso donde el calcio y el EGTA están en exceso respecto del Fluo 4



(a) k_E = 0.001, k_{offF4} = 1000 s^{-1}, k_{offE} = 1 s^{-1}



(b) k_E = 0.1, k_{offF4} = 10 s^{-1}, k_{offE} = 1 s^{-1}



(c) k_E = 100, k_{offF4} = 1 s^{-1}, k_{offE} = 100 s^{-1}

Figura 4.1: Gráfico de los cocientes adimensionales de los coeficientes efectivos teóricos de la reacción Ca–Fluo 4–EGTA: D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}, y de las reacciones Ca–Fluo 4, D_{ef1}^{Ca-F4}, D_{ef2}^{Ca-F4} y Ca–EGTA, D_{ef1}^{Ca-E}, D_{ef2}^{Ca-E} en función de la concentración total de calcio. Con D_{Ca} = 1000 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, D_{F4} = 100 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, D_E = 300 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $F4_{tot}$ = 1000 nM, E_{tot} = 1000 nM, K_{dF4} = 500 nM y K_{dE} = 100 nM.

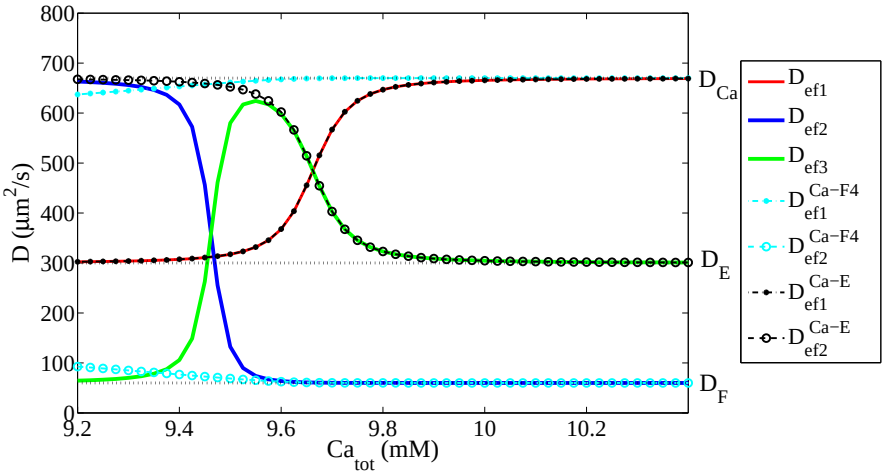


Figura 4.2: Gráfico de los coeficientes efectivos teóricos de la reacción Ca–Fluo 4–EGTA, D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3} y de las reacciones Ca–Fluo 4, D_{ef1}^{Ca-F4}, D_{ef2}^{Ca-F4} y Ca–EGTA, D_{ef1}^{Ca-E}, D_{ef2}^{Ca-E} en función de la concentración total de calcio. Con $F4_{tot}$ = 676 nM, E_{tot} = 9.66 mM, D_{Ca} = 760 μm^2/s, D_{F4} = 85 μm^2/s, D_E = 300 μm^2/s, K_{dF4} = 2600 nM, K_{dE} = 150 nM, k_{offF4} = 300 s^{-1} y k_{offE} = 0.75 s^{-1}.

($F4_{tot}$ = 676 nM mientras que E_{tot} = 9.66 mM y Ca_{tot} = [9.2 – 10.4] mM). Como se puede observar, $D_{ef1} = D_{ef1}^{Ca-E}$ para cualquier concentración de calcio en este caso. Se observa también que $D_{ef3} \approx D_{ef2}^{Ca-E}$ para $Ca_{tot} >$ 9.6 mM, valores de concentración para los que $D_{ef2} \approx D_{F4}$. Bajo esta última condición, el comportamiento observado de D_{ef3} puede deducirse a partir de las expresiones de los coeficientes efectivos. Teniendo en cuenta que $D_{ef1} + D_{ef2} + D_{ef3} = D_{Ca} + D_{F4} + D_E$, si $D_{ef2} \approx D_{F4}$ se puede concluir que $D_{ef3} \approx D_{Ca} + D_E - D_{ef1}$. Insertando en esta última igualdad la expresión aproximada de D_{ef1} dada por (4.19), se obtiene:

$$D_{ef3} \approx \frac{x_E D_{Ca} + D_E}{1 + x_E} = D_{ef2}^{Ca-E} \tag{4.20}$$

Este comportamiento es interesante ya que, en principio, permitiría determinar propiedades de las trampas no fluorescentes a partir de mediciones realizadas con pequeñas cantidades de fluoróforo. En otras secciones de este Capítulo se muestran resultados experimentales que hacen uso de esta propiedad y, basada en ella, se presenta también una propuesta para determinar las propiedades de buffers endógenos en ovocitos usando FCS. Se aprecia a su vez en la figura que los coeficientes efectivos D_{ef}^{Ca-F4} permanecen prácticamente constantes alrededor de los valores extremos que pueden tomar para todas las concentraciones, Ca_{tot}.

4.2.2. Función de autocorrelación

Para calcular la función de correlación hay que conocer la matriz de autovectores:

$$\chi = \begin{pmatrix} 0 & 0 & -\dfrac{(1+c+D_{F4}q^2+\lambda_3)}{a} & -\dfrac{(1+c+D_{F4}q^2+\lambda_4)}{a} & -\dfrac{(1+c+D_{F4}q^2+\lambda_5)}{a} \\ c & 0 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & \dfrac{c_E}{k_E} & -\phi_3 & -\phi_4 & -\phi_5 \\ 0 & 1 & \phi_3 & \phi_4 & \phi_5 \end{pmatrix} \tag{4.21}$$

donde ϕ_i son funciones de q y de los parámetros de reacción - difusión. No se tiene una expresión compacta analítica de los ϕ_i. Como el calcio y el EGTA no son fluorescentes y considerando que la única especie fluorescente es el indicador ligado a calcio ($CaF4$), se emplea la expresión de la Ec. 1.15 para calcular la función de correlación, en donde se asigna:

$$\begin{aligned} C_1 &= Ca_{eq} \quad y \quad Q_1 = 0, \\ C_2 &= CaF4_{eq} \quad y \quad Q_2 = Q, \\ C_3 &= F4_{eq} \quad y \quad Q_3 = 0, \\ C_4 &= CaE_{eq} \quad y \quad Q_4 = 0, \\ C_5 &= E_{eq} \quad y \quad Q_5 = 0. \end{aligned}$$

La función de correlación resulta:

$$\begin{aligned} G(\tau) = & \frac{Go_{F4}}{\left(1+\dfrac{\tau}{\tau_{D_{F4}}}\right)\sqrt{1+\dfrac{\tau}{w^2\tau_{D_{F4}}}}} + \frac{Go_{ef1}}{\left(1+\dfrac{\tau}{\tau_{D_{ef1}}}\right)\sqrt{1+\dfrac{\tau}{w^2\tau_{D_{ef1}}}}} + \\ & + \frac{Go_{ef2}\, e^{-\nu_{ef2}\,\tau}}{\left(1+\dfrac{\tau}{\tau_{D_{ef2}}}\right)\sqrt{1+\dfrac{\tau}{w^2\tau_{D_{ef2}}}}} + \frac{Go_{ef3}\, e^{-\nu_{ef3}\,\tau}}{\left(1+\dfrac{\tau}{\tau_{D_{ef3}}}\right)\sqrt{1+\dfrac{\tau}{w^2\tau_{D_{ef3}}}}} \end{aligned} \tag{4.22}$$

donde $\tau_{D_{efi}} = \dfrac{w_r^2}{4D_{efi}}$. Se obtiene un modelo de 4 componentes, dos de ellos con factores exponenciales. El primer término de la Ec. 4.22 corresponde (como en el caso de una sola trampa) al coeficiente de difusión del indicador, del cual se conoce la expresión analítica de su peso:

$$Go_{F4} = \frac{1}{V_{ef}F4_{tot}}. \tag{4.23}$$

Dado que no se tiene una expresión analítica cerrada de todos los autovectores, tampoco se tiene una expresión analítica de los pesos (Go) de las otras componentes. De todos modos, se puede

suponer que la suma de todos los pesos es inversamente proporcional a la concentración de partículas fluorescentes que, al igual que en el caso de un sistema con calcio y un indicador, es $CaF4_{eq}$ cumpliéndose la Ec. 4.10. En cuanto a los coeficientes de difusión efectivos, se tiene una expresión compacta en el caso de D_{ef1}. Para D_{ef2} y D_{ef3} las expresiones analíticas son bastante extensas, en el apéndice se muestra el procedimiento para obtenerlas.

4.3. Experimentos de FCS en solución. Materiales y métodos.

Para comprobar y corroborar el desarrollo teórico propuesto para el caso de indicadores de calcio se realizaron experimentos de FCS en condiciones controladas. Para el caso de un solo tipo de trampa se emplearon soluciones con diferentes concentraciones del indicador de calcio Fluo 4-dextran high affinity y una concentración de calcio total constante. Para el caso de dos tipos de trampa se empleó el quelante EGTA, que liga y desliga iones de calcio y la versión de baja afinidad del Fluo 4-dextran. Para este último tipo de experimentos, se dejaron constantes las concentraciones totales de Fluo 4-dextran low affinity y EGTA, variando la concentración de calcio total. Los experimentos fueron realizados en el microscopio confocal de la firma Olympus, modelo Fluo View 1000 del Laboratorio de Microscopía y Microespectroscopía.

4.3.1. Adquisición de datos

Para la realización de los experimentos en solución se depositaba una gota de aproximadamente 30 μl de la solución elegida sobre un cubreobjeto y se colocaba en el microscopio empleando un objetivo 60 x de inmersión en aceite (UPlasSapo). Al tratarse del indicador de calcio Fluo 4 se empleó la línea 488 nm del láser de Argón para excitar la muestra y se recolectó la fluorescencia en el rango de [500–600] nm. Se empleó un tamaño de abertura confocal o "pinhole" de 115 μm. Se realizaron experimentos de FCS, es decir, se recolectó la fluorescencia en un punto sin escanear la región. Se prefirió hacer este tipo de experimento que prioriza la resolución temporal sobre la espacial, ya que al tratarse de una solución acuosa, la parte espacial es homogénea. Para ello se enfocaba el microscopio en un punto aproximadamente a 20 μm del cubreobjeto y se adquiría la fluorescencia en un punto fijo a una frecuencia de 50 kHz durante aproximadamente 160 s. El tamaño de pixel es de 0.175 x 0.175 μm^2.

4.3.2. Cálculo de la autocorrelación de la fluorescencia experimental

Se verificó que la serie temporal de la fluorescencia fluctuara alrededor de un valor constante a lo largo de toda la medición y se descartaron series que presentaran alteraciones abruptas con respecto a su valor medio. La serie temporal de la fluorescencia fue dividida en N segmentos de largo FTL. Cada uno de ellos fue extendido al doble de su longitud con ceros para evitar el aliasing. Luego se calculó la autocorrelación a partir del teorema de Wiener-Khinchin, empleando la transformada de Fourier discreta (FTL debe ser una potencia de 2). Finalmente se calculó el promedio de las autocorrelaciones. La longitud del segmento, FTL, determina el mayor tiempo de correlación estudiado, por lo tanto es necesario elegirlo de forma tal que los tiempos característicos estudiados sean mucho menores a él. En este caso se tomó una longitud de FTL = 2^{13} datos obteniendo N = 1021 segmentos de 164 ms de duración, mientras que el mayor tiempo característico de correlación obtenido fue de 1 ms.

4.3.3. Ajuste de las autocorrelaciones experimentales

La correlación promedio obtenida experimentalmente fue ajustada por el modelo indicado en cada caso. En particular, se usó una función de la forma (4.3) para los experimentos con calcio e indicador a partir de los cuales se obtuvieron 3 pesos y 3 tiempos de difusión característicos, Go_i, τ_{D_i}, $0 \leq i \leq 2$, junto con la tasa de decaimiento exponencial ν_2,asociada al término de D_2, que corresponde respectivamente, a las cantidades Go_F, Go_{ef1}^{Ca-F4}, Go_{ef2}^{Ca-F4}, $\tau_{D_{F4}}$, $\tau_{D_{ef1}^{Ca-F4}}$, $\tau_{D_{ef2}^{Ca-F4}}$ y ν_{F4} del modelo. En el caso de los experimentos conteniendo también EGTA, se intentó el ajuste con funciones de la forma (4.22) con diferentes números de componentes y con y sin factores exponenciales. Sin embargo, el mejor ajuste se logró usando una función de la forma Ec. 1.11 con sólo dos componentes ($m = 2$), por lo que se obtuvieron sólo 2 pesos y 2 tiempos característicos de difusión, Go_i, τ_{D_i}, $0 \leq i \leq 1$ para cada tipo de solución analizada. Parte del análisis de estos datos presentado en esta Sección radica en determinar que información proveen estos parámetros en términos de los de la función de autocorrelación teórica (4.22). Para la realización de los ajustes se empleó la función *nlinfit* de la plataforma Matlab, que estima por cuadrados mínimos los parámetros de modelos no lineales, utilizando el algoritmo de Gauss-Newton con modificaciones Levenberg-Marquardt para la convergencia global. Para este método es necesario dar una propuesta inicial de los parámetros a ajustar. El resultado de la minimización puede llegar a depender de estos valores. En muchos casos, dar propuestas muy lejanas a los valores reales de los parámetros puede llevar a encontrar valores no físicamente posibles. Por esta

razón se implementó una rutina en donde se varían las propuestas iniciales de los parámetros, y se descartan los resultados con valores no razonables. En el caso de los experimentos realizados, las restricciones impuestas a los coeficientes de difusión, D, y a los pesos, Go fueron: 10 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s} < D < 2500\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ y $0 < Go < 10$. Si, habiendo descartado las soluciones no físicamente posibles se encuentran más de un conjunto de parámetros razonables, se elige el que presenta un menor valor de χ^2:

$$\chi^2 = \frac{1}{N_p - N_v} \sum_{i}^{N_p} \frac{(G_{teo}(\tau_i) - G_{exp}(\tau_i))^2}{G_{teo}(\tau_i)} \tag{4.24}$$

donde N_p es el número total de puntos de la correlación experimental G_{exp}, N_v el número de variables del modelo y G_{teo} la correlación calculada por el modelo. χ^2 resulta muy útil para comparar ajustes de modelos con diferente número de parámetros.

Como se explicó en el Capítulo 1, para recuperar los coeficientes de difusión en experimentos de FCS para cada tanda de experimentos, se realizó una calibración del volumen confocal empleando una solución 50 nM de Fluoresceína[1], considerando su coeficiente de difusión 300 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$. Los valores de w_r obtenidos variaron entre 220 y 245 $\mu\mathrm{m}$ con $w = w_z/w_r = 5$. El volumen efectivo estimado fue $V_{ef} = (0.35 \pm 0.06)\ \mu\mathrm{m}^3$.

4.4. Experimentos de FCS en soluciones con calcio y Fluo 4

Se realizaron experimentos empleando soluciones acuosas con diferentes concentraciones de Fluo 4-dextran high affinity (Invitrogen-Molecular Probes). En la tabla 4.1 se presentan las concentraciones de los diferentes reactivos empleadas. Usando las estimaciones previas listadas en la tabla 4.2, se calcularon las correlaciones teóricas esperadas para cada solución a partir de las Ecs. (4.3)–(4.9). En la figura 4.3 se grafican estas correlaciones y la contribución de cada componente a la correlación total. Estas últimas varían según la composición de la solución. Para concentraciones menores de Fluo 4, predomina la componente asociada al coeficiente D_{F4} y a mayores concentraciones predomina la asociada a D_{ef1}^{Ca-F4}.

[1]La Fluoresceína es un fluoróforo con espectro de absorción y emisión similar al de Fluo 4.

Tabla 4.1: Concentraciones de los distintos reactivos usados en experimentos de FCS en solución

Solución	$F4_{tot}$	Ca_{tot}
S1	429 nM	4286 nM
S2	857 nM	4286 nM
S3	1371 nM	4286 nM
S4	1886 nM	4286 nM
S5	2571 nM	4286 nM
S6	4286 nM	4286 nM
S7	9000 nM	4286 nM
S8	15000 nM	4286 nM
S9	19286 nM	4286 nM
Todas las soluciones contienen además: 100 mM KCl,30 mM MOPS, pH 7.2		

Tabla 4.2: Parámetros de reacción - difusión

Coeficientes de difusión y constantes de reacción estimados previamente		
D_{Ca}	760 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Qin et al. [1991]
D_{F4}	85 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Gennerich and Schild [2002]
K_{dF4}	772 nM	Invitrogen-Molecular Probes
k_{offF4}	80 s^{-1}	no se encontraron estimaciones

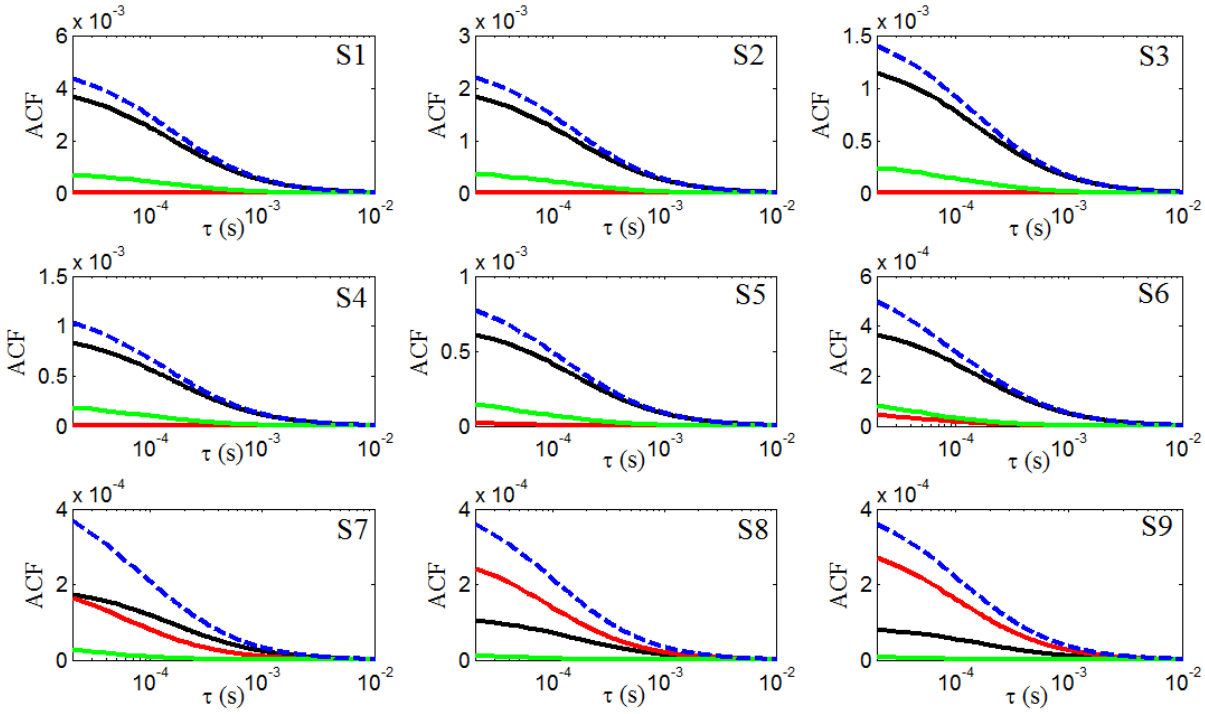


Figura 4.3: Gráfico de las correlaciones teóricas y las diferentes componentes, para cada una de las soluciones analizadas. En línea continua negra, roja y verde, se grafican respectivamente, el primer, segundo y tercer término de la función de autocorrelación del modelo de la Ec. 4.3, que corresponden a los términos asociados a los coeficientes de difusión D_{F4}, D_{ef1}^{Ca-F4} y D_{ef2}^{Ca-F4} respectivamente. En línea punteada se grafica la autocorrelación total.

4.4.1. Obtención de parámetros de ajuste y estimación de coeficientes de difusión.

Para cada una de las soluciones presentadas en la tabla 4.1 se realizaron experimentos de FCS que fueron ajustados con funciones de la forma eq 4.3 a partir de los cuales se obtuvieron los pesos y coeficientes de cada componente, Go_0, Go_1, Go_2, D_0, D_1 y D_2 y la tasa del factor exponencial, ν_2. En la figura 4.4 se presentan los coeficientes de difusión del ajuste encontrados para cada solución en función del $F4_{tot}$ y los resultados teóricos esperados, D_{F4}, D_{ef1}^{Ca-F4} y D_{ef2}^{Ca-F4} calculados a partir de las Ecs. 4.8 y 4.9 usando los parámetros de las tablas 4.2 y 4.1. Como se puede observar en dicha figura, el coeficiente, D_0, obtenido del ajuste permanece aproximadamente constante a lo largo de todas las soluciones analizadas y es fácilmente atribuible al coeficiente de difusión del Fluo 4, D_{F4}. El valor de D_{F4} obtenido del promedio de D_0 es de (47 $\pm$ 4) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, si bien es un poco menor que el esperado $\sim$ 85 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, no se tiene con certeza el valor de su difusión. El valor dado en la referencia de la tabla 4.2 es el estimado para la TMR dextran, que es un dextrano de 10 kDa como el Fluo 4-dextran pero en lugar de tener asociado el Fluo 4, tiene asociada una molécula de TMR (Tetramethyl Rhodamine) que no requiere calcio ni ningún otro ligando para fluorescer. Con respecto a los otros dos coeficientes de difusión mostrados en la figura 4.4, se puede ver que ambos siguen las tendencias esperadas para los coeficientes teóricos: D_1 decrece con $F4_{tot}$ aproximándose a D_{F4} para $F4_{tot}$ grande como lo hace D_{ef1}^{Ca-F4}, mientras que D_2, como D_{ef2}^{Ca-F4}, presenta el comportamiento contrario. Por otro lado, el valor al que se aproximan D_1 y D_{ef1}^{Ca-F4} para bajo $F4_{tot}$ es del orden del valor esperado del coeficiente de difusión libre de calcio, D_{Ca} [Qin et al., 1991].

En la figura 4.5, se presentan los valores de ajuste del parámetro ν_2. Hay que destacar que este parámetro, a diferencia de los coeficientes de difusión efectivos y los pesos Go, depende de la constante de disociación k_{offF4} de la reacción calcio–indicador, un parámetro pobremente conocido (no se encontró una referencia para éste). Los experimentos que presentamos acá permiten entonces estimar este valor. Se observa, en particular, que k_{offF4} parece estar aproximadamente entre 20 y 80 s^{-1}.

Con respecto a los pesos de los diferentes términos de la correlación, en la figura 4.6 se grafican los obtenidos a partir del ajuste en función del $F4_{tot}$, junto con los valores teóricos determinados usando las Ecs. 4.4–4.6 y los parámetros de las tablas 4.2 y 4.1. Como se observa en los gráficos de dicha figura, que el valor de Go_0, identificado con Go_{F4}, responde a lo esperado en casi todos los casos, mientras que las contribuciones de Go_1 y Go_2 son mayores a las esperadas

para los experimentos realizados en soluciones con concentración de Fluo 4 por debajo de 5 μM. Para concentraciones de $F4_{tot}$ entre 1 y 5 μM, los pesos esperados teóricamente, Go_{ef1}^{Ca-F4} y

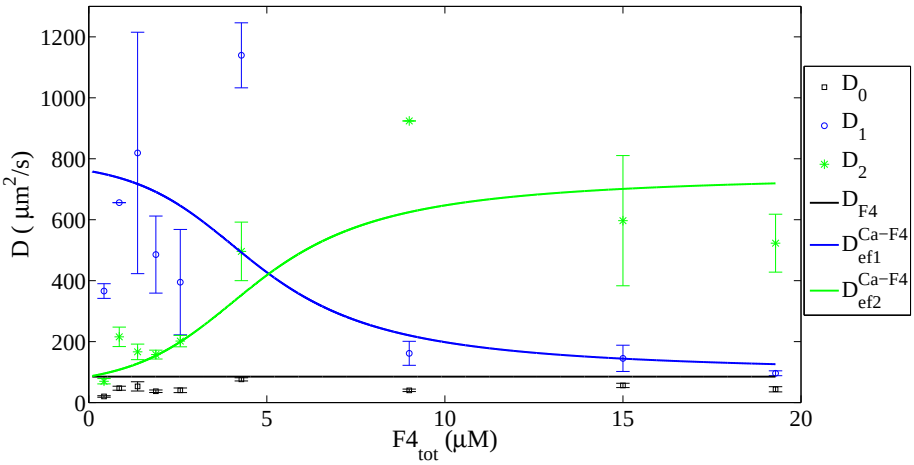


Figura 4.4: Gráfico de los coeficientes de difusión D_0, D_1 y D_2 obtenidos del ajuste del modelo a las curvas de correlación experimentales de las diferentes soluciones. En línea continua negra, azul y verde, los valores teóricos esperados de D_{F4}, D_{ef1}^{Ca-F4} y D_{ef2}^{Ca-F4} (Ecs. 4.8 y 4.9) calculados usando los parámetros de las tablas 4.2 y 4.1. Valores de $F4_{tot}$ usados en la confección de las soluciones, tabla 4.1.

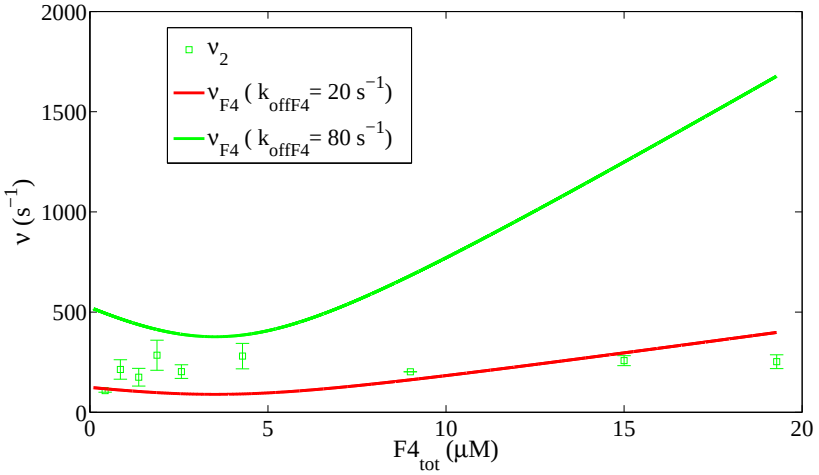


Figura 4.5: Gráfico del valor de ν_2 obtenido del ajuste del modelo a las curvas de correlación experimentales de las diferentes soluciones. En línea continua los valores teóricos esperados de ν_{F4} (Ec. 4.2) calculados con $k_{offF4} = 80s^{-1}$ (verde) y considerando $k_{offF4} = 20s^{-1}$ (rojo), el resto de los parámetros necesarios para estimar ν_{F4} obtenidos de las tablas 4.2 y 4.1. Valores de $F4_{tot}$ usados en la confección de las soluciones, tabla 4.1.

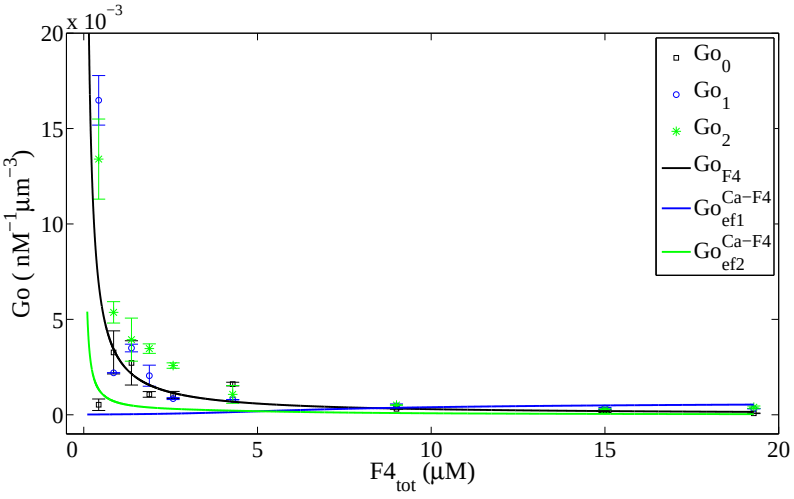
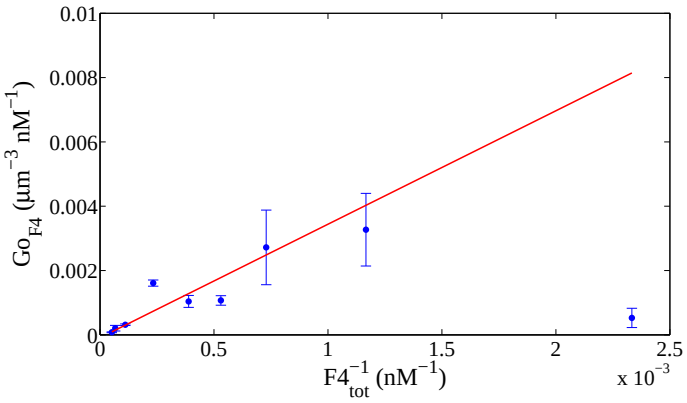


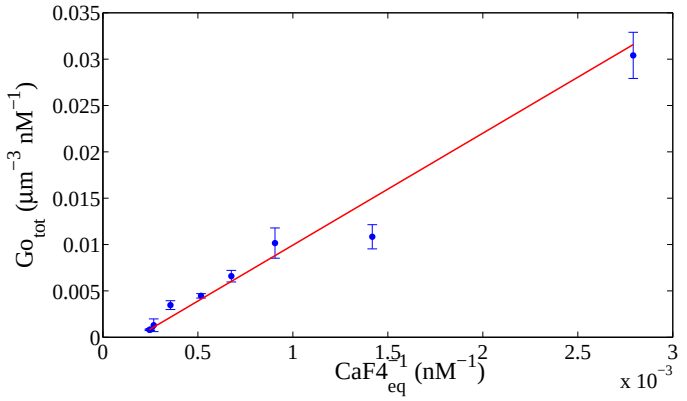
Figura 4.6: Valores de Go_0, Go_1 y Go_2 obtenidos del ajuste del modelo a las curvas de correlación experimentales de las diferentes soluciones. En línea continua negra, azul y verde, los valores teóricos esperados de Go_{F4}, Go_1^{Ca-F4} y Go_2^{Ca-F4} (Ecs. 4.4–4.6)calculados usando los parámetros de las tablas 4.2 y 4.1. Valores de $F4_{tot}$ usados en la confección de las soluciones, tabla 4.1. Valores de $F4_{tot}$ usados en la confección de las soluciones, tabla 4.1.

Go_{ef2}^{Ca-F4}, resultan mucho menores que Go_{F4}, por lo que es de esperar que no se los pueda determinar correctamente a partir de los experimentos. En la región donde Go_{ef1}^{Ca-F4}, Go_{ef2}^{Ca-F4} y Go_{F4} son más comparables los valores obtenidos, Go_1 y Go_2, en cambio, resultan más cercanos a los esperados, Go_{ef1}^{Ca-F4} y Go_{ef2}^{Ca-F4}.

Dado que Go_{F4} es inversamente proporcional a la concentración de $F4_{tot}$, si se grafica Go_0 en función de $F4_{tot}^{-1}$, la pendiente debería ser igual a la inversa del valor de V_{ef} (Ec. 4.4). En el gráfico de la figura 4.7(a) se presenta dicho ajuste. El valor de V_{ef} estimado a partir de la pendiente es igual a (0.28 $\pm$ 0.02) μm^3, consistente con el obtenido a partir de la calibración con Fluoresceína V_{ef} = (0.35 $\pm$ 0.06) μm^3. Además, la suma de todos los pesos, Go_{tot}, es inversamente proporcional a la concentración de $CaF4_{eq}$, Ec. 4.10. En la figura 4.7(b) se presenta la suma de los Go obtenidos del ajuste de los datos experimentales en función del valor de $CaF4_{eq}$ calculado teóricamente a partir de los datos de las tablas 4.1 y 4.2, junto con el ajuste lineal de los mismos. En este caso, la pendiente también debería ser la inversa de V_{ef}. Estimado de esta forma, se obtiene (0.083 $\pm$0.004) μm^3 que no se ajusta al valor esperado, probablemente debido a las diferencias observadas en los valores de Go_1 y Go_2. De todos modos, se observa que hay una buena correlación lineal de los datos.



(a)



(b)

Figura 4.7: (a) Gráfico de Go_0 (identificado con Go_{F4}) en función de la inversa de $F4_{tot}$, en línea continua el ajuste lineal. Valores de $F4_{tot}$ usados en la confección de las soluciones, tabla 4.1. (b) Gráfico de la suma de todos los Go provenientes de ajuste (Go_{tot}) en función de la inversa de $CaF4$, en línea continua el ajuste lineal. $CaF4_{eq}$ se calculó teóricamente a partir de los datos de las tablas 4.1 y 4.2.

4.4.2. Estimación de parámetros de reacción y concentraciones.

A partir de los datos del ajuste del modelo es posible inferir todos los parámetros de la reacción de Ca^{2+} con su indicador, Fluo 4, además de sus coeficientes de difusión libre. Para cada solución empleada se estiman estos parámetros. Los coeficientes de difusión libres D_{Ca}, D_{F4}, las constantes de reacción K_{dF4}, k_{offF4} y la concentración total de calcio Ca_{tot} son iguales para todas las soluciones estudiadas, por lo tanto para estimar su valor se realiza el promedio pesado de los valores obtenidos con cada solución. Los resultados de cada solución se presentan en el gráfico de la figura 4.8, donde también se presenta el promedio pesado de los datos. Los valores estimados de la reacción y difusión se presentan en la tabla 4.3.

En cuanto a los coeficientes de difusión del calcio y el indicador, están dentro de lo razonable. En la subsección anterior se comentó acerca del valor de D_{F4} y el valor de D_{Ca} en solución acuosa es consistente con estimaciones previas de la literatura Qin et al. [1991]. Con respecto a la constante de disociación K_{dF4}, si bien presenta un error apreciable, su valor es consistente con el informado por el fabricante. Cabe aclarar que el fabricante determina esta constante en ciertas condiciones (composición iónica, pH, temperatura), no necesariamente iguales a las empleadas en este trabajo, el modelo propuesto permite inferir el medio el valor de K_d *in situ*. Se estimó el valor de k_{offF4} en (90 $\pm$ 20) 1/s, no se encontró en la literatura una estimación del mismo. Conocer este parámetro es sumamente importante a la hora de modelar la cinética de los procesos de reacción–difusión. Si bien las concentraciones en el equilibrio no dependen de k_{off} sino del cociente $K_d = k_{off}/k_{on}$, la evolución de la concentración de las especies involucradas dependen de los valores de k_{off} y K_d.

La concentración de calcio total estimada a partir de los experimentos resulta menor a la

Tabla 4.3: Parametros de reacción–difusión obtenidos empleando el modelo propuesto para el calcio y su indicador.

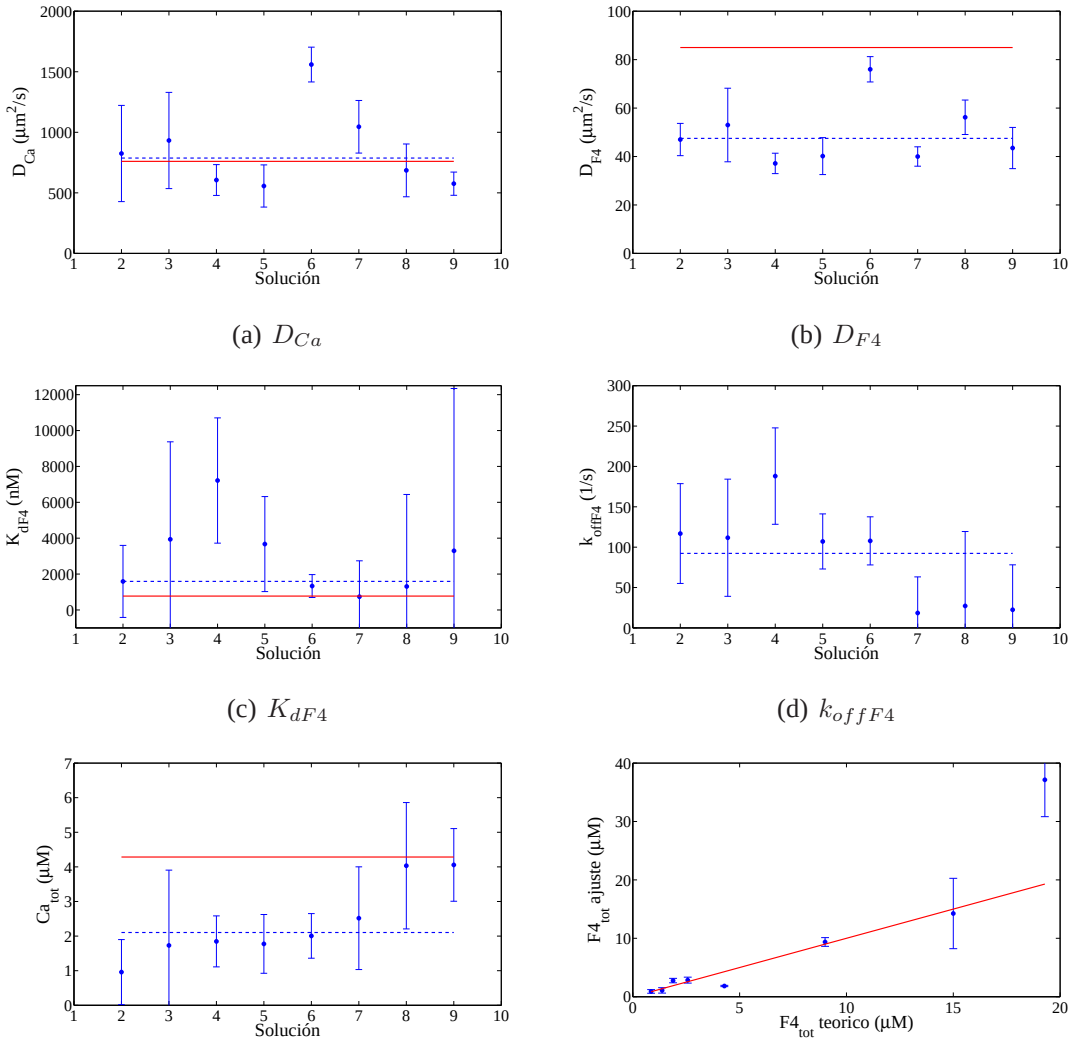
Parámetro	Valor del ajuste	Estimaciones previas	
D_{F4}	(47 $\pm$ 4) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	85 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Gennerich and Schild [2002]
D_{Ca}	(790 $\pm$ 110) $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	760 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Qin et al. [1991]
Ca_{tot}	(2100 $\pm$ 380) nM	4285 nM	
K_{dF4}	(1590 $\pm$ 840) nM	772 nM	Invitrogen-Molecular Probes
k_{offF4}	(90 $\pm$ 20) 1/s		

esperada en casi todas las tandas de experimentos salvo en las dos con mayor concentración de Fluo 4. Esto es consecuencia de la mayor divergencia encontrada entre los valores de los pesos determinados experimentalmente y los esperados para las tandas con menor concentración total de Fluo 4. Esta última concentración puede ser determinada también a partir de los datos experimentales usando exclusivamente información sobre el peso, Go_{F4}, que presenta menos error. En la figura 4.8(f) se muestra el gráfico de la concentración $F4_{tot}$ determinada del ajuste del modelo en función de la concentración $F4_{tot}$ esperada, donde se puede apreciar que esta concentración puede ser determinada correctamente en todos los experimentos. Al trabajar en soluciones acuosas, se conoce la concentración de todos los reactivos. Aquí se muestra que estas concentraciones, en particular, la del indicador, pueden ser obtenidas a partir de los experimentos. Esto es de especial importancia en caso de querer aplicar la técnica acá analizada en células intactas, ya que es difícil estimar la cantidad de indicador que se introduce en ellas. El abordaje propuesto en este trabajo muestra cómo es posible inferir concentraciones de interés *in situ*.

4.5. Experimentos de FCS en soluciones con calcio, Fluo 4 y EGTA.

Se realizaron experimentos empleando soluciones acuosas conteniendo además del calcio y su indicador, el quelante EGTA que también liga y desliga iones de calcio. En este caso se utilizó el indicador Fluo 4-dextran low affinity, que es el análogo de baja afinidad del Fluo 4-dextran utilizado en los experimentos de la Sección anterior. En la tabla 4.4 se presentan las concentraciones de los diferentes reactivos empleados en esta nueva serie de experimentos. En este caso, varía la concentración de calcio total, dejándose constante la concentración de Fluo 4-dextran low affinity y EGTA.

Usando los valores de coeficientes de difusión y constantes de reacción de los diferentes reactivos presentados en la tabla 4.5 y las concentraciones de la tabla 4.4, se calcularon los valores teóricos de los coeficientes de difusión efectivos (D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}) y de ν_{ef2} y ν_{ef3} empleando las expresiones analíticas (Ec. 4.17 y Apéndice), con el fin de compararlas con los valores obtenidos experimentalmente.



(a) D_{Ca} (b) D_{F4}

(c) K_{dF4} (d) k_{offF4}

(e) Ca_{tot} (f) $F4_{tot}$

Figura 4.8: (a) - (e) Gráficos de los parámetros de reacción - difusión obtenidos de los datos del modelo para cada solución estudiada. En línea punteada el promedio pesado de las diferentes estimaciones y en línea roja continua el valor esperado. (f) Gráfico de la concentración $F4_{tot}$ determinada del ajuste del modelo en función de la concentración $F4_{tot}$ empleada en la confección de las soluciones, tabla 4.1. En línea continua la recta identidad.

Tabla 4.4: Concentraciones de los distintos reactivos usados en experimentos de FCS en solución

Solución	Ca_{tot}	$F4_{tot}$	$EGTA_{tot}$
A01	9.37 mM	676 nM	9.66 mM
A02	9.42 mM	676 nM	9.66 mM
A03	9.47 mM	676 nM	9.66 mM
A04	9.52 mM	676 nM	9.66 mM
A05	9.57 mM	676 nM	9.66 mM
A06	9.61 mM	676 nM	9.66 mM
A07	9.66 mM	676 nM	9.66 mM
A08	9.69 mM	676 nM	9.66 mM
A09	9.90 mM	676 nM	9.66 mM
A10	10.63 mM	676 nM	9.66 mM
Todas las soluciones contienen: 100 mM KCl,30 mM MOPS, pH 7.2			

Tabla 4.5: Parámetros de reacción - difusión

Coeficientes de difusión y constantes de reacción		
D_{Ca}	760 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Qin et al. [1991]
D_{F4}	85 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Gennerich and Schild [2002]
K_{dF4}	2600 nM	Invitrogen-Molecular Probes
k_{offF4}	300 s^{-1}	Shuai et al. [2006]
D_E	300 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$	Qin et al. [1991]
K_{dE}	150 nM	Invitrogen-Molecular Probes
k_{offE}	0.75 s^{-1}	Shuai et al. [2006]

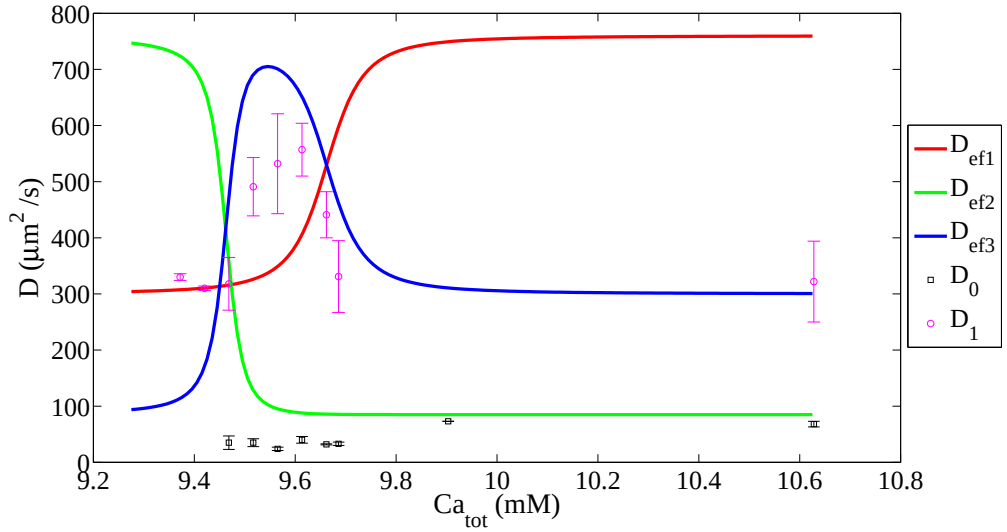
4.5.1. Obtención de parámetros de ajuste y estimación de coeficientes de difusión.

Los experimentos se realizaron de la misma manera que los experimentos en solución con una sola trampa. El ajuste de las funciones de autocorrelación experimentales se realizó en una primera instancia, con un modelo de 3 componentes, una de ellas con factor exponencial. Como

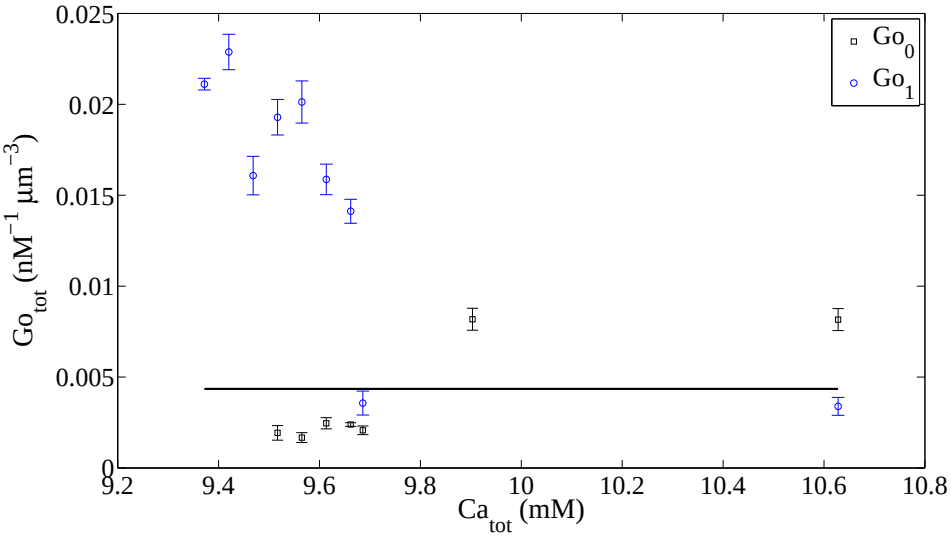
no se encontraron conjuntos de parámetros de ajuste de este modelo dentro de los límites razonables, se probaron modelos de 3, 2 y 1 componente, con o sin factor exponencial, y el mejor ajuste fue obtenido por el modelo de 2 componentes sin ningún término con factor exponencial (es decir, usando una expresión de la forma Ec. 1.11 con $m = 2$). Los resultados del ajuste para cada solución, se presentan en los gráficos de la figura 4.9. Se muestran también en esta figura los coeficientes efectivos esperados, D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}, calculados utilizando los datos de las tablas 4.4 y 4.5.

Se puede observar en la figura 4.9(a) que el coeficiente de difusión de menor valor determinado experimentalmente, D_0, se mantiene aproximadamente constante para las diferentes soluciones. Como discutimos más adelante, el peso correspondiente, Go_0, también permanece constante con Ca_{tot} por lo que identificamos a D_0 con el del Fluo 4-dextran low affinity, D_{F4}. El valor promedio obtenido con los ajustes, por otro lado, es $D_0 = (42 \pm 6)\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, compatible con el coeficiente de difusión, D_{F4}, encontrado para las soluciones de calcio y Fluo 4-dextran high affinity. Comparando el otro coeficiente obtenido, D_1, con los valores teóricos esperados, D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3}, vemos que $D_1 \approx D_{ef1}$ en los experimentos con menor concentración total de calcio ($Ca_{tot} < 9.5$ mM) y que $D_2 \approx D_{ef3}$ para concentraciones mayores. Vemos además que D_1 permanece aproximadamente constante para las primeras tres soluciones analizadas. En base a los estudios teóricos discutidos anteriormente, sabemos que los coeficientes efectivos no varían con las concentraciones de los reactivos cuando se aproximan a los coeficientes de difusión libre de alguno de los compuestos que intervienen: calcio, indicador o segunda trampa, EGTA. En este caso, suponemos que $D_1 \approx D_E$ en los experimentos con baja concentración total de calcio donde D_1 es prácticamente constante. Sabemos que no puede estar aproximándose al coeficiente de difusión del indicador porque, como se muestra más adelante, el valor del peso asociado, Go_1, no permanece constante con Ca_{tot}. Tampoco puede tratarse de D_{Ca}, porque D_1 crece para valores mayores de Ca_{tot} y, teniendo en cuenta las masas de los reactivos involucrados, D_{Ca} constituye una cota máxima para todos los coeficientes efectivos. El valor de D_E estimado de esta forma resulta $(319 \pm 6)\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$.

Con respecto a los Go experimentales presentados en la figura 4.9(b), se observa que Go_0 (asociado al coeficiente D_0 que identificamos con D_{F4}) permanece aproximadamente constante y su valor promedio es $Go_0 = (0.0035 \pm 0.0010)\ \mu\mathrm{m}^{-3}\mathrm{nM}^{-1}$. Esto ratifica el hecho de que la componente asociada al coeficiente D_0 corresponde al Fluo 4-dextran ya que al ser $F4_{tot}$ la misma en todas las soluciones, el valor teórico esperado, Go_{F4}, es constante e igual a $\dfrac{1}{V_{ef} F4_{tot}}$. Usando el valor determinado de V_{ef} y el de Go_0 obtenido del ajuste se estima $F4_{tot} = (847 \pm 253)$ nM,



(a)

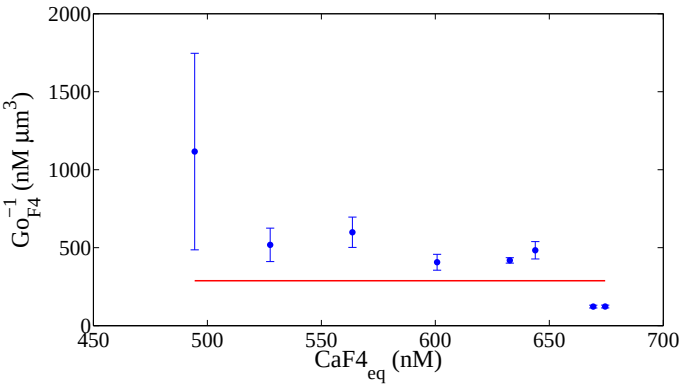


(b)

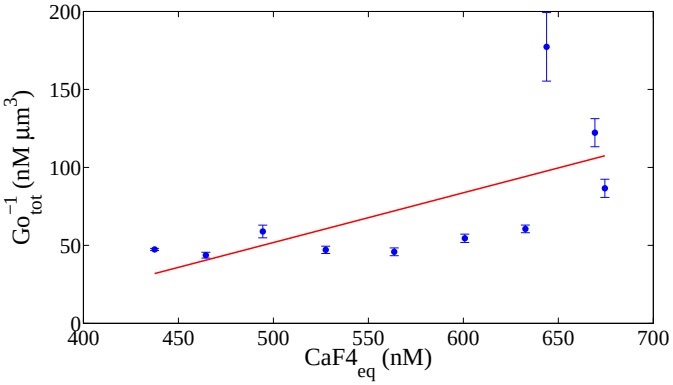
Figura 4.9: Parámetros obtenidos del ajuste de las correlaciones experimentales por el modelo de dos componentes, en función del Ca_{tot} empleado en la confección de las soluciones, tabla 4.4. (a) Coeficientes de difusión experimentales D_0 y D_1, en línea continua los valores esperados de D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3} calculados a partir de sus expresiones analíticas y los datos de las tablas 4.4 y 4.5 (b) Valores de Go experimentales Go_0 y Go_1. En línea continua el valor esperado de Go_{F4} calculado a partir de la Ec. 4.23 usando los datos de la tabla 4.4.

consistente con la concentración empleada en la confección de las soluciones, $F_{tot} = 676$ nM.

Para corroborar la correcta tendencia de los pesos con las concentraciones, en la figura 4.10 se muestran los gráficos de las inversas de Go_0 y $Go_{tot} = Go_0 + Go_1$ en función de la concentración de $CaF4_{eq}$ calculada teóricamente usando los datos de las tablas 4.4 y 4.5. En el primer gráfico se superpone el promedio y en el segundo el ajuste lineal de los datos. Se observa que Go_0^{-1} permanece aproximadamente constante para casi todas las concentraciones de $CaF4$ mientras que Go_{tot}^{-1} crece con ellas de forma prácticamente lineal. Recordando que el Go_{tot} es inversamente proporcional a la concentración de partículas fluorescentes (en este caso $CaF4_{eq}$) y a V_{ef}, del valor de la pendiente se obtiene el valor de V_{ef} = (0.32 $\pm$ 0.14) μm^3, consistente con el valor



(a)



(b)

Figura 4.10: Inversa de los Go obtenidos del ajuste de las correlaciones experimentales por el modelo de dos componentes en función de la concentración de calcio ligado al indicador, $CaF4_{eq}$. (a) Inversa de Go_{F4}, en línea continua el promedio de los valores. (b) Inversa de Go_{tot} , en línea continua el ajuste lineal de los datos. $CaF4_{eq}$ se calculó teóricamente a partir de los datos de las tablas 4.4 y 4.5.

obtenido en la calibración ($V_{ef} = (0.35 \pm 0.06)\ \mu\mathrm{m}^3$).

Para interpretar el significado del coeficiente obtenido del ajuste, D_1, hay que considerar que tanto el buffer EGTA como el calcio total se encuentran en exceso en comparación al indicador Fluo 4 en estos experimentos, por lo que valen las consideraciones que dieron lugar a las relaciones (4.18)–(4.19) reflejadas en la figura 4.1. Esta figura fue hecha utilizando los valores de los parámetros de los experimentos presentados en esta Sección. Comparando las figuras 4.1 y 4.9 vemos que el coeficiente de difusión, D_1, es $D_1 \approx D_{ef3}$ para valores de concentración para los cuales se espera que $D_{ef3} \approx D_{ef2}^{Ca-E}$. Teniendo en cuenta esto se graficaron en la figura 4.11 los coeficientes experimentales asociados a D_{ef3} en función del cociente E_{eq}^2/E_{tot} calculado teóricamente a partir de los datos de las tablas 4.4 y 4.5. Ajustando los datos de esta figura mediante la función:

$$f(x) = (a + bx)/(1 + cx) \tag{4.25}$$

y haciendo la identificación $a = D_E$, $b = D_{Ca}/K_{dE}$ y $c = 1/K_{dE}$ se recuperan los coeficientes de difusión y parámetros de reacción asociados al EGTA. Obtenemos, en particular: $D_E = (304 \pm 57)\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $D_{Ca} = (551 \pm 803)\ \mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ y $K_{dE} = (154 \pm 163)$ nM, que si bien presentan errores importantes, los valores concuerdan con los esperados corroborando la interpretación acá presentada del significado del coeficiente, D_1, obtenido a partir del ajuste de los datos experimentales.

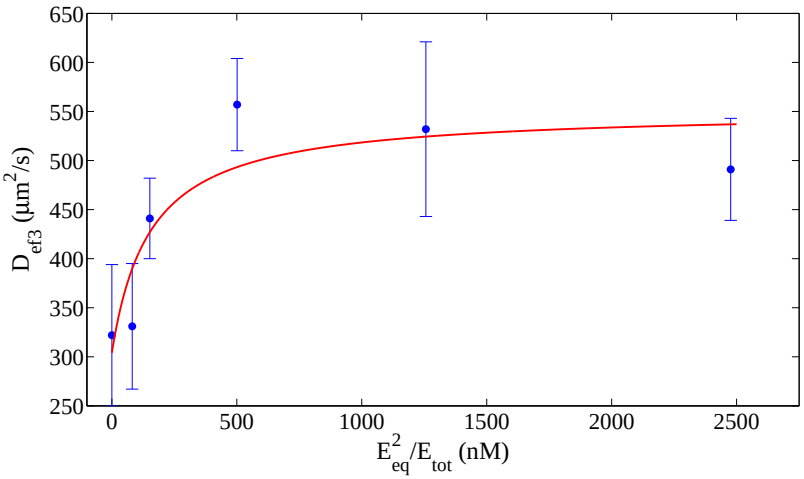


Figura 4.11: Gráfico de datos experimentales del coeficiente de difusión D_{ef3} obtenidos del ajuste del modelo aproximado en función de E_{eq}^2/E_{tot}. En línea continua, el ajuste de los mismos por la función de la Ec. 4.25. El cociente E_{eq}^2/E_{tot} se calculó teóricamente usando los datos de las tablas 4.4 y 4.5.

Finalmente, cabe notar que el término de la función de autocorrelación Ec. 4.22 asociado a D_{ef3} presenta un factor exponencial de la forma $e^{-\nu_3 t}$ que no se vio reflejado en el ajuste de los datos experimentales. Esto puede ser debido a que el valor del factor sea prácticamente uno en los tiempos en donde la correlación varía más, es decir, tiempos cercanos al tiempo característico asociado al coeficiente D_{ef3}, $\tau_{D3} = w_r^2/(4D_{ef3})$, que en este caso toma valores entre [0.015 – 0.044] ms. De hecho, si se calcula el valor del factor en el tiempo característico asociado al termino D_{ef3} empleando los valores teóricos de ν_3 para cada solución, se comprueba que resulta ser mayor a 0.99 en todos los casos, salvo para la última solución (A10) donde toma el valor de 0.81. Si se analiza en un tiempo 10 veces mayor al tiempo característico, el factor es mayor a 0.9 en todos los casos salvo el ultimo punto que es 0.12. El valor de ν_3 para la última solución es aproximadamente 5000 s^{-1} mientras que para el resto de las soluciones varía entre [380– 1250] s^{-1}.

4.5.2. Estimación de parámetros de reacción y concentraciones.

Hasta ahora se ha mostrado cómo los coeficientes de difusión que pueden extraerse de los ajustes de los datos experimentales con dos componentes pueden identificarse con los obtenidos a partir del análisis teórico y de qué manera pueden ser usados entonces para estimar los coeficientes de difusión libre, D_{F4} y D_E. Para ratificar la validez de la identificación entre valores ajustados y cantidades teóricas aquí propuesta, se mostró cómo los primeros seguían la tendencia esperada de acuerdo a esta identificación con las concentraciones teóricas de las diferentes especies. Se analiza ahora qué datos (en especial, referentes al EGTA) se pueden extraer a partir de las observaciones suponiendo que sólo se conocen las concentraciones totales de calcio y Fluo 4. Con este objetivo se vuelve sobre el análisis de D_1.

Como ya se argumentó, se asociaron los valores donde D_1 es decreciente con $D_{ef3} \approx D_{ef2}^{Ca-E}$:

$$D_{ef2}^{Ca-E} = \frac{x_E D_{Ca} + D_E}{1 + x_E} = \frac{Kd_E E_{tot} D_{Ca} + (Ca + Kd_E)^2 D_E}{Kd_E E_{tot} + (Ca + Kd_E)^2} \tag{4.26}$$

donde x_E se reescribió en términos del calcio libre como $x_E = K_{dE} E_{tot}/(Ca + K_{dE})$. Para las distintas soluciones empleadas en los experimentos, la concentración de EGTA permanece constante. Por lo tanto, si se pudiera estimar el calcio libre en cada solución, a partir de los diferentes valores que toma D_{ef2}^{Ca-E} se podrían inferir los parámetros de la trampa, K_{dE}, D_E y E_{tot}, además del coeficiente de difusión del calcio utilizando la ec. (4.26). Para estimar la concentración de calcio libre se procede del siguiente modo. A partir del valor Go_{tot} se estima

$CaF4_{eq} = 1/(V_{ef}Go_{tot})$ para cada solución, y del valor de Go_{F4} se obtiene $F4_{tot} = 1/(V_{ef}Go_{F4}$ a partir de los cuales se determina $F4_{eq} = F4_{tot} - CaF4_{eq}$. Usando el valor de K_{dF4} del indicador dada por el fabricante, se puede inferir el calcio libre en cada solución, Ca_{eq} de la forma:

$$Ca_{eq} = \frac{K_{dF4}CaF4_{eq}}{F4_{eq}} = K_{dF4}\frac{Go_{F4}}{(Go_{tot} - Go_{F4})} \tag{4.27}$$

A partir de 3 valores diferentes obtenidos de D_1 (y distintos a D_E) y estimando en cada caso el valor de Ca_{eq} mediante la Ec. 4.27, se pueden despejar los valores de E_{tot}, K_{dE} y D_{Ca} empleando, a su vez, el valor D_E determinado a partir de D_1 donde éste no varía con Ca_{tot}. Se siguió este procedimiento usando los valores experimentales de las soluciones A4, A7 y A8 (D_2 igual a 491 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, 441 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ y 331 $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, respectivamente) obteniendo $D_{Ca} = 580$ $\mu\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$, $K_{dE} = 135$ nM y $E_{tot} = 2490$ nM. El coeficiente de difusión de calcio se encuentra dentro de lo esperado. La concentración de EGTA resulta mucho menor que la utilizada en la confección de las soluciones, sin embargo se obtiene una buena estimación de la constante, K_{dE}, que según el fabricante debería ser 150 nM a la temperatura y pH empleados en los experimentos.

En resumen, se han podido determinar los coeficientes de difusión libres tanto del indicador como de la segunda trampa, sin suponer como conocido ninguna constante de reacción. Además se pudieron estimar las concentraciones del indicador en todas sus formas: $F4_{eq}$, $CaF4_{eq}$ y $F4_{tot}$. Por otro lado, usando la constante de disociación de la sonda de calcio indicada por el fabricante, se pudo estimar satisfactoriamente el coeficiente de difusión del calcio y la constante de disociación de la segunda trampa, el EGTA.

4.6. Propuesta de aplicación del modelo a mediciones de FCS en ovocitos

El análisis teórico y los resultados experimentales de FCS en soluciones con calcio, indicador y un buffer adicional dan ideas de cómo obtener información sobre el transporte de calcio y la capacidad “buffering” en células intactas mediante experimentos ópticos. En particular, estamos interesados en determinar estas propiedades en ovocitos. En todas las células, en condiciones basales, los iones de calcio están en su mayoría atrapados por buffers o trampas (el calcio basal libre es del orden de 40 nM). No se conoce mucho acerca de estos buffers en ovocitos. Se cree que están en concentraciones altas y que tienen baja movilidad. Comparada con la concentración de indicador de calcio que se usa en los experimentos, se puede considerar que, en el ovocito, las

concentraciones totales de buffer y calcio E_{tot} y Ca_{tot}, son mucho mayores que la de la sonda, $F4_{tot}$. Es decir, se está en una situación análoga a la de los experimentos de la última sección. Sin embargo, hay una diferencia y es que muy probablemente el coficiente de difusión libre de los buffers endógenos sea menor que el del indicador de calcio. Este hecho no cambia significativamente el comportamiento de los coeficientes de difusión efectivos. Es más, si en el caso expuesto de Ca–Fluo 4–EGTA, el EGTA tuviese coeficiente nulo de difusión, los coeficientes efectivos se comportarían de la misma forma, es decir, D_{ef1} sería igual a D_{ef1}^{Ca-E}; D_{ef3} se aproximaría a D_{ef2}^{Ca-E} luego de alcanzar su valor máximo y D_{ef2} sería aproximadamente igual a D_{F4}. En la figura 4.12 se pueden observar los diferentes coeficientes efectivos suponiendo manteniendo los mismos parámetros que en el caso de las reacciones con Fluo 4 y EGTA pero considerando D_E = 0.

Para estimar parámetros de las trampas en el ovocito, habría que realizar experimentos de FCS en diferentes condiciones, de forma tal que los coeficientes efectivos variaran su valor. Dado que las trampas son desconocidas, no es posible variar su concentración, habría que variar la concentración de indicador o de calcio. Como experimentos de FCS requieren bajas concentraciones de partículas fluorescentes, de forma de obtener fluctuaciones más grandes en la fluorescencia, la concentración del indicador no se puede variar en forma significativa, y como

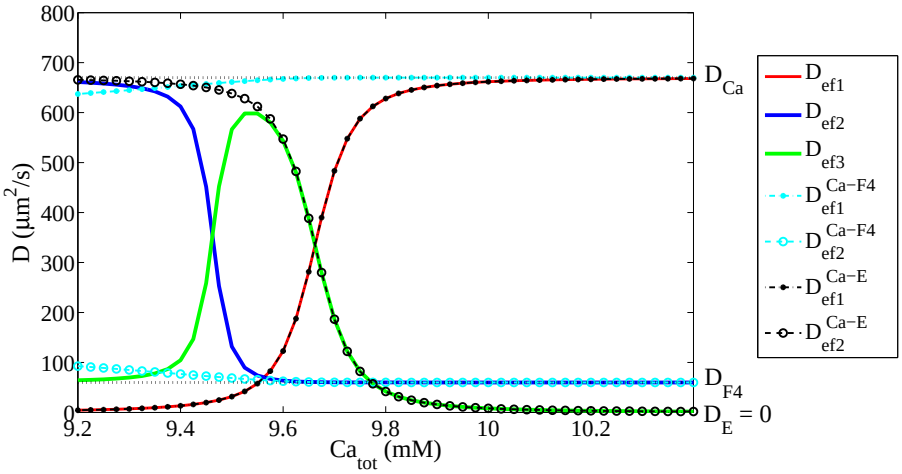


Figura 4.12: Gráfico de los coeficientes efectivos teóricos de la reacción Ca–Fluo 4–EGTA, D_{ef1}, D_{ef2} y D_{ef3} y de las reacciones Ca–Fluo 4, D_{ef1}^{Ca-F4}, D_{ef2}^{Ca-F4} y Ca–EGTA, D_{ef1}^{Ca-E}, D_{ef2}^{Ca-E} en función de la concentración total de calcio. Con D_{Ca} = 760 μm^2/s, D_{F4} = 85 μm^2/s, D_E = 0, $F4_{tot}$ = 676 nM, E_{tot} = 9.66 mM, K_{dF4} = 2600 nM, K_{dE} = 150 nM, k_{offF4} = 300 s^{-1} y k_{offE} = 0.75 s^{-1}.

la trampa está en exceso, una variación en la concentración de la sonda prácticamente no modificaría los valores de coeficientes efectivos que se obtendrían. Sería necesario entonces variar la concentración de calcio total en el citosol. Una de las posibilidades para lograrlo es interferir farmacológicamente con el funcionamiento de las bombas que retiran parte del calcio del citosol, por ejemplo empleando tapsigargina, que es un inhibidor de la bomba del retículo endoplásmico.

Se propone entonces realizar experimentos de FCS en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, variando la concentración de calcio citosólico mediante el uso de tapsigargina. Aplicando a los datos obtenidos el análisis utilizado acá en el caso de soluciones con calcio, EGTA y Fluo 4, esperamos estimar coeficientes de difusión de calcio, indicador y buffers endógenos *in situ*. Se espera, a su vez, extraer información sobre algunos parámetros de reacción y la capacidad "buffering" de la célula.

5

Señales intracelulares de calcio, modificación de un microscopio comercial confocal para su observación

En este capítulo se describe la modificación introducida en el microscopio confocal multiespectral Olympus Fluo View 1000 para realizar experimentos en los que es necesario fotolizar compuestos enjaulados. Esta modificación resulta esencial e imprescindible para el estudio de señales de calcio evocadas por IP_3mediante métodos ópticos, ya que permite generar un estímulo preciso y controlado de IP_3, simultáneamente a la obtención de imágenes confocales. Se presenta una caracterización de las propiedades principales del sistema y se corrobora la efectividad del sistema propuesto, empleando un compuesto enjaulado de calcio junto con un indicador fluorescente de calcio.

5.1. El microscopio confocal Olympus FV1000

El microscopio confocal espectral de la firma Olympus, modelo Fluo View 1000 (FV1000), con el que se realizaron los experimentos presentados en este trabajo de Tesis, fue adquirido a mediados del año 2007 y se encuentra instalado en el laboratorio de Microscopía y Microespectroscopías (LMM) del departamento de Física. El LMM forma parte de un proyecto interdisciplinario y está compuesto por investigadores del departamento de Física, del Centro de Microscopías Avanzadas y de Biología.

El microscopio está formado por un módulo confocal espectral, unido a un microscopio invertido IX81. Posee dos modos para adquirir imágenes, vinculados a dos sistemas de iluminación diferentes: por una parte el modo confocal, que tiene láseres como fuente de iluminación por el que se obtienen imágenes con alta resolución axial, y por otra parte la adquisición de imágenes convencionales de fluorescencia (“wide field”), que utiliza la luz de una lámpara de mercurio.

Modo confocal El microscopio tiene tres láseres que proveen en total cinco longitudes de

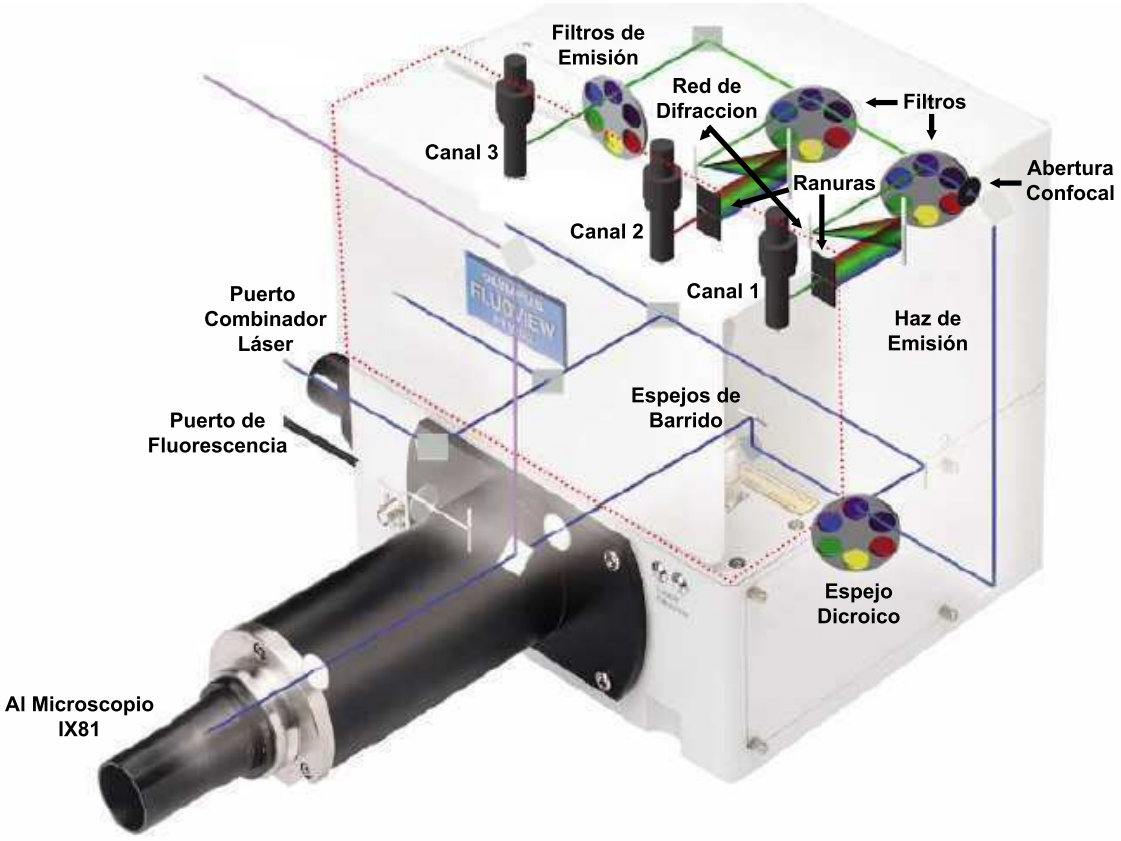


Figura 5.1: Esquema de la unidad confocal espectral del microscopio FV1000.

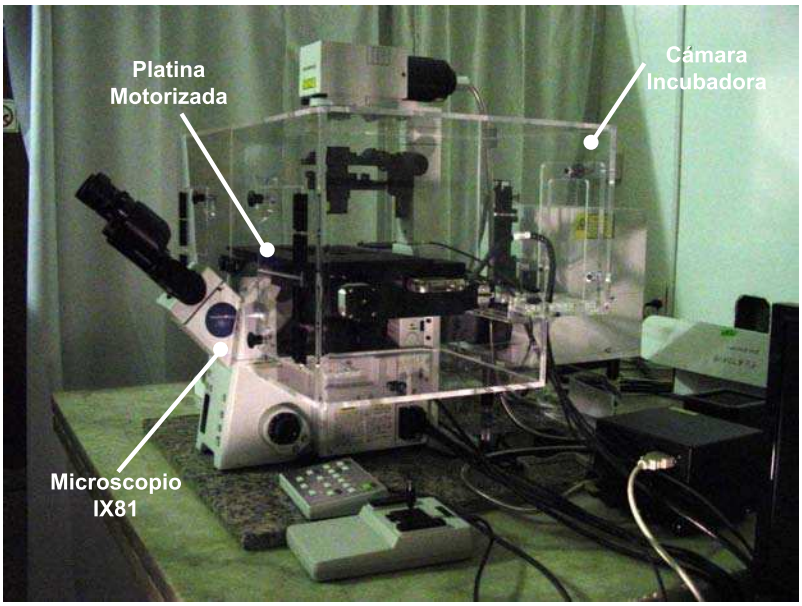
onda: láser multilínea de Argón (457 nm, 488 nm, 515 nm), láser de Helio-Neón (543 nm) y un láser diodo de estado sólido (635 nm). Una unidad combinadora de láseres permite iluminar a la muestra simultáneamente con tres longitudes de onda. Consta de tres canales de detección, dos de ellos espectrales. Los detectores son fotomultiplicadores de alta sensibilidad con eficiencia cuántica $\sim 100\,\%$ para 500 nm (Hamamatsu). El sistema de detección, que se encuentra dentro de la unidad confocal, tiene dos sistemas de red de difracción (para los dos primeros canales) con una resolución de 2 nm que trabajan en todo el espectro visible 400 nm a 700 nm. El tercer canal posee filtros barrera. Un par de espejos galvanómetros permiten generar imágenes por barrido, con una velocidad máxima de 16 cuadros por segundo, para una imagen de 256 x 256 píxeles. La máxima resolución es de 4096 x 4096 píxeles y el mínimo intervalo de detección es de 2 μs. En la figura 5.1 se presenta un esquema de la unidad confocal con los elementos mencionados.

Modo Fluorescencia Como fuente de iluminación para fluorescencia, el microscopio tiene una lámpara de mercurio externa de 100 Watts, conectada vía fibra óptica al microscopio a través del puerto de fluorescencia. Se tienen diversos cubos de filtros de fluorescencia para ser empleados con distintas sondas fluorescentes. Como sistema de detección se emplea una cámara CCD Proscan 128+.

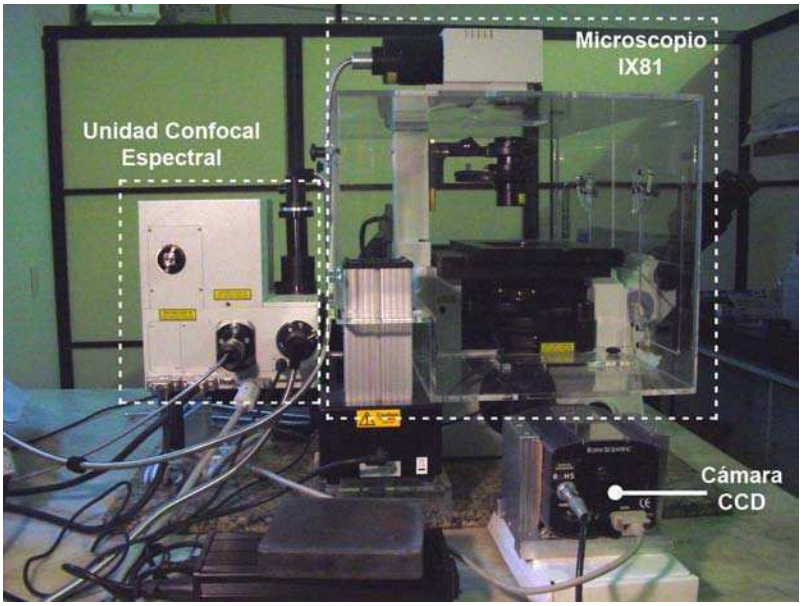
El microscopio cuenta con diversos objetivos, el empleado en los experimentos mostrados en este trabajo es el objetivo 60 x (UPlanSAPO, Olympus), apocromático de inmersión en aceite, apertura numérica 1.35 y distancia de trabajo 0.15 mm. Además, se incorporó al microscopio una platina motorizada (Scientific Roper) y una cámara ambientadora para mantener la temperatura constante. En la figura 5.2 se presentan dos fotografías donde se pueden observar los diferentes componentes del sistema.

5.2. Adaptación del FV1000 para la fotólisis de compuestos enjaulados

La luz ultravioleta (UV) es proporcionada por la lámpara de mercurio externa que se utiliza para la observación de fluorescencia convencional. Como se observa en la figura 5.3, el espectro de emisión de la lámpara de mercurio es continuo y presenta un importante pico a 365/366 nm que se aprovecha para la fotólisis. La luz de la lámpara se conecta al microscopio a través de una fibra óptica pero, en lugar de utilizar el puerto convencional de fluorescencia, en el modo de fotólisis la luz de la lámpara de mercurio se introduce a través del puerto SIM. En la figura 5.4(a)



(a)



(b)

Figura 5.2: Fotografías del microscopio confocal espectral de Olympus, FV1000.

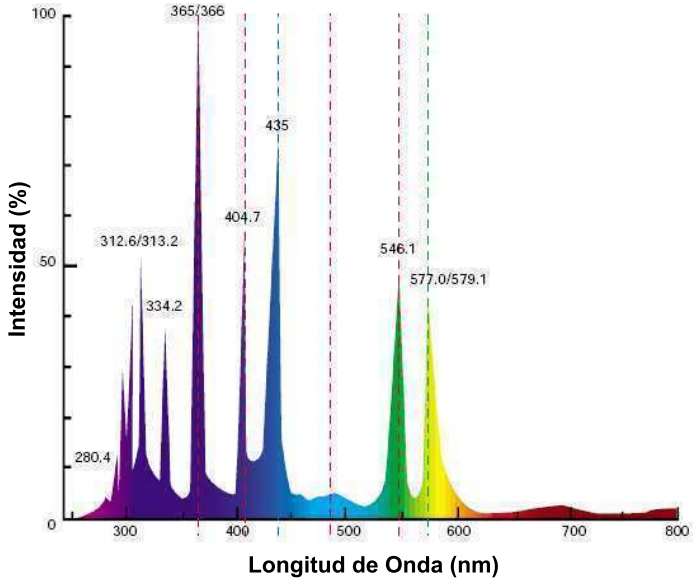
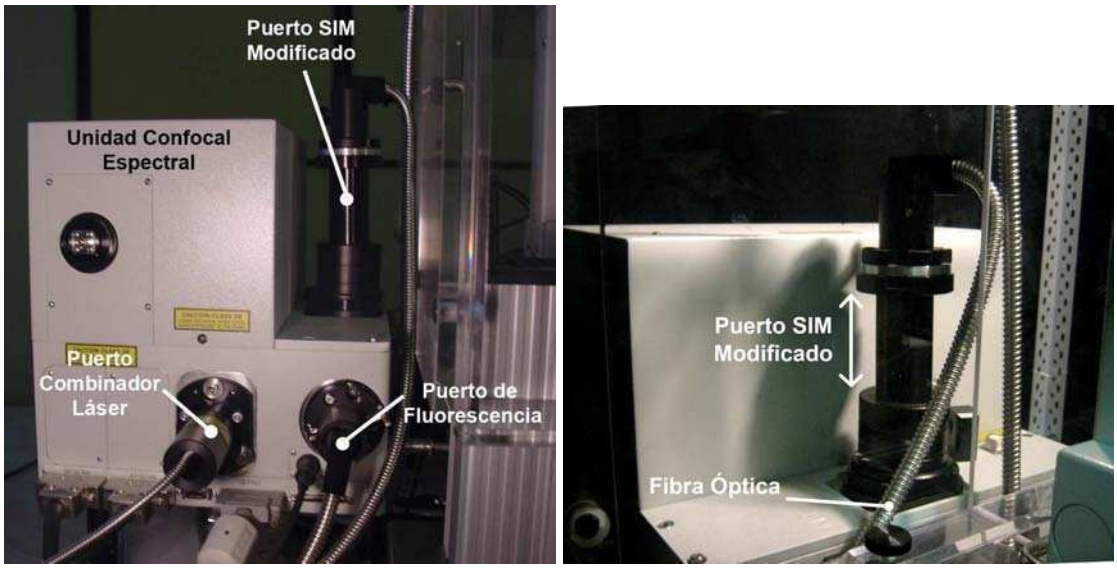


Figura 5.3: Espectro de la lámpara de mercurio.

se muestra una fotografía de la vista lateral de la unidad confocal, donde se puede observar que los diferentes sistemas de iluminación entran al microscopio a través de esta unidad. En la fotografía se identificaron el puerto para el combinador láser, el puerto de fluorescencia, que es el empleado para la lámpara de mercurio en su uso convencional, y el puerto SIM modificado para la fotólisis. Tradicionalmente el puerto SIM se utiliza para incorporar una segunda unidad de escaneo, dedicada a la estimulación con luz láser, independiente de la unidad primaria.

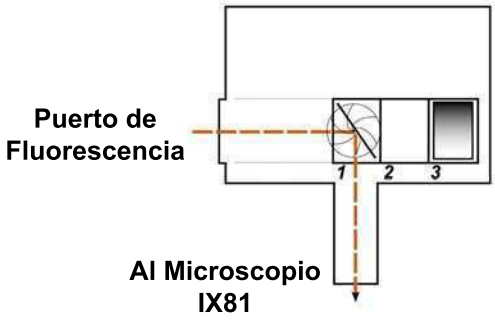
A la salida de la fibra óptica del puerto SIM se colocó un sistema de lentes que permite enfocar la luz proveniente de la fibra en el microscopio. En este caso se replicó el sistema de lentes usado en el puerto convencional de fluorescencia. Además se incorporó un filtro 377/50 (Brightlines) para seleccionar las longitudes de onda cortas usadas en la fotólisis. El sistema de lentes y el filtro UV se colocaron en un tubo negro que puede desplazarse verticalmente, ver la fotografía de la figura 5.4(b). El desplazamiento vertical del tubo que contiene el sistema de lentes, permite variar el plano imagen de la luz UV con respecto al plano imagen del microscopio. El cable que transmite la luz de la lámpara está compuesto por varias fibras ópticas. Si se enfoca la salida del cable en el plano imagen del microscopio, la iluminación UV no resulta homogénea, dado que se pueden observar las imágenes circulares de cada fibra individual que componen el cable. Con el fin de priorizar la homogeneidad de la iluminación UV en el plano confocal, se desenfoca ligeramente la iluminación UV modificando la altura del posicionador vertical.

Como se mostró, las diferentes formas de iluminación entran al microscopio IX81 a través

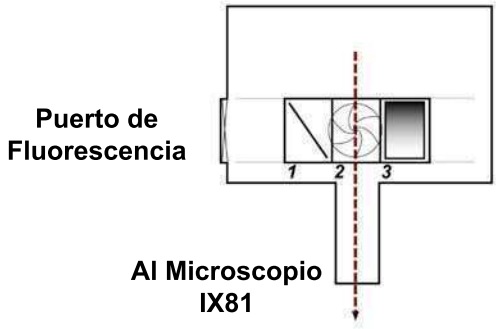


(a) (b)

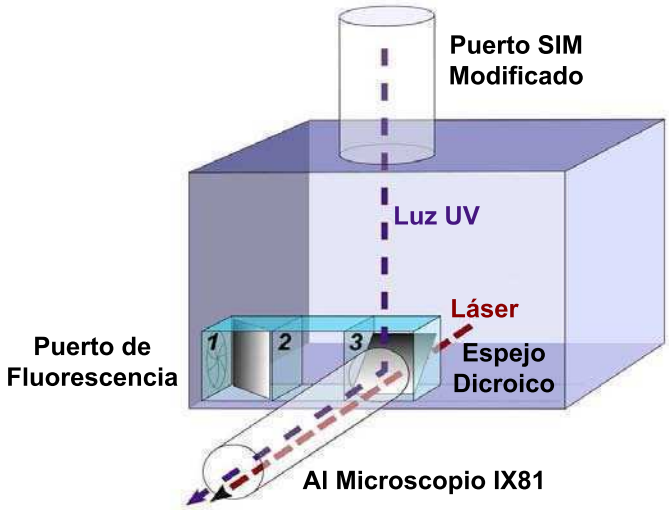
Figura 5.4: Fotografía de la unidad confocal modificada. (a) Vista lateral mostrando los tres puertos de iluminación: el puerto de fluorescencia para la luz de la lámpara de mercurio, el puerto del combinador láser para la obtención de imágenes confocales, y el puerto SIM modificado, que permite obtener imágenes confocales simultáneamente a la fotólisis de compuestos enjaulados.(b) vista detallada del puerto SIM modificado donde se observa el posicionador vertical que permite cambiar la localización relativa de la iluminación UV con respecto al plano focal del microscopio.



(a) Esquema de la unidad confocal vista desde arriba



(b) Esquema de la unidad confocal vista desde arriba



(c) Esquema de la unidad confocal

Figura 5.5: Esquema de los caminos ópticos de los diferentes sistemas de iluminación que se consiguen moviendo la posición del riel: (a) Posición 1 tiene un espejo que re-dirige la luz de la lámpara de mercurio para la observación convencional de fluorescencia (b) Posición 2 está vacía, de este modo la luz del combinador de láseres puede llegar al microscopio para la adquisición de imágenes confocales (c) Posición 3 tiene un espejo dicroico que refleja las longitudes de onda cortas (<450 nm) usadas en la fotólisis, y permite la transmisión de los láseres para el modo confocal.

de la unidad confocal. Esta unidad cuenta con un riel motorizado que posee tres posiciones: en la primera hay un espejo que refleja la luz de la lámpara de mercurio en el camino convencional para fluorescencia (en este caso la luz que proviene del combinador láser no puede pasar); la segunda se encuentra libre, de forma que permite el paso de la luz láser para la obtención de imágenes confocales (pero no pasa la luz de la lámpara de mercurio); y la tercera se utilizó para la fotólisis. En esta tercera posición se colocó un espejo dicroico que refleja luz de longitudes de onda menores a 450 nm y transmite mayores longitudes de onda. De esta forma, se logra iluminar simultáneamente con los láseres disponibles y la luz UV de la fotólisis. Además, el espejo dicroico permite la transmisión de la luz proveniente de la muestra hacia el sistema de detección confocal y así obtener imágenes confocales. En la figura 5.5 se muestra un esquema de los distintos caminos para la iluminación.

Con el fin de controlar el tiempo de exposición a la luz UV, se colocó un obturador ultra rápido (Uniblitz) entre la lámpara de mercurio y la fibra óptica. El obturador posee su propio controlador (VCM-D1, Uniblitz). Para controlar la duración del flash un generador de pulsos construido en el departamento de Física se conecta al controlador del obturador, mandando señales TTL de 5 volts de la duración deseada, a partir de 10 ms y de a pasos de 10 ms. El FV1000 tiene una señal de salida TTL que es comandada por el software del microscopio FW10-ASW (version 01.07.03) a través de la ventana *time controller*. Esta ventana permite al usuario programar la rutina de adquisición, por ejemplo: seleccionar los láseres y sus intensidades; elegir la forma de barrido; el tiempo de adquisición, etc.; además de controlar el envío de la señal de salida TTL. Para sincronizar el flash de UV con la adquisición de la imagen, la señal de salida del microscopio se conecta al generador de pulsos y usando el *time controller* es posible elegir el tiempo en el cual se envía la señal de salida y se genera el flash UV.

La potencia de la luz UV empleada en la fotólisis se controla agregando una rueda de filtros motorizada con 6 sitios donde se colocaron 5 filtros neutros de diferentes densidades ópticas (New Focus), ver tabla 5.1. Según el fabricante, los filtros atenúan todas las longitudes de onda en el rango de [400– 700] nm por igual. Un lugar se dejo vacío para obtener la mayor potencia UV. La rueda motorizada es comandada desde el software del microscopio. En la figura 5.6 se presenta una fotografía del sistema de iluminación externo de la lámpara de mercurio, mostrando los diferentes elementos mencionados.

Figura 5.6: Fotografía del sistema de iluminación externo. Se obseva la lámpara de mercurio, el obturador rápido y la rueda de filtros motorizada.

Tabla 5.1: Densidad óptica y transmisión de los filtros neutros (New Focus)

Densidad óptica	Transmisión (%)
0	100
0.3	50
0.5	32
1	10
1.5	3
2	1

5.3. Caracterización del sistema de fotólisis

5.3.1. Potencia UV y atenuadores

La lámpara de mercurio es de 100 W, distribuidos en un espectro continuo de emisión con un pico importante a 365/366 nm. Los componentes ópticos del sistema de fotólisis y del microscopio atenúan la potencia de la luz especialmente en el rango ultravioleta. Se midió la potencia de la luz empleada en la fotólisis a la salida del objetivo 60 x, después de haber pasado a través de los filtros neutros indicados en la tabla 5.1. En la figura 5.7 se muestra el gráfico de la potencia en función de la transmisión de cada filtro neutro. Las mediciones se realizaron empleando un medidor de potencia de la luz Advantest TQ8210 registrando a 364 nm. La máxima potencia obtenida fue de $\sim$ 400 μW. En la figura 5.7 se presenta el gráfico de la potencia en función de la transmisión de los filtros empleados. Recordando que la densidad óptica (OD) y la transmisión (T) cumplen la relación $T = 10^{OD}$ se puede inferir, del ajuste lineal de los datos en la figura 5.7, que los filtros pueden considerarse neutros, inclusive en el rango de [350– 400] nm, hecho que no fue informado por el fabricante (que aseguraba el buen comportamiento de los filtros en el rango visible [400– 700] nm).

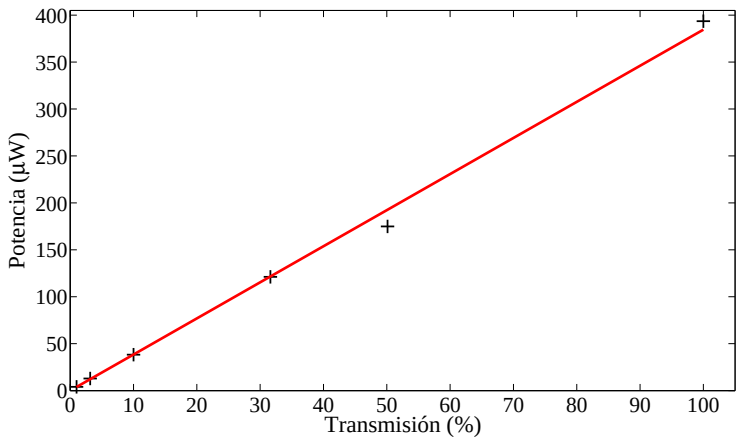


Figura 5.7: Gráfico de la potencia de la luz de fotólisis en función de la transmisión de los filtros neutros.

5.3.2. Tamaño del haz de iluminación

Una de las técnicas más comunes para determinar el ancho de un haz es generar el perfil de intensidades, midiendo la intensidad de la luz transmitida a través de una pequeña ranura que se va deslizando a lo largo del haz [Wright et al., 1992]. La intensidad del haz es integrada sobre el ancho de la ranura, el resultado de la medición es equivalente a la convolución de la intensidad original con el perfil de la ranura. Para estimar el tamaño del área iluminada por UV, en vez de medir la luz transmitida por una rendija, se midió la luz reflejada por un delgado hilo que se hace pasar a lo largo del haz. De esta forma se obtiene el perfil de intensidades en función de la posición del hilo. Asumiendo que el haz presenta una distribución gaussiana, el ancho de la cintura puede ser estimado ajustando el perfil por:

$$\mathbf{E}(x, y, 0) = \mathbf{E_0}\, e^{-(x^2+y^2)/\omega_0^2}, \tag{5.1}$$

donde $\mathbf{E_0}$ es un vector constante en el plano transversal (x, y), $z = 0$ en la cintura del haz y ω_0 es el radio de la cintura.

Un delgado hilo ($\sim 60\mu$m) se montó sobre un cubreobjeto, solamente se permitía el paso de luz UV del sistema de fotólisis. Usando una platina motorizada (Scientific Roper) se movió la posición del hilo de a pasos de 10 μm mientras la intensidad reflejada se registraba usando los detectores del sistema confocal. En la figura 5.8 se muestra el gráfico de la intensidad reflejada en función de la posición del hilo, junto con el ajuste de los datos experimentales por la Ec. 5.1. El tamaño de la imagen UV depende del diámetro de la fibra óptica y de la magnificación del objetivo. El experimento se realizó utilizando el objetivo de inmersión en aceite 60 x y una apertura del diafragma confocal de 105 μm. Este objetivo produce un círculo de iluminación UV de diámetro (212 ± 7) μm. Se hicieron pruebas (que no se muestran) corroborando que el tamaño del área de iluminación UV estimada de la forma aquí presentada, no depende del tamaño de la apertura confocal.

5.4. Prueba de funcionamiento usando calcio enjaulado

A fin de comprobar la efectividad del sistema de fotólisis, se utilizó NP-caged EGTA (Invitrogen-Molecular Probes), que es un quelante fotolábil que presenta una alta selectividad por el Ca^{2+}. Este quelante, aumenta su constante de disociación K_d por el Ca^{2+}, desde 80 nM a más de 1 mM, al ser expuesto a luz UV [Graham and Davies, 1994; Graham et al., 1996].

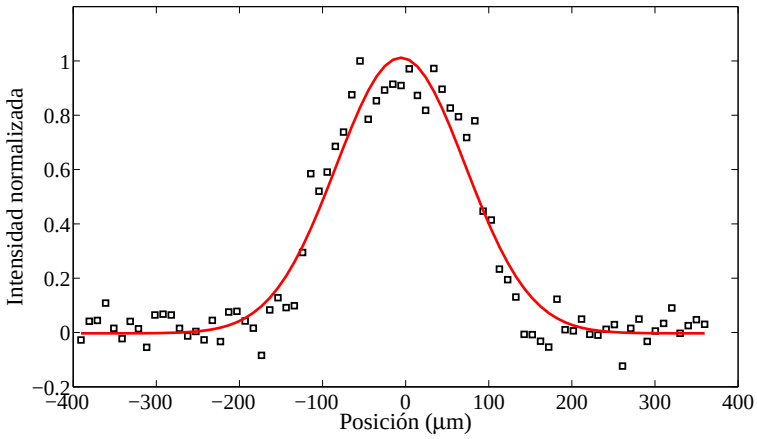
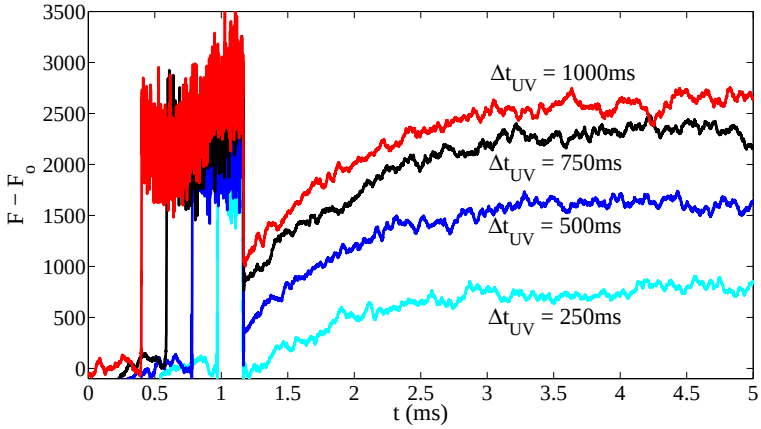


Figura 5.8: Gráfico del perfil de intensidad reflejada en función de la posición del hilo. En línea continua el ajuste de los datos experimentales por la Ec. 5.1.

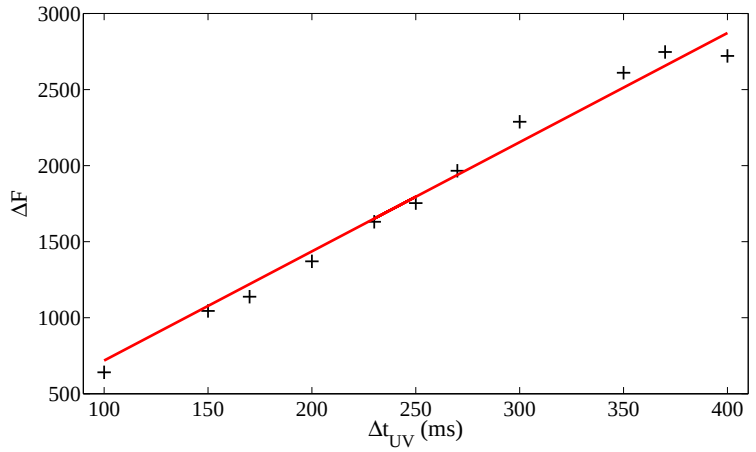
Este compuesto enjaulado rápidamente liberará Ca^{2+} después de su fotólisis. Empleando un indicador de calcio junto con el NP-caged EGTA es posible verificar la eficacia del sistema de fotólisis.

Con este fin se confeccionaron soluciones que contenían NP-caged EGTA, calcio y el indicador de calcio Fluo 4-dextran high affinity (Invitrogen-Molecular Probes). Empleando el microscopio confocal FV1000 modificado, se realizaron mediciones en gotas de aproximadamente 30 μl de la solución, y se empleó el sistema de fotólisis para liberar en cierto momento el calcio enjaulado. Para ello se registró la fluorescencia proveniente de la muestra para longitudes de onda dentro del rango [500– 600] nm, en un punto a aproximadamente 10 μm del cubreobjeto, a una frecuencia de 100 kHz, empleando la línea 488 nm del láser de argón y el objetivo 60x. No se utilizó ningún filtro neutro para atenuar la intensidad de la iluminación UV.

En la figura 5.9(a) se presentan las series temporales de la fluorescencia (F) a la que se le resta el promedio de la fluorescencia antes del pulso UV (F_o), obtenidas a partir de experimentos realizados con distinta duración del pulso de UV (Δt_{UV}), que van desde los 250 ms hasta 1 s. En esta figura se puede observar el aumento de la fluorescencia después del pulso UV, en respuesta a la liberación de calcio debida a la fotólisis del NP-caged EGTA. Se observa que cuanto más larga sea la duración del pulso de UV, mayor será la cantidad de calcio puesto en libertad y disponible a ser ligado por el indicador de calcio. Se espera que la cantidad de calcio liberado sea linealmente proporcional no sólo a la concentración del compuesto enjaulado, sino también a la intensidad del pulso de UV y a su duración. Para corroborar esto, en la figura 5.9(b) se grafica la diferencia de fluorescencia (ΔF), calculada como la diferencia entre la máxima fluorescencia



(a)



(b)

Figura 5.9: (a) Serie temporal de la fluorescencia (F) menos la fluorescencia basal (F_o), para distintas duraciones del pulso de UV (Δt_{UV}). Mediciones realizadas en solución con concentraciones [NP-caged EGTA] = 1 mM, [Ca] = 0.8 mM y [Fluo 4] = 30 μM. (b) Gráfico de ΔF (diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia basal) en función de la duración del pulso de UV (Δt_{UV}), en línea continua la regresión lineal de los datos. Mediciones realizadas en solución con concentraciones [NP-caged EGTA] = 1.5 mM, [Ca] = 8.5 μM y [Fluo 4] = 100 μM.

y la fluorescencia basal antes de dar el pulso de UV, en función de la duración del pulso de UV (en este caso desde 100 ms a 400 ms). Como se observa en esta figura, la relación lineal es seguida casi exactamente.

6

Observación de señales de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*

En este capítulo se presenta el método de obtención de las señales de calcio y se muestran diferentes registros de señales de calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*. En estas células el calcio es liberado desde el retículo endoplasmático a través de canales receptores de IP_3, que necesitan ligar calcio e IP_3 para poder abrirse. Este último es introducido en la célula en forma enjaulada junto con el indicador de calcio y liberado posteriormente con un pulso de luz ultravioleta [Callamaras and Parker, 1998]. Las imágenes son tomadas con el microscopio modificado FV1000 descripto en el capítulo anterior. Con el fin de caracterizar la región del ovocito donde se encuentran los receptores de IP_3, se muestra la estructura del retículo endoplasmático empleando un marcador fluorescente específico. Esto último permite conocer la geometría desde donde el calcio es liberado e inferir cómo la misma afecta las señales. Se observan señales de calcio localizadas "puffs" y eventos más globales, "ondas". Se calcularon los perfiles temporales de intensidad que permiten analizar y extraer más fácilmente información acerca de los eventos observados.

6.1. Obtención de señales de calcio en el FV1000

6.1.1. Acondicionamiento del laboratorio para tratamiento de ovocitos

Dado que se trata de una nueva línea experimental de investigación en el departamento de Física, formó parte de mi trabajo doctoral acondicionar el laboratorio para el tratamiento de los ovocitos y posibilitar el estudio de señales de calcio. No sólo se modificó el microscopio FV1000 para adaptarlo a la fotólisis de compuestos enjaulados, sino que también se seleccionaron y adquirieron los diferentes dispositivos relacionados a la técnica aquí descripta.

Incubadora La temperatura corporal de las ranas es de 17ºC, para preservar a los ovocitos se adquirió una incubadora que mantiene la temperatura constante, fijándose la misma en 17ºC.

Lupa estereoscópica Se compró una lupa estereoscópica Olympus SZ51, junto con un iluminador por fibra óptica marca Arcano, para observar a los ovocitos durante el tratamiento previo a las mediciones. La lupa posee ocular 10 x con una distancia de trabajo de 110 mm.

Tubos capilares Las micropipetas son formadas a partir de tubos capilares de vidrio boro silicato, con un punto de ablandamiento estándar de 780 ^{o}C.

Estirador de micropipetas Para dar forma a las micropipetas, se compró un Puller PC-10, Narishigue, que utiliza un método de calor y estiramiento vertical del capilar de vidrio por fuerza de la gravedad. Dispone de dos modos de estiramiento: simple y doble (donde cambian las condiciones del estiramiento a mitad del proceso). El sistema puede producir micropipetas largas y finas para inyección a partir de 0.3 μm de diámetro en la punta, facilitando la producción de grandes cantidades de micropipetas idénticas y de calidad uniforme.

Microinyector Para realizar la microinyección, se optó por adquirir un microinyector automático Drummond, Nanoject II, que está especialmente diseñado para realizar de forma delicada, inyecciones de volúmenes de nanolitros en ovocitos, embriones y tejidos. Posee un microprocesador que controla automáticamente una pipeta de microinyección, permitiendo inyectar pequeños volúmenes (nanolitros) en forma precisa. El volumen a inyectar se puede elegir entre 16 valores en un rango de 2.3 nl a 69.0 nl. Además tiene un sistema de control remoto y un émbolo no-rotacional que elimina vibraciones, permitiendo una microinyección más precisa y minimizando el daño ocasionado a las células al microinyectar.

Micromanipulador El microinyector debe ser montado sobre un micromanipulador que permita posicionar la micropipeta para la microinyección. El micromanipulador es manual, de tipo

mecánico y mediante un juego de tornillos permite el movimiento en todas direcciones.

6.1.2. Preparación de los ovocitos

Aislamiento del ovocito

Los ovocitos empleados en este trabajo provienen de una especie de rana acuática africana llamada *Xenopus laevis*. Los ovocitos son óvulos inmaduros de rana sin fecundar; se encuentran en sacos o lóbulos que conforman el ovario de la rana. Los sacos del ovario se extirpan quirúrgicamente. Una vez extirpados, los sacos junto con los ovocitos se deben mantener inmersos en una solución salina con antibiótico llamada Barth [1]. En la fotografía de la figura 6.1(b) se observa parte de un saco, en donde se puede apreciar el tejido conectivo que rodea al saco y contiene vasos sanguíneos. Cada saco contiene ovocitos en diferentes estadios. La membrana del saco se rompe para acceder a los ovocitos, y se separan los ovocitos en los estadios V y VI, que corresponde a las últimas dos etapas previas a la maduración. En esos estadios el ovocito mide alrededor de 1 mm de diámetro y posee bien distinguidos dos hemisferios denominados hemisferio vegetal (claro) y animal (oscuro), ver fotografía de la figura 6.1(d). A su vez, los ovocitos están envueltos en una capa de células foliculares que contiene pequeños capilares sanguíneos, ver figura 6.1(c). Esta capa puede ser removida mecánicamente mediante el uso de pequeños fórceps o químicamente mediante un tratamiento de colagenasa[2].

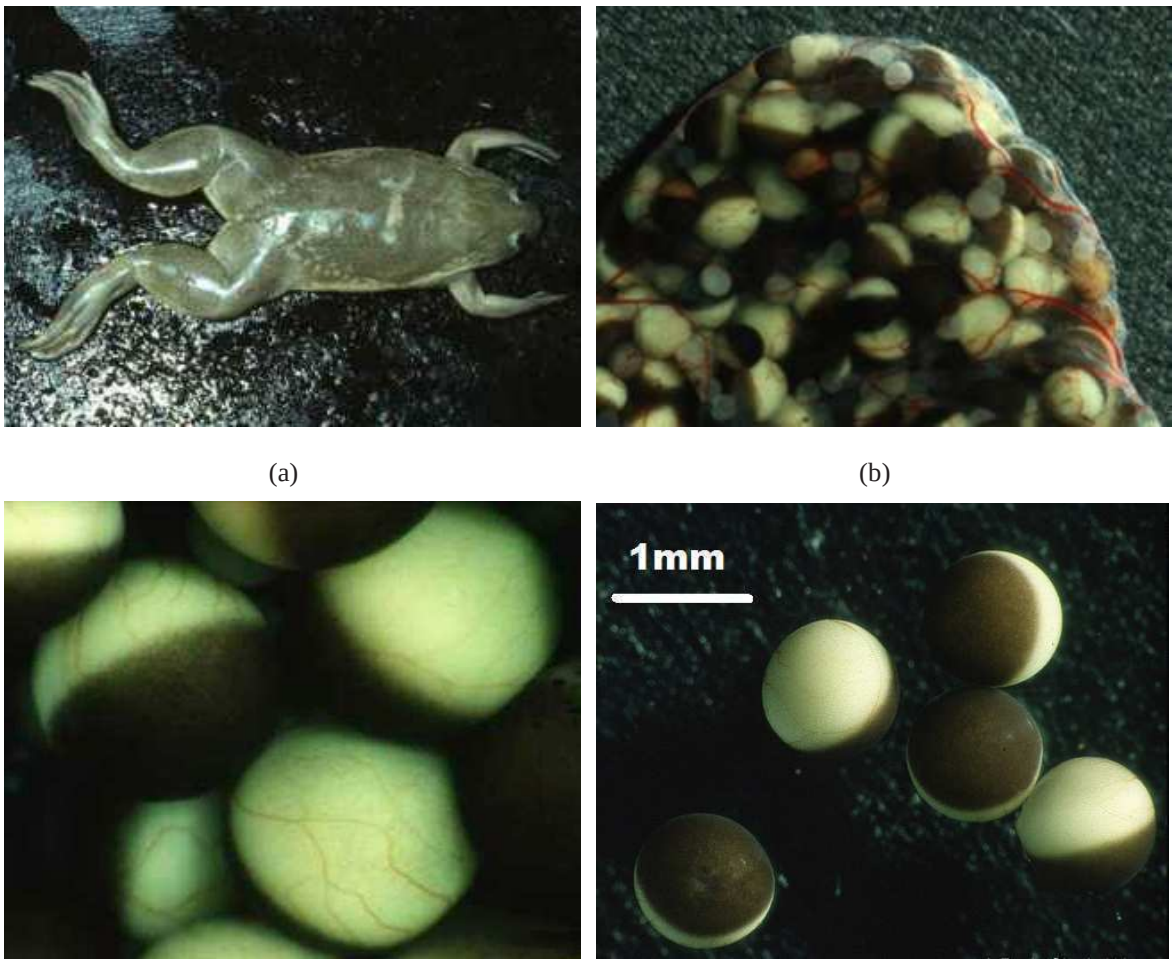
Los ovocitos son provistos generosamente por el grupo del Dr. Daniel J. Calvo, del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), CONICET-UBA, en dos formas diferentes: ovocitos aislados mediante un tratamiento de colagenasa o sacos que luego son tratados en el laboratorio de la forma descripta anteriormente.

Solución de microinyección

La solución con que se microinyecta al ovocito para la observación de señales de calcio es una mezcla del indicador de calcio (que puede ser por ejemplo Fluo 4 dextran) y el IP_3 enjaulado en concentraciones tales que las concentraciones finales en el ovocito son aproximadamente

[1] Composición de la solución Barth: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO3, 0.82 mM MgSO4, 0.33 mM Ca(NO3)2, 0.14 mM CaCl2, 5 mM HEPES, 0.5 mg/mL gentamicina, pH 7.4.

[2] La colagenasa es una enzima que digiere las células foliculares que rodean al ovocito.



(a) (b)

(c) (d)

Figura 6.1: (a) Rana africana *Xenopus laevis*. (b) Detalle se un saco que contiene ovocitos en diferente estadio. Envolviendo al saco se observa el tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos. (c) Ovocitos aislados. (d) Ovocitos de 1-1.2 mm de diámetro en estadio VI, se distinguen los hemisferio animal (oscuro) y vegetal (claro). Fotografías de Erwin Sigel, 1987. Institute for Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern.

$\sim 40\ \mu\mathrm{M}$ y $\sim 9\ \mu\mathrm{M}$ respectivamente[3].

Si se quieren observar eventos localizados de calcio, puffs, se agrega a la solución de microinyección EGTA, que inhibe el acople entre los sitios de liberación. Gracias a su lenta capacidad de ligar calcio ($k_{on} \sim 20\ \mu\mathrm{M}^{-1}\mathrm{s}^{-1}$) el EGTA evita que el Ca^{2+} difunda en distancias del orden de micrómetros. Dado que la distancia entre sitios de liberación es de este mismo orden, el EGTA tiene la acción de desacoplar los sitios de liberación, dejando prácticamente sin alterar las características del puff. De esta forma, los diferentes sitios operan autónomamente y no se propagan ondas de Ca^{2+} [Callamaras and Parker, 2000; Marchant and Parker, 2001].

Todos los indicadores de calcio y compuestos enjaulados empleados en este trabajo son de Invitrogen-Molecular Probes. Los demás compuestos utilizados son de Sigma.

Microinyección

Para la microinyección de los ovocitos se prepara la micropipeta estirando un capilar de vidrio. La punta de la pipeta es de aproximadamente 15 $\mu\mathrm{m}$. Empleando una jeringa y aguja metálica, el capilar estirado se rellena con aceite mineral y se monta en el microinyector automático. Se carga la micropipeta con la solución deseada y los ovocitos aislados se alinean en una grilla plástica. Con el micromanipulador se introduce la punta de la micropipeta en el ecuador del ovocito, se elige microinyectar en el ecuador para evitar el núcleo del ovocito que se encuentra en el polo animal, ver figura 6.2. Accionando el microinyector automático, un volumen de aproximadamente 40 nl de la solución empleada se inyecta en el citoplasma del ovocito. Los ovocitos microinyectados se incuban a 17^{o}C por al menos 30 minutos para permitir que los compuestos introducidos alcancen una distribución uniforme a lo largo del citoplasma.

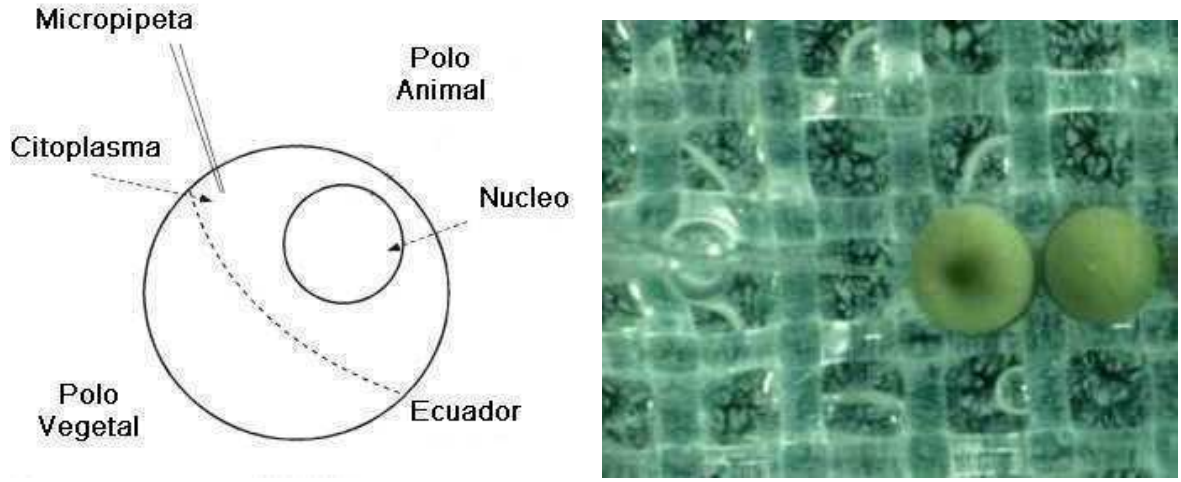
6.1.3. Adquisición y procesamiento de imágenes

Adquisición de imágenes

Para adquirir las señales de calcio se emplea el microscopio FV1000 modificado, descripto en el capítulo anterior. El ovocito microinyectado se coloca sobre un cubreobjetos en un pequeño contenedor, inmerso en solución salina Ringer[4], con el hemisferio animal hacia abajo. Se emplea un objetivo 60 x (UPlanSAPO, Olympus), apocromático de inmersión en aceite, apertura

[3]Para estimar las concentraciones finales en la célula, se supone un volumen del ovocito de 1 μl

[4]Composición de la solución Ringer: 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl2, 5 mM HEPES, pH 7.2.



(a) (b)

Figura 6.2: (a) Esquema ilustrando la microinyección de los ovocitos (b) Ovocitos alineados en una grilla plástica durante la microinyección con capilar de vidrio de aproximadamente 15 μm. Fotografía de Erwin Sigel, 1987. Institute for Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern.

numérica 1.35. Si se trata del indicador de calcio Fluo 4-dextran o Fluo 5N, se excita la muestra con la línea 488 nm del láser de Argón y se detecta la fluorescencia en el rango de [500– 600] nm. Sea cual fuere el indicador de calcio, en primer lugar se toman imágenes de barrido en el modo confocal del lado animal del ovocito de forma de ubicar la zona de los gránulos corticales, que se encuentra aproximadamente a [3– 10] μm de la superficie de la célula. Una vez identificada la zona de interés, se emplea el modo confocal de barrido de una línea de aproximadamente 45 μm, centrada en el área de iluminación UV. Se elige adquirir la fluorescencia en una línea en lugar de una imagen ya que, si bien se pierde cierta resolución espacial, la resolución temporal es significativamente mayor. El tiempo de adquisición en cada punto es de 10 μs, y el tiempo que tarda en barrer una línea es de aproximadamente 3.7 ms. El tamaño de un píxel es de 0.175 x 0.175 μm^2. Con respecto al flash de UV, se especifica el filtro de atenuación deseado y se determina la duración y el momento en el cual se da el pulso de UV. En general el pulso se da después de $\sim$ 0.5 s, para tener registro de la fluorescencia antes de la estimulación. La longitud total del experimento suele ser de 10 s aproximadamente. Para permitir que los receptores de IP_3 se recuperen de una eventual desensibilización, se deja pasar alrededor de un minuto entre registros sucesivos en una misma zona de un ovocito.

El registro de señales de calcio se realiza en el hemisferio animal del ovocito porque éste presenta una mayor probabilidad de aparición de eventos, los sitios de liberación de calcio pare-

cerían estár más concentrados en ese hemisferio Callamaras and Parker [1994, 1999].

Procesamiento de imágenes

Los datos se guardan en imágenes TIFF de tamaño n x m, en donde n es la cantidad de píxeles de la línea barrida y m equivale a la cantidad de veces que se barrió la línea. El eje vertical corresponde al espacio y el horizontal al tiempo. Las imágenes adquiridas son analizadas en la forma que se detalla a continuación. Para cada posición j de la línea de barrido digitalizada se definió el nivel de fluorescencia basal F_0^j como el promedio de los registros obtenidos en esa posición hasta el momento previo al pulso UV (equivaldría al promedio de la fluorescencia basal para cada posición de la línea barrida). Una vez calculada esta cantidad para cada posición de la línea de barrido, la serie temporal de fluorescencia proveniente de cada punto fue procesada de la siguiente manera: al i-ésimo punto registrado en la j-ésima posición de la línea de barrido se le asignó la cantidad

$$\Delta F_i \equiv \frac{Fi^j - F_0^j}{F_0^j}. \tag{6.1}$$

La cantidad definida de esta manera es entonces, para cada punto de la línea de barrido, una medición de la evolución de los cambios relativos de la fluorescencia detectada. Cambios en esta magnitud dan cuenta de cambios en la concentración de calcio citosólico.

Para apreciar con más detalle la dinámica de un evento, se realizaron perfiles temporales de la intensidad ΔF a lo largo de una posición dada. Con el fin de reducir el ruido presente en los registros se realizó un promedio de 7 píxeles consecutivos en la dirección espacial, o sea a lo largo de la dirección de barrido.

Separación de canales

En el caso de trabajar simultáneamente con dos indicadores fluorescentes cuyos espectros de emisión se superpongan, es necesario separar las contribuciones de cada fluoróforo. En la figura 6.3 se muestran en el mismo gráfico los espectros de dos indicadores de calcio, el Fluo 4 y Rhod 2, como se observa, los espectros de emisión (línea continua) se superponen. En esa figura, el sombreado verde y rojo representa el rango de longitudes de onda registradas por el canal 1 y 2, respectivamente. Se puede apreciar, que el canal 1, registra únicamente la señal proveniente del Fluo 4, pero el canal 2 registra contribuciones de ambos fluoróforos. Para obtener la señal "limpia" del Rhod 2 es necesario conocer el porcentaje de señal del Fluo 4 que se introduce

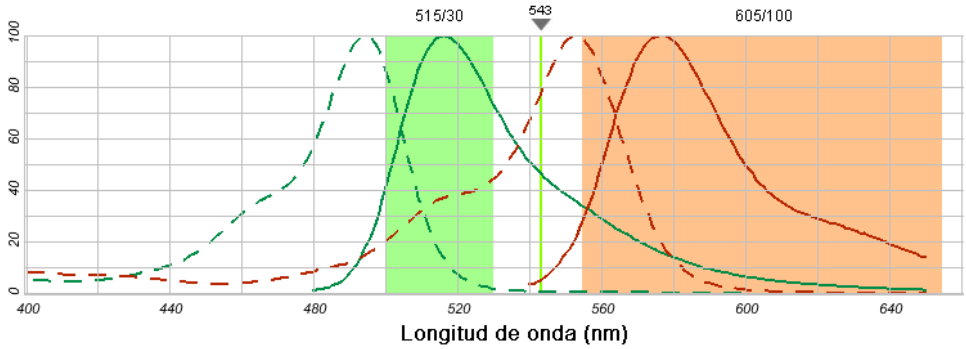


Figura 6.3: Espectros de absorción (línea punteada) y emisión (línea continua) de los indicadores fluorescentes de calcio Fluo 4, en verde, y Rhod 2, en rojo. El sombreado verde y rojo indican los rangos de longitudes de onda registradas por los canales 1 y 2 respectivamente.

en el canal 2. Para ello se debe realizar una calibración, tomando imágenes de referencia de las muestras empleando solamente el indicador cuya señal se introduce en ambos canales, en este caso el Fluo 4. Estas imágenes deben ser adquiridas en las mismas condiciones que se adquieren las imágenes con dos fluoróforos. Una vez adquirida las imágenes de referencia, se realiza el cociente de la señal del canal 2 y el canal 1. Este cociente (R) es una magnitud aproximadamente constante, que depende exclusivamente del fluoróforo empleado y las condiciones de adquisición. Al obtener imágenes con ambos fluoróforos simultáneamente, la señal del Fluo 4 será la proveniente al canal 1 y para obtener la señal proveniente del Rhod 2, al canal 2 se le resta el producto del canal 1 por R [Zimmermann, 2005].

6.2. Observación y caracterización de señales usando Fluo 4 Dextran

Empleando el microscopio modificado FV1000 presentado en el capítulo anterior y siguiendo los protocolos descriptos en este capítulo, se realizaron diversos experimentos en ovocitos de *Xenopus laevis* empleando IP_3 enjaulado y un indicador de calcio. A continuación se presentan imágenes representativas de cada tipo de evento evocado. Se incluye también un análisis de los mismos que permite concluir que se trata de eventos mediados por receptores de IP_3 y que el sistema de fotólisis está funcionando del modo esperado para evocar las señales.

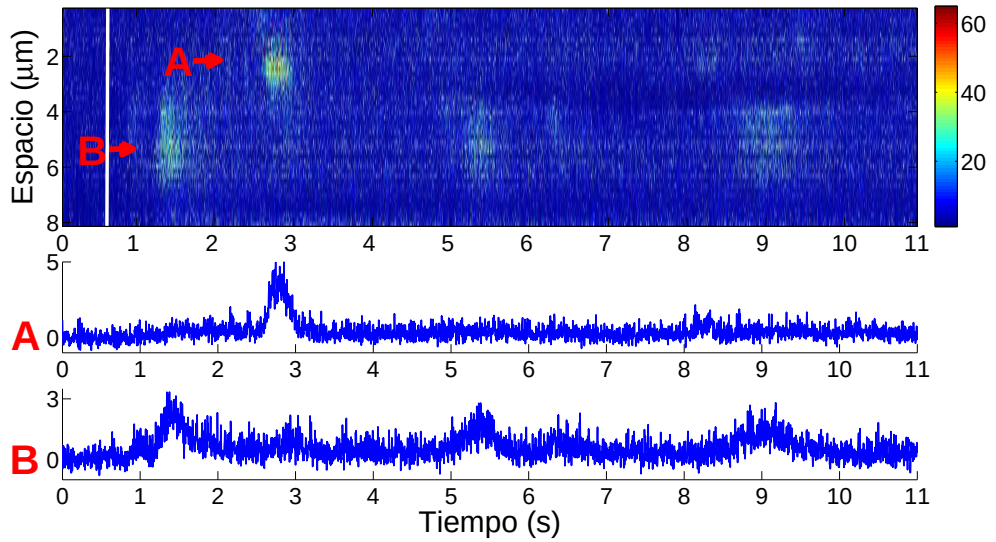
En los paneles de la figura 6.4 se muestran imágenes representativas de distintos tipos de

señales obtenidas, después de un pulso UV de 10 ms, en ovocitos previamente microinyectados con una mezcla de Fluo 4-dextran (de alta afinidad) e IP_3 enjaulado. Se trata de típicas imágenes confocales de barrido de una línea, en donde se grafica ΔF (Eq. 6.1) usando un código de colores ilustrado en la misma figura. En este tipo de gráficos, el eje vertical corresponde a la posición a lo largo de la línea barrida y el eje horizontal al tiempo de barrido de la línea. En línea blanca vertical se indica el momento en el cual se dio el pulso UV. En ambos paneles presentados en la figura 6.4 se puede apreciar un aumento en el cociente de fluorescencia ΔF luego del pulso UV, indicando un aumento en el calcio libre, pero las escalas temporales y espaciales de los aumentos difieren notablemente entre sí.

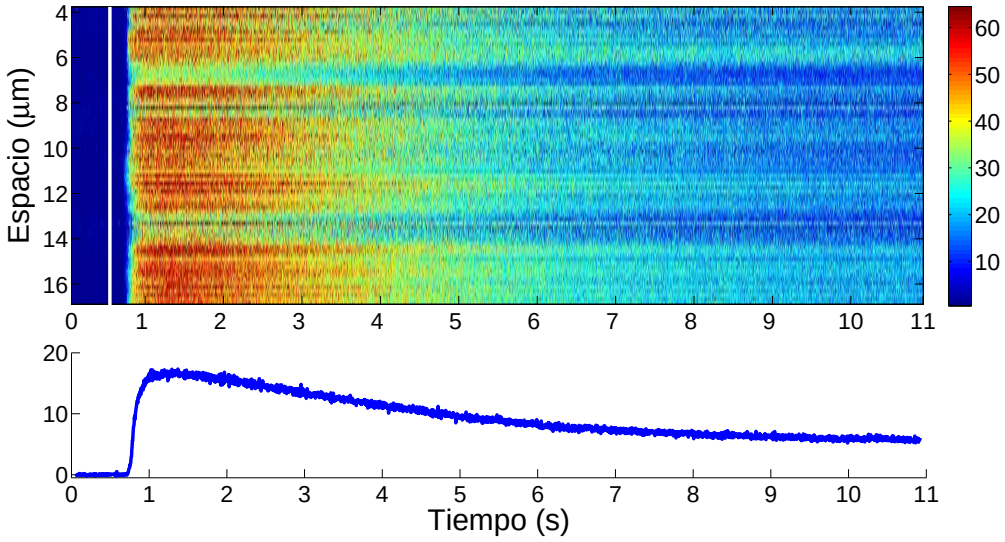
En el caso de la figura (a), al microinyectar se agregó EGTA para prevenir la propagación de ondas de Ca^{2+} y aumentar la probabilidad de observar señales localizadas tales como puffs. En esta figura se pueden distinguir dos sitios diferentes de liberación indicados con las letras A y B. Los perfiles temporales de intensidad se muestran en la misma figura. Es evidente que en este registro los dos sitios actúan en forma independiente iniciándose la liberación de Ca^{2+} en momentos no correlacionados. Por otra parte, en el sitio B, se observa el suceso de tres puffs consecutivos. Se puede observar claramente, especialmente en el perfil temporal de la intensidad, que el primer evento presenta mayor amplitud que los otros. El tiempo entre eventos es de aproximadamente 3.5 s, consistente con las estimaciones del intervalo de tiempo entre puffs consecutivos presentadas en Daniel Fraiman et al. [2006]; Marchant et al. [1999].

Se presenta en la figura 6.4(b), un evento más global, en este caso no se agregó EGTA al microinyectar las células. Se observa que todos los sitios de liberación fueron activados prácticamente al mismo tiempo y liberan Ca^{2+} durante más tiempo. El perfil de intensidad se presenta en la misma figura, en este caso mostrando que la concentración de Ca^{2+} decae en una escala temporal consistente con observaciones previas [Dargan and Parker, 2003].

En la figura 6.5 se presenta una típica onda de calcio. Como se puede apreciar, luego de que un sitio se activa, el Ca^{2+} entra al citosol, difunde e induce la apertura de receptores de IP_3 en sitios vecinos, generando una onda. Se sabe que la velocidad de las ondas de Ca^{2+} varía con la concentración de IP_3, tomando valores desde $\sim 10\ \mu\mathrm{m/s}$ a baja concentración de IP_3 hasta $\sim 50\ \mu\mathrm{m/s}$ a mayores [Marchant et al., 1999]. Con el fin de estimar la velocidad de la onda a partir del experimento de la figura 6.5, se alineó una recta con el frente de onda aparente como se muestra en la misma figura. La velocidad promedio de la onda obtenida de las pendientes es de $(18 \pm 2)\ \mu\mathrm{m/s}$, valor que se encuentra dentro del rango de valores esperados.



(a)



(b)

Figura 6.4: Imágenes confocales representativas mostrando diferentes eventos de Ca^{2+} después de un flash UV de $10\ ms$ de duración, empleando el indicador Fluo 4-dextran e IP_3 enjaulado. En los paneles se grafica ΔF (Eq. 6.1) usando un código de colores, con la distancia a lo largo del eje vertical y el tiempo a lo largo del eje horizontal. Un aumento en el cociente de fluorescencia ΔF (aumento en el Ca^{2+} libre) se denota con colores cada vez más "cálidos" como se indica en la barra de color. La línea blanca vertical indica el momento en el cual se dio el pulso UV. (a) *arriba* Imagen típica de eventos localizados de Ca^{2+}, (puffs). Los sitios de liberación están indicados con las letras A y B. En este caso también se microinyectó EGTA. *abajo* perfiles temporales de los puffs que ocurrieron en los sitios A y B. (b) *arriba* Evento más global de Ca^{2+} (onda de Ca^{2+}) *abajo* perfil temporal de la onda.

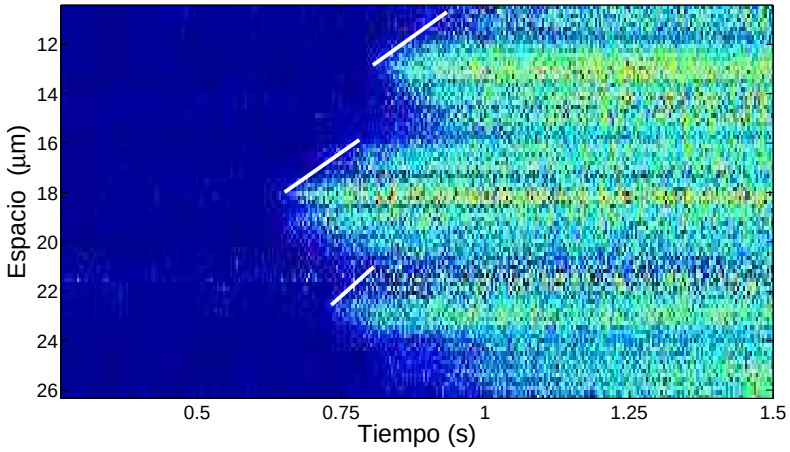


Figura 6.5: Imagen confocal mostrando una onda de Ca^{2+} después de un flash UV de 10 ms. Las líneas blancas están alineadas con los frentes de la onda con el fin de estimar la velocidad de la onda a partir de su pendiente. Concentraciones finales en ovocito: 37 μM Fluo 4-dextran, 9.2 μM IP_3 enjaulado y sin EGTA.

Los comportamientos observados en las figuras 6.4 y 6.5 y las estimaciones cuantitativas que se pueden derivar de ellas están en total acuerdo con observaciones previas de señales de Ca^{2+} mediadas por IP_3. Estos resultados indican que el sistema efectivamente fotoliza el IP_3 enjaulado previamente microinyectado en las células y permite adquirir simultáneamente imágenes confocales de las señales evocadas. No hay duda de que, tanto la modificación introducida en el microscopio FV1000 como el tratamiento de los ovocitos, han sido implementados exitosamente.

6.3. Observación de señales desde el retículo y perspectivas futuras

Las observaciones presentadas en la sección anterior, si bien han significado un gran desafío para nuestro proyecto, no aportan nueva información sino que confirman resultados previos. La modificación del microscopio confocal FV1000 presentada en el capítulo anterior, sin embargo, abre enormes perspectivas para la realización de estudios originales sobre señales de calcio en ovocitos. Acá describimos algunos de los caminos que planeamos seguir mostrando resultados preliminares.

Una de las propiedades del microscopio que puede ser explotada para avanzar hacia una

comprensión más acabada de las señales intracelulares de calcio es su multi-espectralidad. Esto abre la posibilidad de observar el comportamiento espacio-temporal del calcio en distintas regiones simultáneamente utilizando marcadores que emiten en distintas longitudes de onda. Dado que el rol del calcio contenido en el lumen del retículo endoplasmático (calcio luminal) sobre las señales mediadas por receptores de IP_3 no ha sido prácticamente estudiado y teniendo en cuenta que cumple un papel fundamental en las señales en músculos (mediadas por receptores de rianodina) decidimos hacer experimentos para observar eventos en el lumen y en el citosol simultáneamente. Para tal fin decidimos utilizar los indicadores Fluo 5N y Rhod 2.

El Fluo 5N es un análogo al Fluo 4 con una afinidad por el Ca^{2+} mucho más baja. La constante de disociación (K_d) del Fluo 5N es $\sim 90\ \mu\mathrm{M}$ mientras que la del Fluo 4-dextran es $\sim$ 800 nM. Esto quiere decir que a una misma concentración de calcio, en equilibro, el Fluo 5N ligaría mucho menos calcio que el Fluo 4-dextran. Este tipo de indicador de baja afinidad se emplea para registrar niveles de calcio del orden del mM, como es la concentración de calcio dentro del retículo endoplasmático (ER). El Rhod 2, por otro lado, es un indicador de calcio con constante, K_d, similar a la del Fluo 4-dextran pero con espectro de emisión claramente separable de la de los indicadores tipo “Fluo”, como se mostró en la figura 6.3. La utilización simultánea de ambos indicadores permitiría, por lo tanto, registrar señales en el lumen y en el citosol simultáneamente.

Para poder registrar el calcio luminal, se empleó una versión de Fluo 5N AM que es capaz de atravesar membranas. El Fluo 5N se microinyecta en el citoplasma del ovocito y se deja incubar entre 3 a 6 horas. No existe un protocolo para el uso de este indicador en ovocitos de *Xenopus laevis*, no se han encontrado trabajos que lo empleen en este tipo de célula. De hecho, que nosotros sepamos, no hay registros del calcio luminal en ovocitos de *Xenopus laevis*. Una vez microinyectado el Fluo 5N difunde y es capaz de atravesar la membrana del ER. Es posible que parte del Fluo 5N quede en el citoplasma, pero debido a su bajísima afinidad por el calcio, la señal proveniente del citoplasma debería ser despreciable frente a la señal proveniente del lumen. Por lo tanto consideramos que la señal del Fluo 5N debería brindar información sobre el calcio en el interior del retículo.

Como paso previo a la observación de señales en ovocitos desde el retículo estudiamos si con el protocolo diseñado el Fluo 5N reporta información sobre el calcio luminal. Para tal fin se utilizó un marcador fluorescente de retículo llamado DiI y se adquirieron imágenes confocales de barrido x–y de algunas regiones del ovocito utilizando DiI y Fluo 5N. Las señales provenientes de ambos fluoróforos pudieron ser separadas dado que el espectro de emisión del DiI es similar al del Rhod 2 y el del Fluo 5N al del Fluo 4-dextran, por lo que estamos en la situación de la

figura 6.3. El marcador DiI emite muy poca luz al estar disuelto en agua pero es muy fluorescente al incorporarse a las membranas. Al ser microinyectado en el ovocito, se incorpora a la membrana del retículo y difunde por la misma. Para permitir que se distribuya por toda la célula, una vez microinyectados con DiI, los ovocitos son incubados por aproximadamente 12 hs. Cabe recordar que el DiI marca la membrana del retículo y no su interior, siendo la información que brinda el DiI complementaria a la del Fluo 5N.

El retículo endoplasmático es un sistema formado por una red de cisternas y túbulos. Está organizado en forma de una red laberíntica de túbulos ramificados que se extiende por todo el citoplasma. La membrana del ER constituye prácticamente la mitad del total de la membrana de la célula. Se cree que los túbulos están interconectados, de modo que la membrana del ER forma una lámina continua que define un único espacio interno (espacio luminal) [Alberts et al., 2007]. En el citoplasma del ovocito, próximo a la membrana plasmática, se localizan los gránulos corticales (vesículas usadas en la fertilizacion) que poseen un tamaño de 1– 2 μm. Estos gránulos se encuentran distribuidos en una capa que se encuentra aproximadamente a [3– 10] μm de la superficie de la célula. Adentrándose ($\sim$ 10 μm) aparecen unas plaquetas de aproximadamente 5 μm. En el hemisferio animal, se pueden encontrar gránulos de pigmento de aproximadamente 0.5 μm, que le confieren el color oscuro [Terasaki et al., 2001; Callamaras and Parker, 1999; Dumont, 1972]. Esta estructura es identificable en las imágenes confocales de barrido x–y obtenidas en la capa de los gránulos corticales de ovocitos previamente microinyectados con DiI y Fluo 5N como se muestra en la figura 6.6.

Los espectros de emisión del DiI y el Fluo 5N se solapan. Para separar las contribuciones de cada fluoróforo y obtener las imágenes de la figura 6.6 se usó el método descripto en la Subsección 6.1.3. Como ya mencionamos, el espectro de emisión del DiI es similar al del Rhod 2 y el del Fluo 5N al del Fluo 4-dextran, así que se empleó la misma configuración de adquisición detallada en dicha subsección. En la señal correspondiente al DiI se observa una estructura con dimensiones comparables a las reportadas para el ER en *Xenopus laevis*[Charbonneau and Grey, 1984; Terasaki et al., 2001] donde los espacios oscuros podrían corresponder a gránulos corticales o a otras organelas presentes en el ovocito. La señal correspondiente al Fluo 5N, es bastante más débil. Al observar la superposición de ambas señales se puede apreciar, en la figura 6.6, que algunas zonas oscuras de la señal de DiI se corresponden con zonas que presentan un aumento en la señal del Fluo 5N. Es de esperar que estas regiones correspondan al interior del ER. Esto se hace más evidente en la figura 6.7(b) donde se muestran los perfiles normalizados de la fluorescencia correspondiente al Fluo 5N y DiI, a lo largo de la recta indicada en la figura 6.7(a).

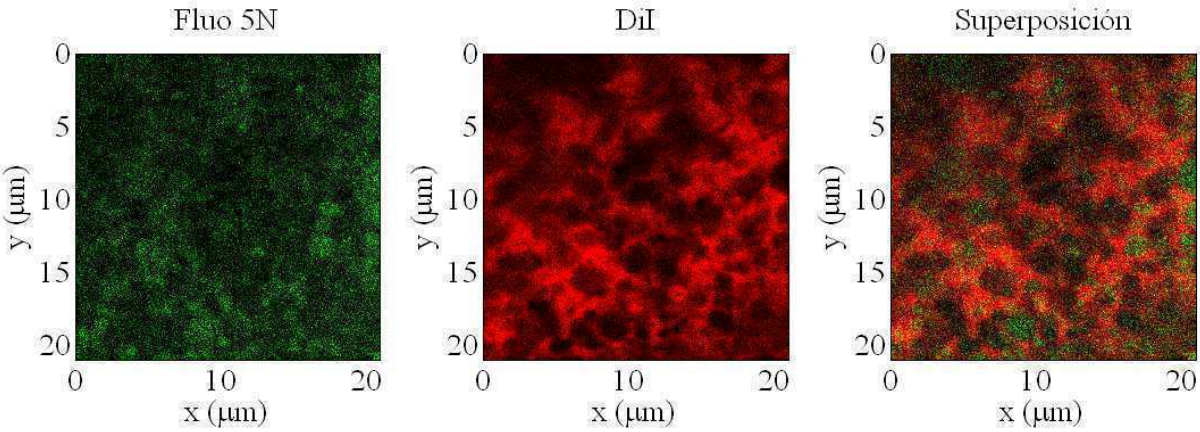
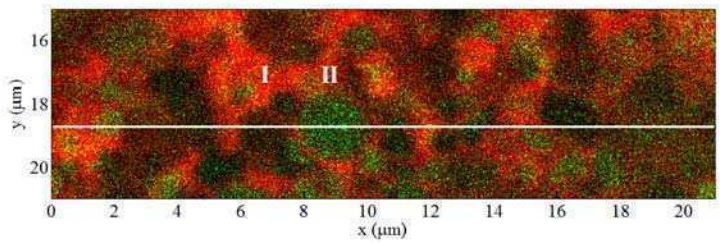


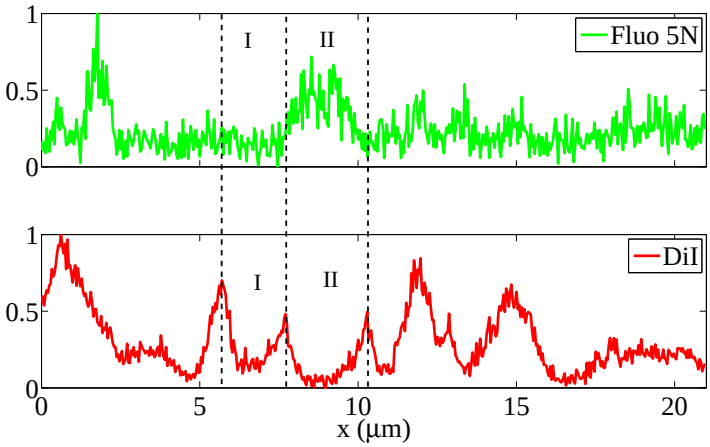
Figura 6.6: Imágenes confocales en x–y obtenidas en dos canales simultáneamente, en la zona de los gránulos corticales (z = 0) del hemisferio animal. Ovocito microinyectado con el marcador de retículo DiI y el indicador de calcio permeable a membrana Fluo 5N. Se muestran imágenes de las contribuciones de cada indicador y la superposición de ambas.

Tanto en la región I como en la II indicadas en las figuras, la señal del DiI presenta una zona oscura de diámetro aproximadamente 2 μm. Si se observa el perfil de la señal del Fluo 5N, en la región I es nulo, consistente con la presencia de un gránulo cortical, pero en el caso de la región II, se observa un claro aumento de la señal, indicando que se trata del interior del ER. Esto es una indicación de que el Fluo 5N está ingresando al lumen. Para corroborarlo y para determinar también que la señal del Fluo 5N no reporta información sobre el calcio citosólico repetimos los experimentos utilizando DiI y Fluo 4-dextran, un indicador de calcio que permanece en el citosol. Las imágenes correspondientes se muestran en la figura 6.8.

No se ve en la figura 6.8 ningún comportamiento como el descripto a partir de las figuras 6.7(b) y 6.7(a). En la imagen que corresponde a la señal de DiI se observa la ya presentada estructura de red que conforma la membrana del retículo. La señal del Fluo 4-dextran es más débil, si bien se trata de un indicador de alta afinidad por el calcio, hay que considerar que el nivel de calcio libre basal en el citoplasma es muy bajo ($\sim$ 40 nM). En la superposición de ambos canales se distinguen claramente regiones de tamaño entre 1 y 2 μm consistentes con el tamaño característico de los gránulos corticales. Por otro lado, las regiones en donde la señal del Fluo 4-dextran es mucho más intensa que la del DiI, tienen una estructura diferente a aquéllas donde la del Fluo 5N lo era. Todas estas observaciones sirven para concluir que el protocolo diseñado para utilizar el Fluo 5N ha sido exitoso y que este fluoróforo reporta exclusivamente información sobre el calcio luminal. Estos estudios previos permiten concluir que estamos en condiciones de



(a)



(b)

Figura 6.7: (a) Detalle de la imagen confocal x–y presentada en la figura 6.6, se indica mediante una linea blanca la recta donde se realiza el perfil de la fluorescencia (b) Perfiles normalizados de la fluorescencia correspondiente al Fluo 5N y DiI, a lo largo de la recta indicada en la imagen (a).

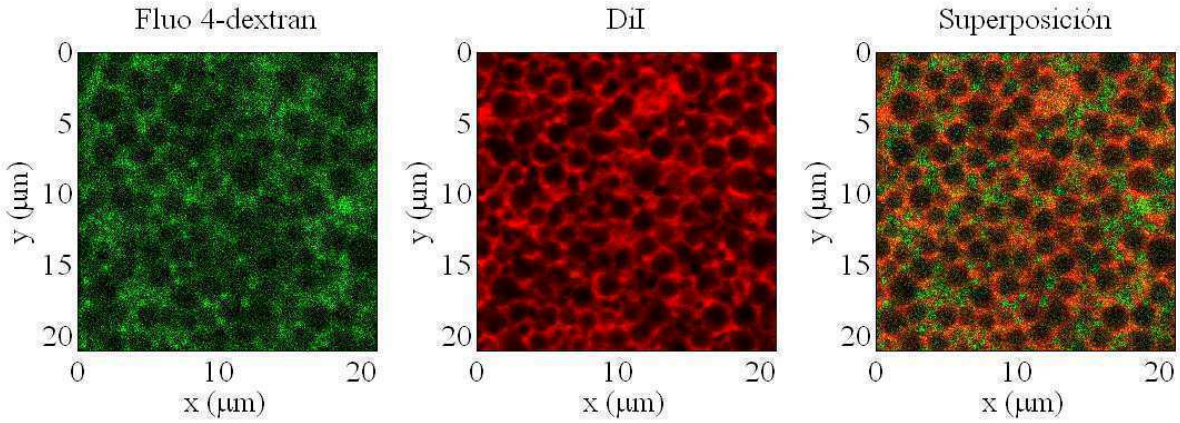


Figura 6.8: Imágenes confocales en x–y obtenidas en dos canales simultáneamente, en la zona de los gránulos corticales (z = 0) del hemisferio animal. Ovocito microinyectado con el marcador de retículo DiI y el indicador de calcio citosólico Fluo 4-dextran. Se muestran imágenes de la contribución de cada indicador por separado y la superposición de ambas.

observar señales de calcio simultáneamente en el ER y en el citosol y ayudar así a dilucidar el papel del calcio luminal sobre las señales mediadas por receptores de IP_3.

7

Conclusiones

Las señales de calcio son utilizadas por una enorme variedad de células para regular procesos tan distintos como la fertilización, la contracción muscular, la comunicación neuronal y la muerte celular, entre muchos otros. La versatilidad de las señales se basa en la gran diversidad de comportamientos que la concentración de este ión puede desplegar dentro de las células que involucran escalas temporales y espaciales muy diversas, imposibles de abarcar por una única técnica experimental. El modelado se hace entonces indispensable para lograr una descripción abarcadora de las señales. Los modelos realistas, por otro lado, requieren contar con estimaciones confiables, idealmente obtenidas *in situ*, de algunos de los parámetros que caracterizan a los procesos involucrados. En esta Tesis se ha avanzado hacia la cuantificación de estos procesos en células vivas, realizando experimentos ópticos y desarrollando el marco teórico para extraer la información necesaria a partir de los mismos.

La primera parte del trabajo estuvo dirigida a la determinación en células intactas de la tasa de transporte del calcio y de las sondas fluorescentes usadas para visualizarlo. Teniendo en cuenta que el calcio no difunde libremente dentro del citosol sino que reacciona con numerosas

sustancias (“buffers”) se estudió, en primer lugar, la información que es posible extraer usando técnicas ópticas, tales como FRAP o FCS, cuando se usan partículas marcadas fluorescentemente que interactúan con “trampas” que reaccionan con ellas. En FCS, se miden las fluctuaciones de la fluorescencia en un pequeño volumen y se calcula su autocorrelación. En el caso en que todas las partículas son fluorescentes y difunden sin interactuar, la función de autocorrelación tiene una expresión analítica en términos del coeficiente de difusión libre y de la concentración de partículas, que puede ser usada para ajustar las mediciones experimentales y extraer información. Cuando las partículas fluorescentes difunden y reaccionan, la función de autocorrelación no puede ser integrada analíticamente. En el presente trabajo se estudió el comportamiento de esta función de correlación obteniendo aproximaciones analíticas que permiten usarla para ajustar datos experimentales en distintas situaciones.

En una primera instancia, se analizó el caso en que partículas fluorescentes difunden en un medio homogéneo con trampas, que presentan cierta probabilidad por unidad de tiempo de atrapar o liberar a una partícula de acuerdo a un esquema de reacción bi-molecular. De acuerdo a los estudios de Pando et al. [2006], hay dos coeficientes de difusión efectivos que caracterizan el transporte en este caso: el llamado “colectivo”, D_u y el de un sola partícula, D_t. En este trabajo de Tesis se presentó una aproximación analítica a longitudes de onda larga de la función de autocorrelación que caracteriza a los experimentos de FCS, que puede ser usada para ajustar los datos experimentales y extraer información a partir de ellos. La función de autocorrelación aproximada es la suma de dos contribuciones (dos componentes) cada una caracterizada por un tiempo distinto: uno asociado al coeficiente de difusión de la trampa, D_S, y el otro al coeficiente de difusión efectivo, D_u, que depende no sólo de los coeficientes de difusión de las especies involucradas, sino también de parámetros de la reacción. Esto permite concluir que a partir del ajuste de los experimentos es posible obtener D_u. Se estudió el límite de aplicación de la aproximación a longitudes de onda largas y se determinó que es válido para reacciones que ocurren en escalas temporales más rápidas que la difusión libre de la partícula, $\tau_{reac} \ll \tau_f$. Se había mostrado en Sprague et al. [2004] que bajo la misma aproximación, $\tau_{reac} \ll \tau_f$, los experimentos de FRAP dan los valores del coeficiente efectivo de difusión de una sola partícula, D_t. A partir del trabajo presentado en esta Tesis se puede concluir que FCS y FRAP dan información sobre diferentes coeficientes efectivos de difusión por lo que, combinando la información proveniente de ambas técnicas, es posible inferir parámetros de reacción y coeficientes de difusión libre de las partículas y de las trampas. Con el fin de corroborar la aproximación a la función de autocorrelación propuesta y comprobar qué tan bien se pueden inferir los parámetros de ajuste, se empleó el

modelo integral, sin aproximaciones, para confeccionar curvas de correlación teóricas que luego fueron ajustadas por el modelo aproximado propuesto. Se analizaron alrededor de 330 casos con diferentes parámetros de reacción–difusión, que se encuentran dentro del rango de validez del modelo. Del análisis de los diferentes casos se encontró que todos los parámetros recuperados del ajuste de modelo completo con el modelo aproximado, presentan errores relativos promedio menores al $30\,\%$ con respecto al valor teórico, inclusive cuando el tiempo de reacción τ_{reac} es similar al tiempo de difusión, τ_f. En todos los casos analizados, D_u y el peso de la componente correspondiente, Go_{ef}, fueron determinados con errores relativos menores a $15\,\%$ y $7\,\%$ respectivamente, mientras que D_S y su peso, Go_S, fueron estimados con errores relativos promedio de $27\,\%$ y $22\,\%$. Se investigó también qué experimentos pueden ser combinados para obtener información acerca de los parámetros de la reacción y de los coeficientes de difusión libre (en lugar de los efectivos) de las diferentes especies involucradas. En particular, se mostró que si el número de partículas fluorescentes puede ser cambiado, al realizar experimentos de FCS en por lo menos dos concentraciones diferentes, entonces se puede estimar el coeficiente de difusión de partículas libres y parámetros de la reacción, tales como la concentración total de trampas, la constante de afinidad y la fracción de partículas ligadas y libres.

Se estudió a continuación la aplicación de FCS a un sistema de partículas marcadas y no marcadas que presentan la misma funcionalidad, y reaccionan con trampas de la misma forma. Este modelo resulta muy útil dado que en las técnicas de marcación es común que algunas moléculas no sean marcadas exitosamente. En este caso la función de autocorrelación aproximada bajo la condición $\tau_{reac} \ll \tau_f$ presenta una componente adicional: además de las asociadas al coeficiente de difusión de la trampa, D_S, y al coeficiente efectivo D_u, aparece una nueva asociada al coeficiente de difusión efectivo obtenido en FRAP, D_t. Este cálculo fue utilizado para analizar resultados publicados recientemente sobre experimentos de FCS realizados en embriones de *Drosophila melanogaster* empleando la proteína fusionada $Bcd - gfp$. En este sistema es posible suponer que no sólo está presente la proteína marcada fluorescentemente, sino que también hay proteína sin marcar, Bcd. Experimentos de FCS y FRAP realizados por diversos grupos para estudiar la tasa de transporte de Bcd dan coeficientes de difusión de esta sustancia muy diferentes entre sí, suscitando controversias alrededor de qué grupo y/o técnica es la correcta. Conocer la tasa a la que difunde Bcd es fundamental para determinar la forma en que se genera el gradiente de esta sustancia en los embriones y que constituye la base para el establecimiento del eje dorsoventral en este organismo. Utilizando la expresión analítica aproximada de la función de autocorrelación obtenida para el caso con partículas marcadas y no marcadas, se determinó que

la diferencia de estimaciones del coeficiente de difusión del Bcd medidas en FCS, Abu-Arish et al. [2010], y FRAP, Gregor et al. [2007], es totalmente compatible con el hecho de que ambas técnicas dan información sobre distintos tipos de coeficientes de difusión efectivos. Más aún, empleando el modelo propuesto en esta tesis, no solamente se lograron explicar satisfactoriamente las diferencias, sino que también se estimaron parámetros referidos a la reacción de Bcd con las posibles trampas.

Subsiguientemente, dentro del marco del uso de métodos ópticos para estimar tasas de transporte, se estudió el caso de la reacción entre el calcio y algunas de sus sondas, en donde no sólo coexisten procesos de difusión y reacción, sino que hay también fluctuaciones debidas al cambio en la intensidad de la fluorescencia si el fluoróforo está o no ligado a calcio. A diferencia del caso de partículas siempre fluorescentes estudiado en el capítulo 2, en este caso la función de autocorrelación en la aproximación de longitudes de onda larga es la suma de tres componentes. La primera es la asociada a la difusión libre del indicador de calcio, la segunda al coeficiente efectivo D_{ef1} (equivalente al D_u del caso de partículas siempre fluorescentes) y la tercera asociada a un comportamiento no exclusivamente difusivo, con un factor exponencial decreciente, dependiente de un nuevo coeficiente efectivo, D_{ef2}. Se analizó también el caso en que además del indicador hay otra sustancia (”buffer”) que reacciona con el calcio. Se estudió el comportamiento de los coeficientes efectivos de difusión en este caso y se mostró cómo variando las concentraciones de las sustancias involucradas es posible inferir coeficientes libres y tasas de reacción. Se presentaron luego experimentos de FCS realizados en soluciones conteniendo distintas cantidades de calcio, del indicador Fluo 4-dextran y de un quelante (o “buffer”) de calcio llamado EGTA. El análisis de estos datos corroboró la existencia de los varios coeficientes efectivos y su variación con algunas de las concentraciones tanto en los casos con fluoróforo y calcio exclusivamente (caso con “una trampa”) y en aquéllos que además tenían EGTA (caso con “dos trampas”). A partir de los experimentos en solución y del marco teórico de análisis de los mismos hemos elaborado una propuesta experimental para estimar coeficientes de difusión de calcio, sondas y “buffers” endógenos en ovocitos obteniendo, a su vez, información sobre algunos parámetros de reacción.

La segunda parte del trabajo estuvo dirigida a dar los pasos necesarios para la realización de experimentos propios de observación de señales de calcio intracelular mediadas por receptores de IP_3. Para tal fin, se diseñó una modificación del microscopio confocal comercial FV1000 de Olympus para permitir la fotólisis de compuestos enjaulados, la que fue implementada exitosamente. La modificación es simple y económica y permite obtener simultáneamente imágenes confocales y fotolizar compuestos enjaulados. Se determinó que la iluminación UV obtenida en

la muestra es relativamente uniforme en un círculo de diámetro $\sim$ 200 μm para longitudes de onda en el rango de [350–400] nm. La máxima potencia dentro de ese rango es de 0.4 mW. El sistema permite controlar la intensidad de la luz por medio de filtros neutros que producen la atenuación esperada en el rango de longitudes de onda usadas. El tiempo de exposición también puede ser controlado de a pasos de 10 ms y sincronizado con el proceso de adquisición confocal. Se demostró la capacidad del sistema en experimentos realizados en soluciones acuosas en donde el Ca^{2+} enjaulado por el NP-EGTA fue fotoliberado al ser expuesto a pulsos UV de diferente duración y, empleando un indicador de calcio, se mostró que la cantidad de Ca^{2+} liberado es proporcional al tiempo de duración del pulso UV.

La modificación introducida al microscopio resulta esencial e imprescindible para el estudio de señales de calcio evocadas por IP_3 mediante métodos ópticos, ya que permite generar un estímulo preciso y controlado de IP_3, simultáneamente a la obtención de imágenes confocales. El sistema fue usado exitosamente en experimentos en ovocitos de *Xenopus laevis* en donde el IP_3 enjaulado fue liberado para evocar señales intracelulares de Ca^{2+}. Para la realización de estos experimentos fue necesario acondicionar el laboratorio para el tratamiento de los ovocitos, incorporando nuevas técnicas que hacen posible el estudio de señales intracelulares de calcio *in vivo*. Esto permitió extender la línea de investigación teórica preexistente sobre el tema a una nueva línea experimental de investigación en el departamento de Física, teniendo la ventaja de que conjuga el desarrollo de modelos teóricos con la elaboración de experimentos.

La parte final de la Tesis estuvo dedicada a mostrar la habilidad de la modificación introducida en el microscopio para permitir la observación de señales de calcio evocadas por IP_3 simultáneamente a la fotólisis de IP_3 enjaulado.

Para tal fin, se mostraron, en primer lugar, imágenes confocales de barrido obtenidas en ovocitos previamente microinyectados con una mezcla de Fluo 4-dextran (de alta afinidad) e IP_3 enjaulado. Se repitieron los experimentos con y sin EGTA para variar la probabilidad de observar señales localizadas llamadas puffs. Las observaciones mostraron sitios de liberación que presentaban varios eventos de puff consecutivos, donde el primero era de mayor amplitud que los siguientes. Se calcularon los perfiles temporales de intensidad a partir de los cuales se estimó el tiempo entre eventos en aproximadamente 3.5 s, valor consistente con estimaciones previas de la literatura [Daniel Fraiman et al., 2006; Marchant et al., 1999]. También se observaron en un mismo registro, sitios de liberación que ante el mismo estímulo UV se comportaban en forma independiente entre sí, activándose en momentos no correlacionados. Se mostraron también ejemplos de eventos de liberación de Ca^{2+} más globales, en donde varios sitios se encuentran

involucrados, activándose prácticamente al mismo tiempo y liberando Ca^{2+} durante más tiempo. La escala temporal del decaimiento de la concentración de Ca^{2+} observada es consistente con lo reportado previamente en la literatura [Dargan and Parker, 2003]. Se mostró también la generación de una típica onda de Ca^{2+} en donde se observa que al activarse un sitio, entra Ca^{2+} al citosol y al difundir va induciendo la activación de sitios de liberación vecinos. Se midió la velocidad de la onda, dando como resultado (18 $\pm$ 2) μm/s, valor que se encuentra dentro del rango de valores esperados [Marchant et al., 1999]. Los diferentes eventos de liberación de Ca^{2+} observados y las estimaciones cuantitativas inferidas a partir de ellos están en total acuerdo con observaciones previas de señales de Ca^{2+} mediadas por IP_3. Estos resultados indican que el sistema fotoliza eficazmente el IP_3 enjaulado, previamente microinyectado en las células, y permite adquirir simultáneamente imágenes confocales de las señales evocadas.

Los primeros experimentos de señales acá descriptos no aportan nueva información sino que sirven para comprobar que tanto la modificación introducida en el microscopio como el tratamiento de los ovocitos han sido implementados exitosamente. El FV1000 posee una serie de características que permiten imaginar una enorme variedad de nuevos experimentos. En particular, basado en su multi-espectralidad propusimos observar simultáneamente la dinámica espacio-temporal del calcio luminal y la del citosólico durante señales mediadas por receptores de IP_3 utilizando Fluo 5N y Rhod 2. El calcio luminal cumple un papel fundamental en las señales en músculos mediadas por receptores de rianodina, por lo que es esperable que algo similar ocurra en aquéllas en las que intervienen los receptores de IP_3. Si bien el Fluo 5N ha sido utilizado en diversos tipos celulares para observar el calcio en el interior del retículo, que nosotros sepamos, no existen antecedentes de su uso en ovocitos. Es por eso que debimos desarrollar un protocolo para poder utilizarlo en este tipo de células. Los resultados preliminares descriptos en esta Tesis muestran que el Fluo 5N ingresa al lumen y da información exclusivamente sobre el calcio luminal. Las imágenes obtenidas usando Fluo 5N y el marcador de retículo, DiI, son un ejemplo, por otro lado, del uso de las propiedades multi-espectrales del FV1000. Estos resultados preliminares muestran que estamos en condiciones de observar señales de calcio simultáneamente en el lumen del retículo y en el citosol y ayudar así a dilucidar el papel del calcio luminal sobre las señales mediadas por receptores de IP_3.

PERSPECTIVAS

Los resultados de los experimentos de FCS en soluciones acuosas, empleando indicadores de calcio, muestran la posibilidad de aplicar el modelo aproximado de FCS aquí propuesto para el estudio de la difusión del calcio en células vivas permitiendo inferir, entre otras cosas, el coefi-

ciente de difusión del calcio libre y parámetros de interacción con otras sustancias. Con este fin se planea en el futuro próximo realizar experimentos en ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectando diferentes concentraciones del indicador de calcio y/o alterando la concentración de calcio basal mediante el uso de inhibidores de las bombas que remueven el calcio citosólico (como por ejemplo la tapsigargina). De este modo se espera poder cuantificar los coeficientes de transporte *in situ* del calcio y de los indicadores fluorescentes que se suelen utilizar para observar señales de calcio.

La exitosa modificación del microscopio FV1000 y la implementación de nuevas técnicas abre un gran abanico de posibilidades en el estudio de señales intracelulares de calcio *in vivo*. Uno de los temas que la nueva técnica posibilita, es el estudio del efecto del calcio presente en el lumen del retículo sobre las señales. Con este fin se planea realizar en el futuro próximo observaciones de señales en ovocitos de *Xenopus laevis* previamente microinyectados con IP_3 enjaulado, el indicador de calcio y quelantes de calcio aniónicos de baja afinidad (como el citrato o el maleato). Estos quelantes aniónicos deberían ser transportados hacia el interior del retículo actuando como quelantes en el lumen de este reservorio. De este modo esperamos poder estudiar cómo el calcio luminal influye sobre la probabilidad de apertura de los receptores y sobre el desarrollo de las señales, en particular sobre la finalización de las que permanecen localizadas.

A

Apéndice

Coeficientes efectivos de difusión para la reacción Ca–Fluo 4–EGTA

Como se mostró en el Capítulo 4, el sistema de reacción-difusión que describe la dinámica, cerca del equilibrio, del calcio en presencia de Fluo 4 y el EGTA está caracterizado por 5 ramas de auto-valores, dos de ellas asociadas a la difusión libre del Fluo 4 y el EGTA. El tercer autovalor, desarrollado a orden $\mathcal{O}(q^2)$, en el número de onda, q, también describe un comportamiento difusivo con coeficiente efectivo, D_{ef1} dado por 4.17. Asociados a los otros 2 autovalores definimos los coeficientes efectivos, D_{ef2} y D_{ef3}, como los factores que multiplican a q^2 en su expansión (ver Ecs. (4.15)–(4.16)). Usando programas de manipulación algebraica es relativamente sencillo obtener expresiones analíticas de D_{ef2} y D_{ef3}. Sin embargo, son demasiado largas y por eso no fueron incluidas explícitamente en el Capítulo 4. Describimos brevemente en este Apéndice los pasos seguidos para obtenerlas.

Los autovalores de la matriz de la Ec. 4.13, que caracteriza la evolución del problema linea-

lizado en el espacio de Fourier, son:

$$\lambda_1 = -D_F q^2 \tag{A.1}$$

$$\lambda_2 = -D_E q^2 \tag{A.2}$$

$$\lambda_3 = -\frac{\Sigma}{3} + \frac{2^{-1/3}}{3}\left(m + \sqrt{m^2 + 4(-\Sigma^2 + 3u)^3}\right)^{1/3} \tag{A.3}$$

$$-\frac{1}{3}\frac{2^{1/3}(-\Sigma^2 + 3u)}{\left(m + \sqrt{m^2 + 4(-\Sigma^2 + 3u)^3}\right)^{1/3}} \tag{A.4}$$

$$\lambda_4 = -\frac{\Sigma}{3} - \frac{1}{6}(1 - i\sqrt{3})2^{-1/3}\left(m + \sqrt{m^2 + 4(-\Sigma^2 + 3u)^3}\right)^{1/3} + \tag{A.5}$$

$$+\frac{1}{6}\frac{(1 + i\sqrt{3})2^{1/3}(-\Sigma^2 + 3u)}{\left(m + \sqrt{m^2 + 4(-\Sigma^2 + 3u)^3}\right)^{1/3}} \tag{A.6}$$

$$\lambda_5 = \bar{\lambda_4} \tag{A.7}$$

$$\tag{A.8}$$

donde:

$$\begin{aligned}
\Sigma &= a + a_E + 1 + c + c_E + k_E + q^2\,(1 + D_{F4} + D_E) \\
u &= q^4(D_E + D_{F4} + D_E D_{F4}) + \\
&\quad q^2[(D_{F4} + 1)(c_E + k_E) + (D_E + 1)(1 + c) + (D_{F4} + D_E)(a + a_E)] + \\
&\quad + a(c_E + k_E) + (1 + c)(a_E + c_E + k_E) \\
m &= a_1 + b_1 q^2 + c_1 q^4 + d_1 q^6 \\
a_1 &= -2\,(1 + a + c)^3 - 2\,k_E(1 + a + c_E)^3 + 3\,k_E(1 + a_E + c_E)(1 + a + c)^2 + \\
&\quad + 3\,k_E^2(1 + a + c)(1 + a_E + c_E)^2 - 9\,a\,a_E\,k_E\,[(1 + a + c) + k_E(1 + a_E + c_E)]
\end{aligned}$$

e i es la unidad imaginaria. Si bien la notación es compleja, se puede probar que todos los autovalores son funciones reales de q^2. No se dan las expresiones de b_1, c_1 y d_1 porque no intervienen en la definición de los coeficientes efectivos. Expandiendo los autovalores λ_3, λ_4 y λ_5 a orden $\mathcal{O}(q^2)$ y haciendo la identificación introducida en (4.14)–(4.16) se llega a la expresión (4.17) para D_{ef1}. Para calcular numéricamente los valores de ν_{ef2} y ν_{ef3} se especializan en $q^2 = 0$ las expansiones de λ_4 y λ_5 obtenidas. Para determinar los valores D_{ef2} y D_{ef3} se calculan las diferencias $\lambda_4 - \nu_{ef2}$ y $\lambda_5 - \nu_{ef3}$ usando las expansiones a orden $\mathcal{O}(q^2)$ de los autovalores y se las especializa en $q^2 = 1$.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle muy especialmente a Silvina, por guiarme durante estos años e introducirme en el mundo de la Biofísica y la Investigación. Por darme la oportunidad de participar de la formación de un nuevo laboratorio y de enfrentar el desafío que representa comenzar una nueva línea experimental.

A María Laura, Emiliano y a los chicos del laboratorio, Lucía, Estefanía, Rocío y Mariano, por su empuje y buena predisposición, con quienes siempre resulta un placer trabajar!

A Lía y todo el grupo del CMA y a Oscar y la gente del LEC, que siempre estuvieron dispuestos a contestar dudas y prestar cualquier tipo de reactivo/dispositivo que fuese necesario.

A Valeria y Alejandro por atender las dudas química-biológicas que surgieron en el camino.

A Ian Parker y todo su grupo de la Universidad de California, Irvine, por recibirme en su laboratorio y guiarme en los primeros pasos hacia la investigación experimental en células vivas.

A Daniel Calvo y su grupo por brindarnos generosamente los ovocitos y estar siempre dispuesto a disipar cualquier duda que surgiera con su manejo.

A mis amigos, a los que están cerca y a los que están distribuidos por el mundo, gracias por su cariño y apoyo incondicional! Especialmente a Luz, Flor, Carla y Ceci gracias por escucharme! A los viejos amigos de plasma, Vero, Pablo, Fran y César, que siempre están presentes. A Gustavo, Fede F., Fede W. y Gabriel, los amigos que amenizaron los almuerzos.

A la familia! A mamá y a papá, a mis hermanos: Lolo, Leo y Titen y a mi hermana Jackie! A Fede y a tía Vicky, no pueden faltar! gracias a cada uno de ellos, porque desde que empecé la carrera de Física cada uno contribuyó a que haya podido llegar a este día. Gracias por todo su amor y por estar siempre!! Y por supuesto a la nueva familia que me adoptó como propia!

A Néstor, mi invalorable compañero de aventuras y (aunque suene trillado) el amor de mi vida, gracias por su infinita paciencia durante la elaboración de este trabajo! Y especialmente por el amor que me brinda cada día.

Bibliografía

A. Abu-Arish, A. Porcher, A. Czerwonka, N. Dostatni, and C. Fradin. High mobility of bicoid captured by fluorescence correlation spectroscopy: Implication for the rapid establishment of its gradient. *Biophys. J.*, 99:L33, 2010.

S. R. Adams and R. Y. Tsien. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu. Rev. Physiol.*, 55:755, 1993.

B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, fifth edition, 2007.

N.L. Allbritton, T. Meyer, and L. Stryer. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, 258:1812, 1992.

D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.*, 16(9):1055, 1976.

M.J. Berridge, M. D. Bootman, and P. Lipp. Calcium - a life and death signal. *Nature*, 395:645, 1998.

I. Bezprozvanny, J. Watras, and B. E. Ehrlich. Bell-shaped calcium-response curves for ins(1,4,5)p_3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351:751, 1991.

E. Bismuto, E. Gratton, and D. C. Lamb. Dynamics of ans binding to tuna apomyoglobin measured with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 81:3510, 2001.

K. Braeckmans, L. Peeters, N. N. Sanders, S. C. De Smedt, and J. Demeester. Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. *Biophys. J.*, 85:2240, 2003.

W. B. Busa, J. E. Ferguson, S. K. Joseph, J. R. Williamson, and R. Nuccitelli. Activation of frog (*xenopus laevis*) eggs by inositol trisphosphate. i. characterization of ca^{2+} release from intracellular stores. *J. Cell Biol.*, 101:677, 1985.

N. Callamaras and I. Parker. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in xenopus laevis oocytes: localization and modulation by ca^{2+}. *Cell Calcium*, 15:66, 1994.

N. Callamaras and I. Parker. Caged inositol 1,4,5-trisphosphate for studying release of ca^{2+} from intracellular stores. *Methods Enzymol.*, 291:380, 1998.

N. Callamaras and I. Parker. Radial localization of inositol 1,4,5-trisphosphate sensitive ca^{2+} release sites in xenopus oocytes resolved by axial confocal linescan imaging. *J. Gen. Physiol.*, 113:199, 1999.

N. Callamaras and I. Parker. Phasic characteristic of elementary ca^{2+} release sites underlies quantal responses to ip3. *EMBO J.*, 19(14):3608, 2000.

E. M. Callaway and R. Yuste. Stimulating neurons with light. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12:587, 2002.

M. Charbonneau and R. D. Grey. The onset of activation responsiveness during maturation coincides with the formation of the cortical endoplasmic reticulum in oocytes of xenopus laevis. *Dev. Biol.*, 102:90, 1984.

C-U. Choe and B. E. Ehrlich. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (ip3r) and its regulators: Sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE*, 2006(363):re15, 2006.

D. Chudakov, S. Lukyanov, and K. Lukyanov. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.*, 23(12):605, 2005.

F. Daniel Fraiman, B. Pando, S. Dargan, I. Parker, and S. Ponce Dawson. Analysis of puff dynamics in oocytes: Interdependence of puff amplitude and interpuff interval. *Biophys. J.*, 90:3897, 2006.

S. L. Dargan and I. Parker. Buffer kinetics shape the spatiotemporal patterns of ip3-evoked ca^{2+} signals. *J.Physiol.*, 553(3):775, 2003.

J. N. Dumont. Oogenesis in xenopus laevis (daudin) i. stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, 136:153, 1972.

R. J. Ellis. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11:114, 2001.

E. L. Elson. Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic*, 2:789, 2001.

J. K. Foskett, C. White, K-H. Cheung, and D-O.D. Mak. Inositol trisphosphate receptor ca^{2+} release channel. *Physiol. Rev.*, 87:593, 2007.

A. Gennerich and D. Schild. Anisotropic diffusion in mitral cell dendrites revealed by fcs. *Biophys. J.*, 83:510, 2002.

C. R. Graham and J. H. Davies, E. amd Kaplan. Nitrophenyl-egta, a photolabile chelator that selectively binds ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:187, 1994.

C. R. Graham, J. H. Davies, E. amd Kaplan, and R. J. Barsotti. Laser photolysis of caged calcium: Rates of calcium release by nitrophenyl-egta and dm-nitrophen. *Biophys. J.*, 70:1006, 1996.

T. Gregor, E. F. Wieschaus, A. P. McGregor, W. Bialek, and D. W. Tank. Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient. *Cell*, 130:141, 2007.

P. Gribbon and T. E. Hardingham. Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.*, 75:1032, 1998.

D. Grünwald, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, and V. Buschmann. Diffusion and binding properties investigated by fluorescence correlation spectroscopy (fcs). *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 6:381, 2005.

M. B. Jackson. *Molecular and cellular biophysics*. Cambridge University Press, 2006.

K. Jacobson and J. Wojcieszyn. The translational mobility of substances within the cytoplasmic matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81(21):6747, 1984.

J. H. Kaplan. Photochemical manipulation of divalent cation levels. *Annu. Rev. Physiol.*, 52:897, 1990.

J. P. Keener and J. Sneyd. *Mathematical Physiology*. Springer-Verlag, 1998.

A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H.and Vogel, and K. Johnsson. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 21(1):86, 2003.

S. A. Kim and P. Schwille. Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13:583, 2003.

O. Krichevsky and G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.*, 65:251, 2002.

D. C. Lamb, A. Schenk, C. Röcker, C. Scalfi-Happ, and G. Ulrich Nienhaus. Fcs - sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection. *Biophys. J.*, 79:1129, 2000.

J. D. Lechleiter and D. E. Clapham. Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *x. laevis* oocytes. *Cell*, 69:283, 1992.

D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reaction system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29(11):705, 1972.

D-O D. Mak, S. McBride, and J.K. Foskett. Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor ca^{2+} channel by ligand tuning of ca^{2+} inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:15821, 1998.

D-O D. Mak, S. McBride, V. Raghuram, Y. Yue, S. K. Joseph, and J. K. Foskett. Single channel properties in endoplasmic reticulum membrane of recombinant type 3 inositol trisphosphate receptor. *J. Gen. Physiol.*, 115:241, 2000.

J. Marchant and I. Parker. Role of elementary ca^{2+} puffs in generating repetitive ca^{2+} oscillations. *EMBO J.*, 20(1 & 2):65, 2001.

J. Marchant, N. Callamaras, and I. Parker. Initiation of ip3-mediated ca^{2+} waves in *xenopus* oocytes. *EMBO J.*, 18(19):5285, 1999.

U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys. J.*, 76:1619, 1999.

R. Nuccitelli. *Methods in cell biology. Volume 40. A practical guide to the study of calcium in living cells*. Academic Press, 1994.

B. Pando, S. Ponce Dawson, D. D. Mak, and J. E. Pearson. Messages diffuse faster than messengers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(14):5338, 2006.

I. Parker, J. Choi, and Y. Yao. Elementary events of insp3-induced ca^{2+} liberation in *xenopus* oocytes: hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium*, 20:105, 1996a.

I. Parker, J. Choi, and Y. Yao. Elementary events of insp3-induced ca^{2+} liberation in xenopus oocytes: Hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium*, 20:105, 1996b.

J. B. editor Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy (3rd ed.)*. Springer, 2006.

M. Petrán, M. Hadravsky, M. D. Egger, and Galambos. Tandem-scanning reflected-light microscope. *J. Opt. Soc. Am.*, 58:661, 1968.

D. Qin, A. Yoshida, and A. Noma. Limitations due to unstirred layers in measuring channel response of excised membrane patch using rapid solution exchange methods. *Japanese Journal of Physiology*, 41:333, 1991.

J. Shuai, H.J. Rose, and I. Parker. The number and spatial distribution of ip3 receptors underlying calcium puffs in xenopus oocytes. *Biophys. J.*, 91:4033, 2006.

C. Smith. Keeping tabs on fluorescent tags. *Nat. Methods*, 4:755, 2007.

G. D. Smith, J. Wagner, and J. Keizer. Validity of the rapid buffering approximation near an open ca^{2+} channel. *Biophys. J.*, 70:2527, 1996.

J. Sneyd, P. Dale, and A. Duffy. Traveling waves in buffered systems: applications to calcium waves. *SIAM J. Appl. Math.*, 58:1178, 1998.

B. L. Sprague and J. G. McNally. Frap analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol.*, 15(2):84, 2005.

B. L. Sprague, R. L. Pego, D. A. Stavreva, and J. G. McNally. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.*, 86:3473, 2004.

O. V. Stepanenko, V. V. Verkhusha, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky, and K. K. Turoverov. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 9(4):338, 2008.

D. Strier, A. C. Ventura, and S. Ponce Dawson. Saltatory and continuous calcium waves and the rapid buffering approximation. *Biophys. J.*, 85:3575, 2003.

X. P. Sun, N. Callamaras, J. S. Marchant, and I. Parker. A continuum of insp3-mediated elementary ca^{2+} signalling events in *xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 509(1):67, 1998.

S. Swillens, G. Dupont, L. Combettes, and P. Champeil. From calcium blips to calcium puffs: Theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:13750, 1999.

M. Terasaki, L. L. Runft, and A. R. Hand. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during xenopus oocyte maturation and activation. *Mol. Biol. Cell*, 12:1103, 2001.

M. A. Walling, J. A. Novak, and J. R. E. Shepard. Quantum dots for live cell and in vivo imaging. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(2):441, 2009.

J. Watras, I. Bezprozvanny, and B. E. Erlich. Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels in cerebellum: presence of multiple conductance states. *J. Neurosci.*, 11:3239, 1991.

T. Wilson and C. J. R. Sheppard. *Theory and practice of scanning optical microscopy*. Academic Press, 1984.

D. Wright, P. Greve, J. Fleischer, and L. Austin. Laser beam width, divergence and beam propagation factor - an international standardization approach. *Optical and Quantum Electronics*, 24:S993, 1992.

T. Zimmermann. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 95:245, 2005.