

Tesis Doctoral

Estudio de dinámica de biomoléculas en sistemas complejos mediante la combinación de técnicas avanzadas de microscopía y simulación computacional

Angiolini, Juan Francisco

2017-12-21

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:

Angiolini, Juan Francisco. (2017-12-21). Estudio de dinámica de biomoléculas en sistemas complejos mediante la combinación de técnicas avanzadas de microscopía y simulación computacional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Angiolini, Juan Francisco. "Estudio de dinámica de biomoléculas en sistemas complejos mediante la combinación de técnicas avanzadas de microscopía y simulación computacional". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-12-21.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de dinámica de biomoléculas en sistemas complejos mediante la combinación de técnicas avanzadas de microscopía y simulación computacional

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Juan Francisco Angiolini

Directores de Tesis: Dra. Valeria Levi

Dr. Esteban Mocskos

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Martí

Lugar de trabajo: Laboratorio de Dinámica Intracelular. Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2017

Estudio de dinámica de biomoléculas en sistemas complejos mediante la combinación de técnicas avanzadas de microscopía y simulación computacional

En las últimas décadas, la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) se convirtió en un grupo de técnicas ampliamente usadas para estudiar la dinámica de moléculas en sistemas de diversa complejidad. Estas técnicas son mínimamente invasivas y permiten determinar con alta resolución espacio-temporal coeficientes de difusión, constantes cinéticas e interacciones moleculares tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo de tesis, desarrollamos una combinación de métodos de FCS y simulaciones computacionales para comprender procesos difusivos en sistemas complejos. Las herramientas y conocimientos obtenidos fueron aplicados al estudio de la dinámica de factores de transcripción en embriones tempranos de ratón y al estudio de la difusión en sistemas porosos ordenados.

Una pregunta muy importante en el campo de desarrollo embrionario es en qué momento del desarrollo las células que componen el embrión de mamíferos comienzan a ser diferentes entre sí y cómo estas diferencias influyen el destino de las células hijas. Para responder esta pregunta, utilizamos FCS y caracterizamos la dinámica de ciertos factores de transcripción (i.e. Sox2, Oct4 y Cdx2) en el núcleo de las células de embriones tempranos de ratón. Además, para interpretar los resultados obtenidos desarrollamos FERNET (*Fluorescence Emission Recipes and NumErical routines Toolkit*), una herramienta que permite simular experimentos de FCS en escenarios más complejos y realistas.

Nuestro análisis permitió determinar que los datos de FCS pueden ser interpretados por un modelo que considera que los factores de transcripción difunden en el núcleo celular e interactúan con dos poblaciones de sitios en la cromatina, con distintos tiempos de interacción. Estos estudios permitieron determinar que cuando el embrión está formado por tan sólo por cuatro células ya existen diferencias en la interacción de Sox2 con el ADN, las cuales se correlacionarían con el linaje final de la progenie celular.

En una segunda etapa, exploramos la difusión de sondas fluorescentes en films de óxidos mesoporosos, materiales sumamente relevantes por sus posibles aplicaciones como sensores, catalizadores, y para la adsorción de gases. A diferencia del escenario anterior, en este caso el sistema es altamente restringido y la geometría es estática. Nuestros estudios permitieron caracterizar la influencia de ciertas propiedades del film (i.e. tamaño de poros y cuellos) en la difusión de una sonda fluorescente. Con el fin de comprender las tendencias observadas en los experimentos realizamos simulaciones estocásticas en sistemas periódicos con potenciales simples.

Palabras claves: microscopía de fluorescencia, espectroscopia de correlación de fluorescencia, simulaciones computacionales, difusión, factores de transcripción, desarrollo embrionario, materiales mesoporosos.

Dynamics of biomolecules in complex systems unveiled by the combination of advanced microscopy techniques and computational simulation

In the last decades, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) became a widely used group of techniques for the study of molecular dynamics in systems with diverse complexity. These techniques are noninvasive and allows the determination of in vivo and in vitro diffusion coefficients, kinetic constants and molecular interactions with high spatiotemporal resolution. In the present thesis work we developed and employed a combination of FCS methods and computational simulations to study the underlying processes in the motility of molecules in complex systems. The tools and knowledge obtained was applied to the study of transcription factor dynamics in early mouse embryos and diffusion in ordered porous systems.

One of the most important questions in this field is when the cells of an embryo begins to behave differently and how these differences influences its cell fate. To answer this question, we employed FCS to study the interaction between certain transcription factors involved in embryonic development with chromatin in early mouse embryos. Moreover, we developed FERNET (*Fluorescence Emission Recipes and NumErical routines Toolkit*) to aid in the results interpretation, a toolkit to simulate FCS experiments in more complex and realistic scenarios.

Our analysis allowed us to determine that the experimental data could be explained by a model that considers two distinctly binding sites populations, each with its corresponding residence time. By performing single cell FCS experiments we determined that when the embryo is at its 4-cell stage Sox2 interacts differently with DNA. Moreover, those cells with more Sox2-DNA interaction shows a greater predisposition to form the embryo inner mass.

Secondly, we explored the diffusion of fluorescent dyes in mesoporous oxide films. Due to the relevance of these materials as sensors, catalysts, gas sorption, among other uses, we studied the diffusion of molecules inside the films. We observed how properties of

the material, such as pore size, pore connectivity and coating restrict and influences the mass transport inside these materials. In contrast with the previous scenario, this material represents a highly restricted and static system, with dimensions clearly defined and partially known. To replicate and explain the observed tendencies in the experimental data we performed stochastic simulations in periodic systems with simple and easy to implement potentials.

Keywords: fluorescence microscopy, fluorescence correlation spectroscopy, computational simulations, diffusion, transcription factors, embryonic development, mesoporous materials.

*A mis abuelos y a mi tía
Estén donde estén*

Agradecimientos

Quienes me conocen saben lo escueto que soy, así que no esperen una excepción.

A mi familia, por haberme acompañado toda la vida y respaldarme en todas las decisiones que tomé, hayan sido acertadas o no. Y por el jueguito de química regalado a los 8 años, probablemente por eso esté acá.

A Julieta, por haberme bancado en lo que debe haber sido el año más neurótico de mi vida y ayudarme a terminar este manuscrito. Por los findes de no escritura que vendrán.

A los tres mentores que tuve durante la tesis: Vale, Esteban y Diana. Por todo lo aprendido, discutido y vivido.

A toda la gente que pasó por QB6 en los 8 años que estuve, por haber creado un hermoso lugar de trabajo. En especial a Rama, Tincho y Herno, por estas tardes/noches donde hacíamos de todo menos trabajar.

A Los Nefastos: Ari, Belén, Carla, Ceci, Eli, Lanza, Cordo, Tita, Parra, Herno, Lucas, Dipa, Pali y Chupi (un solo corazón), Nati, Nohe, Suárez, Sol, Sole, Radu, Rodrigo y Emilio. Por los bares, juntadas y bichos enteros a la parrilla sacrificados para saciar nuestra hambre.

A los chicos de la facu: Ana, Cyn, Eze, Flori, Irene, Juan, Leo, Pablo y Rolo. Por las tardes de estudio durante la carrera, por las tardes de (no tanta) libertad después de recibirnos.

En resumen, como dice un sabio poeta del rock nacional: *somos los mismos de siempre*.

Publicaciones derivadas del presente trabajo de tesis

Diffusion of single dye molecules in hydrated TiO₂ mesoporous films. Juan F. Anqiolini, *Martín Stortz, Paula Y. Steinberg, Esteban Mocskos, Luciana Bruno, Galo Soler-Illia, Paula C. Angelomé, Alejandro Wolosiuk, Valeria Levi*. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 2017,19, 26540-26544.

Dynamics of intracellular processes in live-cell systems unveiled by fluorescence correlation microscopy. *Nicolás González Bardeci*, Juan Francisco Anqiolini, *María Cecilia De Rossi, Luciana Bruno, Valeria Levi*. **IUBMB life**, 2017, 69, 8-15.

Long-lived binding of Sox2 to DNA predicts cell fate in the four-cell mouse embryo. *Melanie D White**, Juan F Anqiolini*, *Yanina D Alvarez*, Gurpreet Kaur*, Ziqing W Zhao, Esteban Mocskos, Luciana Bruno, Stephanie Bissiere, Valeria Levi, Nicolas Plachta*. **Cell**, 2015 165, 75-87. (* contribución igualitaria)¹



Exploring the dynamics of cell processes through simulations of fluorescence microscopy experiments. Juan Anqiolini, *Nicolas Plachta, Esteban Mocskos, Valeria Levi*. **Biophysical Journal**, 2015, 108, 2613-2618.²

Efficient fluorescence microscopy analysis over a volunteer grid/cloud infrastructure. *Miguel Da Silva, Sergio Nesmachnow, Maximiliano Geier, Esteban Mocskos, Juan Anqiolini, Valeria Levi, Alfredo Cristobal*. **Latin American High Performance Computing Conference**, 2014, 113-127.

¹ Tapa de revista del volumen 165.

² Elegido como relevante en el área de microscopía de fluorescencia por el *Editor in Chief* de Biophysical Journal (<http://www.cell.com/biophysj/collections/fluorescence-methods>).

Contenido

CAPÍTULO 1: DIFUSIÓN EN SISTEMAS COMPLEJOS Y HERRAMIENTAS PARA SU ESTUDIO 2

1.1	Motivación: ¿por qué estudiar difusión en sistemas complejos?	2
1.2	Difusión	3
1.2.1	Difusión libre	3
1.2.2	Difusión anómala	5
1.2.2.1	Difusión anómala causada por colisiones con obstáculos	6
1.2.2.2	Difusión anómala causada por interacciones	10
1.3	Herramientas de estudio para mecanismos de difusión	12
1.3.1	Microscopía confocal	12
1.3.2	Técnicas experimentales para el estudio de difusión e interacciones in vivo	18
1.3.2.1	Fotoblanqueo y recuperación de la fluorescencia	18
1.3.2.2	Técnicas basadas en el estudio de fluctuaciones de fluorescencia	22
1.3.2.3	Técnicas de seguimiento de partículas únicas	27
1.4	Simulaciones computacionales para complementar a la microscopía confocal	32

CAPÍTULO 2: ESTRUCTURA DEL NÚCLEO, FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SU ROL EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO 35

2.1	Estructura del núcleo celular	35
2.1.1	Compartimentalización sin membranas	35
2.1.2	Territorios cromosómicos	37
2.2	Estructura y función de la cromatina	39
2.2.1	Empaquetamiento del ADN	39
2.2.2	Modificaciones de histonas	41
2.2.3	Fábricas de transcripción	43
2.3	Factores de transcripción	44
2.3.1	Estructura y función	44
2.3.2	Dinámica e interacción de factores de transcripción con el ADN	47
2.4	Factores de transcripción y desarrollo embrionario	49
2.4.1	Proceso de diferenciación en embriones tempranos	50
2.4.2	Factores de transcripción relacionados con el desarrollo embrionario	51

2.4.2.1	Oct4	52
2.4.2.2	Sox2	52
2.4.2.3	Cdx2	53
2.4.3	¿En qué momento las células empiezan a ser diferentes?	53
CAPÍTULO 3: DIFUSIÓN EN MEDIOS POROSOS ORDENADOS		55
3.1	Nanoescala y principales características de los materiales mesoporosos	55
3.2	Breve historia de los materiales mesoporosos	56
3.3	Síntesis de materiales mesoporosos	57
3.3.1	Agentes surfactantes y proceso de autoensamblado	58
3.3.2	Método sol-gel de síntesis de materiales porosos	60
3.3.3	Mecanismos de formación y métodos de obtención	62
3.3.3.1	Autoensamblado inducido por evaporación	64
3.4	Aplicaciones de materiales mesoporosos	67
3.5	Estudio de la difusión en medios mesoporosos	70
CAPÍTULO 4: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		74
4.1	Contexto científico de este trabajo de tesis	74
4.2	Hipótesis y objetivos	74
CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS		77
5.1	Dinámica de factores de transcripción en embriones tempranos de ratón	77
5.1.1	Embriones y células madre	77
5.1.2	Manipulación de ARN, plásmidos y drogas	78
5.1.3	Microscopía confocal y paFCS (photoactivatable FCS)	78
5.1.4	Seguimiento celular y segmentación	79
5.1.5	Análisis de datos	79
5.1.6	Simulaciones	80
5.2	Dinámica de sondas fluorescentes en materiales mesoporosos	80
5.2.1	Preparación de los films mesoporosos de TiO ₂	80
5.2.2	Microscopía confocal y FCS	81
5.2.3	Medidas de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)	82

5.2.4	Construcción de la geometría de la celda unidad para las simulaciones	83
-------	---	----

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS PARA LA SIMULACIÓN DE EXPERIMENTOS DE FCS EN SISTEMAS COMPLEJOS 87

6.1 Motivación para el desarrollo de nuevas herramientas 87

6.2 Generación de trayectorias moleculares en sistemas complejos 87

6.2.1	Breve descripción de MCell	88
-------	----------------------------	----

6.2.2	Diseño de un formato de salida de MCell adecuado para la generación de trazas de fluorescencia	90
-------	--	----

6.3 Generación de la traza de intensidad de fluorescencia 91

6.3.1	Algoritmo de excitación/emisión	92
-------	---------------------------------	----

6.4 Modos disponibles para la simulación de experimentos de fluorescencia y sus parámetros 95

6.4.1	Parámetros comunes a todos los modos	96
-------	--------------------------------------	----

6.4.2	Modo de FCS en un punto fijo (single point FCS)	96
-------	---	----

6.4.2.1	Ejemplo de simulación: FCS en un único punto y detección en dos canales	96
---------	---	----

6.4.3	Modo de múltiples FCS en un punto fijo	99
-------	--	----

6.4.4	Modo de barrido en línea (line scan)	100
-------	--------------------------------------	-----

6.4.5	Modo de barrido en órbitas (orbital scan)	102
-------	---	-----

6.4.6	Modo de barrido de área (raster scan)	103
-------	---------------------------------------	-----

6.4.6.1	Ejemplo de simulación: interacción de proteínas con microtúbulos	104
---------	--	-----

6.4.7	Modo de barrido en Z (Z-stack)	105
-------	--------------------------------	-----

6.4.7.1	Ejemplo de simulación: reconstrucción 3D con Z-stack	105
---------	--	-----

6.4.8	Modo de iluminación en plano (SPIM)	107
-------	-------------------------------------	-----

6.4.8.1	Ejemplo de simulación: dinámica de sistemas heterogéneos con FCS de imágenes	108
---------	--	-----

6.5 Discusiones 109

6.6 Anexo 110

6.6.1	Archivo de configuración de FERNET	110
-------	------------------------------------	-----

6.6.2	Cálculo del número de iteraciones necesarias para cada modo	112
-------	---	-----

6.6.2.1	Modo de barrido en línea	112
---------	--------------------------	-----

6.6.2.2	Modo de barrido en órbita	113
---------	---------------------------	-----

6.6.2.3	Modo de barrido de área	113
---------	-------------------------	-----

6.6.2.4	Modo de barrido en Z	114
---------	----------------------	-----

6.6.2.5	Modo SPIM	115
---------	-----------	-----

CAPÍTULO 7: DINÁMICA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN EMBRIONES TEMPRANOS DE RATÓN

116

7.1 Motivación: difusión anómala de factores de transcripción en células madre y embriones

tempranos de ratón

116

7.1.1 La técnica de FCS de barrido en línea permite discernir entre difusión y eventos de unión 117

7.1.2 El componente anómalo de la ACF corresponde a eventos de unión 120

7.2 Un modelo con una única población de sitios de unión no explica las curvas experimentales

121

7.3 El grado de compactación de la cromatina modifica la fracción de factores de transcripción en eventos de unión

127

7.4 Mutaciones en los dominios de unión a ADN modifican los tiempos de residencia de los factores de transcripción

128

7.5 Sox2, Oct4 y Cdx2 interactúan de manera dependiente del linaje en embriones de 16 a 32 células

131

7.6 La heterogeneidad en la interacción cromatina-Sox2 se da en el estadio de cuatro células

134

7.7 Las células internas del embrión en el estadio de 16 células provienen en su mayoría de células con mayor fracción unida de Sox2 en sitios de mayor tiempo de residencia en el estadio de cuatro células

138

7.8 Discusiones

139

7.8.1 Partición de los factores de transcripción en el núcleo celular 139

7.8.2 Determinación del linaje celular en embriones vivos 141

CAPÍTULO 8: DINÁMICA DE SONDAS FLUORESCENTES EN MATERIALES MESOPOROSOS DELGADOS

142

8.1 Motivación: estudio de difusión de moléculas en matrices inorgánicas ordenadas

142

8.2 Elección de la sonda fluorescente

143

8.3 Preparación de las muestras

145

8.4 FRAP revela una fracción inmóvil minoritaria

146

8.5 Determinación del plano focal de la muestra para los experimentos de FCS

148

8.6	Resultados experimentales de FCS en films mesoporosos	150
8.6.1	El tamaño de poro y cuello modulan la difusión	151
8.6.2	Modulación de la difusión por interacciones sonda-sustrato	153
8.7	Simulaciones de difusión de moléculas en materiales mesoporosos	155
8.7.1	Construcción de la geometría del sistema	155
8.7.2	Generación de las trayectorias de las partículas	155
8.7.3	Análisis de las trayectorias en dos escalas temporales distintas	158
8.7.4	Relación entre el tiempo de residencia y el coeficiente de difusión	164
8.8	Discusiones	165
8.8.1	La geometría del sistema y las interacciones sonda-sustrato modulan la difusión	165
8.8.2	Las simulaciones arrojan información sobre la dinámica micro y macro del sistema	166
	CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	169
	REFERENCIAS	174

Abreviaturas

ACF	<i>autocorrelation function</i>
AEIE	<i>autoensamblado inducido por evaporación</i>
AOTF	<i>acousto-optical tunable filter</i>
APD	<i>avalanche photodiode detector</i>
CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CCF	<i>cross-correlation function</i>
cpms	<i>cuentas por molécula por segundo</i>
CTAB	<i>cetyltrimethylammonium bromide</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
ESC	<i>embryonic stem cells</i>
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HILO	<i>highly inclined and laminated optical sheet</i>
ITO	<i>indium tin oxide</i>
LSCM	<i>laser scanning confocal microscopy</i>
MSD	<i>mean squared displacement</i>
paFCS	<i>photoactivatable FCS</i>
PBC	<i>periodic boundary conditions</i>
PDMS	<i>polidimetilsiloxano</i>
PRMTs	<i>protein arginine methyltransferases</i>
PSF	<i>point spread function</i>
ROI	<i>region of interest</i>
SMT	<i>single molecule tracking</i>
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i>
SPIM	<i>selective plane illumination microscopy</i>
SSA	<i>specific surface area</i>
SSD	<i>signal sensing domain</i>
TAD	<i>transactivation domain</i>
TIRF	<i>total internal reflection microscopy</i>

Introducción

Capítulo 1: difusión en sistemas complejos y herramientas para su estudio

1.1 Motivación: ¿por qué estudiar difusión en sistemas complejos?

Muchos procesos químicos dependen de la interacción entre moléculas distintas. Para que esto ocurra, las mismas deben encontrarse en el tiempo y el espacio. En sistemas sencillos, resulta trivial predecir teóricamente la probabilidad de estos encuentros y, como consecuencia, predecir parámetros del proceso tales como velocidades de reacción y constantes termodinámicas. Pero en entornos complejos, hiperpoblados, donde las moléculas interactúan con otros compuestos, son obstruidas en su movimiento o quedan excluidas de ciertas regiones la predicción es mucho más difícil y, como consecuencia, no resulta sencillo entender los mecanismos por los cuales las reacciones químicas ocurren.

El estudio de la difusión en medios complejos o desordenados resulta de gran interés y necesidad debido a que muchos de los materiales encontrados en la naturaleza son desordenados. Para estos materiales, las teorías clásicas de transporte en sistemas ordenados no se aplican y, en particular, la difusión de moléculas dentro de estos materiales resulta anómala. La literatura sobre el estudio de este fenómeno es de por sí demasiado extensa, en particular nos centraremos en los dos sistemas estudiados durante el desarrollo de este trabajo de tesis: matrices inorgánicas[1-4] y entornos celulares[5-10].

Como fue mencionado anteriormente, no solo la difusión de las moléculas se ve afectada por este entorno complejo, además afecta velocidad de reacciones y constantes de equilibrio, entre otras propiedades [11]. En consecuencia, no es inusual encontrar discrepancias entre observaciones de procesos biológicos realizados en ensayos *in vitro*, en los cuales los componentes son aislados y los procesos generalmente estudiados en soluciones acuosas y aquellas observaciones realizadas en células[12-14]. Por lo tanto, resulta de interés estudiar la difusión de moléculas dentro de esos sistemas *in vivo* con técnicas no invasivas. A continuación, se detallarán conceptos básicos de

difusión, cómo un entorno complejo como la célula la afecta y técnicas para estudiar la difusión.

1.2 Difusión

1.2.1 Difusión libre

Desde los trabajos pioneros de Einstein y von Smoluchowski[15, 16], es universalmente aceptado que el transporte de partículas mesoscópicas (desde átomos a partículas micrométricas) en solventes simples está regida por difusión Browniana. El movimiento o difusión Browniana es el movimiento azaroso de partículas suspendidas en un fluido (líquido o gas) resultante de las colisiones con los átomos o moléculas que integran el fluido[17] (Figura 1.1).

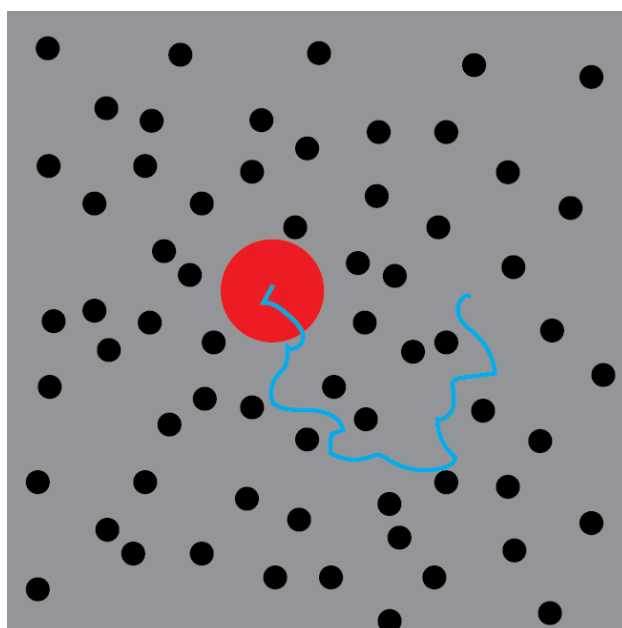


Figura 1.1: esquema de difusión Browniana. La trayectoria azarosa (línea azul) de la partícula (círculo rojo) es ocasionada por las colisiones con partículas del fluido (círculos negros).

Quizás el ejemplo más claro de difusión sea la dispersión de una gota de tinta en un solvente. Con el paso del tiempo, las moléculas de tinta difunden y se observa su presencia en zonas cada vez más alejadas del punto de origen, hasta distribuirse de manera homogénea en la solución (Figura 1.2).



Figura 1.2: evolución temporal (izquierda a derecha) de la dispersión de moléculas de tinta en un solvente acuoso. Extraído de [18]

La evolución en el espacio y el tiempo de las moléculas se denomina comúnmente perfil difusional y fue estudiada teóricamente por Einstein. Al considerar el movimiento colectivo de las partículas brownianas, Einstein llegó a la siguiente solución analítica para el perfil de difusión unidimensional[19]:

$$\rho(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad \text{Ec. (1.1)}$$

donde N es el número de partículas y D es el coeficiente de difusión, una constante de proporcionalidad entre el flujo molar de una partícula y el gradiente de concentración de la misma, que es la fuerza motriz de la difusión[20].

A partir de esta expresión (una distribución normal con $\mu = 0$ y $\sigma^2 = 2Dt$), podemos observar que el primer momento de la distribución es nulo, indicando que la dirección de movimiento de la partícula es equiprobable. Por otro lado, el segundo momento no

es nulo, y a partir del mismo se deduce la ecuación del desplazamiento cuadrático medio (*mean squared displacement, MSD*)

$$MSD(\tau) = \langle \Delta x(\tau)^2 \rangle = 2D\tau \quad Ec. (1.2)$$

donde $\Delta x(\tau)$ es la distancia recorrida por una molécula luego de un tiempo de retardo τ . En su forma más genérica, la ecuación 1.2 se puede escribir como

$$MSD(\tau) = \langle \Delta \vec{r}(\tau)^2 \rangle = 2nD\tau \quad Ec. (1.3)$$

donde n es la dimensionalidad del sistema (1, 2 ó 3 para difusión en 1, 2 y 3 dimensiones, respectivamente).

1.2.2 Difusión anómala

Habitualmente la relación descrita por la ecuación 1.3 no se verifica en medios más complejos, y el proceso se denomina "difusión anómala". Esta denominación involucra una relación empírica no lineal entre el desplazamiento cuadrático medio y el tiempo:

$$MSD = A\tau^\alpha \quad Ec. (1.4)$$

donde A es una constante y α es el coeficiente de difusión anómala[21].

Si $\alpha > 1$, el proceso se denomina superdifusión, mientras que valores inferiores a 1 determinan un proceso subdifusivo. Estas definiciones no proveen información acerca de los procesos que causan difusión anómala, los cuales, como veremos más adelante, pueden ser muy variados. En la Figura 1.3 se presenta un esquema del comportamiento esperado para el MSD para tres tipos muy sencillos de difusión.

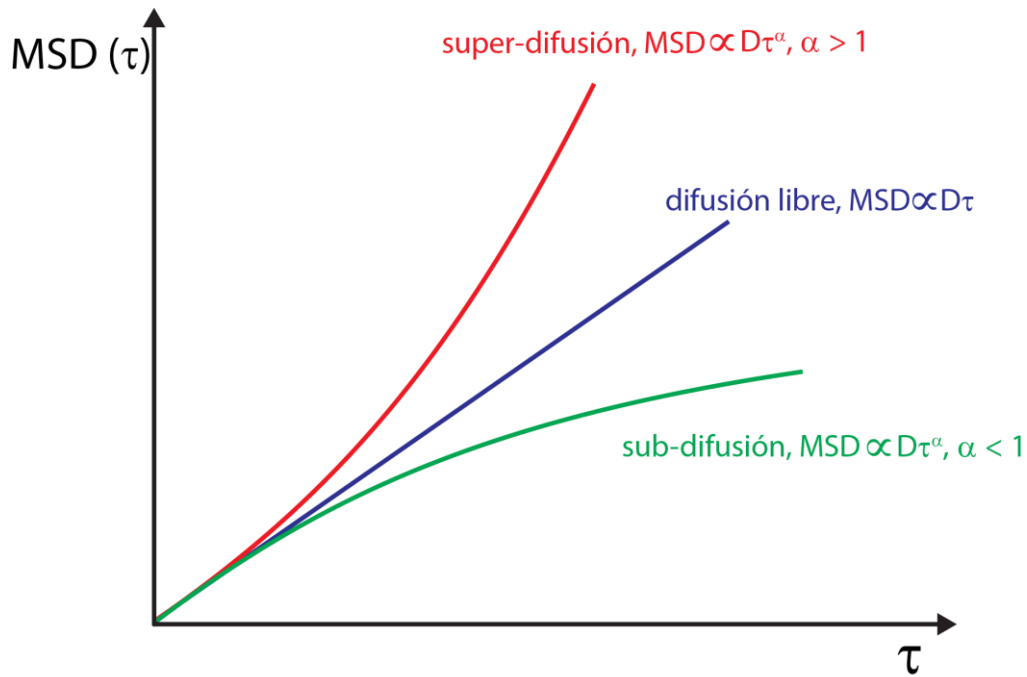


Figura 1.3: relación entre el MSD y el tiempo de retardo para los tres casos de difusión: difusión libre (azul), super-difusión (rojo) y sub-difusión (verde).

En el entorno celular, el comportamiento superdifusivo es comúnmente observado en fenómenos de transporte activo mediado por motores moleculares[22, 23]. En este caso, el transporte es guiado sobre segmentos de filamentos curvilíneos con la posibilidad de cambios de direcciones por este motivo, los valores de coeficientes anómalos se encuentran entre $1 < \alpha < 2$, siendo el límite superior denominado difusión balística.

Por su gran relevancia en numerosos sistemas, el comportamiento subdifusivo de moléculas ha sido estudiado experimental y teóricamente. En las siguientes secciones, describiremos en detalle dos procesos que pueden dar lugar a subdifusión y son relevantes para el desarrollo de este trabajo de tesis.

1.2.2.1 Difusión anómala causada por colisiones con obstáculos

El fenómeno de subdifusión ocasionado por colisiones con obstáculos puede ser explicado intuitivamente tal como se ilustra en la Figura 1.5: los choques entre las partículas que difunden y los obstáculos restringen la movilidad de las mismas y como

consecuencia, su movimiento se retrasa respecto al de una partícula moviéndose libremente.

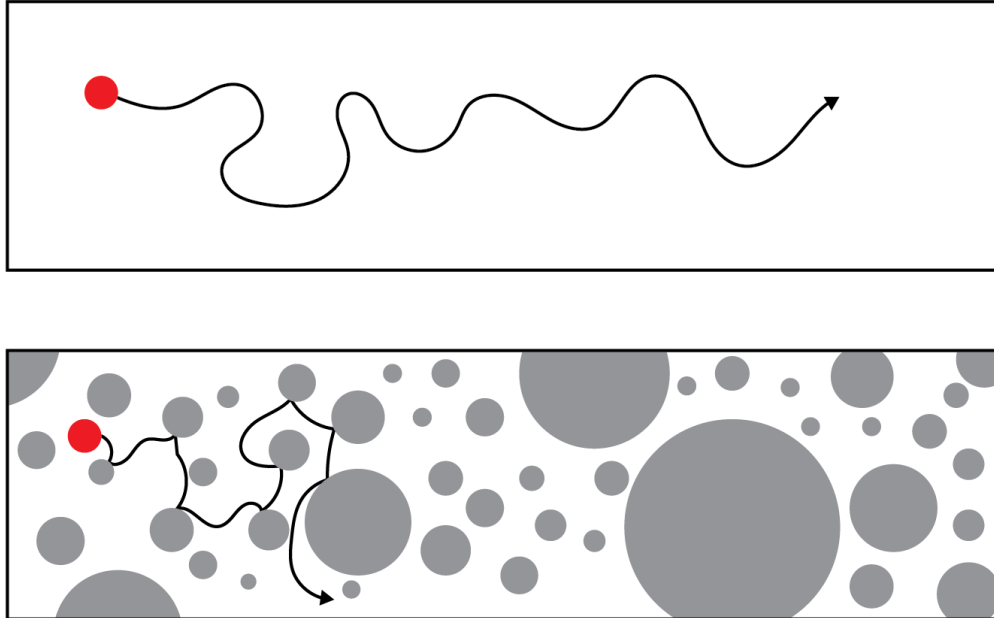


Figura 1.4: comparación entre difusión libre (panel superior) y subdifusión ocasionada por choques con obstáculos (panel inferior). En ambos casos, la flecha denota una trayectoria de igual duración temporal. En el caso de choques con obstáculos, la distancia recorrida en este período de tiempo es menor.

Saxton et al. [9] estudiaron mediante simulaciones de Monte Carlo (similares a las que se describirán en la sección 1.4) la difusión de moléculas en un amplio rango de concentración de obstáculos distribuidos al azar hasta el umbral de percolado [10, 24]. En la Figura 1.5 se presenta uno de los resultados obtenidos en este trabajo teórico.

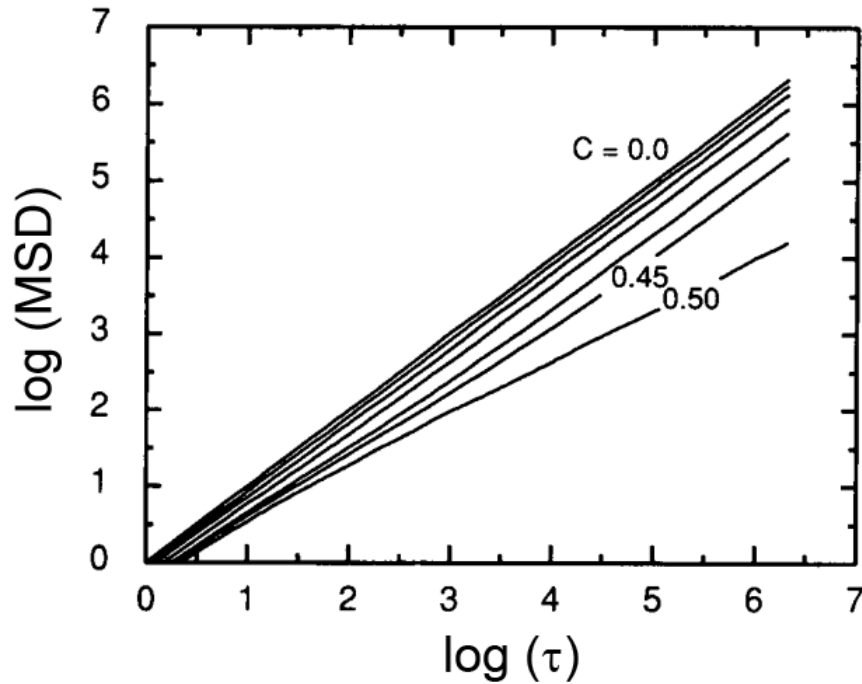


Figura 1.5: gráfico logarítmico del MSD para distintas concentraciones de obstáculos. La pendiente de cada línea es equivalente al coeficiente de difusión anómala. Adaptado de [9].

El parámetro C representa una normalización de la concentración de obstáculos: a mayor valor de C , mayor concentración de obstáculos. En un gráfico logarítmico del MSD, la pendiente corresponde al coeficiente anómalo α (ecuación 1.4). Estos resultados demuestran que, al aumentar la concentración de obstáculos, las trayectorias se vuelven más tortuosas y como consecuencia, la anomalía (reflejada en el parámetro α) aumenta. Dado que la probabilidad de encontrar la molécula en un instante de tiempo a una dada distancia es menor para el escenario con obstáculos, su MSD es menor (Figura 1.3).

Estos autores también verificaron que, a tiempos de retardo largos, se observaría una transición a un régimen de difusión normal. Esta dependencia temporal se puede observar en un gráfico logarítmico del cociente entre el MSD y el tiempo de retardo en función del tiempo de retardo. Al reescribir la ecuación 1.4 de esta manera, una pendiente horizontal corresponde a difusión libre (Figura 1.6).

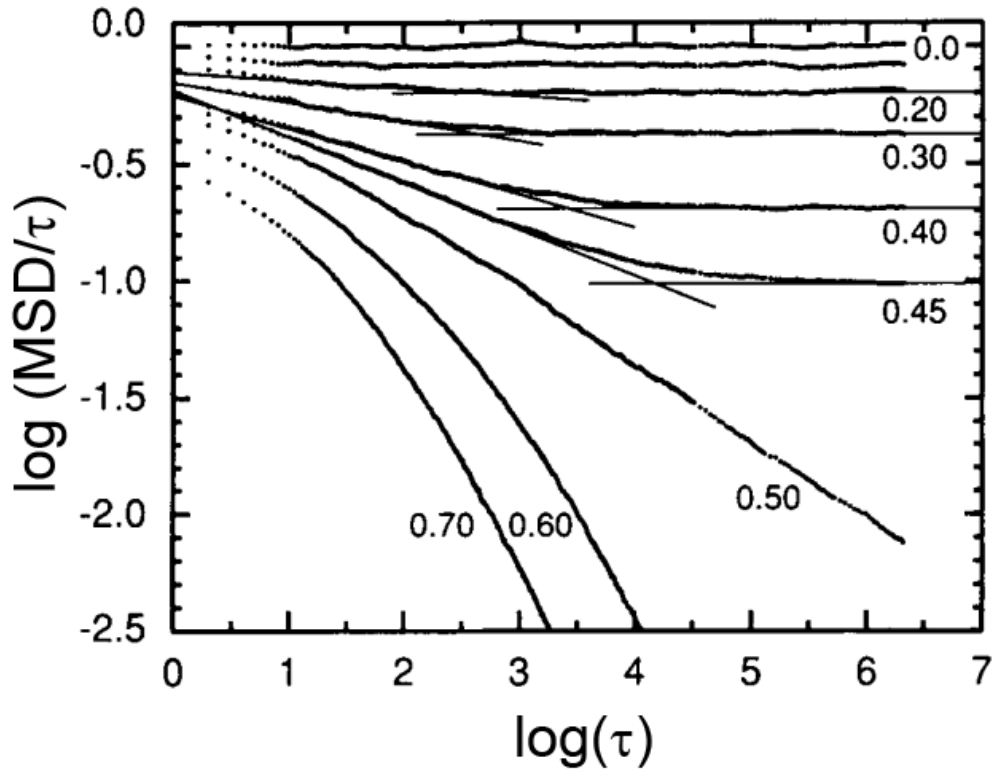


Figura 1.6: gráfico logarítmico del cociente MSD/τ para distintas concentraciones de obstáculos. En este gráfico, una pendiente horizontal representa difusión normal ($\alpha = 1$). Adaptado de [9].

Esta transición entre regímenes puede ser explicada al observar el entorno de las moléculas en cada escala temporal. A tiempos de retardo cortos, la difusión de las moléculas es tortuosa debido a los obstáculos. Sin embargo, a tiempos de retardo mayores, el espacio explorado por las moléculas es más homogéneo (ya que los obstáculos se distribuyen al azar), ocasionando una difusión aparentemente normal, pero con un coeficiente de difusión efectivo menor. El punto de quiebre entre ambos regímenes depende de la concentración de obstáculos, como se puede observar en la Figura 1.6.

Estos modelos se han aplicado para caracterizar la difusión de moléculas en entornos atestados como células vivas. Por ejemplo, Di Rienzo et al.[6] y Baum et al.[5] estudiaron la difusión de GFP en el citoplasma mediante técnicas de correlación de fluorescencia (descriptas en la sección 1.3.2). En este trabajo, los autores observaron un comportamiento difusivo anómalo y sugirieron que el mismo se debía al comportamiento viscoelástico del medio intracelular. Estos resultados implican que

moléculas tan chicas como GFP (un cilindro de 42 Å de largo por 24 Å de diámetro[25]) ya presentan comportamiento anómalo, ilustrando el impacto del entorno atestado en cualquier proceso biológico que requiera una precisa regulación espacial de moléculas.

Si bien en una primera instancia se puede pensar que los entornos atestados reducen la velocidad de una reacción, se ha demostrado que este no es el caso en ciertas condiciones experimentales. En particular, Guigas et al.[8] demostraron que la difusión anómala ocasionada por entornos atestados, en vez de entorpecer los procesos celulares relacionados a eventos de unión, aumentan la probabilidad de los mismos, debido a que reducen el espacio a explorar por las moléculas previo a encontrar su sitio de unión.

1.2.2.2 Difusión anómala causada por interacciones

El segundo mecanismo propuesto para explicar procesos de difusión anómala es el de interacciones con blancos fijos o móviles. De manera similar al caso anterior, la interacción con sitios de unión retrasa la difusión de las moléculas, ocasionando que recorran una distancia menor comparada con el caso de difusión libre (Figura 1.7).

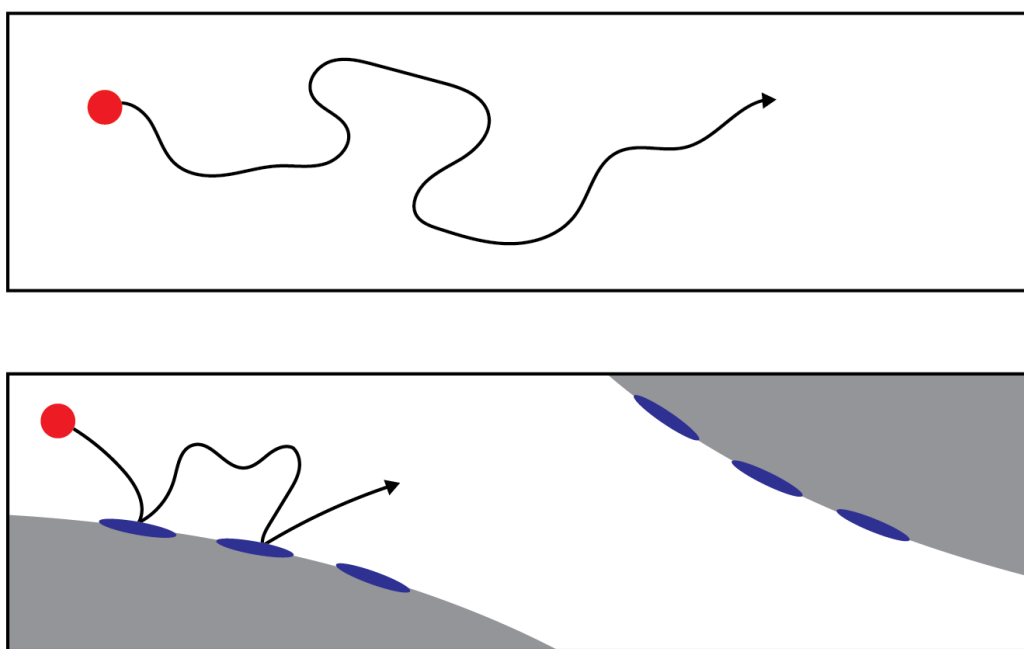


Figura 1.7: comparación entre difusión libre (panel superior) y subdifusión ocasionada por interacción con sitios de unión (panel inferior). En ambos casos, la flecha denota una trayectoria de igual duración temporal. En el caso de interacción con sitios de unión, la distancia recorrida en ese tiempo es menor.

En particular, Saxton estudió teóricamente el fenómeno de difusión anómala causada por interacciones[26]. La motivación fundamental de este estudio era comprender si la interacción con proteínas de membrana que actúan como sitios de unión puede ser responsable de la difusión anómala de sus ligandos. Entre los modelos estudiados se encuentran sitios de unión puntuales fijos que unen moléculas cercanas, poblaciones de sitios con distribuciones de energías de unión y modelos de valle y montañas para los perfiles energéticos, observando difusión anómala en la cercanía de los sitios de unión.

En dos trabajos seminales, Platani et al.[27, 28] estudiaron la difusión de cuerpos de Cajal en el núcleo de células HeLa; mencionamos en particular este trabajo ya que en la presente tesis exploraremos ciertos procesos difusivos en el núcleo celular. Los autores verificaron que estos cuerpos presentan difusión anómala caracterizada por $\alpha = 0.67$, en un intervalo de tiempo muy grande (segundos a horas). Al tratar las células con un inhibidor de la transcripción (actinomicina D) observaron una difusión más rápida y menos anómala (i.e. un valor de alfa más próximo a 1). Por otra parte, al privar a la célula de energía la difusión se vuelve más rápida y la ventana temporal de la difusión anómala

más corta. Los autores concluyeron que esta difusión anómala varía con la función biológica y provee información sobre posibles interacciones entre, en este caso, los cuerpos de Cajal y sitios de transcripción.

Similarmente, Markovitz et al.[29] estudiaron cómo la interacción de proteínas con ADN se ve facilitada por una difusión anómala ocasionada por la reducción en el espacio a explorar. Esta difusión facilitada, que combina difusión 3D junto con deslizamiento sobre el ADN y saltos entre segmentos, aumenta la efectividad en la búsqueda de sitios de unión. Estos mecanismos serán profundizados en el capítulo 2 debido a su relevancia para este trabajo de tesis.

Estas contribuciones iniciales en el área abrieron las puertas a numerosas preguntas relacionadas con los mecanismos de reacción en el núcleo celular, las cuales comenzaron a ser respondidas con la aparición de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia, herramientas que permitieron observar el movimiento de moléculas *in situ*.

1.3 Herramientas de estudio para mecanismos de difusión

1.3.1 Microscopía confocal

El desarrollo de la microscopía confocal fue, y continúa siendo, impulsado por el deseo de investigar procesos biológicos *in vivo*. La invención del microscopio confocal es atribuida a Marvin Minsky, quien construyó un microscopio confocal en 1955 para obtener imágenes de redes neuronales en preparados de cerebros[30]. Todos los microscopios confocales modernos, por definición, emplean el mismo principio de obtención de imágenes confocales patentado por Minsky en 1957[31], aunque el término confocal fue introducido muchos años después[32].

En el microscopio original de Minsky, la fuente de iluminación puntual se lograba colocando una apertura confocal (*pinhole*) frente a una lámpara de arco de zirconio. La fuente de luz puntual era enfocada sobre la muestra y la luz que atravesaba la misma se enfocaba por un segundo objetivo sobre un segundo *pinhole* ubicado en un plano

conjugado o confocal. La luz que atraviesa el segundo *pinhole* impacta sobre un fotomultiplicador de bajo ruido que produce una señal proporcional a la intensidad de luz recolectada (Figura 1.8).

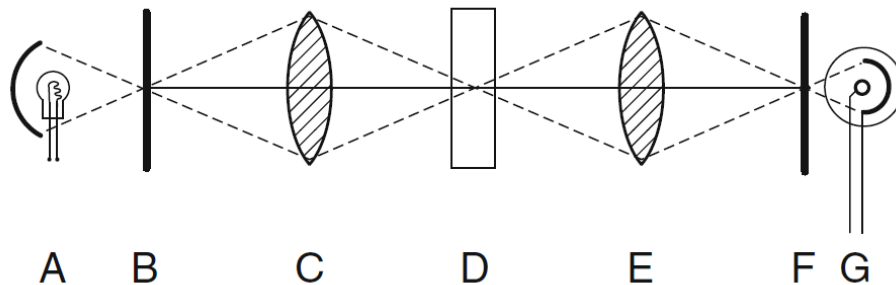


Figura 1.8: esquema del microscopio confocal de luz transmitida de Minsky. La fuente de luz puntual es generada por una lámpara de zirconio (A) y un pinhole posicionado frente a la misma (B). La luz es enfocada por un objetivo (C) sobre la muestra (D), y la luz que atraviesa la misma es enfocada por un segundo objetivo (E) sobre un segundo pinhole (F). La luz que atraviesa la muestra es recolectada por un fotomultiplicador (G). Adaptado de [33].

La clave de la microscopía confocal es la eliminación de la luz proveniente de planos que no sean el plano focal utilizando un *pinhole* para rechazar la luz fuera del plano focal. Minsky también describió una versión del microscopio confocal que utiliza luz reflejada, un único objetivo y un arreglo de espejos dicróicos (Figura 1.9). Este arreglo experimental eliminó la tediosa tarea de alinear ópticamente dos objetivos al utilizar un único objetivo para la iluminación y detección. Este diseño de epi-iluminación es la configuración básica de los sistemas confocales modernos utilizados hasta el día de hoy.

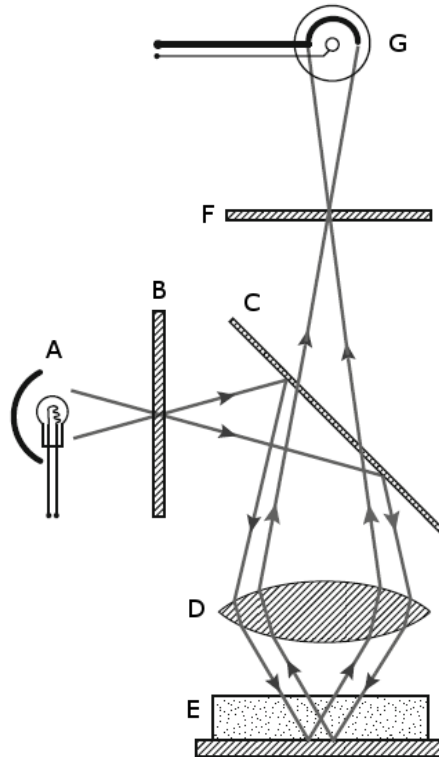


Figura 1.9: esquema del microscopio confocal de epiiluminación de Minsky. La fuente de luz puntual es generada por una lámpara de zirconio (A) y un pinhole posicionado frente a la misma (B). La luz es reflejada por un espejo dicróico (C) y enfocada por el objetivo (D) sobre la muestra (E). La luz de mayor longitud de onda es reflejada, enfocada por el mismo objetivo y transmitida por el espejo dicróico, para luego ser filtrada por un segundo pinhole (F) y colectada por el fotomultiplicador (G). Adaptado de [33].

Para obtener una imagen, la fuente de luz puntual debe recorrer la muestra, registrando la intensidad punto a punto. En el microscopio original de Minsky el haz de luz era estacionario y la muestra se movía. Este arreglo óptico poseía la ventaja de que el eje óptico permanecía inalterado, eliminando defectos de las lentes. Sin embargo, el barrido y, como consecuencia la obtención de una imagen, era relativamente lenta debido a limitaciones técnicas de la época, haciendo prácticamente imposible la aplicación de esta metodología a la observación de especímenes vivos.

Se necesitaron varios avances tecnológicos para explotar la idea original y revolucionaria de Minsky y aplicarla al campo de la biología. En particular, el desarrollo de láseres estables y de alto brillo como fuente de iluminación, espejos y filtros más eficientes, mejoras en la electrónica para la detección y el escaneo de la muestra, fotodetectores de alto rendimiento cuántico y bajo ruido y mejoras en la adquisición y análisis de resultados permitieron grandes avances en el desarrollo de esta microscopía.

El uso de la microscopía confocal tuvo un salto de calidad por el desarrollo de métodos eficientes para el barrido del volumen de iluminación sobre la muestra. En particular, se diseñaron metodologías para barrer la fuente de iluminación sobre la muestra, en forma análoga a la forma en que los ojos recorren una página al leer un libro. Esta metodología resulta más rápida, y como consecuencia, más práctica para trabajar con muestras biológicas.

Fundamentalmente, se diseñaron dos métodos para barrer el láser sobre la muestra moviendo la fuente de iluminación que incluyen un único o múltiples haces. El método de simple haz es el método más común utilizado, siendo el más claro ejemplo la microscopía confocal por barrido de laser (*laser scanning confocal microscopy, LSM*). En esta modalidad, el escaneo de la muestra es logrado utilizando espejos incorporados a monturas acopladas a motores galvanométricos controlados por computadora para modular espacialmente un haz láser sobre la muestra.

El sistema LSMC está construido en base a un microscopio de epi-fluorescencia convencional, en configuración derecha, popular en trabajos con animales, o en configuración invertida, utilizado principalmente para el trabajo con cultivos celulares (Figura 1.10).

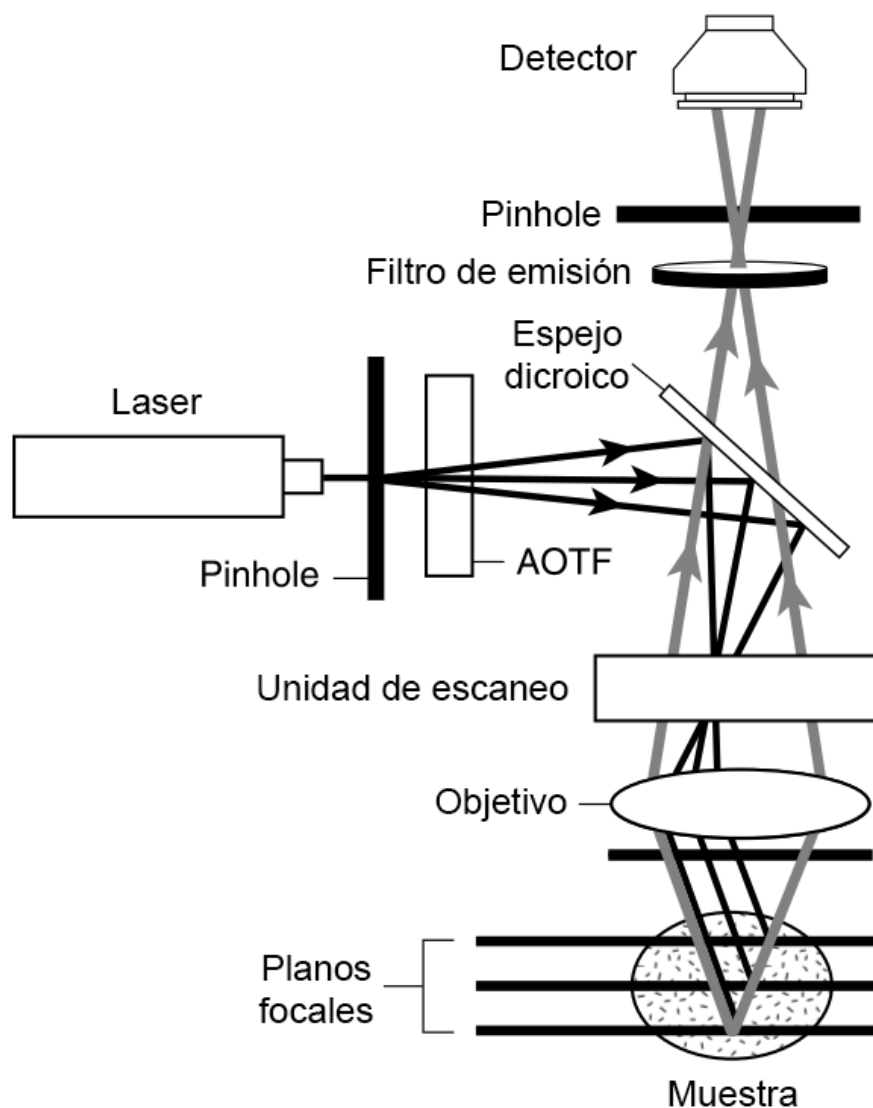


Figura 1.10: componentes principales de un LSCM derecho. La luz de uno o más láseres pasan por un pinhole, es atenuada y filtrada por el AOTF, reflejada por el espejo dicróico y es recibida por la unidad de escaneo. El láser es enfocado por un objetivo sobre la muestra en el plano focal deseado (línea gris). La fluorescencia obtenida por la excitación y emisión de las moléculas fluorescentes en colectada por el mismo objetivo. Como esta luz es de mayor longitud de onda es transmitida por el espejo dicróico, filtrada espectralmente y enfocada en un segundo pinhole. La luz que provenga de otros planos focales (líneas negras) es rechazada por el pinhole. Finalmente, la fluorescencia colectada es cuantificada por un detector. Adaptado de [33].

Los microscopios confocales generalmente se complementan con los accesorios requeridos para microscopía óptica y de fluorescencia de campo amplio para facilitar la observación rápida de regiones extensas de la muestra previa a la adquisición en modo confocal. Los equipos de LSCM modernos utilizan láseres como fuentes de iluminación en vez de lámparas, filtros ajustables acusto-ópticos (*acousto-optical tunable filter*, *AOTF*) para seleccionar la longitud de onda de excitación y la potencia del láser, espejos dicróicos para separar la luz de acuerdo a sus propiedades espectrales,

fotomultiplicadores sensibles para la detección y computadoras para controlar el microscopio, adquirir y manipular los datos. Mediante una adecuada selección de láseres, filtros, dicróicos y detectores es posible excitar y registrar simultáneamente la fluorescencia de fluoróforos con distintas propiedades espectrales.

En LSCM, la iluminación y detección están confinadas a un punto limitado por difracción, llamado volumen confocal o PSF (*point spread function*). Como veremos más adelante (sección 1.3.2), la forma, tamaño y propiedades de este volumen confocal son importantes para las técnicas de correlación y fluctuaciones de fluorescencia, por lo tanto, es importante que dicho volumen esté bien caracterizado. El perfil de observación, en el caso de excitación por absorción de un fotón, puede ser aproximado por una gaussiana 3D:

$$p(\vec{r}) = I_0 \times \exp\left(\frac{-2(x^2 + y^2)}{\omega_{xy}^2} + \frac{-2z^2}{\omega_z^2}\right) \quad Ec. (1.5)$$

donde ω_{xy} y ω_z son los radios ecuatorial y axial del volumen, respectivamente (Figura 1.11), definidos como la distancia a la cual la intensidad cae a I_0/e^2 [34]. Si el volumen de observación gaussiano es descrito con la fórmula anterior, el volumen efectivo del mismo se calcula de acuerdo a [34]

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_{xy}^2 \omega_z \quad Ec. (1.6)$$

En condiciones estándar en un experimento de microscopía confocal, $\omega_{xy} \approx 0.2\mu m$ y $\omega_z \approx 1.0\mu m$, por lo cual el volumen efectivo de la PSF se encuentra en el orden de 0.2 fL.

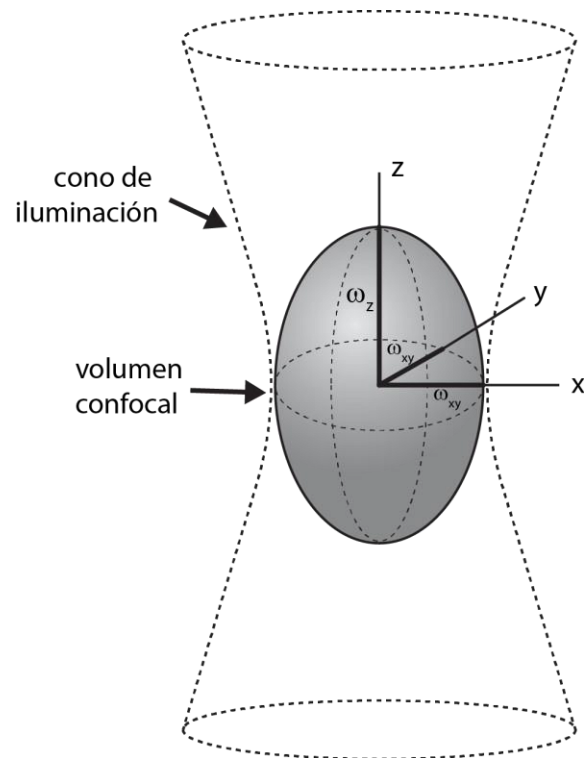


Figura 1.11: volumen de observación en un microscopio confocal y parámetros geométricos del mismo.

1.3.2 Técnicas experimentales para el estudio de difusión e interacciones *in vivo*

1.3.2.1 Fotoblanqueo y recuperación de la fluorescencia

La técnica de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) data de la década del 1970 y fue una de las técnicas más utilizadas en ese período para el estudio del movimiento de biomoléculas en especímenes vivos[35-37]. La Figura 1.12 esquematiza un experimento típico de FRAP.

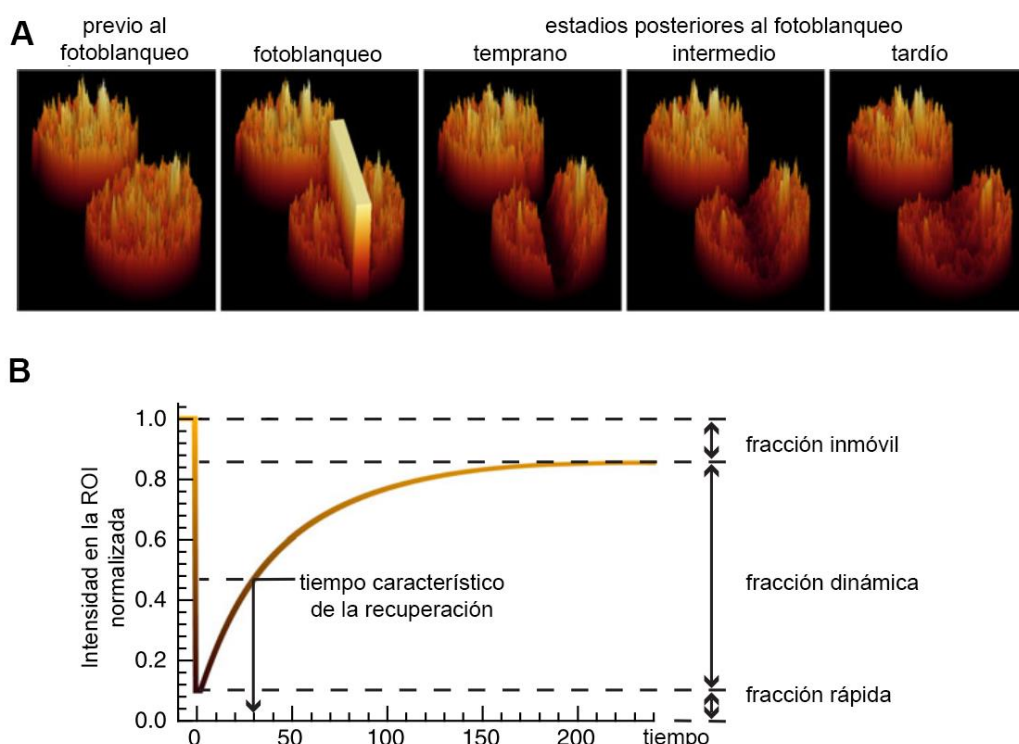


Figura 1.12: (A) experimento típico de FRAP mostrando dos regiones fluorescentes, la zona de interés (abajo) y una zona de referencia (arriba) para distintos estadios del mismo. En ambos casos, la altura de la zona (eje Z) es proporcional a la intensidad de fluorescencia. (B) curva típica de FRAP (intensidad de fluorescencia en función del tiempo) mostrando la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia y los parámetros extraíbles de la curva. Adaptado de[38].

Brevemente, la técnica consiste en “apagar” (fotoblanquear) las moléculas fluorescentes en una región de la muestra. Las moléculas apagadas u oscuras se intercambian con moléculas fluorescentes que se encontraban originalmente fuera de la zona fotoblanqueada, por lo cual la intensidad de fluorescencia en la región blanqueada aumenta con el tiempo; la velocidad de recuperación depende de la tasa de recambio de las moléculas y, por ende, de su movilidad.

Originalmente, los experimentos de FRAP sólo podían realizarse en microscopios diseñados especialmente para esta tarea y dependían de la dificultosa introducción de biomoléculas marcadas con sondas fluorescentes en las células. FRAP se hizo más popular y accesible en la segunda mitad de la década del 1990 por dos motivos. Primero, la oferta de LSCM comerciales con buena resolución, velocidad, sensibilidad y flexibilidad permitieron la realización de experimentos de fotoblanqueo[39]. Segundo, el descubrimiento de la *green fluorescent protein (GFP)* y de proteínas fluorescentes

derivadas de GFP, junto con avances en la biología molecular, revolucionaron la marcación de proteínas *in vivo*[40].

El fotoblanqueo es la transición irreversible fotoinducida de un fluoróforo a un estado no fluorescente. Anteriormente, la velocidad de fotoblanqueo era asumida como proporcional a la intensidad de iluminación[35, 41], sin embargo, otros trabajos más recientes observaron un alejamiento del comportamiento lineal[42, 43]. Estas discrepancias pueden ser explicadas mediante un diagrama de Jablonski (Figura 1.13A). Bajo iluminación constante, las moléculas son excitadas desde el estado fundamental S_0 a un estado singulete excitado S_1 y, luego de un cierto tiempo, decaen nuevamente al estado fundamental S_0 con la emisión de un fotón. Luego, la ocupación en estado estacionario de los estados S_1 o T_1 (estado triplete excitado) dependen proporcionalmente de la intensidad de iluminación[44]. Suponiendo que el proceso de fotoblanqueo ocurre por la posterior excitación de fluoróforos en estados excitados S_1 o T_1 [45], la velocidad de fotoblanqueo no depende linealmente de la intensidad de iluminación. A modo de ejemplo, la Figura 1.13B muestra la relación entre la velocidad de fotoblanqueo de la sonda fluoresceína y la intensidad de iluminación [44]

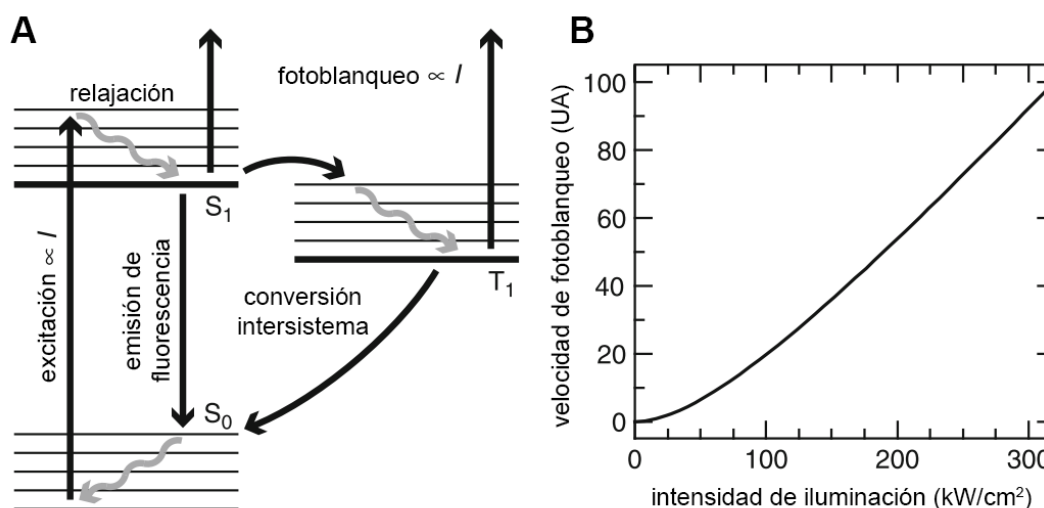


Figura 1.13: (A) diagrama de Jablonski de estados electrónicos de un fluoróforo típico, mostrando las transiciones electrónicas entre estados involucrados en excitación, emisión de fluorescencia, conversión a triplete, conversión intersistema y fotoblanqueo. (B) dependencia no lineal de la velocidad de fotoblanqueo con la intensidad de iluminación. Adaptado de [38].

En un experimento típico de FRAP (Figura 1.12A), la intensidad de fluorescencia en estado estacionario de una región de interés (*region of interest, ROI*) de la muestra es registrada en condiciones de baja intensidad de iluminación. A continuación, las moléculas fluorescentes incluidas en la ROI son fotoblanqueadas rápidamente y de manera irreversible con un láser de alta potencia. Debido a difusión y otros mecanismos de transporte las moléculas fotoblanqueadas son intercambiadas por moléculas fluorescentes dentro de la ROI. Esta redistribución es registrada en condiciones de baja potencia de iluminación (para evitar nuevo fotoblanqueo), y a partir de la recuperación de la intensidad de fluorescencia dentro de la ROI (Figura 1.12B) es posible extraer parámetros como coeficientes de difusión, fracciones de población totalmente móvil, inmóvil y dinámica o tiempos de residencia en sitios de unión. Para evitar artefactos ocasionados por el fotoblanqueo durante la adquisición de la imagen o pérdidas de intensidad por derivas del foco se registra también la intensidad en una zona de referencia, utilizada para normalizar la intensidad de fluorescencia (más detalle en el Capítulo 5).

Para obtener parámetros dinámicos de los procesos en estudio, la fluorescencia promedio dentro de la ROI fotoblanqueada es promediada, normalizada y graficada en función del tiempo, permitiendo extraer parámetros cinéticos del sistema (Figura 1.12B). Como se detallará a continuación, a veces los datos experimentales son ajustados con ecuaciones empíricas que reportan parámetros efectivos, o simplemente se informa el tiempo medio de recuperación, debido a la complejidad de los modelos de FRAP.

Dependiendo de los valores de los coeficientes de difusión y constantes cinéticas de los eventos de unión, las curvas de FRAP obtenidas en células son analizadas con modelos que incluyen difusión pura, difusión efectiva, difusión desacoplada de unión o reacción-difusión acopladas[46-49]. En los últimos dos casos, la unión corresponde a interacciones con blancos celulares, y la relación entre las constantes cinéticas de asociación y los tiempos característicos de difusión determina si ambos procesos están acoplados o no. Muchas veces es un desafío discernir claramente el mecanismo subyacente a la curva de FRAP, y los resultados dependen intrínsecamente de las

condiciones experimentales, pudiendo llevar a mala interpretación de los resultados[50-55]. En muchos casos, la interpretación de los datos de FRAP depende sensiblemente de la forma y tamaño de la ROI y se complica aún más si el recambio de moléculas es apreciable durante el período de fotoblanqueo.

En resumen, FRAP es una técnica versátil para estudiar cuantitativamente la dinámica de moléculas en diversos sistemas como células vivas y tejidos. Sin embargo, la técnica posee sus limitaciones, principalmente la baja resolución espacial al promediar grandes zonas de la muestra y el someter a especímenes vivos a altas potencias de iluminación que pueden fotodañarlas. Si bien continúa siendo utilizada, ha sido reemplazada por técnicas menos dañinas para la muestra, más sensibles y de mayor resolución, que serán detalladas a continuación.

1.3.2.2 *Técnicas basadas en el estudio de fluctuaciones de fluorescencia*

En las últimas décadas, la espectroscopía de correlación de fluorescencia (*fluorescence correlation spectroscopy, FCS*) se ha convertido en una técnica de amplio uso para el estudio de procesos moleculares dinámicos. Se ha utilizado para la medición de concentraciones locales, coeficientes de difusión, constantes cinéticas e interacciones moleculares tanto *in vitro* como *in vivo*[56-58]. La sensibilidad y naturaleza no invasiva de la técnica son las claves que permiten estudiar procesos moleculares en células vivas.

Los métodos de análisis de fluctuaciones de fluorescencia se basan en la detección y el estudio de fluctuaciones espontáneas en la intensidad de fluorescencia causadas en un sistema abierto en equilibrio térmico. Ejemplos claros de procesos que pueden causar estas fluctuaciones son la difusión de moléculas, procesos fotofísicos (transiciones singulete-triplete) e interacciones con sitios de unión. En esta tesis, nos concentraremos en el estudio de fluctuaciones causadas por el movimiento de moléculas y nos centraremos en su observación en experimentos que utilizan microscopía confocal.

Para que las fluctuaciones mencionadas sean observables, es deseable trabajar con soluciones diluidas de fluoróforos y volúmenes de observación pequeños (característica trivial de la microscopía confocal). La necesidad de bajas concentraciones y volúmenes

chicos para observar las fluctuaciones puede ser entendida con una simple analogía: observar la entrada y salida de personas en el público de un recital es prácticamente imposible, mientras que observar la entrada y salida de una persona en un cuarto chico vacío es trivial.

Uno de los procesos más sencillos que pueden causar fluctuaciones es la difusión de moléculas fluorescentes. Cualitativamente, la duración de las fluctuaciones depende del movimiento de las moléculas: moléculas lentas producen fluctuaciones duraderas en el tiempo, mientras que moléculas rápidas ocasionan fluctuaciones rápidas. Paralelamente, la amplitud relativa de estas fluctuaciones está relacionada con la concentración de las moléculas dentro del volumen confocal (Figura 1.14). Generalmente, la amplitud de estas fluctuaciones es similares a la del ruido experimental y no se pueden identificar claramente en la traza de intensidad. Para subsanar este inconveniente se apelan a técnicas estadísticas de correlación temporal, aprovechando el hecho de que la mayoría de los ruidos involucrados en estos experimentos son eventos azarosos y por lo tanto no presenta correlación temporal.

FCS permite extraer información cuantitativa de los procesos que producen las fluctuaciones, calculando la función de autocorrelación de la traza de intensidad. La función de autocorrelación, como su nombre lo indica, correlaciona una serie temporal consigo misma desfasada un tiempo τ , de acuerdo a

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \times \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad Ec. (1.7)$$

donde $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$ es la fluctuación de la intensidad, definida como la diferencia entre la intensidad de fluorescencia y el promedio temporal de la intensidad de fluorescencia.

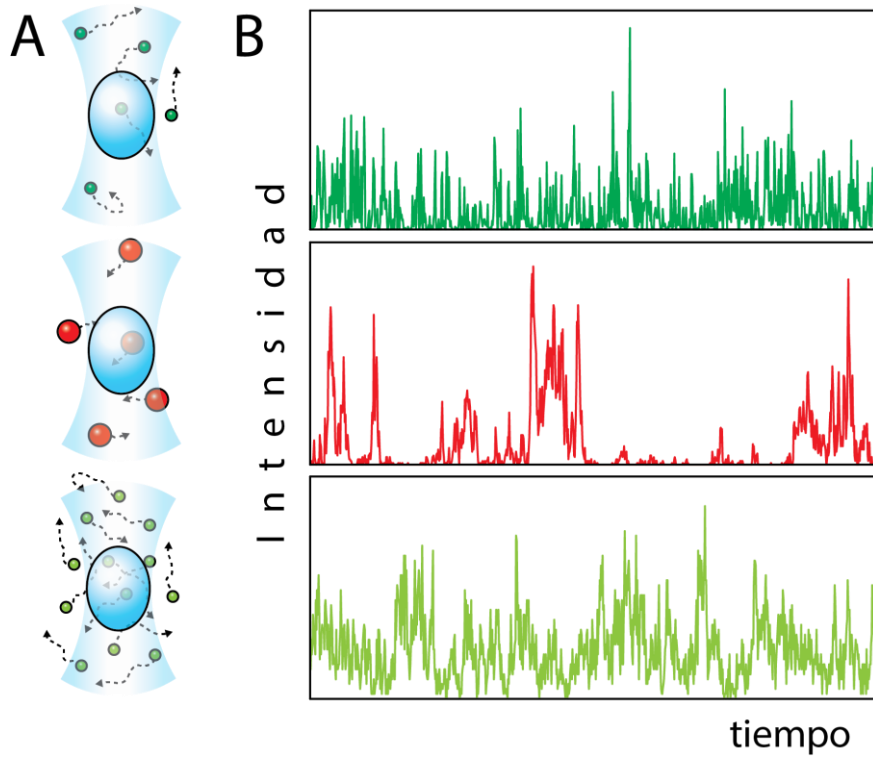


Figura 1.14: esquema representativo de tres escenarios de difusión de moléculas a distintas concentraciones y s con diferentes coeficientes de difusión (A) y trazas de intensidad esperadas en cada caso (B). Moléculas rápidas (paneles superior e inferior) ocasionan fluctuaciones rápidas, mientras que moléculas lentas (panel central) ocasionan fluctuaciones lentas. La amplitud relativa de las fluctuaciones es proporcional a la cantidad de moléculas en el volumen de observación (comparar los paneles superior e inferior de la figura). Los tres gráficos poseen la misma escala en el eje vertical.

En muchos casos, el modelado teórico de los mecanismos moleculares que producen las fluctuaciones de fluorescencia y de la forma y parámetros del volumen confocal permiten obtener una solución analítica para la función de autocorrelación [59-62]. La curva de autocorrelación experimental es analizada con la solución analítica para recuperar información cuantitativa de los mecanismos que originaron las fluctuaciones.

Para el caso de difusión browniana en 3 dimensiones y un volumen confocal gaussiano [63], la función de autocorrelación es de la forma

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\omega^2 \tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. (1.8)}$$

donde $\tau_D = \omega_{xy}^2 / 4D$ es el tiempo característico de difusión, D el coeficiente de difusión de la molécula, $\omega = \omega_z / \omega_{xy}$ es el cociente entre el radio axial y ecuatorial de la PSF, respectivamente, y $\langle N \rangle$ es el promedio del número de moléculas en el volumen confocal.

Este procedimiento permite calcular el coeficiente de difusión de las moléculas a partir del tiempo característica de la curva de autocorrelación y la concentración de las moléculas a partir de la extrapolación a $\tau \rightarrow 0$ de la función de correlación. En la Figura 1.15 se observan las diferencias cualitativas en las curvas de autocorrelación de los escenarios presentados en la Figura 1.14.

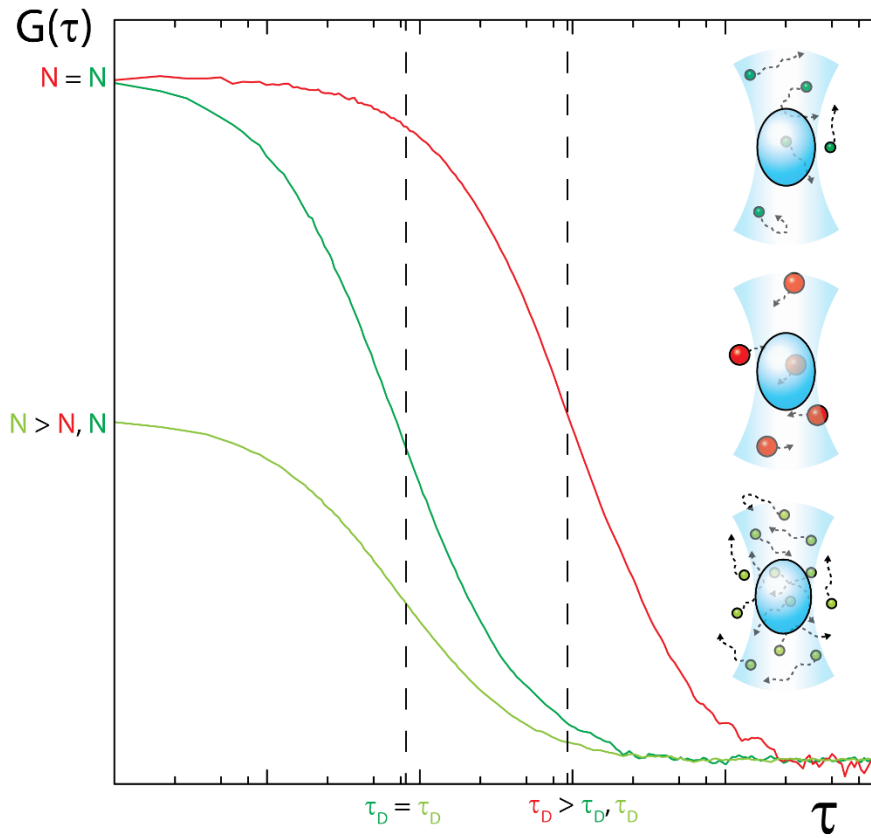


Figura 1.15: diferencias cualitativas en las curvas de autocorrelación obtenidas para los escenarios mostrados en la Figura 1.14. Las moléculas rojas y verdes se encuentran a la misma concentración, pero poseen distintos coeficientes de difusión. Por este motivo, las curvas convergen al mismo punto a $\tau \rightarrow 0$ pero el tiempo característico de difusión (τ_D) de las moléculas rojas es mayor. Las moléculas verdes y verde claro poseen el mismo coeficiente de difusión, pero al haber más moléculas verdes claro en el volumen confocal la ordenada de la curva de autocorrelación es menor.

Una de las mayores desventajas de las medidas de FCS puntual es que solamente arrojan información sobre un volumen muy pequeño de la muestra. Para sobrellevar esta

limitación y obtener resolución e información espacial, fueron desarrolladas nuevas técnicas que incluyen medir en muchos volúmenes confocales simultáneamente[64, 65] o escanear la muestra repetitivamente moviendo el láser de forma linear (*line scan*), en un área (*raster scan*) o recorriendo una órbita (*orbital scan*)[66-68] registrando así la intensidad en cada píxel del área barrida en función del tiempo. Estos últimos métodos poseen la ventaja de ser fácilmente realizables en microscopios confocales estándares, sin la necesidad de adicionales costosos o difíciles de implementar.

En los últimos tiempos, se produjeron importantes avances en el área de óptica y electrónica que permitieron el desarrollo de técnicas para confinar la excitación a una sección muy fina de la muestra. Técnicas que aprovechan la reflexión interna total (*total internal reflection fluorescence, TIRF*)[69] o que generan un plano de excitación perpendicular o inclinado respecto al plano de detección (por ejemplo, *single plane illumination microscopy, SPIM*)[70] en combinación con cámaras de alta velocidad y sensibilidad permitieron la colección simultánea y paralela de la intensidad de fluorescencia en múltiples puntos de la muestra. Estos desarrollos constituyen la base de los métodos de *imaging FCS*[71-73], técnicas que permiten calcular la función de autocorrelación para cada píxel del área escaneada y obtener mapas con información dinámica del sistema (Figura 1.16). Las técnicas de *imaging FCS* están generalmente restringidas al estudio de procesos relativamente lentos, debido a que la resolución temporal está limitada a la velocidad de adquisición de la cámara (milisegundos). Sin embargo, adelantos en la electrónica están permitiendo el registro de áreas relativamente grandes en tiempos del orden de milisegundos a microsegundos, acercándose a las frecuencias de muestreo de las medidas de FCS puntuales sin sacrificar resolución espacial.

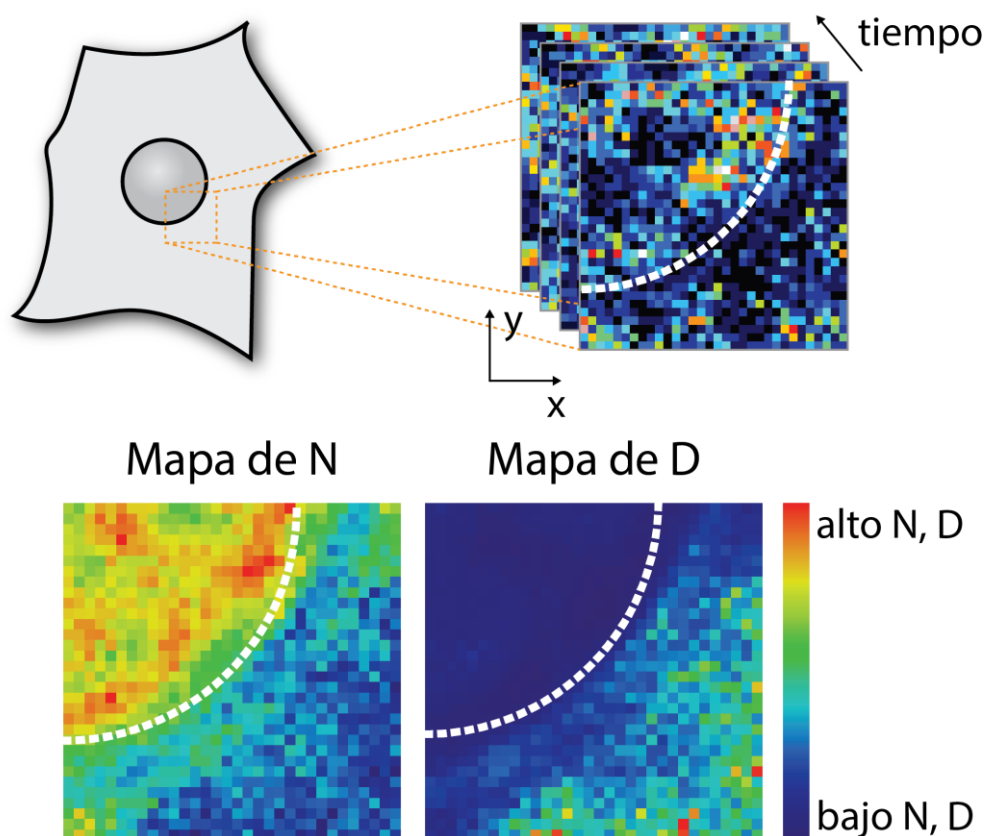


Figura 1.16: esquema de un experimento de imaging FCS. Se registran imágenes consecutivas con una cámara de la zona de interés (frontera entre el núcleo y citoplasma, en este caso) y se calcula la función de autocorrelación en cada pixel, obteniendo los mapas de número de moléculas y coeficientes de difusión. En este ejemplo se ilustra un escenario en el cual una población a de moléculas se distribuye entre núcleo y citoplasma, presentando una difusión más lenta en el primer compartimento celular.

En resumen, la familia de técnicas derivadas de FCS son adecuadas para el estudio de dinámicas rápidas *in vivo*, con resolución temporal del orden del microsegundo[74], imposible de lograr con otros métodos como FRAP. Además, a diferencia de FRAP, no requieren fotoblanqueo ni someter la muestra a altas intensidades de iluminación. El análisis de correlación permite obtener información adicional interesante, como concentraciones locales y grado de oligomerización[75].

1.3.2.3 Técnicas de seguimiento de partículas únicas

Los métodos descritos en las secciones anteriores se basan en el análisis de un número relativamente alto de moléculas, por lo cual, en mayor o menor medida pueden enmascarar información importante en muestras donde el comportamiento de las moléculas no es homogéneo[76]. Avances tecnológicos lograron subsanar esta

limitación y posibilitaron la observación de moléculas fluorescentes individuales[77-79]. Estas técnicas fueron perfeccionándose hasta, en la actualidad, lograr visualizar proteínas marcadas con sondas fluorescentes *in vivo*[80-84].

La técnica de seguimiento de moléculas únicas (*single molecule tracking, SMT*) consiste en obtener imágenes secuenciales de la región de interés y extraer las trayectorias de las proteínas de interés. La imagen de cada una de estas moléculas individuales es un patrón de intensidad dado por la difracción; la posición del centro del mismo puede ser determinada con una precisión de 1-2 nm[85], superior al límite de difracción, cercano a los 200 nm (Figura 1.17). La precisión en la localización depende del cociente señal/ruido (*signal-to-noise ratio, SNR*) y en entornos complejos como células vivas se puede obtener valores en el rango 20-40 nm[86]. Esta buena resolución, combinada con los tiempos de adquisición de los sensores de cámaras modernas, permite el estudio del movimiento de moléculas individuales. Las trayectorias moleculares son obtenidas al analizar la posición de cada molécula individual en cada cuadro de la serie de imágenes capturadas, obteniendo la evolución temporal de las coordenadas espaciales de la molécula.

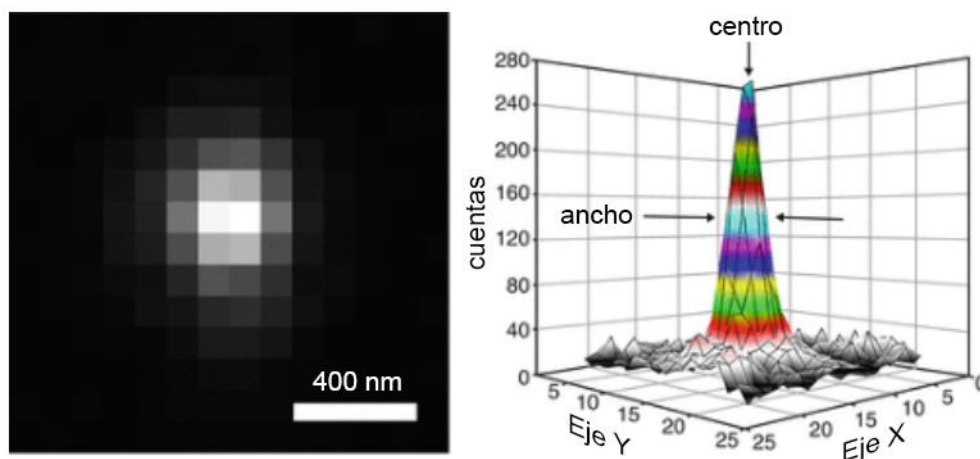


Figura 1.17: imagen de un fluoróforo individual (izquierda) y el perfil gaussiano de intensidad de fluorescencia (derecha). El ajuste del perfil de intensidad permite determinar la localización de la molécula individual con resolución menor al límite de difracción. Adaptado de [85].

Si los experimentos de SMT son realizados en muestras de gran espesor, como el núcleo de células de mamíferos, el contraste disminuye producto de fluorescencia originada en

otros planos de la muestra. Por este motivo, y como mencionamos previamente, se diseñaron distintas técnicas de microscopía para lograr una iluminación confinada a un plano de la muestra. Una de las estrategias más comunes para lograr este objetivo es la iluminación inclinada (*highly inclined and laminated optical sheet, HILO*)[87], que puede ser implementada fácilmente en microscopios diseñados para TIRF. Otra alternativa es la utilización de SPIM (*selective plane illumination microscopy*), técnica que también confina la iluminación a un plano de la muestra, pero requiere un diseño experimental más complejo. En la Figura 1.18 se presentan esquemas de estas dos técnicas.

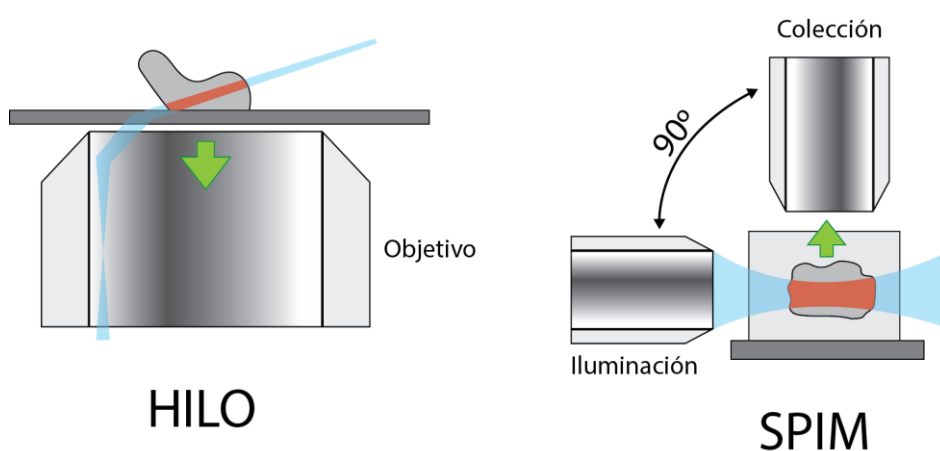


Figura 1.18: esquema del arreglo experimental para una medición de SPIM (izquierda) y HILO (derecha). En ambos esquemas, el haz azul representa el perfil de iluminación, en rojo se denota la sección de la muestra iluminada y la flecha verde representa la colección de fluorescencia. Adaptado de [88].

Durante la última década surgieron distintos enfoques e implementaciones de técnicas SMT. Sin embargo, todas tienen en común tres factores importantes. Primero, es fundamental utilizar sondas fluorescentes con gran brillo molecular y alta fotoestabilidad. Expresar la proteína con la sonda asociada dentro de la célula es el enfoque más sencillo y menos trabajoso, pero estas sondas resultan menos fotoestables, poseen menos brillo molecular que sus contrapartes sintéticas y resultan en trayectorias más cortas y ruidosas. Segundo, la concentración de sonda fluorescente debe ser del orden de nanomolar para poder visualizar correctamente las moléculas individuales. Tercero, es importante maximizar el SNR para una detección adecuada, especialmente si se desea estudiar dinámica de unión de proteínas. El desarrollo de técnicas como SPIM y HILO lograron minimizar el SNR al no coleccionar fluorescencia fuera del plano deseado.

Inicialmente, se utilizaron dos estrategias distintas para lograr muestras con bajas concentraciones de moléculas fluorescentes endógenas. En primer lugar, se regula la expresión de la proteína marcada de modo de conseguir un bajo nivel de la misma [89]. Otra opción fue utilizar variantes fotoactivables de la proteína fluorescente y fotoactivar una proporción reducida de la población de moléculas [90]. Como fue mencionado anteriormente, estos enfoques permiten la obtención de una gran cantidad de trayectorias de corta duración, debido al fotoblanqueo.

En años recientes, se combinaron las grandes ventajas de sondas fluorescentes sintéticas, en particular la fotoestabilidad, su tamaño reducido (en comparación a las sondas endógenas) y el gran brillo molecular, con la simplicidad de la expresión de proteínas. Estas técnicas se basan en utilizar sistemas en los cuales se expresa la proteína de interés fusionada a otra pequeña proteína (SNAP-Tag u HaloTag[91], por ejemplo), que a su vez posee un grupo que reacciona con sondas fluorescentes modificadas químicamente con este fin y que generalmente entran a células por difusión a través de la membrana[92].

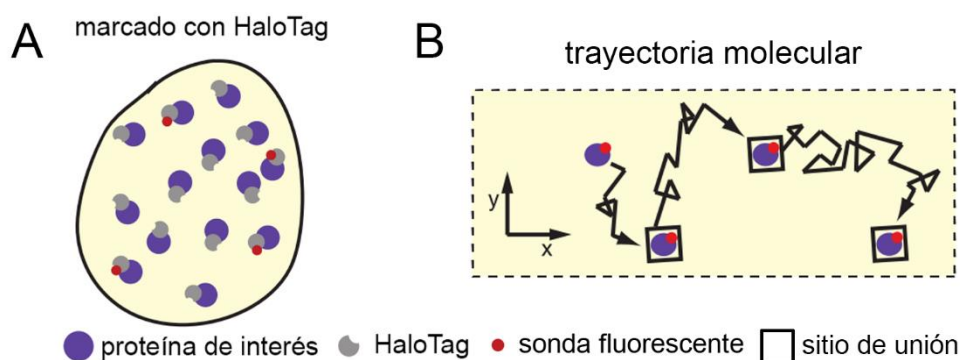


Figura 1.19: esquema de distribución de sondas marcadas en el núcleo celular (A) y trayectorias moleculares recuperadas con experimentos de SMT (B). Adaptado de [93].

Un análisis cuantitativo de las trayectorias permite obtener información sobre la dinámica de la proteína, determinar el valor del coeficiente de difusión y explorar los mecanismos subyacentes a su movimiento[94]. Como veremos más adelante, estas técnicas se utilizaron para caracterizar procesos difusivos puros pero también para el estudio de interacciones de moléculas con sitios de unión, permitiendo obtener

información cuantitativa de por ejemplo, la interacción de factores de transcripción con sitios de unión en la cromatina[95-98] (más detalle en el capítulo 2).

En el caso más sencillo, las trayectorias obtenidas se dividen en segmentos con propiedades diferenciales en cuanto a la movilidad de la molécula (Figura 1.19B). Primero, las proteínas en difusión van a mostrar segmentos de desplazamiento de distintas longitudes. El análisis de esta distribución de pasos provee información sobre las propiedades difusivas de la moléculas, haciendo posible el estudio de la movilidad de la proteína en distintas regiones del núcleo, por ejemplo, nucléolo, heterocromatina y eucromatina[99]; estas estructuras nucleares se discutirán en la sección 2.2. Segundo, las proteínas que interactúan y se unen al ADN presentarán períodos en las trayectorias en los cuales la partícula no cambia su posición ya que se encuentra unida a un blanco relativamente inmóvil. La duración de estos eventos (denominada tiempo de residencia) depende de la cinética de unión. Un análisis del histograma de tiempos de residencia permite obtener parámetros cinéticos de interacción con el ADN (Figura 1.20).

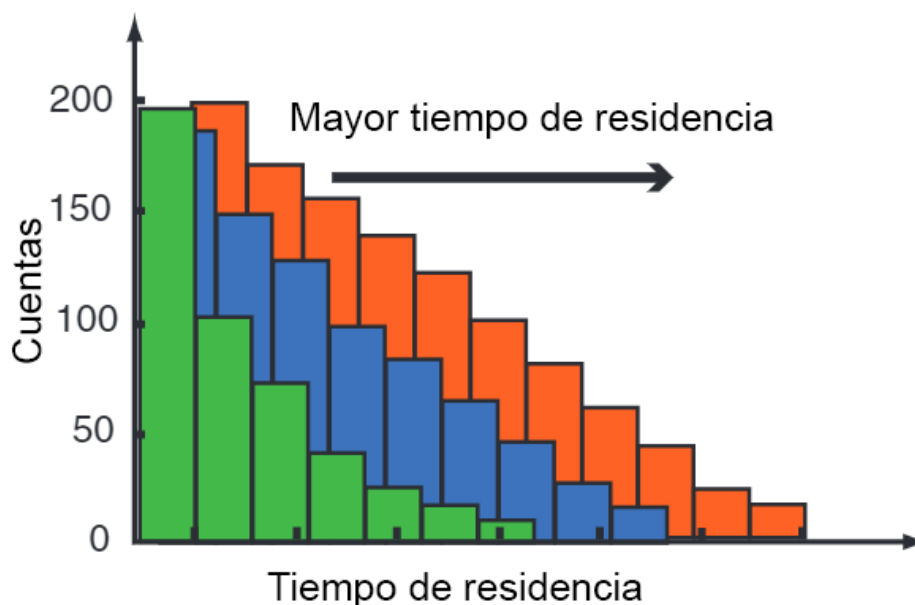


Figura 1.20: ejemplo de histograma de tiempos de residencia en sitios de unión obtenido en experimentos de SMT. En este ejemplo, el histograma rojo presenta el mayor tiempo de residencia característico y el verde el menor. Adaptado de [93].

En resumen, SMT analiza el comportamiento de moléculas individuales sin promediar poblaciones, arrojando un panorama más detallado de la dinámica de difusión e interacción de la proteína estudiada. Estos resultados no requieren suponer ningún modelo previo para el estudio de los mismos, de hecho, los resultados de SMT pueden ayudar a la elección de modelos para estudios de FRAP o FCS[91]. En contraparte, esta técnica posee una baja resolución temporal (frente a FCS), por lo que limita el análisis a procesos lentos.

1.4 Simulaciones computacionales para complementar a la microscopía confocal

Muchas veces, los resultados experimentales de microscopía confocal, en especial los de FRAP y FCS, son difíciles de interpretar, o la obtención de información cuantitativa a partir de los resultados experimentales requiere asumir un modelo previo. Por lo tanto, la simulación computacional se constituye en otra de las herramientas disponibles para la investigación científica. En particular, los experimentos de microscopía confocal son frecuentemente complementados con simulaciones computacionales para orientar en la interpretación de los resultados experimentales y postular o verificar modelos. En numerosas ocasiones, la simulación computacional propone aspectos que requieren nuevos experimentos, realimentando así el círculo de descubrimiento científico (Figura 1.21).

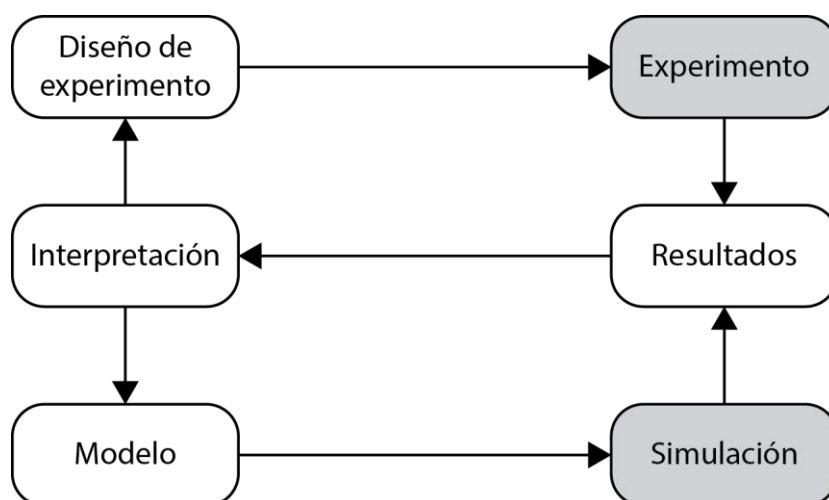


Figura 1.21: esquema del proceso iterativo que integra las simulaciones con los experimentos, donde los resultados y la interpretación de los mismos sirven como nexo entre ambos. Adaptado de [100].

Las simulaciones de experimentos de microscopía confocal y FCS requieren modelar el movimiento de las moléculas en el medio simulado (en particular su travesía a través del volumen confocal) y generar, a partir de estos datos, información de fluorescencia (fotones o cuentas) debido a la excitación y posterior emisión de las moléculas dentro del volumen confocal. Para la generación de las trayectorias moleculares, las dos técnicas más utilizadas son dinámica molecular o simulaciones de Monte Carlo.

La dinámica molecular, originalmente desarrollada en la década del 1950, es un método de simulación computacional utilizado para estudiar el movimiento de átomos o moléculas, observando las interacciones durante un periodo de tiempo para obtener la evolución temporal del sistema. En su versión más común, las trayectorias son obtenidas resolviendo numéricamente las ecuaciones de Newton para el movimiento en un sistema de partículas que interactúan, donde las fuerzas entre las partículas y su correspondiente energía potencial son calculadas utilizando potenciales interatómicos o campos de fuerza moleculares. Trabajos previos utilizaron esta técnica para simular trayectorias moleculares en sistemas donde hay interacciones entre las partículas, debido a la facilidad de implementar este tipo de cálculos en dinámica molecular[101, 102].

Los métodos de Monte Carlo (o simulaciones estocásticas) son una amplia gama de algoritmos computacionales que dependen del muestreo azaroso para obtener

resultados numéricos, esto es, utilizan la aleatoriedad para resolver problemas que son deterministas en principio. En particular, para la generación de trayectorias moleculares, este método se acopla con el criterio de Metropolis[103] y un campo de potencial al que está sujeto el sistema. Se proponen movimientos azarosos de la molécula y el paso es aceptado o no en base a criterios energéticos (más detalle en el capítulo 7). La ventaja de este método es la simplicidad de aplicación y la versatilidad de usos, principalmente en el campo de biofísica de partículas[104-106].

La generación de información de fluorescencia a partir de las trayectorias moleculares es modelada teniendo en cuenta la descripción analítica del volumen confocal y asignando probabilidades de excitación y emisión en base a criterios fotofísicos. La gran mayoría de trabajos que realizan simulaciones de fluorescencia combinan ambas bases necesarias en un mismo programa realizado en forma casera, limitando y simplificando severamente los escenarios a ser simulados, los cuales normalmente sólo pueden incluir difusión y reacciones simples dentro de una caja[101, 102, 105, 107]. Como será detallado en el capítulo 6, optamos por un enfoque distinto: aprovechar un programa ya existente, robusto y validado para la simulación de las trayectorias moleculares en sistemas complejos y acoplarla a una herramienta modular y versátil solamente enfocada en la generación de información de fluorescencia para diversos modos de adquisición de microscopía confocal.

Capítulo 2: estructura del núcleo, factores de transcripción y su rol en el desarrollo embrionario

2.1 Estructura del núcleo celular

El núcleo celular es responsable del almacenamiento, expresión, propagación y manutención del material genético que contiene. Estas tareas tan importantes se desarrollan en un entorno atestado de biomoléculas con distintas y precisas funciones. La respuesta a cómo una estructura tan densamente poblada puede funcionar yace en una precisa arquitectura tridimensional dentro del núcleo. La distribución de componentes nucleares no es al azar, sino que se organizan en una jerarquía de estructuras ordenadas. Este proceso se denomina compartimentalización y determina que relevantes procesos nucleares no ocurran de manera homogénea en el espacio sino que se encuentran limitados a regiones que, sorprendentemente, no se encuentran separadas del medio externo por membranas biológicas como ocurre en el citoplasma [108, 109]. Por lo tanto, resulta de interés estudiar y entender los mecanismos subyacentes a la compartimentalización y al transporte y difusión de moléculas dentro del núcleo celular.

2.1.1 Compartimentalización sin membranas

En las células de mamíferos, la envoltura nuclear define dos compartimentos mayoritarios, el núcleo y citoplasma, que poseen características estructurales y funciones distintas. Mientras que el citoplasma presenta organelas discretas, como mitocondrias y lisosomas separadas del medio celular por membranas biológicas, los principios que definen la estructura nuclear son diferentes[110-114]. El núcleo no posee organelas (por definición, una organela se encuentra encerrada por una membrana); sino zonas discretas o compartimientos enriquecidos en ciertos componentes específicos y donde serían llevadas a cabo funciones particulares; estas regiones se encuentran en contacto con el nucleoplasma por lo cual existen numerosos interrogantes abiertos acerca de los mecanismos involucrados en la formación y el mantenimiento de los mismos. La Figura 2.1 representa un esquema de distintos

compartimentos que coexisten dentro del núcleo celular de mamíferos sin la necesidad de membranas que los separen.

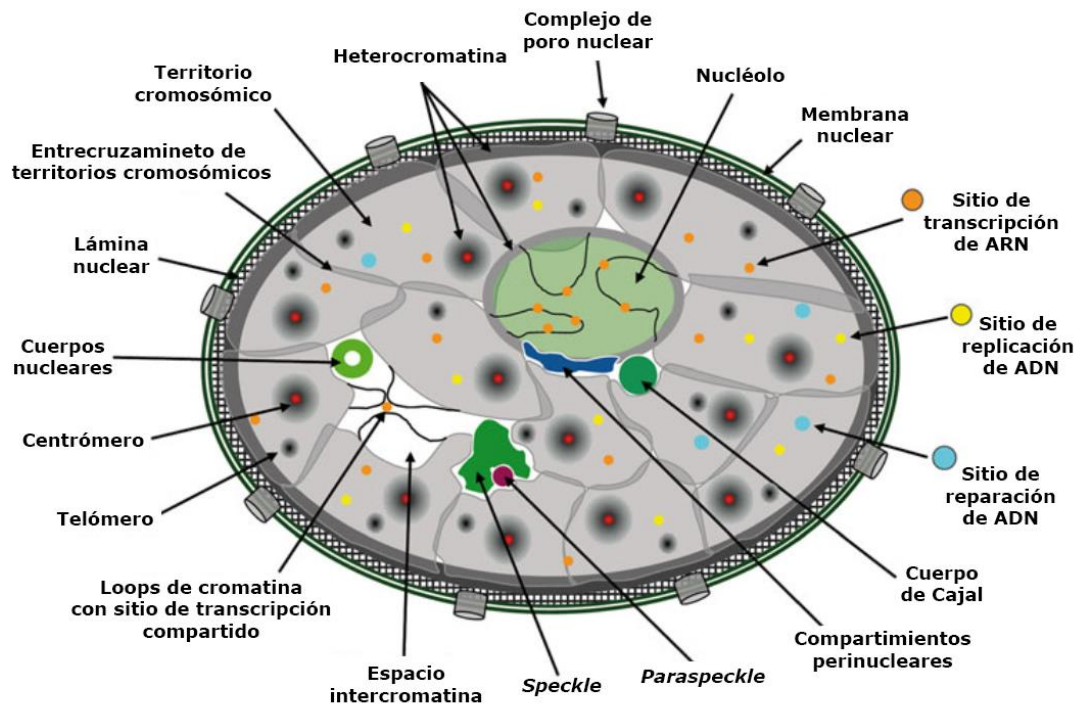


Figura 2.1: esquema de la compartimentalización sin membranas del núcleo celular de mamíferos. Adaptado de [115].

El nucléolo constituye un excelente ejemplo de este esquema de organización; de hecho, es considerado una de las estructuras nucleares de mayor notoriedad en el núcleo celular de mamíferos. El nucléolo es el sitio de la síntesis y procesamiento del ARN ribosomal, además de servir como centro de la biogénesis de las subunidades del ribosoma[116, 117]. A su vez, el nucléolo se encuentra subdividido en regiones donde se desarrollan cada uno de los procesos descritos anteriormente. Las células de mamíferos generalmente poseen de uno a cinco nucléolos, y su tamaño varía entre 0.5-5.0 μm .

Además del nucléolo, existen otros dominios nucleares involucrados en la expresión de genes, como los cuerpos de Cajal, cuerpos nucleares, *paraspeckles*, *speckles*, entre otros[118-122], algunos de ellos con funciones todavía desconocidas. Muchos tipos de células poseen un pequeño número (típicamente uno a cinco) de cuerpos de Cajal, de

0.3-1.0 μm de diámetro y sección transversal semejante a una red de fibras enroscadas[121]. Estos cuerpos contienen diversas proteínas, desde factores de transcripción a pequeñas ribonucleoproteínas. Estos dominios no son transcripcionalmente activos, y se cree que juegan un papel importante en la biogénesis de pequeños complejos ARN-proteína nucleares (*small nuclear RNA-protein complexes*, *snRNPs*) y en el transporte de snRNPs y snoRNPs (*small nucleolar RNA-protein complexes*). Estas estructuras nucleares pueden ser observadas por inmunofluorescencia, como se detalla en la Figura 2.2.

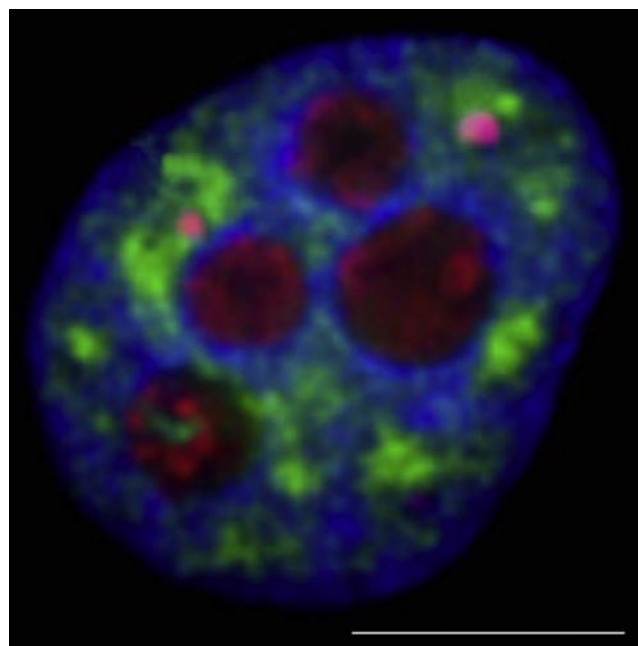


Figura 2.2: cuerpos nucleares revelados por inmunofluorescencia en células de HeLa. La cromatina está marcada con DAPI (azul) en una célula que expresa una proteína snRNP, SmB, marcada con YFP (verde). Los componentes fibrilares densos están marcados con anticuerpos anti-fibrilarina (rojo), mientras que anti-fibrilarina y anti-coilina marcan los cuerpos de Cajal (rosado). La barra de escala denota 10 μm . Adaptado de [123].

2.1.2 Territorios cromosómicos

Un ejemplo claro de la organización heterogénea del núcleo y su impacto en la función nuclear son los territorios cromosómicos. Dentro del núcleo celular, los cromosomas ocupan regiones discretas[114, 124, 125], en contraste a la visión clásica que sugería una distribución completamente al azar. De hecho, en los últimos 20 años, esta idea ha sido confirmada utilizando, por ejemplo, FISH (*fluorescence in situ hybridization*) (Figura 2.3). Este método hace uso de oligonucleótidos fluorescentes que interactúan

específicamente con secuencias del DNA cromosomal y permiten identificar cromosomas en núcleos fijados directamente en un microscopio de fluorescencia. Otra alternativa es utilizar inmunofluorescencia, marcando el ADN-sonda con blancos para anticuerpos o con un análogo de precursor (como biotina-dUTP) previo a la hibridación (el análogo de precursor reacciona posteriormente con biomoléculas afines marcadas con sondas fluorescentes). Esta técnica permitió confirmar que los territorios cromosómicos en células de mamíferos se encuentran en espacios limitados y no solapados completamente entre sí.

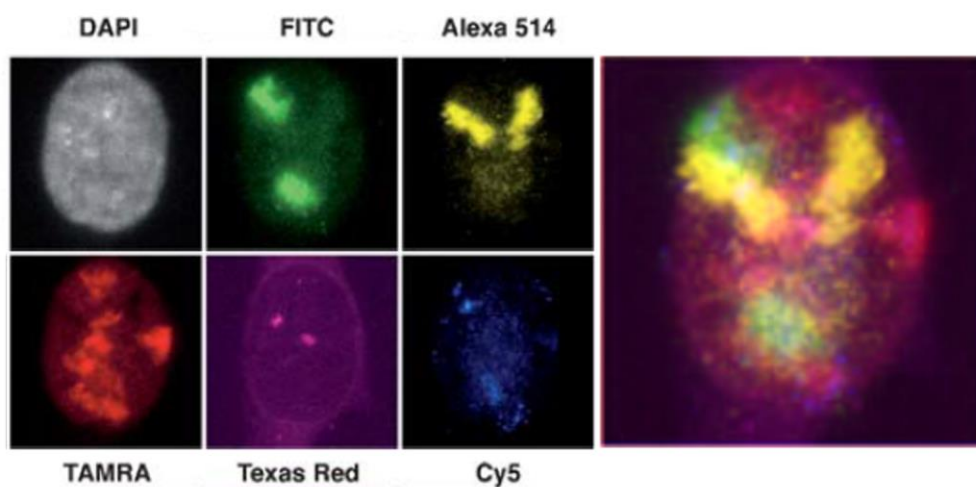


Figura 2.3: estructura de los territorios cromosómicos de fibroblastos humanos revelada por FISH. En este ejemplo, se utilizaron cinco sondas para marcar distintos territorios cromosómicos y DAPI para marcar la cromatina (paneles individuales). La combinación de los canales individuales permite obtener un mapa de los distintos territorios (panel derecho). Adaptado de [126].

La organización dentro de los territorios cromosomales está íntimamente relacionada con la expresión de genes. Por ejemplo, se verifica que regiones con una densidad alta de genes activos tienden a estar posicionados cerca del centro del núcleo, mientras que regiones con poca densidad de genes activos se encuentran en la periferia[124]. En particular, se ha sugerido que regiones de la cromatina en posiciones perinucleares presentan baja actividad génica por la interacción de la cromatina con la lámina nuclear[127], compuesta por una red de filamentos intermedios de clase V y proteínas asociadas[128]. Además, la posición de cromosomas que poseen genes de ARN ribosomal está determinada por su asociación al nucléolo, que tiende a estar cerca del centro del núcleo. Finalmente, otro factor importante en la regulación de la actividad

son los cambios locales o modificaciones de la cromatina, los cuales serán detallados a continuación.

2.2 Estructura y función de la cromatina

Para que ocurra la expresión de un gen, el ADN tiene que interactuar con diversas proteínas involucradas en el proceso de transcripción, como polimerasas y factores de transcripción. Por lo tanto, el empaquetamiento local del ADN es un factor clave que puede modular esta unión. El rol de la estructura, plegamiento y ordenamiento de la cromatina juega un papel importante e implícito para la transcripción.

2.2.1 Empaquetamiento del ADN

La cadena de ADN ocuparía un largo de 3 metros si fuera estirada, pero en las células se empaqueta en el núcleo, el cual mide aproximadamente 10 μm [129]. Existen diversos mecanismos para plegar este largo biopolímero en forma jerarquizada dentro de un espacio tan pequeño como el núcleo celular.

El ADN posee como estructura troncal una cadena fosfatada, con carga negativa al pH fisiológico. La carga negativa de los grupos fosfato introduce una repulsión electrostática que complicaría compactar el ADN en el núcleo. Una familia de pequeñas proteínas de ~10 kDa, ricas en arginina y lisina (aminoácidos con carga positiva a pH fisiológico) denominadas histonas son las responsables de contrarrestar este efecto.

En el núcleo celular, el ADN se encuentra frecuentemente asociado a histonas conformando nucleosomas, cuya estructura consiste en 146 pares de base de ADN enrolladas en 1.75 vueltas sobre la superficie de un octámero de histonas[130]. El nucleosoma contiene dos juegos de cuatro histonas, denominadas H2A, H2B, H3 y H4, en simetría espejada (Figura 2.4). Una quinta histona, H1, no forma parte de este núcleo de histonas, y es comúnmente denominada histona *linker*. Además de interactuar con el nucleosoma, la histona H1 se une al ADN *linker*, ayudando a estabilizar la fibra de cromatina[131]. Trabajos previos demostraron que una sobreexpresión de H1 ocasiona

una morfología nuclear y estructura de cromatina aberrante[132], y que esta histona puede actuar como regulador positivo o negativo de la transcripción[133, 134].

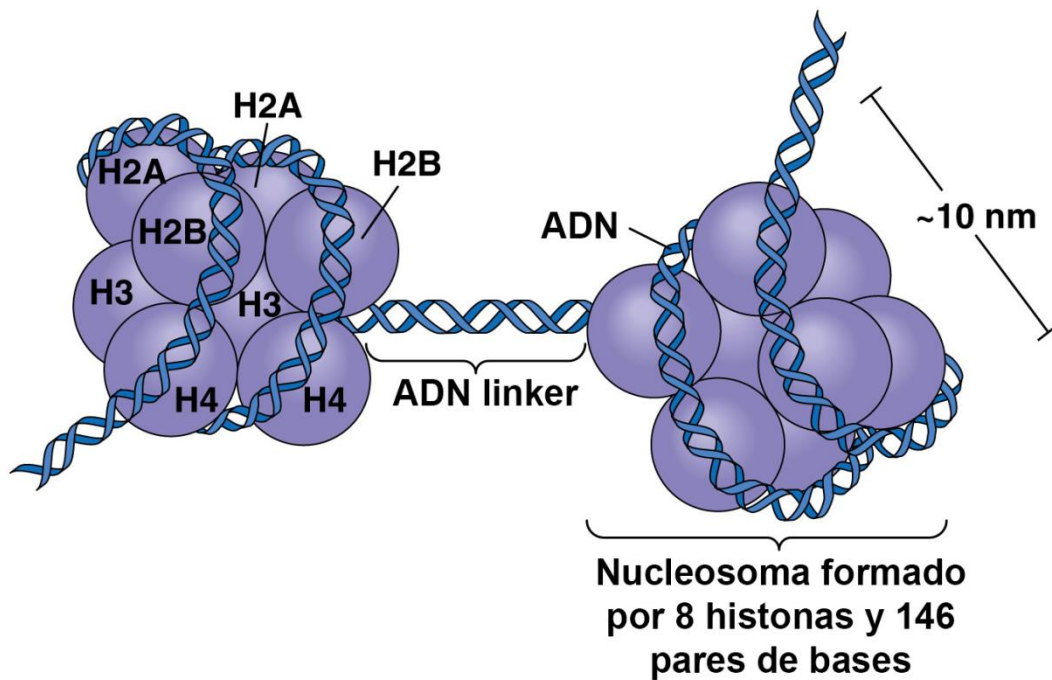


Figura 2.4: representación esquemática del nucleosoma formado por un octámero de histonas enrollado por el ADN. Secciones cortas de ADN (alrededor de 20-80 pares de base) denominadas ADN linker unen los nucleosomas. Adaptado de [135].

Los genes de la histona están altamente conservados en eucariotas, debido a que sus proteínas deben interactuar de manera precisa para formar el nucleosoma. A su vez, este centro está definido por la arquitectura de las histonas individuales (Figura 2.5), mientras que los dominios N-terminal de las histonas se asocian con el ADN y permiten la interacción entre nucleosomas adyacentes.

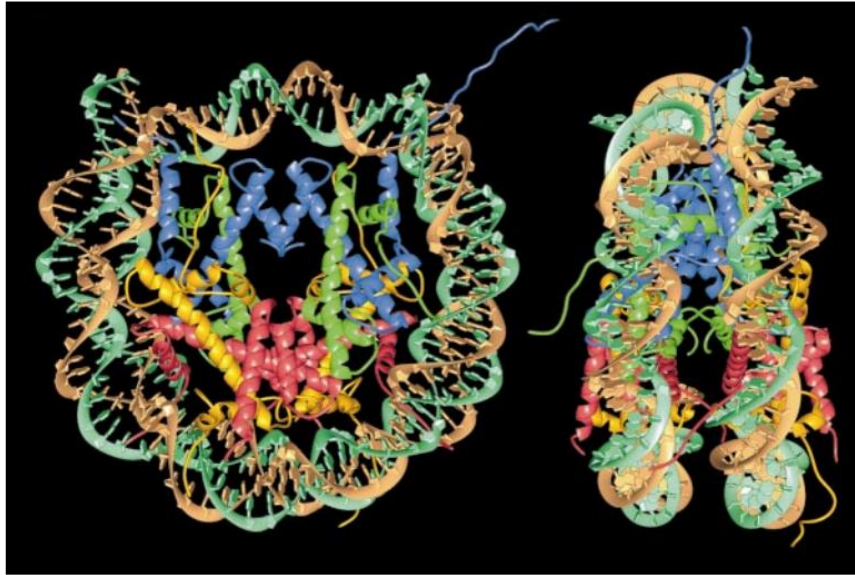


Figura 2.5: estructura del nucleosoma obtenida por rayos X. 146 pares de bases de ADN (turquesa y marrón) se enrollan en 1.75 vueltas al octámero de histonas, compuesto por H2A (amarillo), H2B (rojo), H3 (azul) y H4 (verde). El complejo mide 10 x 6 nm. Adaptado de [130].

La cromatina en los núcleos de células de mamíferos puede ser clasificada en dos grupos: eucromatina y heterocromatina. La primera es compuesta por regiones cromosomales que poseen una alta densidad de genes transcripcionalmente activos, entre otras características. Por el contrario, la heterocromatina posee pocos genes transcripcionalmente activos. Eucromatina y heterocromatina poseen propiedades distintas que se correlacionan con las características mencionadas anteriormente. Por ejemplo, una propiedad diagnóstico clave es la facilidad con la que cada tipo de cromatina es cortada con nucleasas. La eucromatina es fácilmente digerible, mientras que la heterocromatina es poco sensible a la actividad de nucleasas. La facilidad de la digestión refleja la accesibilidad de las nucleasas al ADN: eucromatina posee una estructura más abierta y dinámica, mientras que la heterocromatina es más compacta. Estos estados de compactación se correlacionan con la funcionalidad, reflejando la importancia del efecto de la estructura, y su posibilidad de modificarlo, para la expresión de genes[136].

2.2.2 Modificaciones de histonas

Dada la relación entre la accesibilidad de proteínas y complejos a la cromatina y el control de la expresión génica, es importante entender los principios que rigen este proceso[137-139]. Las histonas son blanco de una variada gama de modificaciones

postraduccionales, como acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ADP-ribosilaciones y ubiquitinaciones. Estas modificaciones regulan la compactación de la cromatina y determinan las zonas de hetero y eucromatina, modulan la estructura de la cromatina durante el ciclo celular y controlan el recambio (*turnover*) de las histonas. A modo de ejemplo, describiremos brevemente los efectos globales de acetilación y metilación de las histonas.

La acetilación del dominio N-terminal de histonas, particularmente de H3 y H4, es de vital importancia para la expresión génica. Estos dominios son ricos en lisinas, las cuales son blanco de acetilación, ocasionando una disminución en la estabilidad del complejo del nucleosoma. Como resultado de esta modificación, el ADN resulta más accesible a la maquinaria transcripcional[140]. De esta forma, la acetilación de las histonas en la cromatina está generalmente correlacionada con un aumento de la expresión génica. Si bien las histonas H3/H4 son los blancos mayoritarios de acetilación, cambios en la acetilación de H2A/B también se correlacionan con un aumento en la expresión de genes, debido a que reducen el apilamiento de nucleosomas adyacentes[141]. Además, ciertas enzimas reclutadas para modular la expresión de genes también pueden catalizar modificaciones postraduccionales de proteínas involucradas en la transcripción como factores de transcripción, y regular así la expresión de genes.

Otra modificación de histonas con implicancias en la regulación de la transcripción y reparación del ADN es la metilación, catalizada por una familia de proteínas metiltransferasas de arginina (PRMTs) que posee al menos nueve miembros[142]. El blanco de estas PRMTs son las colas de las histonas, y la activación o represión de la expresión de genes depende de qué residuo es metilado y su grado de metilación. Las histonas pueden ser metiladas en residuos lisina o arginina, siendo la metilación de lisinas en las colas de las histonas H3 y H4 la más común[143].

Una de las PRMT más importantes es CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*), cuyo reclutamiento a promotores transcripcionales resulta en la metilación de la histona H3[144] y de la histona acetiltransferasa p300/CPB[145]. CARM1 posee una afinidad alta por residuos arginina cercanos a motivos prolina-glicina-

metionina[146]. La arginina posee cinco potenciales grupos dadores de puente de hidrógeno, por lo tanto, efectos estéricos ocasionados por la adición de grupos metilo afecta la interacción con los aceptores de puente de hidrógeno, entorpeciendo la interacción con proteínas claves para la regulación de la transcripción[147].

2.2.3 Fábricas de transcripción

El término “fábricas” de transcripción (*transcription factories*) fue acuñado por Jackson y colaboradores en el año 1993, quienes utilizaron análogos de nucleótidos para visualizar la síntesis de mRNA en células. Utilizando microscopía confocal para visualizar los transcriptos, determinaron que la transcripción ocurría en 300-500 sitios discretos en el núcleo [148]. Estos resultados contrastaban notablemente con una visión de un núcleo organizado al azar, en el cual se esperaría un patrón relativamente homogéneo en la distribución de los sitios de transcripción.

Gracias a mejoras y avances en la microscopía fue posible obtener más información sobre la estructura de estas fábricas de transcripción. En particular, la espectroscopía de rayos X acoplada a microscopía electrónica permite la detección de nitrógeno y fósforo y, por lo tanto, permite mapear la distribución de proteínas y ácidos nucleicos con precisión nanométrica[149]. Cuando esta técnica fue aplicada en células HeLa se observó que las fábricas de transcripción poseen un centro poroso rico en proteínas, con diámetros promedio de 87 nm[149]. En base a estos resultados, se especuló que el centro rico en proteínas posee ARN polimerasa II en la superficie, además de muchas o todas las proteínas involucradas en la síntesis de un transcripto maduro (Figura 2.6). Las imágenes espectroscópicas revelaron pocos átomos de fósforo (elemento presente en los ácidos nucleicos) en este centro rico en proteínas, sugiriendo que el ADN y el transcripto naciente se encuentran fuera de este centro.

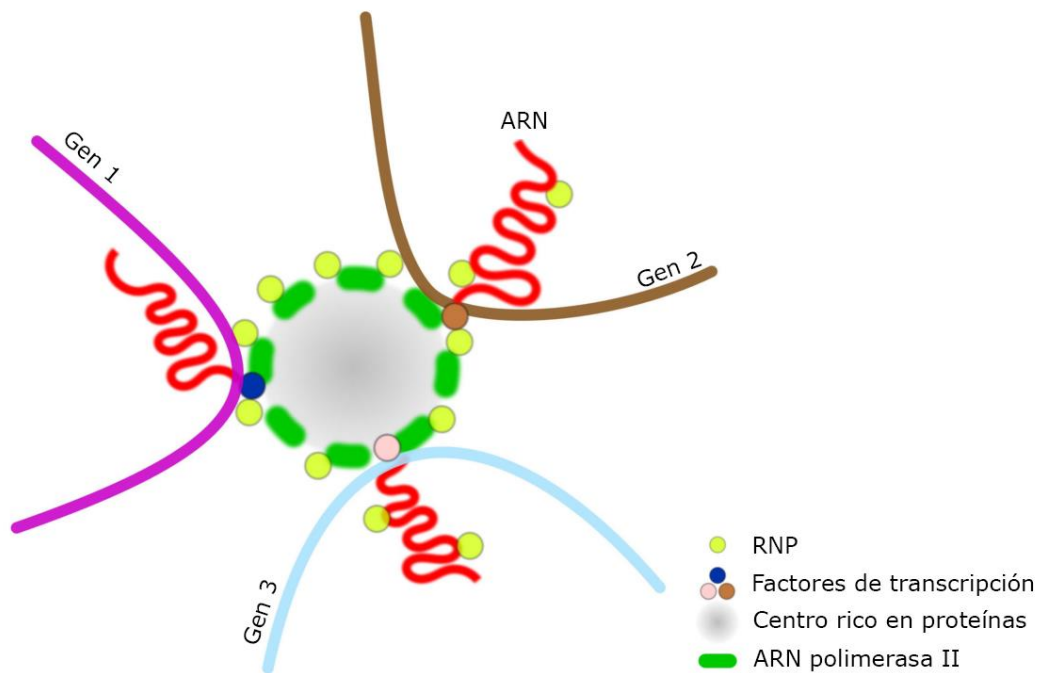


Figura 2.6: esquema de la estructura propuesta para una fábrica de transcripción. Cada fábrica contiene 4-30 moléculas de ARN polimerasa II en la superficie de un centro rico en proteínas. Este centro contiene proteínas involucradas en la transcripción, como coactivadores, remodeladores de cromatina, factores de transcripción, modificadores de histonas, RNPs (ribonucleoproteínas) y helicasas. Múltiples genes pueden ser procesados en la misma fábrica. Adaptado de [150].

Se ha sugerido que las fábricas de transcripción juegan un rol principal en definir la estructura nuclear y la organización tridimensional de la cromatina[151-153]. Se ha propuesto que las fábricas pueden ayudar al agrupamiento de genes corregulados (i.e. genes regulados por el mismo factor de transcripción) y, por este motivo, la interacción con la fábrica contribuye a organizar tridimensionalmente a la cromatina introduciendo lazos en su estructura [110, 152].

2.3 Factores de transcripción

2.3.1 Estructura y función

Los factores de transcripción son proteínas claves en determinar la gran diversidad de patrones de expresión de genes observados en distintos tipos celulares y condiciones. Estas proteínas actúan solas o junto a otras proteínas promoviendo (como activador) o bloqueando (como represor) la acción de la ARN polimerasa, responsable de la transcripción de información genética de ADN a ARN[154-156]. En la Figura 2.7 se presenta un esquema sencillo de la acción de los factores de transcripción.

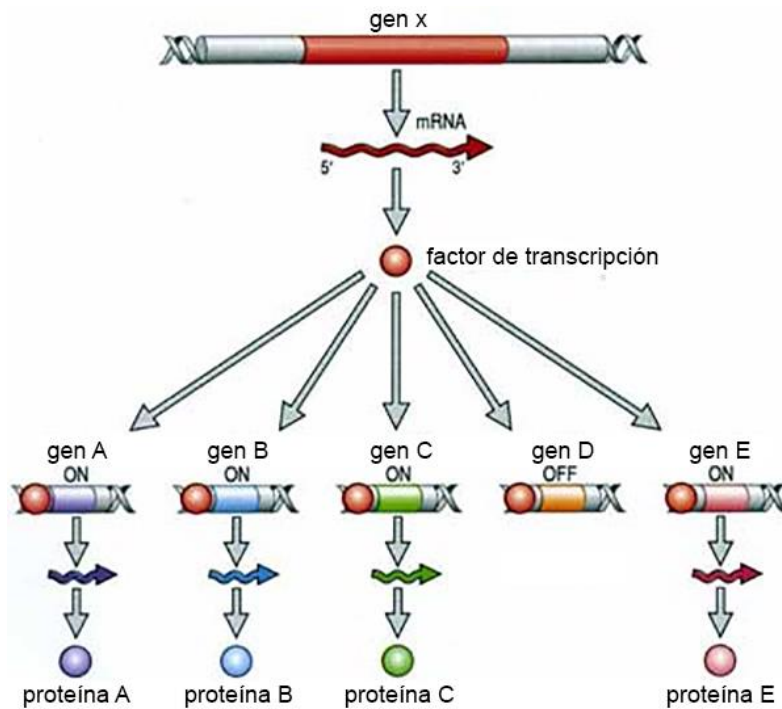


Figura 2.7: esquema de la acción de los factores de transcripción, desde su transcripción y traducción a su efecto como activador o represor de la expresión de genes. En este caso, la interacción directa del factor de transcripción con ciertas regiones en la cromatina activa la transcripción de todos los genes salvo el D, donde actúa como represor inhibiendo la producción de la proteína D.

Como fue mencionado anteriormente, la mayoría de los factores de transcripción no interactúan solos con la cromatina sino que en muchos casos forman complejos homotípicos o heterotípicos mediante dimerización[157]. Para que la transcripción de un gen ocurra, un número de factores de transcripción deben interactuar con la cromatina en una región regulatoria. Esta colección de factores de transcripción recluta a su vez cofactores y proteínas esenciales para la transcripción como la ARN polimerasa.

En muchos casos se ha observado que un mismo gen puede ser activado y reprimido por distintos factores de transcripción (su nivel de expresión depende de la concentración de cada regulador) o inclusive un factor de transcripción puede activar o reprimir su propia expresión[158]. A modo de ejemplo, en la Figura 2.8 se presenta un esquema simplificado de la regulación de la expresión de *rhomboid*, un gen requerido para la diferenciación de la epidermis ventral de *Drosophila*.

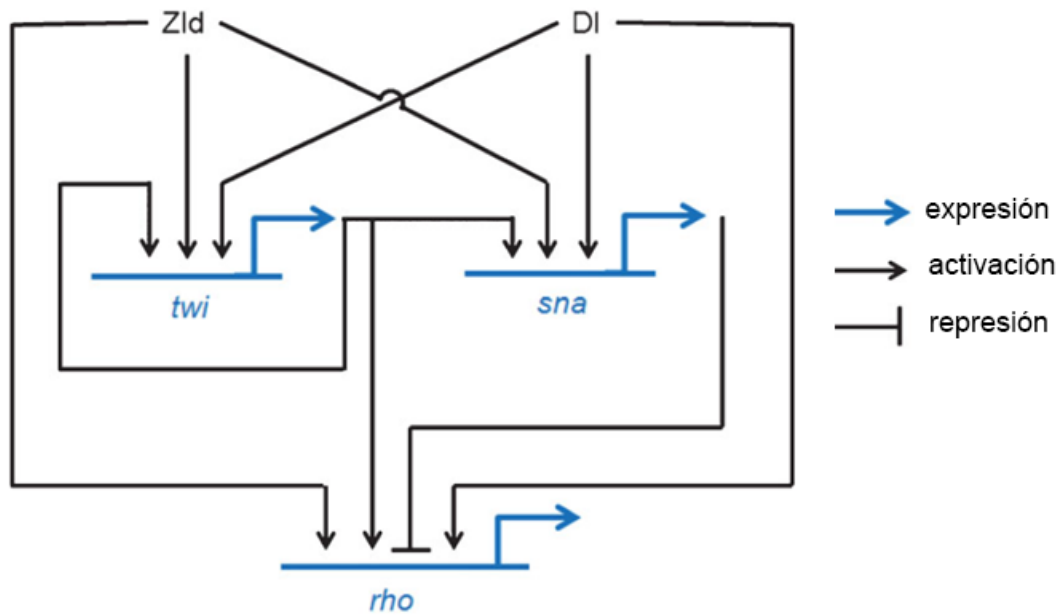


Figura 2.8: la regulación de la expresión de rhomboid en el eje dorsoventral de *Drosophila* generada por una red de interacciones de activación, represión y autorregulación. Adaptado de [159].

Los factores de transcripción son modulares en estructura y generalmente contienen dominios de unión al ADN (*DNA binding domain, DBD*), responsable por la unión a secuencias específicas de ADN adyacentes a los genes que regula; dominios de transactivación (*transactivation domain, TAD*), dominios con sitios de unión a otras proteínas, como corre reguladores de transcripción; y dominios sensibles a señales (*signal sensing domain, SSD*) que reconocen señales externas y las transmiten al resto del complejo de transcripción [160-162]. Para que una proteína sea catalogada como factor de transcripción debe poseer, al menos, un DBD. Estos dominios resultan de tal relevancia que los factores de transcripción son generalmente clasificados en familias de acuerdo a sus DBDs[163].

Dada la relevancia de los factores de transcripción en la expresión génica, es muy importante comprender cómo éstos interactúan con la cromatina en el complejo entorno nuclear[164]. En particular, los factores de transcripción juegan un rol vital en una gran variedad de procesos biológicos incluyendo el desarrollo embrionario[165-168] y la progresión de enfermedades[169]. Por este motivo, este estudio es de gran interés para la reprogramación celular[170], terapia génica[171] y diseño de drogas[172].

2.3.2 Dinámica e interacción de factores de transcripción con el ADN

La visión clásica acerca del mecanismo de acción de los factores de transcripción incluía la idea de que estas proteínas operaban uniéndose a regiones específicas (i.e. secuencias de bases reconocidas por el factor de transcripción) en el genoma de manera estable para formar complejos macromoleculares que perduraban de manera intacta y biológicamente funcional durante minutos u horas inclusive[173].

Sin embargo, esta visión cambió radicalmente con el advenimiento de nuevas metodologías en el campo de la biología molecular que permitieron la expresión de factores de transcripción fusionados a moléculas fluorescentes. En conjunto con nuevas técnicas de microscopía de fluorescencia, estos avances hicieron posible observar la dinámica y la interacción de los factores de transcripción con el ADN en células individuales y organismos vivos, como veremos más adelante.

Los primeros experimentos en esta área, realizados utilizando FRAP (sección 1.3.2.1) arrojaron resultados contradictorios con la visión clásica de complejos estables por largos períodos de tiempo, revelando dinámicas de unión estocásticas con tiempos característicos de segundos[174].

Desde los estudios pioneros de FRAP, un gran número de nuevas técnicas basadas en microscopía de fluorescencia fueron desarrolladas y aplicadas al estudio de la dinámica de factores de transcripción en células vivas en una amplia escala temporal. En particular, FCS (sección 1.3.2.2) posibilitó el monitoreo de la dinámica de factores de transcripción en escalas sub-milisegundos, órdenes de magnitud más rápido que FRAP [74].

Trabajos recientes de SMT (sección 1.3.2.3) en los cuales se siguió el movimiento de factores de transcripción marcados con sondas fluorescentes en células demostraron que la interacción de los mismos con el ADN no pudo ser interpretada considerando una única población de sitios de unión homogéneos. Por el contrario, se encontraron distintas poblaciones con tiempos característicos de interacción desde milisegundos a segundos[175-177].

Se propuso que los eventos rápidos corresponden a eventos de interacción entre los factores de transcripción y la cromatina no específicos, e incluyen además eventos de deslizamiento unidimensional sobre el ADN, saltos (*hopping*) y transferencia entre segmentos[93, 175, 178] (Figura 2.9). Se ha propuesto que estos mecanismos le permiten al factor de transcripción explorar de manera más eficiente el ADN que lo que se verificaría por difusión en tres dimensiones. Por otra parte, estos trabajos asignan a los eventos lentos interacciones del factor de transcripción con blancos específicos en el ADN [93, 174].

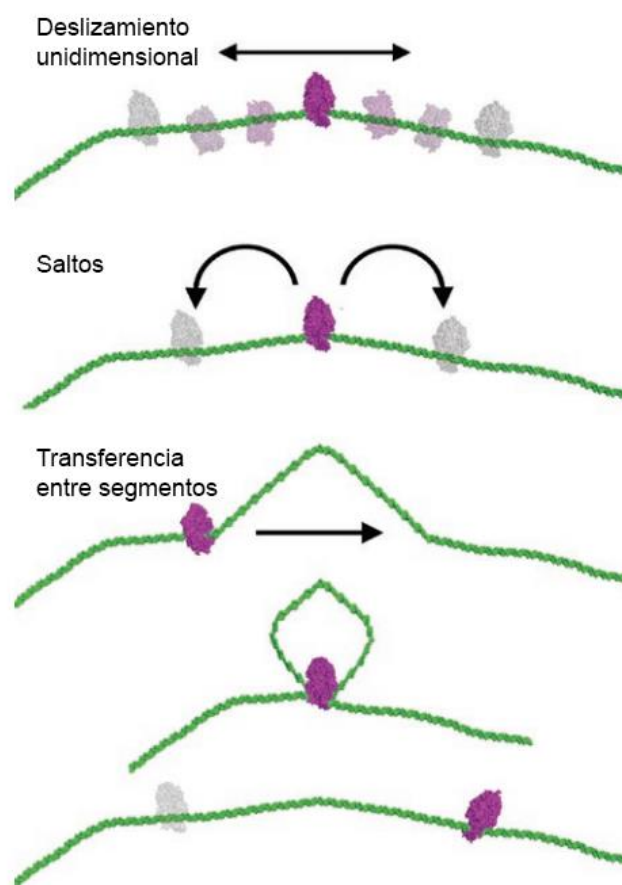


Figura 2.9: esquema de tres mecanismos de interacción inespecífica entre factores de transcripción y ADN. Adaptado de [178].

Mueller et al.[93] integraron los distintos comportamientos de los factores de transcripción observados experimentalmente en un modelo teórico simplificado de tres poblaciones (Figura 2.10), en el cual consideraron que los factores de transcripción

difunden libremente dentro del núcleo y pueden interactuar con dos poblaciones de sitios de unión (i.e. sitios específicos e inespecíficos) con distintas afinidades.

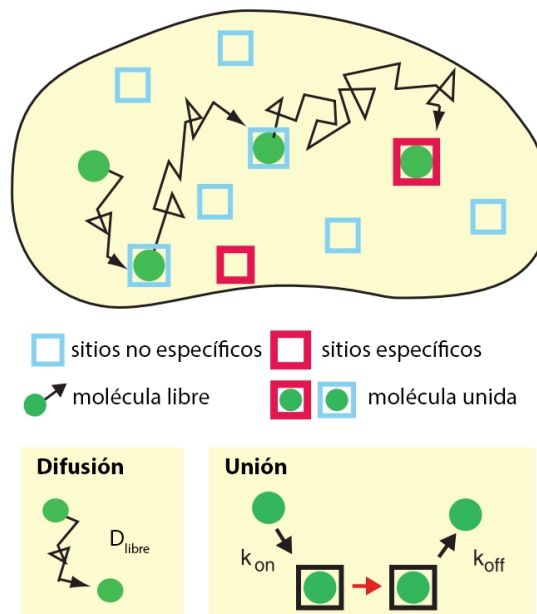


Figura 2.10: esquema de la dinámica de proteínas nucleares. Las proteínas (círculos verdes) difunden libremente en el núcleo e interactúan con sitios de unión (cuadrados). Estas interacciones pueden ser con sitios específicos como promotores (cuadrados rojos) o sitios no específicos (cuadrados azules). Adaptado de [93].

En la actualidad, es un hecho aceptado que no existirían mecanismos activos de transporte de factores de transcripción en el núcleo; estas biomoléculas se trasladarían por difusión pasiva, permitiendo la navegación por el núcleo y búsqueda de sitios de unión específicos sin gasto energético[179]. Sin embargo, el núcleo celular es un entorno sobrepoblado de cromatina y biomoléculas solubles que entorpecen el libre tránsito de las proteínas (detallado en la sección 2.1). En particular, Baum et al.[5] concluyeron que el entorno intranuclear se comporta como un medio poroso multi-escala formado por obstáculos distribuidos al azar que entorpecen la difusión de las moléculas en base a su tamaño.

2.4 Factores de transcripción y desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario, o embriogénesis, es el proceso por el cual el embrión se forma y se desarrolla. En mamíferos el término se aplica a estadios tempranos del desarrollo

prenatal. La embriogénesis comienza con la fertilización del oocito por el espermatozoide para formar el cigoto, una única célula diploide. El cigoto pasa por una serie de divisiones mitóticas sin crecer en tamaño (clivaje) y ocurre el proceso de diferenciación celular para formar un embrión multicelular[180].

Si bien durante el trabajo realizado para esta tesis no abordamos el desarrollo embrionario desde un punto de vista biológico, resulta necesario describir ciertos aspectos del desarrollo embrionario relevantes para los estudios biofísicos realizados.

2.4.1 Proceso de diferenciación en embriones tempranos

La diferenciación celular es un proceso clave en los estadios tempranos del desarrollo embrionario ya que determina cuáles de las células que conforman el embrión contribuirán su progenie al feto y cuáles a las estructuras extraembrionarias [181, 182]. Comprender las bases moleculares biofísicas involucradas en esta decisión es de fundamental importancia para comprender fallas tempranas en embarazos, optimizar la manipulación de embriones para fertilización in vitro y contribuir al diagnóstico genético previo a la implantación [183-186].

Una propiedad clave de las células durante el desarrollo es su potencialidad, es decir, la habilidad de una célula para diferenciarse a distintos tipos celulares. Las células presentes en el óvulo fertilizado o en el cigoto hasta el estadio de ocho células tienen el potencial de generar un organismo completo; a estas células se las denomina *totipotentes*. Durante el desarrollo del cigoto, se pasa por un estadio en el cual sólo se encuentran presentes dos tipos de células, aquellas pertenecientes al trofotodermo y aquellas pertenecientes al macizo celular interno, las cuales a su vez pueden diferenciarse a cualquiera de las tres capas germinales del embrión, el endodermo, el mesodermo y el ectodermo, pero no pueden generar un organismo completo a menos que se las introduzca en un blastocisto receptor, por lo que se las denomina *pluripotentes*. A medida que transcurre el desarrollo, las células continúan diferenciándose y se comprometen a un linaje particular, perdiendo su capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares. En diferentes tejidos adultos como el epitelial o

endotelial hay células madre que mantienen la población de células terminalmente diferenciadas que se dañan o mueren. Estas células progenitoras son *multipotentes*, ya que se encuentran comprometidas con cierto linaje y sólo pueden dar origen a un número limitado de tipos celulares. Aquellas que son precursoras de un único tipo celular, son denominadas *unipotentes*[187]. En la Figura 2.11 se presenta un esquema de la relación entre potencia y grado de diferenciación de una célula.

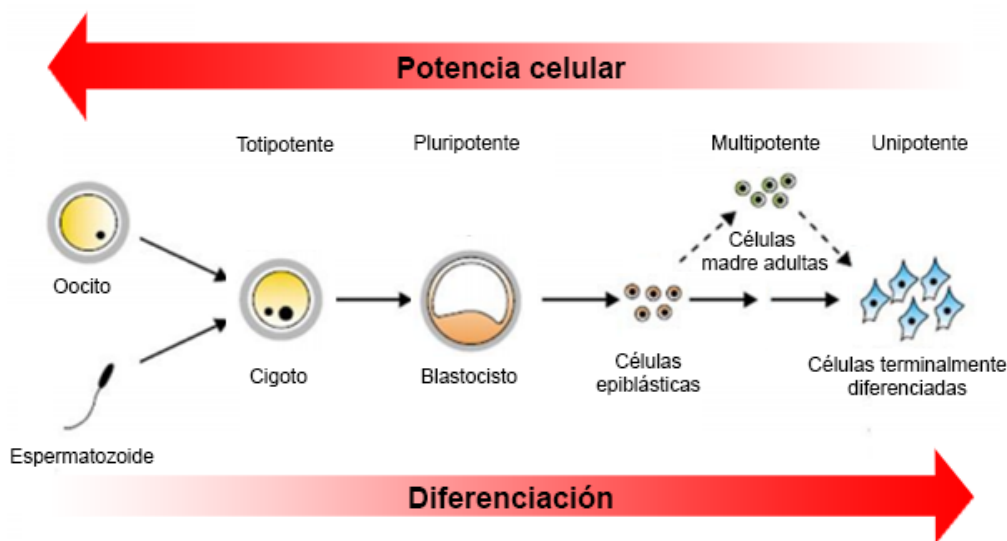


Figura 2.11: relación entre la potencia de una célula y el grado de diferenciación. Adaptado de [188].

El proceso celular de diferenciación puede ser dividido en dos etapas. La primera es una fase reversible, denominada especificación o compromiso, en la que el tipo celular no se encuentra determinado. La segunda fase es irreversible y se denomina determinación, que luego es seguida por la diferenciación. En esta última etapa ocurren los cambios fenotípicos, en la bioquímica, estructura y función que resultan en tipos celulares específicos[189, 190].

2.4.2 Factores de transcripción relacionados con el desarrollo embrionario

Es un hecho muy conocido que ciertos factores de transcripción juegan un papel central en el proceso de diferenciación y en la determinación de los linajes celulares. Trabajos recientes demostraron que la dinámica de estos factores es distinta al comparar células pluripotentes con células diferenciadas hacia un linaje extraembrionario[168, 191].

Por ejemplo, Kaur et al.[168] estudiaron la difusión de diversos factores de transcripción en embriones de ratón mediante FCS, observando que las curvas experimentales obtenidas podían ser ajustadas por un modelo que consideraba una población rápida con difusión normal y una población lenta con difusión anómala. Los autores atribuyeron el comportamiento anómalo a interacciones del factor de transcripción con el ADN, al observar que esta población sufría alteraciones al perturbar el sistema con diversos tratamientos, o inclusive durante distintos estadios del desarrollo.

Estos estudios comprobaron que la dinámica de Oct4, Cdx2 y Sox2 cambia luego de la especificación del linaje celular y que los factores de transcripción presentan menor movilidad en aquel linaje en el cual son esenciales.

2.4.2.1 Oct4

El factor de transcripción Oct4 (*octamer-binding transcription factor 4*), también conocido como Pou5f1 (*POU domain, class 5, transcription factor 1*), posee un rol central en la formación del linaje celular pluripotente y es, por lo tanto, un buen candidato para establecer diferencias durante el desarrollo embrionario en estadios tempranos[192-197]. Embriones que no expresan el gen Oct4 no forman el linaje que da origen al macizo celular interno[195] y una sobreexpresión sostenida de Oct4 puede reprogramar células somáticas a un estadio pluripotente, ya sea en combinación con otros factores de transcripción[198] o por cuenta propia[199, 200].

2.4.2.2 Sox2

Así como con Oct4, la expresión de Sox2 es esencial durante la embriogénesis; embriones que no expresan Sox2 no sobreviven la posterior implantación[201], además de ser uno de los marcadores más tempranos de la formación del macizo celular interno[202]. Sox2, en conjunto con Oct4 y Nanog (otro factor de transcripción responsable de mantener la pluripotencia[203, 204]) forman un centro regulatorio, responsable de mantener la auto-renovación del linaje pluripotente en embriones y células madre embrionarias (*embryonic stem cells, ESC*)[195, 201, 205, 206]. Un par contiguo de sitios de unión altamente conservados para Oct4 y Sox2 es esencial para la

activación de la expresión de genes específicos para el estado pluripotente de ESC[207]. Además, este elemento regulatorio se encuentra cercano al promotor de Nanog[206]. Este complejo regulatorio Sox2-Oct4-Nanog, además de regular la auto-renovación del linaje pluripotente, es responsable por la represión de los genes que inician la diferenciación[208].

2.4.2.3 *Cdx2*

Este factor de transcripción es esencial para la formación y manutención del linaje extraembrionario, en particular el trofotodermo[209, 210]. Su expresión en embriones pre-implantados y estadios tempranos post-implantación se restringe al linaje del trofotodermo, donde actúa como represor de la expresión de Oct4 y Nanog[211-214]. Embriones de ratón que no expresan Cdx2 llegan a formar estructuras similares a blastocistos con pared externa, pero no logran ser implantados ni producen tejido de trofotodermo en cultivo[211]. Estas células de trofotodermo en embriones deficientes de Cdx2 expresan de manera ectópica genes característicos del linaje pluripotente, evidenciando la regulación entre ellos[215]. Por el contrario, la sobreexpresión de Cdx2 puede ocasionar que células ESCs adopten propiedades de células madre de trofoblasto[209, 216].

2.4.3 ¿En qué momento las células empiezan a ser diferentes?

¿En qué momento del desarrollo embrionario de mamíferos las células empiezan a ser diferentes entre sí? y ¿estas diferencias poseen un rol en la determinación del futuro celular? son preguntas muy interesantes y aún abiertas en el estudio del desarrollo embrionario.

Hemos descrito previamente que la primera especificación en el destino celular de embriones de mamíferos se produce con la separación de linajes embrionario y extraembrionario. Históricamente, las células de embriones tempranos de ratón eran consideradas idénticas en su habilidad de dar origen al linaje embrionario o extraembrionario[217, 218]. En particular, la uniformidad en la morfología y la ausencia de diferencias evidentes entre blastómeros en estadios previos apuntaba a un modelo

de determinación estocástica, disparadas por pequeñas heterogeneidades aleatorias y epigenéticas[219, 220]. Esta visión fue respaldada con análisis de niveles de expresión de factores de transcripción en embriones fijados[221] o microscopía de contraste y fluorescencia[222-224]. Estos trabajos concluyeron que la separación entre linajes no era predecible antes del estadio de 16 a 32 células. Sin embargo, estos estudios fueron realizados sobre embriones fijados, imposibilitando la observación de procesos dinámicos que ocurrirían en el embrión durante su desarrollo.

En contraste a esta visión clásica, otros autores propusieron que el destino celular en mamíferos puede ser predicho en estadios tan tempranos como 2 o 4 células[225-227]. Un punto clave en el estudio del rol de las variabilidades epigenéticas en la decisión del linaje celular, fue la identificación de heterogeneidades en los niveles de metilación de arginina en la histona H3 entre las células de embriones en estadio de cuatro células[228]. En este trabajo observaron que una sobreexpresión de CARM1 guiaba los blastómeros hacia la formación del macizo celular interno pluripotente. Por lo tanto, fue sugerido que niveles altos de metilación de la arginina de la histona H3 promueven un estado relajado de la cromatina, facilitando la formación del linaje pluripotente. Como fue descrito en la sección 2.2.2, modificaciones en las histonas controlan la accesibilidad a la cromatina. Por lo tanto, también pueden regular la interacción entre factores de transcripción y la cromatina. En el capítulo 6 se presentarán resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis que estudian estas interacciones *in vivo* en embriones de ratón.

Capítulo 3: difusión en medios porosos ordenados

3.1 Nanoescala y principales características de los materiales mesoporosos

Los nanomateriales se definen como aquellos materiales que poseen una de sus dimensiones físicas en el rango de nanómetros a centenas de nanómetros[229]. Esta característica confiere a dichos materiales propiedades fisicoquímicas muy distintas con respecto a los materiales tradicionales. En esta escala, ciertas propiedades como el punto de fusión, magnetismo e incluso el color se correlacionan con los tamaños característicos del material[230]. Quizás uno de los ejemplos más visuales de esta relación entre tamaño y propiedades sean las nanopartículas de oro en suspensión, donde el color de la solución está relacionado con el tamaño de las mismas (Figura 3.1).

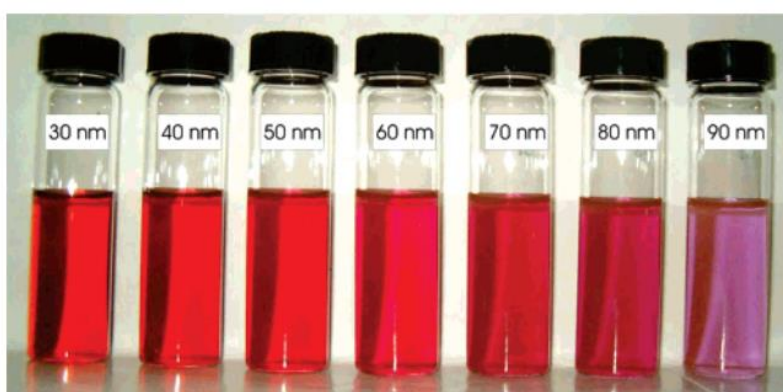


Figura 3.1: nanopartículas de oro de distinto tamaño en solución. La etiqueta indica el diámetro promedio de las partículas. Extraído de [231].

En los últimos años, los materiales porosos han suscitado gran interés dentro del mundo de la nanoescala por sus potenciales aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. Según la definición de la IUPAC[232], los materiales porosos se clasifican de acuerdo al diámetro del poro en tres categorías: microporosos ($d < 2$ nm), mesoporosos ($2 < d < 50$ nm) y macroporosos ($d > 50$ nm).

Una ventaja de los materiales mesoporosos, los cuales son objeto de estudio de la presente tesis, es que su estructura, conectividad y tamaño de poro son controlables durante la síntesis y pueden ser modificados químicamente para reaccionar o responder

en presencia de determinados analitos (Figura 3.2) constituyendo herramientas valiosas para desarrollos tecnológicos, como será detallado en la sección 3.4.

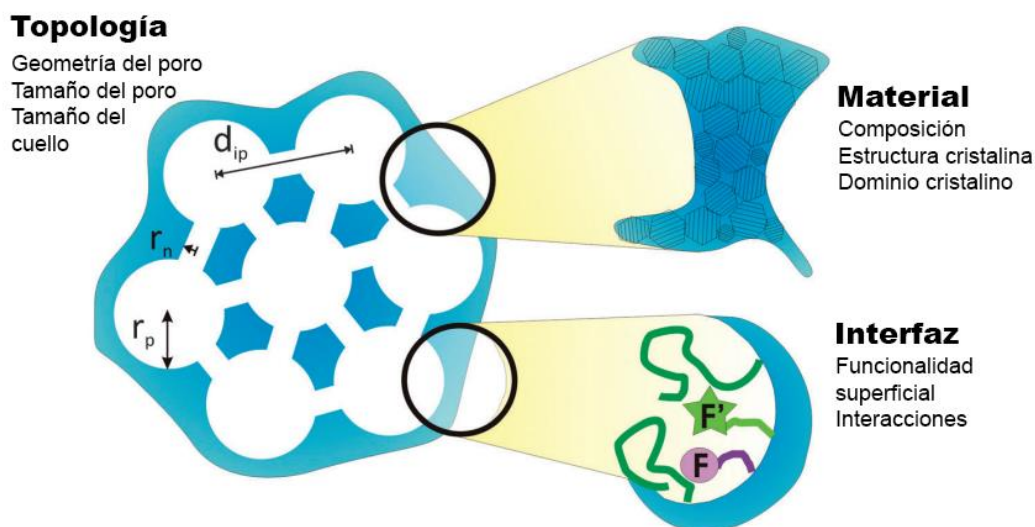


Figura 3.2: esquema de un material mesoporoso y sus propiedades que pueden ser reguladas durante la síntesis. En el esquema, d_{ip} , r_n y r_p representan la distancia entre poros, el radio del cuello y el radio del poro, respectivamente. F y F' representan distintas funcionalizaciones de la pared. Adaptado de [233].

3.2 Breve historia de los materiales mesoporosos

La historia de los materiales mesoporosos es bastante reciente. En los años 90 los materiales porosos más estudiados eran las zeolitas, familias de aluminosilicatos cristalinos[234]. Dichos materiales presentaban pocas aplicaciones debido al reducido tamaño de poro, menor a 2 nm. El próximo avance se dio en el año 1992 cuando fue reportada la síntesis de los primeros materiales mesoporosos, la familia de sílices M41S (MCM-41, MCM-48)[235]. Dichos materiales fueron sintetizados por precipitación en medio acuoso mediante la hidrólisis y condensación de precursores inorgánicos en presencia de surfactantes catiónicos. Los sólidos obtenidos presentan una alta área superficial específica (*specific surface area, SSA*), hasta miles de metros cuadrados por gramo de material, con un tamaño de poro homogéneo entre 2-10 nm, mayor al de las zeolitas previamente obtenidas. Este trabajo es considerado el punto de explosión en popularidad de los materiales mesoporosos. Poco tiempo después se empezaron a realizar estudios sobre el mecanismo de formación de dichos materiales[236-238]

además de otros óxidos de SiO₂[239] y, luego de un par de años, surgieron los primeros ejemplos de óxidos mesoporosos de metales de transición[240-242].

Los surfactantes catiónicos no fueron los únicos moldes utilizados para la síntesis de los materiales mesoporosos. Con el paso del tiempo, se le sumaron moldes aniónicos[239] y no iónicos, como aminas[243], copolímeros dibloque[244, 245] y copolímeros tribloque[244, 246] basados en polióxido de etileno. Por otra parte, se ampliaron las formas de procesar el material y la morfología del mismo. A los polvos obtenidos hasta el momento se le sumaron fibras[247, 248], monolitos[245], esferas[247] y estructuras jerárquicas[249].

En este contexto, se desarrollaron técnicas para la obtención de films delgados de materiales mesoporosos como *spin coating*[250], evaporación controlada[251] y *dip coating*[252, 253]. Esta última técnica de preparación permitió el desarrollo del *autoensamblado inducido por evaporación (AEIE)*[254], cuyo gran aporte fue permitir la síntesis de films delgados de material mesoporoso de forma reproducible. El desarrollo de estos métodos determinó un aumento exponencial en la cantidad y variedad de materiales mesoporosos. El SiO₂ mesoporoso es el material cuya producción fue la más desarrollada, sin embargo, también se produjeron importantes avances en óxidos de metales de transición, carbón y metales mesoporosos con una gran variedad en estructura, conectividad y tamaño de poro.

3.3 Síntesis de materiales mesoporosos

La síntesis de materiales compuestos por óxidos mesoporosos incluye el autoensamblado de surfactantes y reacciones de tipo sol-gel (hidrólisis-condensación de precursores inorgánicos). A continuación, se describirá brevemente cada uno de dichos procesos ya que son relevantes para la síntesis de los materiales usados en el capítulo 7 de la tesis.

3.3.1 Agentes surfactantes y proceso de autoensamblado

Los surfactantes son moléculas anfífilas, esto es, poseen regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas. En la Figura 3.3 se presentan los surfactantes y agentes moldeantes más utilizados en la síntesis de óxidos mesoporosos[255].

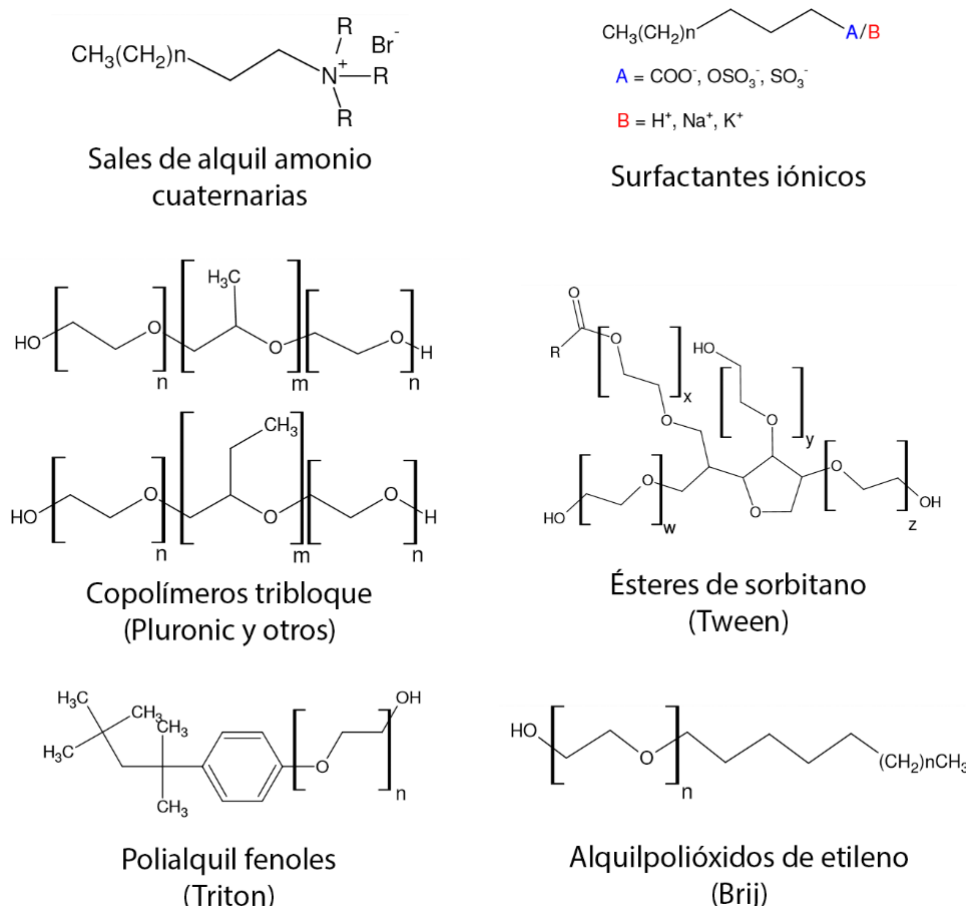


Figura 3.3: surfactantes comúnmente utilizados como agentes moldeantes en la síntesis de óxidos mesoporosos y su nombre comercial (entre paréntesis).

En soluciones acuosas diluidas u otros medios polares, los anfífilos se encuentran solubilizados como monómeros. Al aumentar la concentración, las regiones hidrofóbicas de los anfífilos se atraen entre sí exponiendo las regiones hidrofílicas al medio y minimizando las repulsiones entre las regiones hidrofóbicas y el solvente. Esta estructura, consistiendo en un centro hidrofóbico y una capa exterior hidrofílica, se

conoce como micela y la concentración de anfifilo a la cual ocurre este fenómeno se denomina concentración micelar crítica (CMC)[256]. Si la concentración sigue aumentando, las micelas interactúan entre ellas ordenándose en estructuras periódicas, conocidas como cristales líquidos liotrópicos. Un cristal líquido es un estado de la materia cuyas propiedades se encuentran entre la de líquidos convencionales y las de un cristal sólido[257]. Por ejemplo, un cristal líquido puede fluir como un líquido, pero sus moléculas están organizadas en una estructura de tipo cristalina. Este proceso, esquematizado en la Figura 3.4, en el cual un sistema desordenado de componentes forma una estructura o patrón organizado por consecuencia de interacciones locales específicas entre los componentes, se denomina autoensamblado.

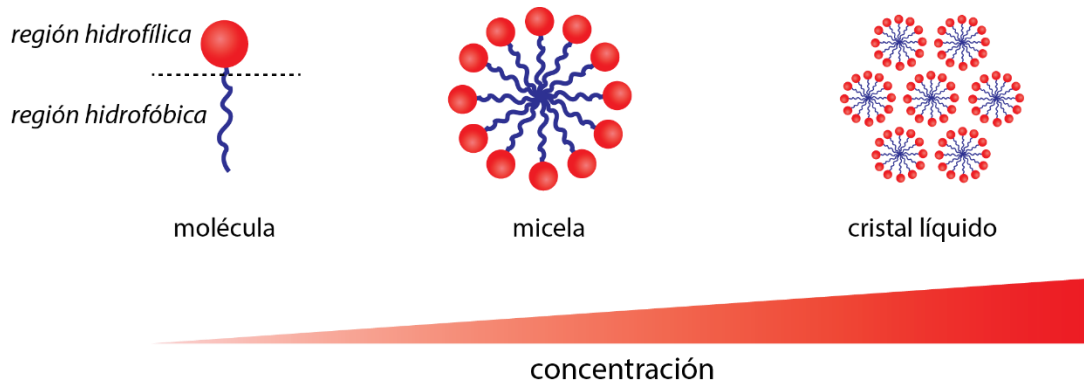


Figura 3.4: esquema del proceso de autoensamblado y efecto de la concentración del agente moldeante.

La estructura tridimensional que se obtendría como consecuencia del proceso de autoensamblado es frecuentemente descrita por el modelo de Israelachvili[258]. En dicho modelo, se considera a los anfífilos como un fragmento cónico (la región hidrofóbica) unido a una cabeza esférica (la región hidrofílica) y se calcula el parámetro g (parámetro de empaquetamiento) cuyo valor predice el tipo de estructura tridimensional:

$$g = \frac{v}{l_c \times a_0} \quad \text{Ec. (3.1)}$$

donde v es el volumen del cono hidrofóbico, l_c es el largo de la cadena hidrofóbica extendida y a_0 es el área efectiva de la región hidrofílica. Por este motivo, el valor de g

depende de la estructura del anfífilo, su concentración, la temperatura y la fuerza iónica del medio. Los ordenamientos más comunes y sus valores de g se detallan en la Tabla 3.1.

Parámetro de empaquetamiento g	Tipo de estructura
< 0.33	Micelas esféricas
0.33-0.5	Micelas cilíndricas
0.5-2	Bicapas (lamelas)
> 2	Micelas inversas

Tabla 3.1: tipo de estructura predicha en función del valor del parámetro de empaquetamiento de acuerdo con el modelo de Israelachvili.

Los óxidos mesoporosos utilizados en el desarrollo de este trabajo de tesis fueron sintetizados utilizando Brij 58 (de la familia de alquilpolióxidos de etileno) y Pluronic F-127 (de la familia de copolímeros tribloque), cuyas estructuras moleculares fueron presentadas en la Figura 3.3.

3.3.2 Método sol-gel de síntesis de materiales porosos

El proceso sol-gel es un método muy utilizado en la síntesis de materiales porosos sólidos a partir de moléculas pequeñas, especialmente en la fabricación de óxidos de silicio y titanio. Este proceso involucra la conversión de monómeros en una suspensión coloidal (sol) que actúa como precursor para una red integrada (gel) de partículas discretas o polímeros. Los precursores más comunes son alcóxidos de metales.

Este tipo de síntesis se realiza, generalmente, en condiciones suaves y solventes acuosos, permitiendo la obtención de fases amorfas o cristalinas metaestables, la incorporación de biomoléculas en el material y el procesamiento de los materiales obtenidos de maneras muy diversas como films, polvos, fibras, etc. (Figura 3.5). La posibilidad de combinar distintos precursores con variadas rutas de síntesis explican la gran cantidad de usos y aplicaciones que presentan los productos obtenidos por el método sol-gel[259].

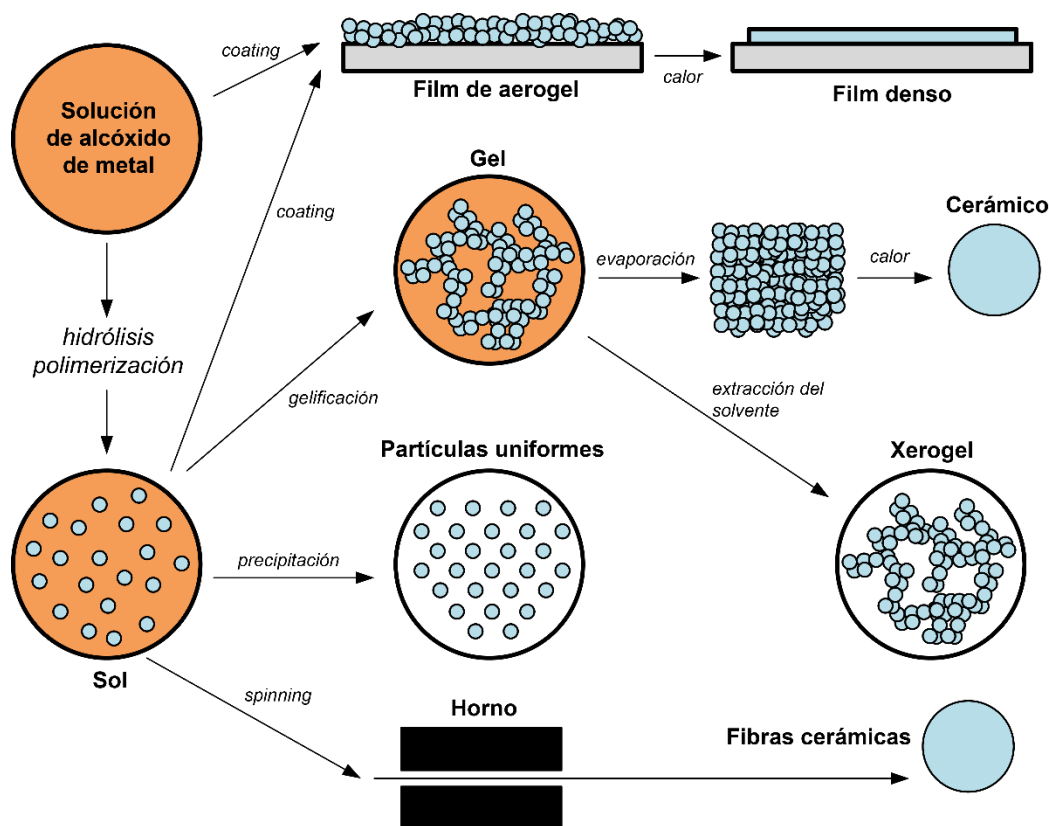
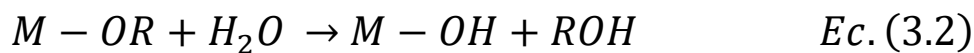
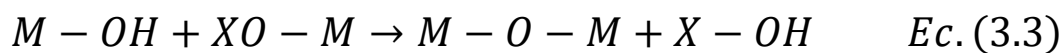


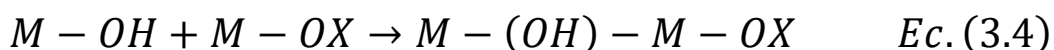
Figura 3.5: representación esquemática de los diferentes estadios y rutas en el proceso sol-gel (adaptado de [260]).

La formación de un óxido por el método sol-gel comienza con la conexión de los centros metálicos mediante puentes oxo o hidroxilo, cuyo fin es generar hidroxopolímeros de metal en solución. Dicho proceso se logra haciendo reaccionar un precursor altamente reactivo MX_4 con agua, donde M es el elemento del cual se quiere obtener el óxido y X es un anión inorgánico o un grupo $-OR$. El primer paso de la reacción es la hidrólisis del grupo alcóxido (o del anión) para formar un hidroxocompuesto.



A continuación, la especie hidroxilada reacciona con otros centros metálicos dando lugar a reacciones de condensación (ecuaciones 3.3 y 3.4) formando así oligómeros y, eventualmente, partículas de óxido. En ambas ecuaciones, X representa un grupo H o R.





Para el caso de precursores de metales de transición, como los de titanio estudiados en esta tesis, ambas reacciones son rápidas, pero requieren de medios extremadamente ácidos ($pH < 1$ para metales tetravalentes) o la presencia de compuestos complejantes en la solución para evitar la condensación extendida.

Un preciso control de las variables que regulan la velocidad de las reacciones de hidrólisis-condensación (solvente, pH, concentración y tipo de precursor y catalizadores) permite definir las propiedades del material que se busca obtener. Además, la cinética de las reacciones sol-gel juegan un rol fundamental en la síntesis, siendo posible obtener de manera sencilla fases metaestables y materiales amorfos.

3.3.3 Mecanismos de formación y métodos de obtención

En las secciones anteriores describimos los dos bloques fundamentales para la síntesis de materiales mesoporosos: el autoensamblado de agentes moldeantes anfífilos y las reacciones sol-gel. Para lograr una correcta obtención de dichos materiales es necesario que ambos procesos ocurran de manera concertada y controlada.

En la Figura 3.6 se representa un esquema de la formación de los materiales mesoporosos. La estructura porosa del mismo es dada por el cristal líquido formado por el agente moldeante (y su posterior remoción por calcinación), y la estructura (o pared) del material está dada por el óxido.

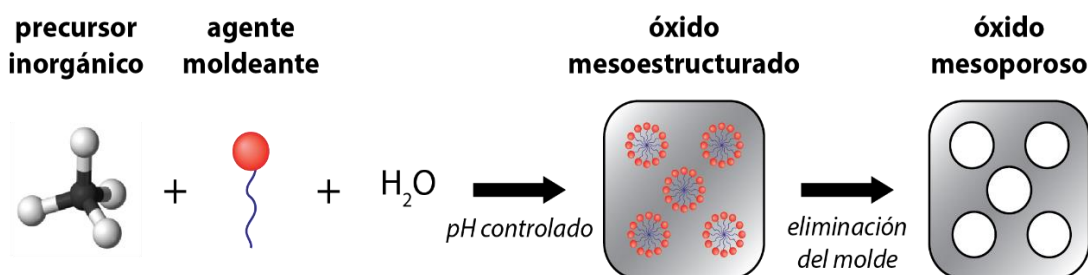


Figura 3.6: esquema de la formación de un material mesoporoso a partir del precursor inorgánico y el agente moldeante.

Todos los estudios mecanísticos de formación de materiales mesoporosos resaltan que la interacción entre el molde y el precursor inorgánico es crucial para el producto obtenido, independientemente del método de síntesis elegido. La interfaz entre ambos es un componente mayoritario y crítico del material final, luego una interacción energética favorable en la interfaz estabiliza el material y contribuye a su correcta formación[261].

Huo y colaboradores[239] y el grupo de Pinnavaia[243] estudiaron la interacción entre el agente moldeante y la pared inorgánica para el caso de surfactantes cargados y no iónicos, respectivamente. En la Figura 3.7 se presenta un esquema de las interacciones propuestas entre ambos componentes.

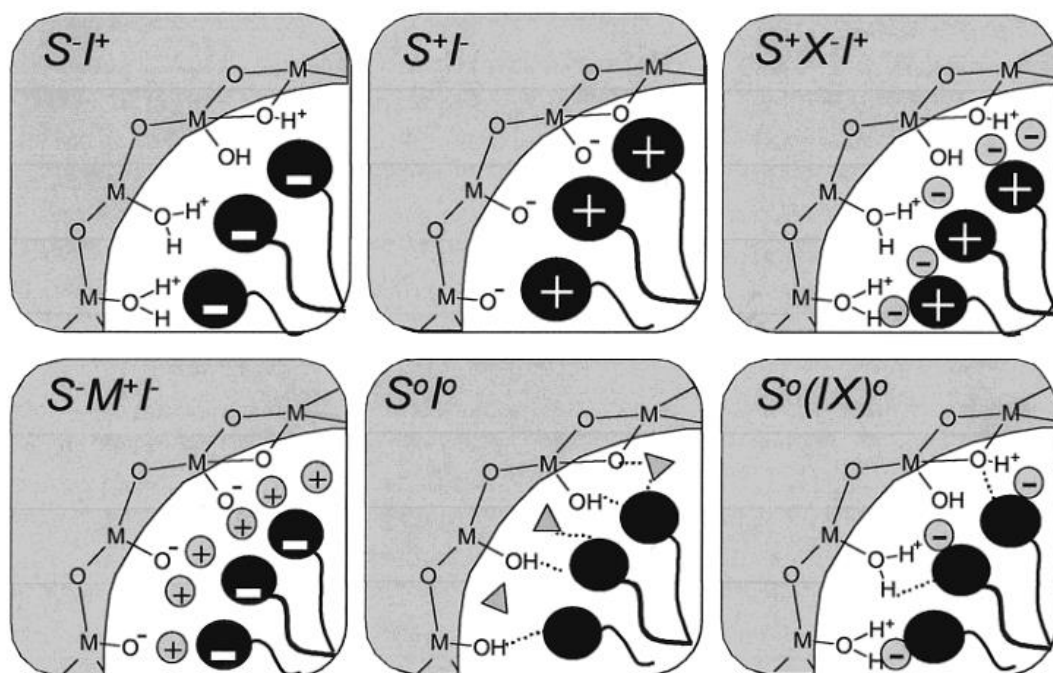


Figura 3.7: representación esquemática de los distintos tipos de interacción entre el agente moldeante y la pared inorgánica. En la nomenclatura de cada tipo de interacción, S representa al surfactante, I la pared inorgánica, M⁺ y X⁻ los correspondientes contraiones y la línea punteada la interacción puente de hidrógeno. Para el caso de S⁰I⁰ los triángulos representan las moléculas de solvente. Adaptado de [234].

El buen diseño de un material mesoporoso se logra variando los parámetros de síntesis (precursor, agente moldeante, pH, solvente, temperatura, entre otros) con conocimiento de las interacciones previamente mencionadas. Los materiales utilizados en este trabajo de síntesis fueron realizados con surfactantes no iónicos (interacciones

S^{0I^0} y $S^{0(IX)^0}$ y se ha determinado que debe trabajarse en condiciones tales que los agregados inorgánicos sean suficientemente hidrofílicos para que puedan interactuar con la región hidrofílica del agente moldeante[262].

La elección de la técnica de obtención está fuertemente relacionada con el tipo de material a obtener. Por ejemplo, el método más utilizado para obtener polvos es la precipitación[235], mientras que para nanopartículas metálicas o de óxidos se utiliza el moldeado por cristales líquidos[245]. A continuación, se detallará el método más difundido para la preparación de films de materiales mesoporosos como los utilizados en el presente trabajo, el autoensamblado inducido por evaporación.

3.3.3.1 Autoensamblado inducido por evaporación

A finales de los años noventa, el grupo de Brinker presentó un novedoso método de síntesis para films mesoporosos delgados, mediante recubrimiento por inmersión (*dip coating*) de un sustrato en una mezcla de reacción integrada por agente moldeante, precursor inorgánico y H_2O en un solvente volátil[252, 254]. El método fue denominado *autoensamblado inducido por evaporación* y es, hasta el día de hoy, el método más utilizado para la preparación de films delgados mesoporosos de estructura y composición variadas. Un esquema general del método y los procesos que ocurren durante su desarrollo se presenta en la Figura 3.8.

La preparación de un film delgado mesoporoso de óxido mediante AEIE comienza con una solución de un precursor inorgánico y un agente moldeante en una mezcla $H_2O/EtOH$ (u otro solvente volátil). La concentración inicial del agente moldeante en solución se ajusta a un valor menor a su CMC. Esta solución inicial corresponde a la zona I de la Figura 3.8. En esta solución se sumerge el sustrato deseado, generalmente vidrio, silicio o ITO (*indium tin oxide*) y con el retirado controlado del sustrato a una velocidad moderada (del orden de mm/s) comienza el proceso de autoensamblado.

A medida que el sustrato es retirado, la película de solvente adherida al sustrato comienza a evaporarse, ocasionando un aumento de la concentración de surfactante. Cuando dicha concentración supera la CMC comienza el proceso de formación de

micelas, representada en la zona II de la Figura 3.8. La utilización de solventes volátiles en la solución del precursor permite lograr un aumento controlado de la concentración de anfifilo y la consecuente formación de micelas.

La etapa final del proceso de AEIE corresponde a la zona III de la Figura 3.8. El solvente volátil se evaporó en su totalidad y se alcanzó un equilibrio con la humedad relativa ambiente. Durante este proceso ocurre el empaquetamiento final de las micelas y la formación del cristal líquido.

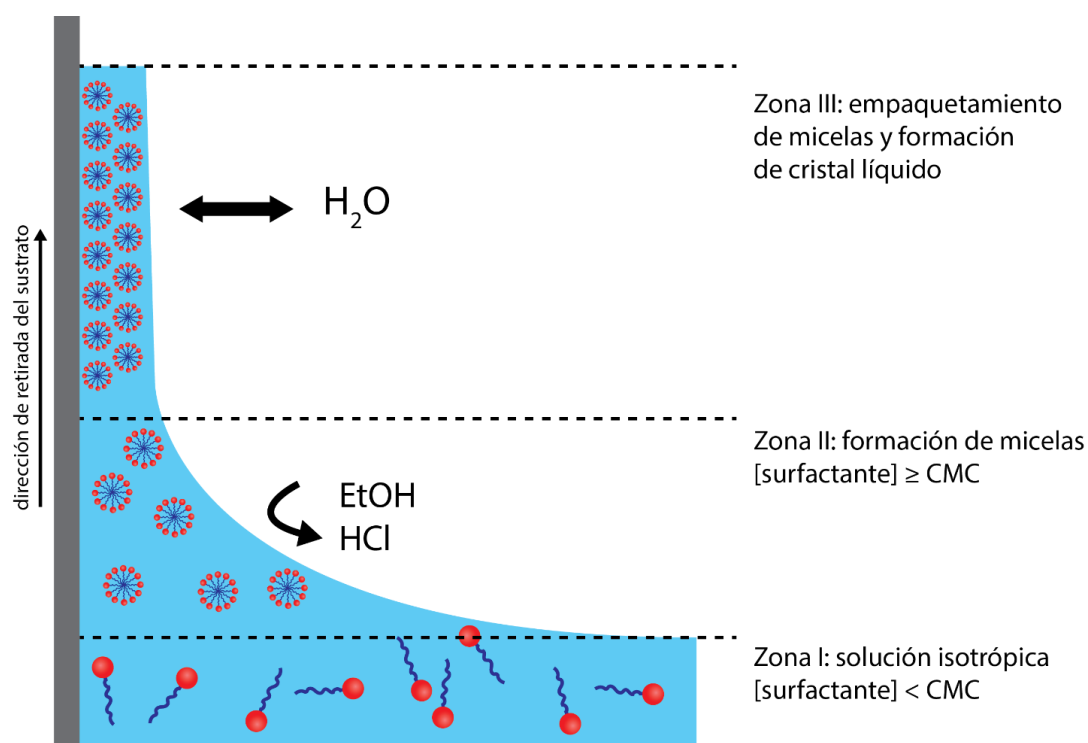


Figura 3.8: esquema del método autoensamblado inducido por evaporación y sus procesos característicos, desde la formación de las micelas al autoensamblado de las mismas.

Durante el proceso de autoensamblado, los agregados de precursor inorgánico presentes en la solución interactúan con las micelas tal como describimos en la sección anterior. Para que el material obtenido resulte homogéneo, es fundamental suprimir la condensación extendida del precursor inorgánico durante la etapa de evaporación. Para metales de transición esto se logra regulando el pH y manteniendo una relación $[H^+]/[M] \approx 1-4$. Una vez que se ha alcanzado el empaquetamiento de las micelas, el material se

comporta como un cristal líquido e, idealmente, es el momento en que debería comenzar la condensación extendida para dar lugar al óxido final.

Un paso clave en la preparación de materiales mesoporosos es la remoción del agente moldeante por tratamiento térmico. Este tratamiento resulta en una conservación de la estructura tridimensional periódica del cristal líquido y genera conectividad entre los poros como consecuencia de la contracción de la red cristalina en la dirección perpendicular al sustrato y una contracción isotrópica de las paredes del material[263]. En la Figura 3.9 se presenta un esquema de este proceso. Los surfactantes no iónicos son usualmente removidos a temperaturas de calcinación de 300-350°C, debido a que un exceso de sinterización a mayores temperaturas en redes de óxido de titanio, como los sintetizados para este trabajo de tesis, causa el colapso de la pared[264-266]. Ozin y colaboradores[266] también calcinaron films a temperaturas superiores (400°C), observando un mayor grado de cristalinidad y menor tamaño de poro que los calcinados a menor temperatura. Por lo tanto, la temperatura de calcinación es un parámetro importante de la síntesis ya que permite regular propiedades del film, como el tamaño de poro y grado de conectividad.

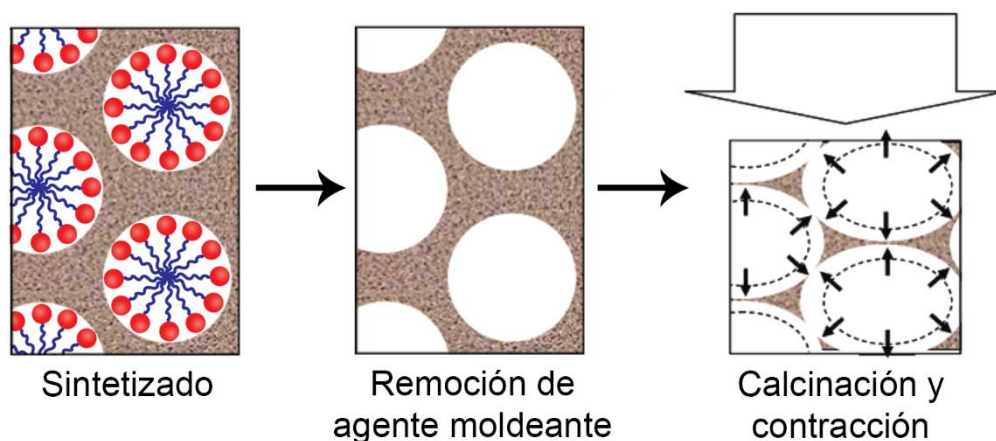


Figura 3.9: esquema del tratamiento térmico para la remoción del agente moldeante, consolidación de la estructura tridimensional y generación de conectividad entre poros. Adaptado de [263].

El desarrollo de este método y la potencialidad de los materiales generados para aplicaciones muy diversas (sección 3.4) determinaron un interés creciente por entender cuáles son los factores que afectan y determinan el tipo de material obtenido. Con este

fin, se utilizaron técnicas que permiten seguir *in situ* la evolución temporal del sistema. Por ejemplo, por interferometría y fluorescencia se pudo determinar que la fase ordenada aparecía una vez alcanzado el espesor final del film[252, 267]. Posteriormente, estudios realizados por 2D-SAXS (*two dimensional small angle X-ray scattering*) o GISAXS (*grazing-incidence small-angle X-ray scattering*) acoplado a medidas de espesor arrojaron resultados similares[268-270]. En particular, se observó para varios sistemas diferentes (TiO_2 y SiO_2 moldeados con surfactantes catiónicos y no iónicos) una tendencia similar: una vez que el film adquiere su espesor final aparece una fase desordenada que luego da paso a la fase final ordenada.

3.4 Aplicaciones de materiales mesoporosos

Los films de materiales mesoporosos poseen propiedades que los hacen ideales para su uso como sensores, incluyendo la gran SSA, transparencia en la región visible del espectro electromagnético, capacidad de ser depositados sobre sustratos conductores, flexibilidad de los films, etc. Dentro de los usos que se le han dado como sensores se destacan los sensores ópticos que cambian su color de acuerdo al medio[271], sensores de gases y humedad relativa, en los que un analito produce un cambio en la conductividad[271-273], o sensores basados en microbalanza de cuarzo, para detección de especies bioquímicas[271]. En la Figura 3.10 se presentan ejemplos de materiales mesoporosos como sensores de gases.

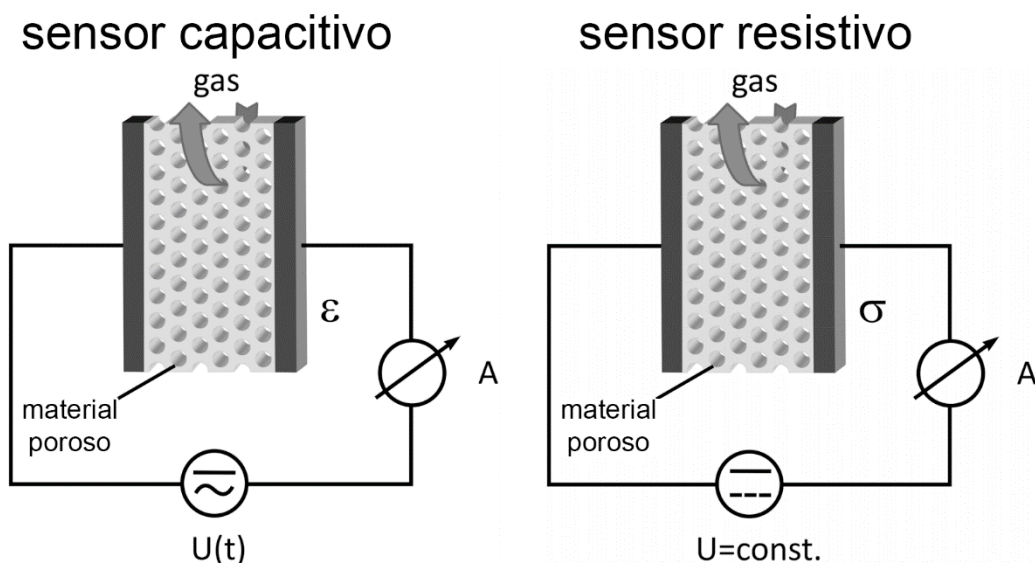


Figura 3.10: representación esquemática de un sensor de gases capacitivo (izquierda) y resistivo (derecha). En ambos casos, el sensor mide el cambio de alguna propiedad del material mesoporoso (permitividad ϵ para el sensor capacitivo, conductividad σ para el sensor resistivo) cuando el gas es adsorbido sobre el material. Adaptado de [274].

Además, los materiales mesoporosos, tanto en forma de polvos como de films, resultaron de gran relevancia en el campo de la catálisis. Estos materiales se utilizaron con éxito para realizar reacciones electroquímicas y polimerizaciones, e incluso el producto de dichas reacciones pueden cambiar según el material utilizado[275-278]. Por otra parte, los films se han empleado para dispositivos de fotocatalisis mediada por semiconductores, especialmente los de TiO_2 , los cuales serán objeto de estudio en esta tesis. Los films mesoporosos de dicho óxido han sido demostrados de uso para la descomposición de contaminantes orgánicos en agua[271].

Cuando los materiales mesoporosos se encuentran depositados en films delgados poseen importantes aplicaciones en óptica, como guía de ondas, fibras ópticas, emisores al encapsular colorantes orgánicos, materiales luminiscentes al ser dopados con tierras raras, entre otros[271]. Otro descubrimiento relevante fue su uso como reflectores de Bragg sensibles a condiciones externas al estar compuestos como multicapas de óxidos mesoporosos con índice de refracción alternado[279, 280]. En la Figura 3.11A se presenta una imagen de estos films multicapas, desde monocapa hasta cuatro capas alternadas. Las propiedades ópticas de estos films se presentan en la Figura 3.11B,

donde se observa un corrimiento hacia el azul y un aumento en el hundimiento de Bragg (*Bragg dip*) al agregar capas al film.

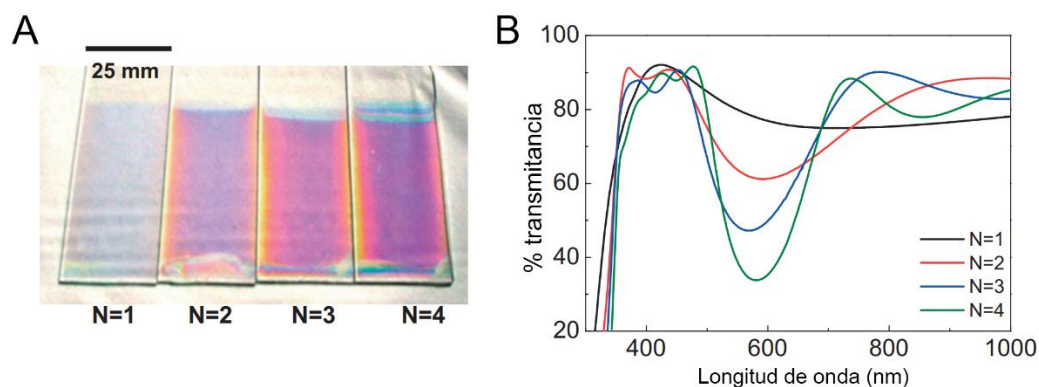


Figura 3.11: imagen de los films multicapas (A) y espectros de transmisión (B). En ambos casos, N denota el número de capas del film. Adaptado de [279].

Finalmente, estos materiales son muy útiles como adsorbentes de contaminantes, dentro de los cuales se destacan metales pesados, aniones, compuestos orgánicos y gases[275, 277, 278]. Además, se han utilizado films mesoporosos funcionalizados con moléculas fotosensibles que actúan como válvulas, permitiendo o no el paso de analitos frente a estímulos externos como luz o calor[281]. En la Figura 3.12 se presenta un esquema de dichos materiales.

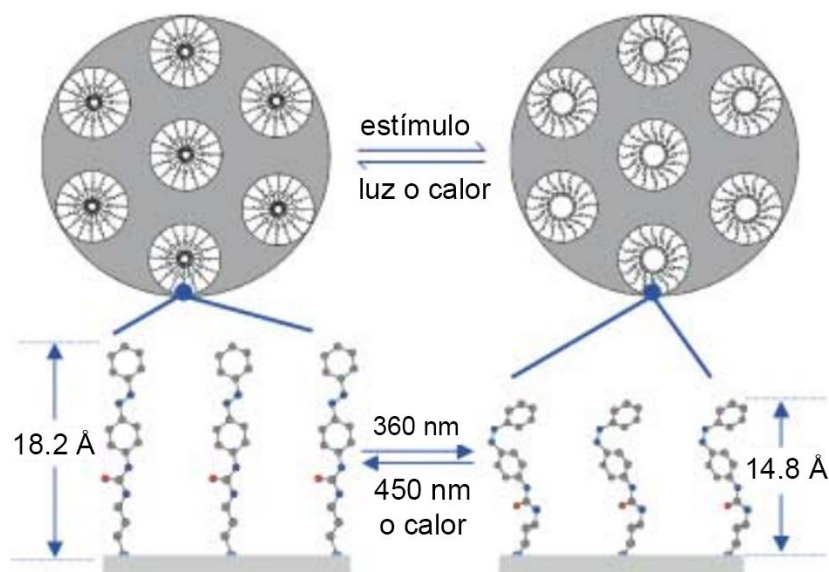


Figura 3.12: esquema de un film mesoporoso fotoresponsivo preparado por AEIE. La molécula de azobenceno alterna entre su conformación *cis* o *trans* por estímulos externos, ocasionando la apertura (derecha) o cierre (izquierda) del poro. Adaptado de [281].

Muchas de estas aplicaciones dependen de la difusión de moléculas en los materiales y de la interacción de las mismas con el sustrato; en la sección siguiente discutiremos el estado de arte en este aspecto.

3.5 Estudio de la difusión en medios mesoporosos

Como mencionamos anteriormente, resulta deseable estudiar los mecanismos de transporte dentro de estos materiales, debido a sus diversas aplicaciones. En este contexto, trabajos previos buscaron realizar esta caracterización utilizando técnicas como RMN[282], cromatografía[283] y técnicas electroquímicas[284, 285]. Sin embargo, estas técnicas involucran la observación simultánea de numerosas moléculas en áreas grandes ($1\text{-}3 \text{ cm}^2$ en las técnicas electroquímicas[285]), impidiendo obtener información sobre posibles micro-heterogeneidades de fenómeno de transporte en estos sistemas. Además, las técnicas electroquímicas, debido al arreglo experimental, estudian el transporte en la dirección perpendicular al sustrato.

Por otro lado, técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia, como FCS y seguimiento de partículas únicas (descritas en el capítulo 1), permiten la obtención de

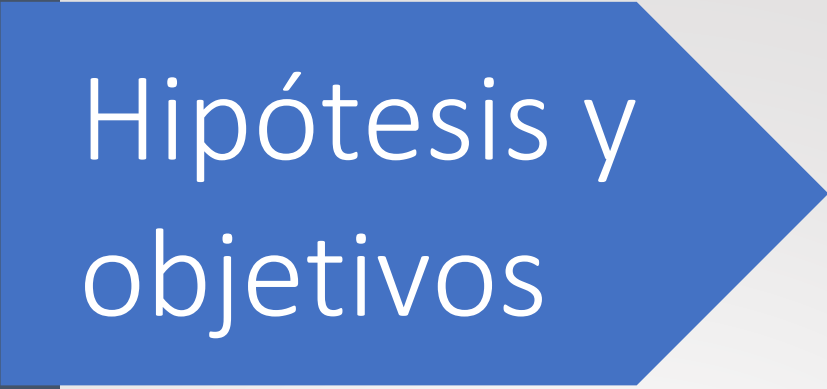
información cuantitativa sobre la difusión de sondas fluorescentes dentro de estos materiales porosos[286]. Estos métodos permiten estudiar de manera más completa y profunda el fenómeno de transporte de masa en la dirección paralela del sustrato, como fue demostrado en diversos trabajos realizados fundamentalmente por los grupos de Higgins[287-291] y Bräuchle[292-294].

Wirth et al.[295-297] fueron pioneros en el uso de FCS para la caracterización de la dinámica de difusión y adsorción de una sonda catiónica en superficies de sílica modificadas con C18. Estas mediciones fueron empleadas posteriormente en diversos sistemas mesoporosos, en particular en films[287, 291, 298-301], relevantes para el presente trabajo de tesis. En particular, Zhong et al.[302] estudiaron la difusión y adsorción de rodamina 6G en partículas porosas de sílica modificadas con C-18, en condiciones similares a una cromatografía de fase reversa. Los coeficientes de difusión obtenidos fueron seis veces menores que los esperados para la sonda en difusión, y los autores atribuyeron estas diferencias al confinamiento de las moléculas dentro de los poros e interacciones con la fase estacionaria.

Fu et al.[287] estudiaron la difusión y adsorción de moléculas neutras de rojo nilo en films con CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*). Posteriormente, Ye et al.[291] compararon la movilidad de rojo nilo y sondas iónicas en films tal cual preparados (i.e. con CTAB presente) y en films calcinados. En los films con CTAB presente, las sondas neutras y catiónicas difundieron dentro del material, mientras que en las sondas aniónicas se observaron eventos largos de adsorción y fotoblanqueo, resultado esperable debido a la naturaleza catiónica del surfactante. Las tres sondas presentaron una fuerte adsorción a los films calcinados secos, sin embargo, el grado de desorción aumentó proporcionalmente con el grado de hidratación de los films. Como en los trabajos mencionados anteriormente, el coeficiente de difusión observado fue menor al esperado para la sonda en solución (cien veces menor[287]). Este trabajo relevó la importancia del solvente y del surfactante para modular el transporte de masa en films mesoporosos de sílica.

En el campo del seguimiento de partículas únicas, el transporte de masa fue estudiado en cristales líquidos liotrópicos[303], polímeros coordinados microporosos[304], copolímeros de bloque[305, 306] y sílica mesoporosa[293, 294, 299, 307-311]. Como en el caso de las técnicas anteriores, los autores también observaron un coeficiente de difusión dentro del material órdenes de magnitud menores que en solución. Tran-Ba et al.[305] atribuyeron esta diferencia a interacciones estéricas y químicas con los poros de 2-3 nm de diámetro. Los autores postularon que, con el nuevo conocimiento en los factores que limitan el transporte de masa, es posible diseñar materiales en los cuales las moléculas difundan más rápido y presenten interacciones más específicas, con el fin de utilizarlos para separaciones químicas.

En el Capítulo 7 presentaremos nuestro aporte al estudio de la difusión de moléculas dentro de materiales mesoporosos. En particular, estudiamos la difusión dentro de films mesoporosos hidratados de TiO_2 , materiales de interés debido a su aplicación en sistemas fotovoltaicos (celdas solares) y remediación ambiental por fotocatalisis[312-314].



Hipótesis y objetivos

Capítulo 4: hipótesis y objetivos

4.1 Contexto científico de este trabajo de tesis

En las últimas décadas, se ha comenzado a estudiar en detalle los fenómenos de transporte de biomoléculas en sistemas complejos, desde biológicos a inorgánicos, dado su gran relevancia en la eficiencia y velocidad de procesos que ocurren en estos sistemas. Este estudio fue potenciado también por el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten visualizar trazadores fluorescentes en estos sistemas de manera no invasiva.

En el capítulo 1 hemos detallado posibles mecanismos que dan origen a la difusión anómala, además de técnicas experimentales y teóricas para estudiar la difusión e interacción de moléculas en entornos complejos.

En el capítulo 2 profundizamos en la estructura del núcleo celular, su compartimentalización y la estructura y función de la cromatina, además de las biomoléculas estudiadas en este trabajo de tesis: los factores de transcripción. También fue descrita la relación entre la función de estas moléculas y el desarrollo embrionario, otro tema central de este trabajo de tesis.

Finalmente, en el capítulo 3 describimos otro sistema complejo de relevancia tecnológica donde resulta de interés estudiar la difusión de biomoléculas: films mesoporosos de óxidos metálicos.

4.2 Hipótesis y objetivos

Como fue mencionado a lo largo de la introducción, la mayoría de los modelos desarrollados hasta la actualidad que consideran difusión en sistemas acuosos diluidos no pueden ser de utilidad para comprender ciertos fenómenos complejos, como el transporte de materia en sistemas atestados o dimensiones similares a la molécula que difunde.

El objetivo central de este trabajo de tesis será comprender procesos de difusión anómala en dos sistemas diferentes. Consideramos que la combinación de herramientas avanzadas de microscopía de fluorescencia y simulaciones computacionales puede ayudar a revelar aspectos fundamentales relacionados con la difusión de moléculas en sistemas complejos.

En particular, la hipótesis subyacente al estudio de la dinámica de factores de transcripción en embriones tempranos es que la microscopía de fluorescencia de correlación permite extraer información valiosa sobre la dinámica de interacción entre factores de transcripción y la cromatina, y que dicha dinámica es clave para determinar el destino celular en estadios tempranos. Por lo tanto, buscaremos desarrollar herramientas informáticas para la simulación de experimentos de microscopía confocal, de forma tal de contribuir a la interpretación de los resultados experimentales obtenidos en sistemas complejos.

Con este fin, utilizaremos un programa ya existente para la simulación de las trayectorias moleculares e interacciones, el cual será acoplado con nuestro programa desarrollado. A diferencia de los programas ya existentes de limitada aplicación, desarrollaremos un programa versátil que permita simular distintos tipos de adquisición en microscopía confocal. Luego, el siguiente objetivo será utilizar esta herramienta y técnicas avanzadas de microscopía confocal para estudiar la interacción de factores de transcripción en embriones tempranos de ratón.

A diferencia del escenario anterior, los films mesoporosos representan un sistema altamente restringido y estático, con dimensiones definidas y parcialmente conocidas. La hipótesis planteada es que propiedades del material, como el tamaño del poro, conectividad entre poros y naturaleza de la pared restringen e influyen el transporte de materia dentro de dichos materiales. Como en el caso anterior, desarrollaremos herramientas informáticas basadas en la simulación de trayectorias moleculares en sistemas periódicos, a la par de realizar experimentos de microscopía confocal para estudiar la difusión de una sonda fluorescente dentro del material.

Metodologías

Capítulo 5: materiales y métodos

5.1 Dinámica de factores de transcripción en embriones tempranos de ratón

El trabajo de biología molecular, manipulación e inyección de los ratones, manipulación de células madre e inmunofluorescencia fue llevado a cabo por técnicos especializados en los laboratorios del EMBL Australia, Australian Regenerative Medicine Institute, Monash University, en colaboración con el grupo del Dr. Nicolás Plachta.

Los experimentos de microscopía confocal fueron realizados en parte por colaboradores del Dr. Plachta y otra parte por mí durante mi estadía en su laboratorio. La interpretación y análisis de datos, el seguimiento celular y la segmentación de embriones fue realizada en mi lugar de trabajo de la tesis.

5.1.1 Embriones y células madre

Fueron utilizadas hembras *wild-type* superovuladas C57BL/6, B6CBA-F1 y B6CBA-SWISS de 28-32 días. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los embriones extraídos del oviducto con medio M2 (Merck) y cultivados en KSOM+AA (Merck) a 37°C y 5% CO₂ cubiertos con aceite mineral (Sigma). Los embriones fueron microinyectados con 0.1 a 0.3 pL RNA diluido en buffer de inyección (5 mM Tris, 5mM NaCl, 0.1M EDTA) con FemtoJet (Eppendorf). Para los experimentos de microscopía, los embriones fueron cultivado en cámaras LabTek (Nunc) a 37°C y 5% CO₂ en una incubadora adaptado para microscopios (Zeiss, Jena).

Células madre embriónicas de ratones C57BL/6 fueron cultivadas con fibroblastos embrionarios irradiados sobre placas plásticas recubiertas con 0.1% gelatina con medio DMEM (Gibco), Glutamax (Gibco), antibióticos (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), β mercaptoetanol (Sigma), 15% suero fetal bovino (Hy-Clone) y 1000 U/ml de factor inhibidor de leucemia (ESGRO) a 37°C y 5% CO₂.

5.1.2 Manipulación de ARN, plásmidos y drogas

La transcripción y purificación de RNA fue realizada utilizando vectores pCS2 y el kit mMESSAGE mMACHINE® SP6 (Ambion) y el kit RNAeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los embriones fueron microinyectados con RNA en las siguientes concentraciones: 100-150 ng/μl para paGFP-Oct4, paGFP-Sox2 and Cdx2-paGFP; 25 ng/μl para H2B-RFP y 40 ng/μl para memb-mCherry.

Las células madre embrionarias fueron transfectadas con plásmidos de paGFP-Oct4, Oct4_{V234P}-paGFP, Oct4_{K118R}-paGFP y Oct4_{ΔSIM}-paGFP según trabajos previos[168]. Para los experimentos de siRNA, las células fueron transfectadas con 200nM ESET siRNA o control negativo siRNA utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para los experimentos de células madres con drogas que regulan la accesibilidad a la cromatina, las mismas fueron incubadas durante 24 horas en medio de cultivo con concentración final de 500nM tricostatina A (Sigma) o 0.5μg/μl actinomicina D (Sigma), respectivamente.

5.1.3 Microscopía confocal y paFCS (*photoactivatable FCS*)

Las mediciones se realizaron en un microscopio Zeiss LSM 780 (Zeiss, Jena) con un objetivo Apochromat 40X 1.2 NA de inmersión en agua. Para FCS, el alineamiento de la apertura confocal para los láseres 488 y 561 nm se realizó de acuerdo a las instrucciones del módulo Confocor 3 (Zeiss, Jena) y el tamaño se fijó en 1 AU (*airy unit*). Las proteínas fusionadas a paGFP fueron excitadas con un láser de argón 488 nm, y RFP o mCherry con un láser diodo 561 nm. Se obtuvo en experimentos de calibración un valor de 0.18 μm para ω_0 .

La fotoactivación multifotónica fue realizada con un láser Chameleon Vision (Coherent) sintonizado a 820 nm con una potencia de 5 μW, como descrito en [168]. Los experimentos fueron realizados en zonas del núcleo fotoactivadas con una distribución homogénea de H2B-RFP, evitando la membrana nuclear, nucléolos y regiones de alta

densidad de H2B-RFP. No se realizaron mediciones en núcleos en fase G1, identificados por su menor tamaño frente a núcleos en fase S/G2. La integridad del núcleo fue monitoreada previo y posterior a cada experimento.

En las medidas de paFCS, la intensidad fue registrada a una frecuencia de 5×10^6 Hz (200 ns por punto) durante 10 a 20 segundos y 7 a 10 repeticiones. La curva de autocorrelación fue calculada utilizando el programa de adquisición ZEN (Zeiss, Jena).

Para los experimentos de *line scan* y FCS, la fluorescencia fue colectada con un detector GaAsP en modo de conteo de fotones. Para *line scan*, se barrió una línea de 2-3 μm a una frecuencia de 1000 Hz durante 200 segundos.

5.1.4 Seguimiento celular y segmentación

La segmentación de los embriones fue realizada con el programa *ilastik*[315], utilizando el módulo *carving* de acuerdo a las instrucciones del programa. Se obtuvieron películas 4D de embriones que expresan memb-mCherry utilizando detectores de avalancha de fotodiodos (*avalanche photodiode detector, APD*) para minimizar la exposición de la muestra. Cada cuadro fue cargado en el programa y se le aplicó un *ridge filter* con $\sigma = 5$ para mejorar el contraste de la membrana y definir bien la interfaz de cada célula. Luego, se calcularon los supervóxeles delimitados por las membranas utilizando algoritmos de *watershed*. Finalmente, para cada célula se definieron los supervoxeles semillas pertenecientes al interior y exterior de la misma y el programa define la morfología 3D de la célula. Los voxeles pertenecientes a cada célula fueron exportados y las superficies y representaciones 3D de los embriones fueron realizadas con el programa FEI Avizo 8 (Visualization Sciences Group).

5.1.5 Análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) y MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). Fue utilizada la prueba t de Student desapareada, y los resultados fueron expresados

como promedio $\pm$ error poblacional. Para la estimación del valor p se asumieron varianzas diferentes.

Para el ajuste de las curvas de autocorrelación con la ecuación 1.8 se utilizó una rutina de ajuste global en MATLAB con el valor de k_{off} común a todas las curvas. El ajuste global permite recuperar constantes de decaimiento en funciones suma de exponenciales sin que exista una correlación entre los valores de las constantes[316].

5.1.6 Simulaciones

Las simulaciones de FCS puntual y *line scan* fueron realizadas con la plataforma MCell-FERNET, como se detallará en el Capítulo 6.

5.2 Dinámica de sondas fluorescentes en materiales mesoporosos

Los films mesoporosos fueron preparados en los laboratorios del Grupo Química de Nanomateriales - Gerencia Química, Centro Atómico Constituyentes, CNEA, en colaboración con la Dra. Paula Angelomé y la Lic. Paula Steinberg.

Las medidas de microscopía confocal y tratamiento e interpretación de datos fue realizada en mi lugar de trabajo de la tesis.

5.2.1 Preparación de los films mesoporosos de TiO_2

Los soles fueron preparados con TiCl_4 (Sigma Aldrich), etanol absoluto (BIOPACK), H_2O E-pure, surfactantes no iónicos tipo copolímero de bloque Brij58 (Merck) o Pluronic F127 (Sigma Aldrich). Para los soles preparados con Brij58, se utilizó una relación molar $\text{Ti}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{Brij58}$ 1:40:10:0.05 mientras que para F127, la relación fue $\text{Ti}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{F127}$ 1:40:10:0.005. Como sustrato se eligió un cubreobjetos de 24x50mm y espesor nominal 1.5 (0.16-0.19 mm), el cual fue lavado exhaustivamente con etanol antes de depositar las películas. Las películas fueron depositadas sobre el sustrato a una velocidad de 2 mm/s en una cámara con 30% de humedad relativa. Luego, se dejaron estabilizar con el siguiente protocolo: un día en una cámara con 50% de humedad

relativa, un día en estufa a 60°C y un día en estufa a 130°C. Finalmente, se trataron desde 130°C hasta la temperatura de calcinación deseada con una rampa de 1°C/min, dejándolos en dicha temperatura por 2 horas. En el caso de temperatura de calcinación de 200°C, hubo un paso adicional que consistió en sumergir las películas en etanol absoluto por tres días para extraer los remanentes de surfactante. Para simplificar la nomenclatura y condiciones de preparado de cada film se adoptó el sistema de abreviaturas detallado en la Tabla 5.1.

Temperatura de calcinación / surfactante	200°C	350°C	400°C
Brij58	TB200	TB350	TB400
F127	TF200	TF350	TF400

Tabla 5.1: nomenclatura utilizada para los films mesoporosos de TiO₂ preparados.

5.2.2 Microscopía confocal y FCS

Las mediciones fueron realizadas en un microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus Inc, Japón) utilizando un láser diodo de 543 nm con una potencia de 0.3 μ W como fuente de excitación. El láser fue reflejado por un espejo dicróico (DM405/488/543/635) y enfocado en la muestra con un objetivo Olympus UPlanSApo 60X de inmersión en aceite (NA = 1.35). La fluorescencia emitida fue colectada por el mismo objetivo, enfocada sobre la apertura confocal (*pinhole*), reflejada con una red de difracción y filtrada por una ranura para acotarla al rango 555-655 nm. La fluorescencia fue cuantificada con un detector fotomultiplicador en modo de pseudo-conteo de fotones (*pseudo photon counting*). Se calibró un valor de 0.23 μ m para ω_0 .

Para las medidas de *point FCS* se utilizó una frecuencia de muestreo de 10⁵ Hz (10 μ s por punto) y se tomaron 8.355x10⁶ puntos por medida, para un total de 83.55 segundos de adquisición. Las curvas de autocorrelación fueron calculadas y ajustadas con un modelo de difusión 2D con el programa SimFCS (Laboratory for Fluorescence Dynamics, www.lfd.uci.edu) o utilizando rutinas caseras de MATLAB. La función de autocorrelación para difusión 2D se define como

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \times \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right) \quad Ec. (5.1)$$

donde $\langle N \rangle$ es el número de moléculas fluorescentes en el volumen confocal y τ_D , el tiempo característico de difusión, se relaciona con el coeficiente de difusión (D) y con la cintura radial de la PSF (ω_0) de la siguiente manera

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad Ec. (5.2)$$

5.2.3 Medidas de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)

Para las medidas de FRAP, el microscopio FV100 fue configurado en forma similar para la excitación y colección a la descrita en la sección anterior. Para observar la muestra, se barrió el láser en un área de 256x256 píxeles (42x42 μm con la magnificación utilizada) con un tiempo por pixel de 10 μs y un tiempo por imagen de 0.928 segundos, con una potencia de láser de 0.3 μW .

El fotoblanqueo fue realizado en una región rectangular de 4 μm de alto por 20 μm de ancho, barriendo la zona rectangular con el láser a una potencia de 30 μW durante 10-20 cuadros.

Por último, se determinó la recuperación de la fluorescencia en la zona fotoblanqueada registrando un cuadro por minuto durante 75-90 minutos. La intensidad de fluorescencia dentro de la zona fotoblanqueada fue normalizada con el criterio de doble normalización, utilizando una zona no fotoblanqueada dentro del cuadro observado con el fin de corregir derivas en el foco durante la adquisición de los cuadros o el fotoblanqueo ocasionado durante el registro de los cuadros. La doble normalización se calcula de acuerdo a la ecuación 5.3, donde $\bar{I}_{\text{FRAP-PRE}}$ e $I_{\text{FRAP}}(t)$ son la intensidad promedio en la zona fotoblanqueada previo al fotoblanqueo y la intensidad en función del tiempo posterior al fotoblanqueo, respectivamente. Similarmente, $\bar{I}_{\text{REF-PRE}}$ e $I_{\text{REF}}(t)$ se calculan en una zona donde no hubo fotoblanqueo,

$$I(t) = \frac{\bar{I}_{REF-PRE}}{I_{REF}(t)} \times \frac{I_{FRAP}(t)}{\bar{I}_{FRAP-PRE}} \quad Ec. (5.3)$$

La recuperación de intensidad de fluorescencia normalizada fue ajustada con la siguiente ecuación empírica

$$I(t) = y_0 + A \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad Ec. (5.4)$$

donde y_0 es la intensidad de fluorescencia en el instante posterior al fotoblanqueo, A la amplitud de la recuperación y τ el tiempo característico de recuperación. En base a la ecuación anterior, la fracción móvil puede calcularse de acuerdo a

$$F_m = \frac{I_\infty - I_0}{1 - I_0} = \frac{(y_0 + A) - y_0}{1 - y_0} = \frac{A}{1 - y_0} \quad Ec. (5.5)$$

5.2.4 Construcción de la geometría de la celda unidad para las simulaciones

La geometría de poros fue construida a partir de datos experimentales de SAX-2D, elipsoporometría, adsorción/desorción y el modelo IIC (*isotropic inorganic pore contraction*)[263] de los sistemas mesoporosos, gentilmente provistas por la Dra. Paula Angelomé y la Lic. Paula Steinberg, del Grupo Química de Nanomateriales - Gerencia Química, Centro Atómico Constituyentes, CNEA. Estas técnicas permiten determinar el tamaño de la celda unidad previa contracción por tratamiento térmico y el grado de contracción en el eje perpendicular al sustrato en función de la temperatura. En la Tabla 5.2 resumimos las propiedades relevantes de estos films para nuestros estudios (sección 8.6).

Sistema	Espesor (nm)	Volumen poroso (%)	Radio cuello (nm)	Radio poro (nm)	Contracción (%)
TB200	145	26.1	0.88 ± 0.1	1.13 ± 0.4	41.2
TB350	113	32.4	1.97 ± 0.4	2.50 ± 0.4	51.2
TB400	112	40.3	2.81 ± 0.5	3.37 ± 1.0	54.4
TF200	193	29.6	1.21 ± 0.1	3.15 ± 0.8	48.3
TF350	161	46.4	2.88 ± 0.4	4.30 ± 0.5	58.6
TF400	143	39.4	3.43 ± 0.5	5.46 ± 0.9	60.9

Tabla 5.2: parámetros geométricos de los films mesoporosos estudiados.

Además de los valores presentados anteriormente, la construcción de la geometría depende del tipo de empaquetamiento y el tamaño de la celda unidad previo a la contracción por el tratamiento térmico. Para los films utilizados en esta tesis, el tipo de empaquetamiento es *Im3m* con un tamaño de celda de 6.0 nm, también determinados por la Dra. Paula Angelomé y la Lic. Paula Steinberg.

Con estos datos, procedimos a simular la geometría del sistema replicando los pasos y modelos descritos en la literatura para la síntesis de films mesoporosos preparados por AEIE. El primer paso fue la construcción de la celda unidad de empaquetamiento *Im3m*, utilizando el valor reportado de 6.0 nm. El siguiente paso fue colocar una esfera en cada posición de la celda unidad para representar las micelas que dan origen al poro (Figura 5.1A). Los valores reportados en la Tabla 5.2 para el tamaño de poro son posteriores a la calcinación y contracción, por lo tanto, no corresponden a los radios de las micelas de origen. Por lo tanto, como aproximación al tamaño de la micela se eligió como valor el tamaño de poro de TB350 (2.50 nm). El siguiente paso fue simular la contracción uniaxial (Figura 5.1B) y la contracción isotrópica del poro (Figura 5.1C). Para la contracción uniaxial se utilizó el valor reportado en la Tabla 5.2, mientras que para la contracción del poro se utilizó el criterio descrito en [263]. Como la contracción isotrópica del poro es debido a la contracción del material inorgánico, la misma fue simulada como una expansión de la esfera que representa el poro.

La siguiente aproximación realizada fue considerar que, debido al poco espesor del film (100-200 nm) frente a la cintura axial de la PSF en experimentos de FCS ($\sim 1 \mu\text{m}$), el transporte en la dirección perpendicular al sustrato (eje Z óptico) es despreciable, reduciendo el sistema a un transporte bidimensional. Debido al empaquetamiento de las micelas que dan origen a los poros, el transporte mayoritario de materia dentro de estos materiales se dará en la dirección del plano diagonal de la celda unidad, conectando el poro central con poros diagonalmente opuestos (Figura 5.1D). Por lo tanto, el plano de difusión de las moléculas se obtuvo al intersectar dicho plano diagonal de la celda unidad con la estructura porosa construida (Figura 5.1E). Finalmente, se procedió a definir la celda unidad, removiendo las líneas que representan intersecciones

dentro de la misma y aquellas que se encuentran por fuera de la celda unidad. La estructura final obtenida (Figura 5.1F) representa la estructura mínima que utilizaremos para generar, mediante repeticiones de la misma, un plano infinito de difusión bidimensional.

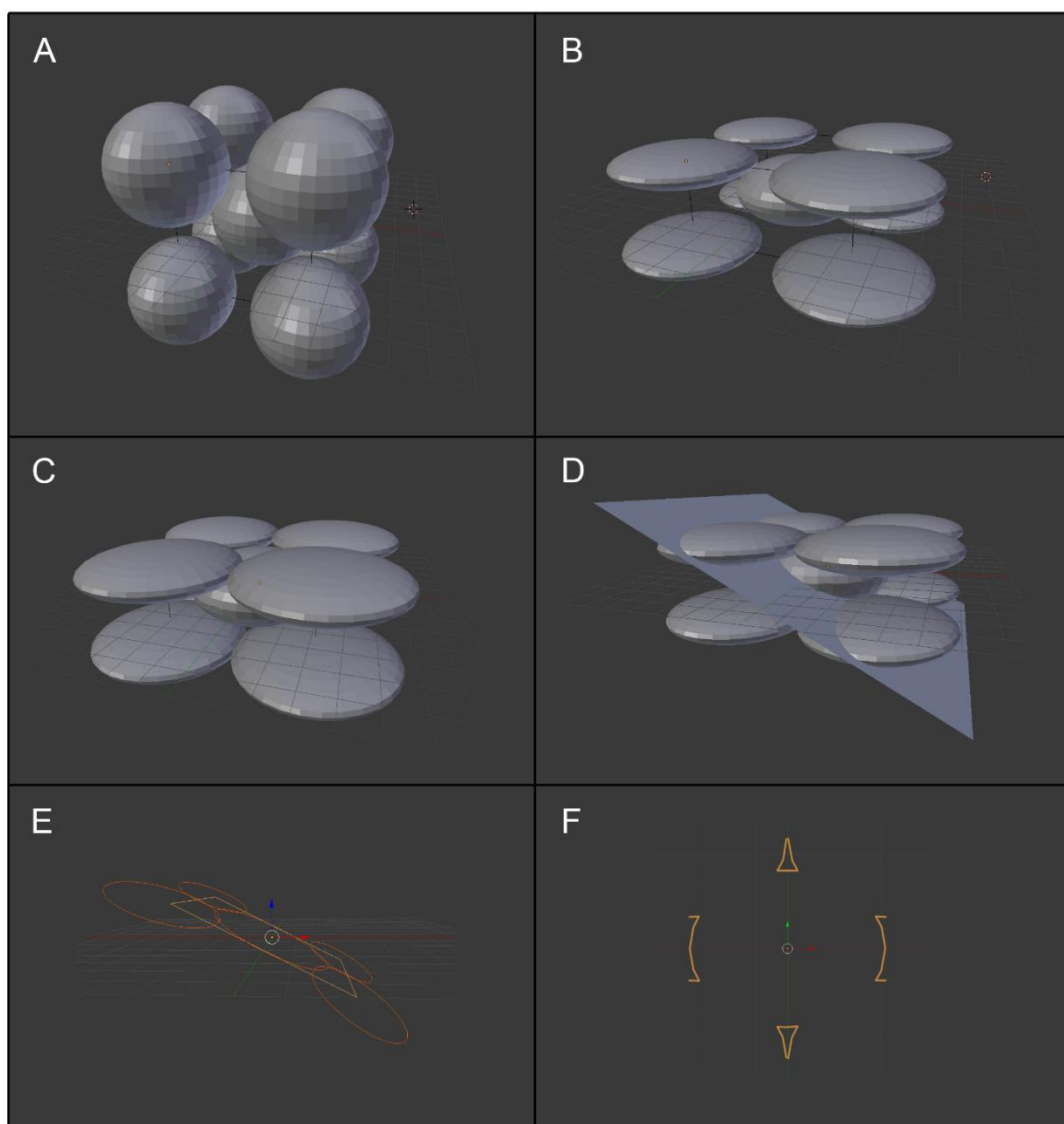


Figura 5.1: esquema de la generación de la geometría de los poros para las simulaciones. (A) Celda unidad con esferas representando la posición de cada micela que da origen a los poros. (B) Contracción uniaxial y (C) contracción isotrópica de las paredes por tratamiento térmico. Como las esferas representan el poro, la contracción isotrópica de la pared fue simulada como una expansión del poro. (D) Plano diagonal de la celda unidad, por el cual se da el transporte de las moléculas. (E) Intersección del plano diagonal con la estructura porosa. (F) Unidad mínima obtenida a partir de e (E) lista para ser replicada infinitamente y generar una geometría periódica.

Resultados y discusiones

Capítulo 6: desarrollo de herramientas informáticas para la simulación de experimentos de FCS en sistemas complejos

6.1 Motivación para el desarrollo de nuevas herramientas

Hemos mencionado en el capítulo 1 antecedentes que describen la utilización de simulaciones computacionales para contribuir a la interpretación de los resultados experimentales en microscopía de fluorescencia. En el caso de las técnicas de correlación de fluorescencia, solamente procesos sencillos en sistemas simplificados, como difusión pasiva en un espacio homogéneo, poseen soluciones analíticas que permiten extraer información cuantitativa. En el capítulo 2 mencionamos que el núcleo celular es un entorno complejo, donde los fenómenos de transporte e interacción muchas veces no pueden ser explicados por modelos sencillos. En estas situaciones, las simulaciones computacionales se vuelven herramientas fundamentales para poder elucidar los fenómenos que luego son registrados en los experimentos.

La gran mayoría de trabajos que realizan simulaciones de experimentos de microscopía de fluorescencia combinan la generación de las trayectorias moleculares y la generación de fluorescencia en un único programa, limitando los escenarios a ser simulados a difusión y reacciones simples dentro de una caja homogénea[101, 102, 105, 107]. Dichos sistemas simplificados distan bastante de los tipos de simulaciones que pueden ser de utilidad para interpretar experimentos de FCS en escenarios complejos. Por este motivo, decidimos desarrollar una herramienta robusta, modular y de fácil uso que permita simular diversos experimentos de FCS en microscopios confocales, utilizando como base un programa existente y validado para la simulación del movimiento de las partículas.

6.2 Generación de trayectorias moleculares en sistemas complejos

Hemos mencionado en la sección 1.4, antecedentes que muestran que las rutinas utilizadas para la simulación de trayectorias son muy limitadas, utilizando algoritmos de *random walk* básicos y reacciones estocásticas simples[105, 107]. Por este motivo, decidimos usar como punto de partida el programa de código libre MCell (Monte Carlo

Cell, <http://mcell.org>), una herramienta poderosa para la simulación de procesos biológicos en geometrías complejas.

6.2.1 Breve descripción de MCell

MCell es una herramienta diseñada con el fin de simular la complejidad de los procesos biológicos como cascadas de señalización y rutas metabólicas, con interacciones entre varios componentes en solución y/o compartimentalizados. MCell posee numerosas ventajas frente a otras herramientas de simulación ya que la aproximación estándar para sistemas de reacción-difusión ignora la naturaleza discreta de los reactantes y el carácter estocástico de su interacción, mientras que técnicas basadas en ecuaciones maestras, como el algoritmo de Gillespie[317], suponen que a cada instante las partículas están uniformemente distribuidas en el espacio.

MCell incluye rutinas optimizadas de dinámica browniana para modelar la difusión de moléculas individuales en volúmenes o superficies, trazado de rayos de vectores de movimiento para detectar colisiones y probabilidades de Monte Carlo para decidir las colisiones que resultarán en eventos de reacción[318-320]. Las partículas difunden en el sistema y las reacciones ocurren de manera instantánea siguiendo un proceso poissoniano. Este enfoque permite desacoplar los eventos de reacción de los de difusión.

Los escenarios de geometría compleja que MCell permite simular son fácilmente creados con Blender, un programa CAD de código abierto (<http://www.blender.org>). Además de facilitar la construcción de la geometría del sistema, Blender sirve también como plataforma para visualizar las trayectorias moleculares generadas con MCell y generar imágenes o películas del escenario simulado, útiles para observar patrones de expresión o cascadas de señalización. Los archivos de entrada de MCell son archivos de texto con la descripción del sistema como en la gran mayoría de los programas de simulaciones computacionales (AMBER, GROMACS, Gaussian, etc.), El *plugin* CellBlender es el encargado de convertir la geometría 3D y parámetros del sistema generada en Blender en archivos de texto interpretables por MCell. Para los casos de

geometría sencilla, como una caja con distribución homogénea de partículas, los archivos de configuración para MCell son simples y pueden ser generados con cualquier editor de texto.

A modo de ejemplo, la Figura 6.1 presenta una captura de pantalla del programa Blender, el cual, en conjunto con CellBlender, se utilizó para crear un escenario complejo para ser simulado utilizando MCell.



Figura 6.1: captura de pantalla de Blender y CellBlender utilizados para la creación de un modelo para la unión neuromuscular de rana. Extraído de [321].

La idea subyacente a nuestro trabajo fue aprovechar la facilidad de uso de MCell para generar trayectorias moleculares en sistemas complejos, y desarrollar un programa que utilice estas trayectorias como base para la generación de trazas de fluorescencia. Lamentablemente, nos encontramos con el problema de que ninguno de los modos de salida de MCell era adecuado para simular los experimentos de fluorescencia requeridos, ya sea porque carecían de la información espacial necesaria o la misma estaba codificada en un formato poco práctico para la generación de información de fluorescencia. Por este motivo, fue necesario modificar el código fuente de MCell para que el archivo de salida del mismo tenga un formato adecuado y práctico.

6.2.2 Diseño de un formato de salida de MCell adecuado para la generación de trazas de fluorescencia

El código fuente de MCell fue modificado para incorporar un nuevo modo de salida adecuado para la simulación de experimentos de microscopía de fluorescencia. En la Figura 6.2 se detalla el formato del archivo de texto de salida de MCell con la información pertinente a las trayectorias moleculares y parámetros necesarios para la generación de fluorescencia.

```
timestep Dmax ← header
molec1 X1 Y1 Z1
molec2 X2 Y2 Z2
...
...
...
molecM XM YM ZM
iter 100 0 N ← fin de la iteración 0
molec1 X1 Y1 Z1
molec2 X2 Y2 Z2
...
...
...
molecM XM YM ZM
iter 100 1 N ← fin de la iteración 1
...
...
...
```

← nombre y posiciones de la molécula en iteración 0

← nombre y posiciones de la molécula en iteración 1

Figura 6.2: formato del archivo de salida de MCell con las trayectorias moleculares simuladas. En rojo se detalla la funcionalidad de cada línea o bloque.

Como se mencionó en la sección 1.3.2.2, la información adquirida en un experimento de microscopía de fluorescencia confocal es la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia. En el caso sencillo de una medición en la cual el láser se mantiene en una posición fija, el valor de la intensidad en cada punto de la traza se obtiene al sumar los fotones emitidos por todas las moléculas del sistema que permanecieron en el volumen de observación en el tiempo de integración. El formato del archivo de salida diseñado sigue esta organización para facilitar la generación de la traza de fluorescencia.

La primera línea del archivo de salida, comúnmente denominado *header*, posee información temporal del sistema simulado, la cual será necesaria para la posterior generación de la traza temporal de intensidad de fluorescencia. El primer parámetro, *timestep* (paso de simulación o tiempo de iteración), corresponde al tiempo de muestreo en el cual MCell graba las coordenadas de las partículas. El segundo parámetro, *Dmax*, es el mayor coeficiente de difusión de todas las especies simuladas. Estos parámetros serán de importancia para determinar si las condiciones simuladas son adecuadas para generar correctamente los datos, como se detallará en la siguiente sección.

Luego de esta línea, el resto del archivo de salida se encuentra organizado en bloques. Cada iteración se encuentra separada por una línea especial, y dentro de cada bloque de iteración se detalla el nombre y posición de cada partícula del sistema. Este tipo de formato de archivo permite una fácil interpretación y organización por parte del programa para simular los experimentos de fluorescencia, como se detallará en las siguientes secciones.

6.3 Generación de la traza de intensidad de fluorescencia

En la sección anterior describimos que MCell permite simular un sistema molecular complejo y obtener información espacial de las moléculas en un formato adecuado para la simulación de experimentos de fluorescencia. En esta sección, utilizaremos como punto de partida esta información y le otorgaremos a cada una de las distintas especies un brillo molecular (definida en cuentas por molécula por segundo, *cpms*), además de definir las propiedades del volumen de observación, la colección de la intensidad y los parámetros de adquisición de los datos. Con esta información, en conjunto con la información espacial obtenida con MCell, construiremos las simulaciones de experimentos de microscopía de fluorescencia.

A continuación, se detallarán los algoritmos y parámetros utilizados por el programa de simulación de experimentos de fluorescencia, y mostraremos ejemplos de simulaciones para ejemplificar las múltiples aplicaciones que puede tener esta rutina. Dicho programa

fue bautizado como FERNET (*Fluorescence Emission Recipes and NumErical routines Toolkit*), cuyo código fuente, manuales, ejemplos y la versión modificada de MCell se pueden encontrar en <http://www.dc.uba.ar> y <https://github.com/jfangiolini/FERNET>.

6.3.1 Algoritmo de excitación/emisión

La Figura 6.3 esquematiza el algoritmo diseñado para generar trazas de intensidad de fluorescencia a partir de las trayectorias moleculares de MCell. FERNET utiliza un volumen confocal cuyas dimensiones pueden ser fácilmente modificables en el archivo de configuración. Para la microscopía confocal, el volumen de observación puede ser aproximado por un elipsoide gaussiano 3D[34]. En cada paso de simulación, el programa evalúa la posición de cada partícula en el volumen confocal y calcula la probabilidad de excitación (g) con la siguiente ecuación:

$$g(x, y, z) = \exp\left(\frac{-2((x - x_0)^2 + (y - y_0)^2)}{\omega_{xy}^2} + \frac{-2(z - z_0)^2}{\omega_z^2}\right) \quad Ec. (6.1)$$

donde ω_{xy} y ω_z son las cinturas radial y axial de la PSF, respectivamente, y (x_0, y_0, z_0) es la posición del centro del volumen confocal.

Para determinar si una molécula es excitada o no el valor de g es comparado con un número al azar entre 0 y 1; si el primero es mayor se considera a la molécula en un estado excitado. Si la molécula es excitada tendrá una probabilidad determinada de emitir un fotón. Tal como describimos en la sección 1.3.2.1, existen procesos no radiativos que compiten con la fluorescencia, por lo tanto, no toda molécula excitada decae al estado fundamental emitiendo un fotón. Para determinar si la molécula excitada emite fotones, definimos el parámetro q como $q = \epsilon \cdot \kappa$, donde ϵ es el brillo molecular (en *cpsm*) y κ es el tiempo entre eventos de emisión (del orden de nanosegundos para los fluoróforos utilizados en microscopía confocal, el tiempo de excitación y de relajación se consideran despreciables en esta escala temporal[34]). El parámetro q representa entonces el número medio de fotones que emitirá la molécula por unidad de tiempo. El algoritmo sortea un segundo número al azar entre 0 y 1 y lo

compara con el valor de q . Similarmente a la excitación, se considera que la molécula emitió un fotón si el valor de q es mayor al valor sorteado al azar.

Para determinar el número total de fotones emitidos por una molécula durante un paso de simulación (t_s), el proceso descrito previamente es repetido t_s/κ veces, suponiendo que la posición de la molécula es aproximadamente constante durante t_s . Dado que esta aproximación no será válida para moléculas rápidas, el programa compara el valor de t_s con el tiempo de tránsito por el volumen confocal de la molécula más rápida simulada (τ_{Dmax}): si $\tau_{Dmax} < 10t_s$ el programa le sugiere al usuario que verifique y modifique el valor de t_s en la simulación de MCell para no introducir artefactos.

El procedimiento descrito anteriormente es repetido para cada una de las moléculas simuladas y la intensidad de fluorescencia para cada paso de simulación es calculada sumando los fotones emitidos por todas las moléculas. Este proceso se repite para todos los pasos de simulación obteniéndose una traza de fluorescencia en función del tiempo. En la Figura 6.3 se presenta un esquema del algoritmo descrito.

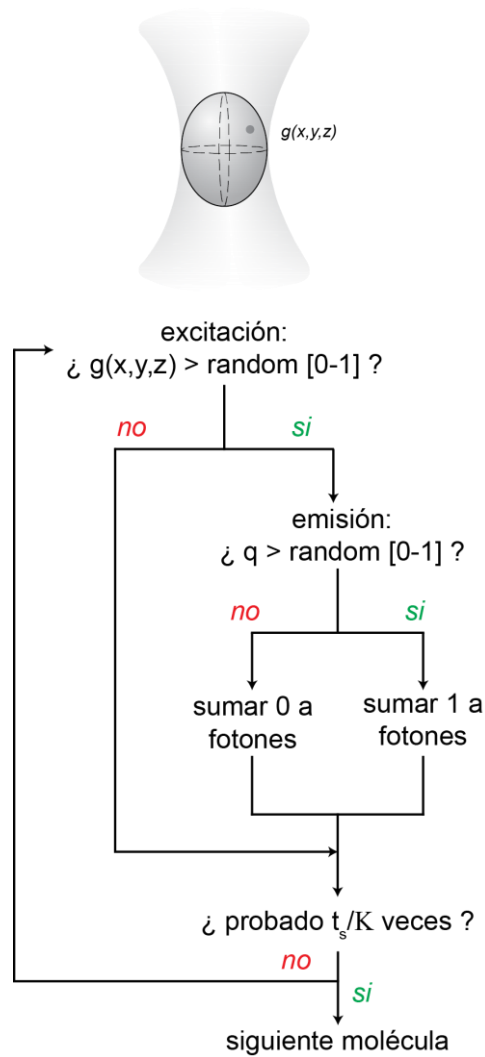


Figura 6.3: esquema del algoritmo de excitación/emisión de FERNET, detallando los chequeos que realiza en cada paso de simulación.

Además, implementamos en FERNET la posibilidad de simular experimentos de fluorescencia en dos canales, permitiendo obtener imágenes en dos colores o simular experimentos de correlación cruzada, útiles para estudiar interacción entre moléculas por FCS[322]. Como se verá más adelante, al darle entidad fluorescente a las moléculas simuladas por MCell, se puede optar por que las mismas emitan en cualquiera de los dos canales o en ambos, simulando moléculas con marcación doble[323].

En la sección 1.3.2.2 describimos que existen técnicas de FCS que utilizan imágenes para subsanar la pérdida de resolución espacial en experimentos puntuales. Debido a la relevancia de estos experimentos, decidimos incorporar la posibilidad de simular estas

técnicas de barrido confocal en un área y de adquisición de imágenes con iluminación en un plano (SPIM, sección 1.3.2.3) en FERNET.

6.4 Modos disponibles para la simulación de experimentos de fluorescencia y sus parámetros

Al momento de ejecutar FERNET, es necesario definir el modo de captura a simular y especificar dos archivos de entrada: i) las trayectorias moleculares obtenidas con MCell y ii) un archivo de configuración con los parámetros relativos a la generación de fluorescencia. En la Figura 6.4 se muestra un diagrama de flujo de la realización de una simulación, detallando los programas y archivos de salida mencionados en la sección 0 además de los archivos y programas relativos a FERNET.

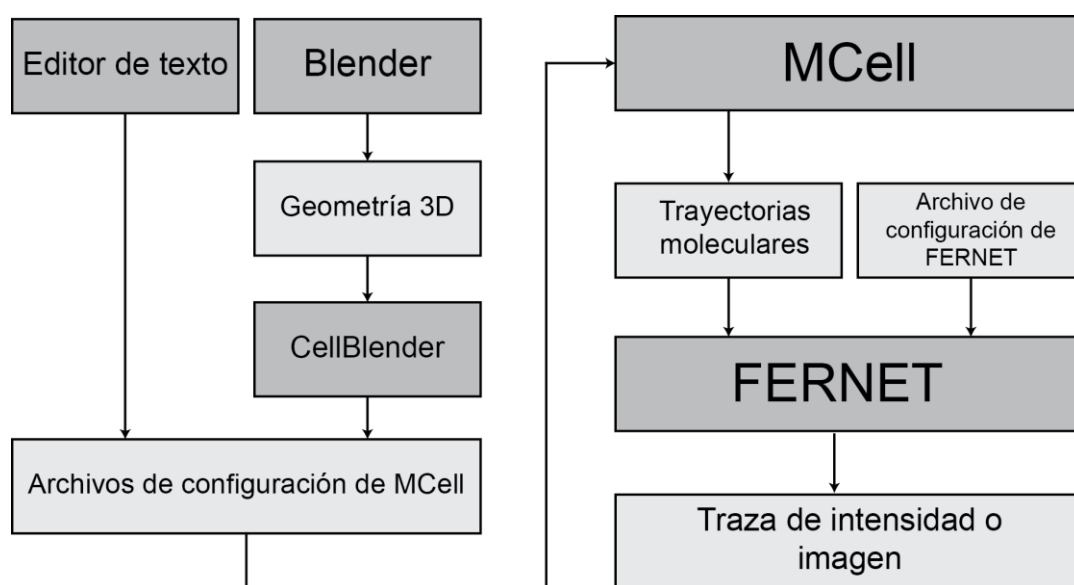


Figura 6.4: esquema de archivos, programas y pasos a seguir necesarios para la simulación de experimentos de fluorescencia utilizando la plataforma MCell-FERNET.

El archivo de configuración de FERNET es un archivo de texto simple que contiene toda la información y parámetros para la generación de fluorescencia. Este archivo se encuentra dividido en bloques, uno para los parámetros comunes a todos los modos y un bloque para cada uno de los posibles modos. A continuación, se detallarán los parámetros de cada bloque (en el anexo a este capítulo se muestra un ejemplo del archivo de configuración con los valores predeterminados).

6.4.1 Parámetros comunes a todos los modos

El bloque común a todos los modos posee información sobre el tamaño de la PSF (cintura radial y axial), el parámetro κ (sección 6.3.1), qué moléculas emiten en cada canal y con qué brillo molecular (en *cpms*). Además, si el usuario lo desea, se puede agregar ruido a los datos simulados para poder analizar cómo éste podría afectar las observaciones. El ruido agregado posee dos componentes: ruido de disparo (*shot noise*) y ruido de lectura (*readout noise*). El primer tipo de ruido, asociado a la dualidad onda-partícula de los fotones, es modelado como un proceso poissoniano con valor medio $\sqrt{N}$, donde N es la cantidad de cuentas obtenidas en el paso de simulación[324]. El segundo tipo de ruido, originado por el ruido asociado al proceso de lectura en equipos electrónicos, es modelado como un proceso gaussiano con media cero y desvío estándar igual a uno, sólo tomándose en cuenta la rama positiva de la distribución[325].

6.4.2 Modo de FCS en un punto fijo (*single point FCS*)

Éste es el modo más sencillo de FCS en microscopía confocal, consiste en coleccionar la fluorescencia proveniente de una PSF inmóvil durante todo el experimento. Para realizar este tipo de simulaciones, es necesario especificar el centro espacial de la PSF y el prefijo del nombre del archivo de salida. La PSF se mantiene en la posición inicial durante el transcurso de la simulación y el resultado obtenido es la traza de intensidad con un total de puntos igual a la cantidad de pasos simulados en la generación de la trayectoria.

6.4.2.1 Ejemplo de simulación: FCS en un único punto y detección en dos canales

En este caso, utilizamos el modo *single point FCS* del programa en un escenario en el cual las moléculas de interés difunden e interactúan con sitios de unión fijos. Como veremos en el capítulo 6, este tipo de escenario será de gran interés para dilucidar la información que es posible extraer a partir de experimentos en núcleos de embriones expresando factores de transcripción fusionados a proteínas fluorescentes. Trabajos previos mostraron que dichas simulaciones son de extrema ayuda para estudiar la interacción de factores de transcripción con cromatina en células *in vivo*[107, 326].

El primer caso estudiado consiste en dos especies A y B (por ejemplo, dos factores de transcripción marcados con fluoróforos que emiten en rangos espectrales distintos) que difunden e interactúan con distintos sitios de unión (Figura 6.5A) o compiten por el mismo sitio de unión (Figura 6.5B). Si bien las funciones de autocorrelación (*autocorrelation function, ACF*) de las moléculas son similares, mostrando la componente de difusión ($\tau_{\text{dif}} \approx 0.2\text{-}0.5\text{ ms}$) y la componente de interacción con el sitio de unión ($\tau_{\text{bind}} \approx 10\text{ ms}$), ambos escenarios pueden ser claramente distinguibles gracias a la función de correlación cruzada (*cross-correlation function, CCF*). La correlación cruzada es una variante de la autocorrelación descrita en la sección 1.3.2.2, con la diferencia de que en vez de correlacionar temporalmente la traza de intensidad obtenida en un canal del microscopio consigo misma se correlaciona con la traza de intensidad obtenida en el otro canal. Este análisis permite, entre otras cosas, detectar fluctuaciones simultáneas en los dos canales que se producen como consecuencia de una asociación entre las moléculas marcadas con las distintas sondas[327].

En el primer caso, dicha función es nula ya que las moléculas marcadas con sondas distintas son independientes entre sí, mientras que en el segundo caso se observa una anticorrelación en la escala temporal del evento de unión (Figura 6.5B), ya que la molécula A sólo se unirá al sitio cuando la B no se encuentra unido al mismo.

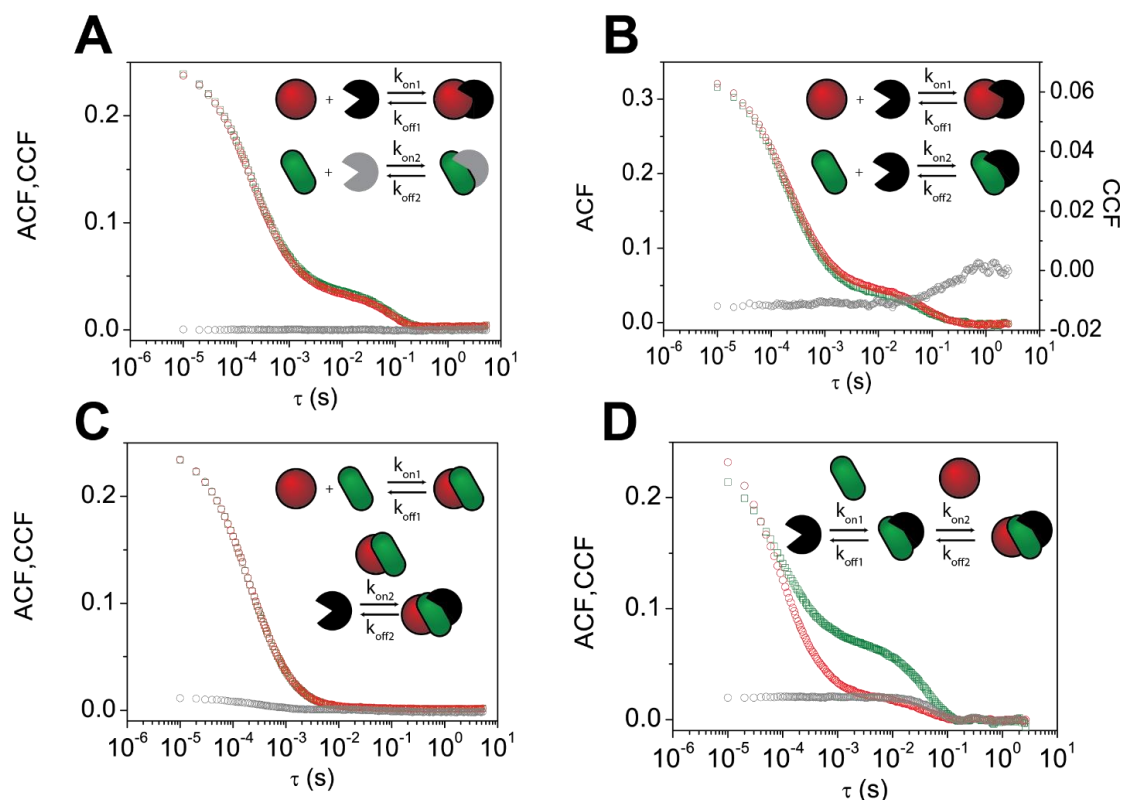


Figura 6.5: simulaciones de experimentos de FCS en dos colores en diversos escenarios: unión no competitiva (A), unión competitiva (B), formación de complejo y posterior unión (C) y reclutamiento secuencial (D). La intensidad de fluorescencia de cada canal fue generada por FERNET y el análisis de correlación fue realizado con rutinas caseras.

Para demostrar la versatilidad de MCell a la hora de definir reacciones, se planteó un escenario en el cual dos moléculas marcadas con sondas fluorescentes distintas forman un complejo que interactúa con sitios de unión estáticos (Figura 6.5C). Este ejemplo es similar a factores de transcripción cuya afinidad por el ADN es influenciada por su interacción con otras proteínas (por ejemplo, el receptor de estrógeno requiere de calmodulina para unirse al ADN[328, 329]). En este caso, la CCF presenta dos componentes, reflejando la difusión del complejo en solución y la unión del mismo a su sitio. Finalmente, fue simulado un último escenario en el cual hay un reclutamiento secuencial de dos moléculas a un sitio de unión (por ejemplo, el receptor de glucocorticoides unido a cromatina recluta correguladores involucrados en la activación de promotores[330]). Las ACFs obtenidas para el canal rojo y verde son diferentes debido al reclutamiento secuencial y se observa una CCF positiva en la escala temporal de los eventos de unión (Figura 6.5D).

En la Tabla 6.1 se presentan los valores utilizados para las simulaciones de los cuatro escenarios presentados en la Figura 6.5. Para los casos en los que se aplica el modelo de Michelman-Ribeiro et al.[107] en régimen de reacción-difusión (más detalle de este modelo en el Capítulo 6) las ACF/CCF fueron analizadas y los parámetros obtenidos no fueron significativamente distintos a los simulados.

Escenario	Parámetro	Simulación	Recuperado de	
			ACF	CCF
Unión no competitiva	$D_{\text{rojo}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	50.00	50.21 ± 0.16	-
	$D_{\text{verde}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	50.00	50.00 ± 0.19	-
	$k_{\text{off,rojo}}(1/\text{s})$	10.00	9.98 ± 0.27	-
	$k_{\text{off,verde}}(1/\text{s})$	10.00	10.37 ± 0.26	-
Unión competitiva	$D_{\text{rojo}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	50.00	-	-
	$D_{\text{verde}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	50.00	-	-
	$k_{\text{off,rojo}}(1/\text{s})$	10.00	-	-
	$k_{\text{off,verde}}(1/\text{s})$	10.00	-	-
Formación de complejo y unión	$D_{\text{complejo}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	39.00	-	38.03 ± 1.63
	$D_{\text{rojo}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	50.00	-	-
	$D_{\text{verde}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	50.00	-	-
	$k_{\text{off,complejo}}(1/\text{s})$	10.00	-	11.78 ± 0.75
Reclutamiento secuencial	$D_{\text{rojo}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	120.00	-	-
	$D_{\text{verde}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	120.00	-	-
	$k_{\text{off,rojo}}(1/\text{s})$	30.0	-	-
	$k_{\text{off,verde}}(1/\text{s})$	30.0	-	-

Tabla 6.1: parámetros utilizados para las simulaciones de la Figura 6.5 y valores recuperados a partir de la ACF/CCF

Estos ejemplos muestran que las simulaciones pueden ser de gran ayuda para discernir entre posibles mecanismos de unión, ya sea obteniendo los parámetros en los casos que existan soluciones analíticas, o simplemente comparando la forma de las ACF/CCF.

6.4.3 Modo de múltiples FCS en un punto fijo

Este modo es equivalente a varios experimentos de *single point FCS* separados espacialmente y adquiridos simultáneamente. Este modo resulta útil para simular experimentos del tipo *spinning disk confocal*[331, 332], multifoco[65, 333] o simplemente para obtener réplicas en distintos puntos de un mismo sistema. El usuario define una grilla 2D de PSFs (cantidad y separación entre las mismas) y obtiene una traza de intensidad para cada posición de la grilla. Como en el caso anterior, la PSF permanece

inmóvil durante la simulación y cada traza posee un total de puntos igual a la cantidad de pasos simulados en la generación de la trayectoria.

Este modo resulta útil para obtener varias trazas de fluorescencia de un mismo sistema, ahorrando tiempo de cómputo. Este enfoque fue utilizado en las simulaciones de las secciones 6.4.2.1 y 7.2 para aumentar la estadística sin necesitar re-simular el sistema entero varias veces. Sin embargo, debido a que MCell no soporta condiciones de contorno periódicas, es aconsejable que las PSFs exteriores de la grilla se encuentren por lo menos 2-3 cinturas radiales del borde del sistema, para evitar que los rebotes de las moléculas en las paredes introduzcan correlaciones espúreas en los resultados obtenidos.

6.4.4 Modo de barrido en línea (*line scan*)

Una limitante substancial de los experimentos de FCS en una única posición es que no poseen resolución espacial, esto es, sólo se obtiene información dinámica en un volumen muy pequeño de la muestra. Por este motivo, fueron desarrolladas las técnicas de FCS de barrido, en las cuales se mueve el volumen de observación repetitivamente a lo largo de una trayectoria determinada. En la Figura 6.6 se presenta un esquema de un experimento de barrido en línea.

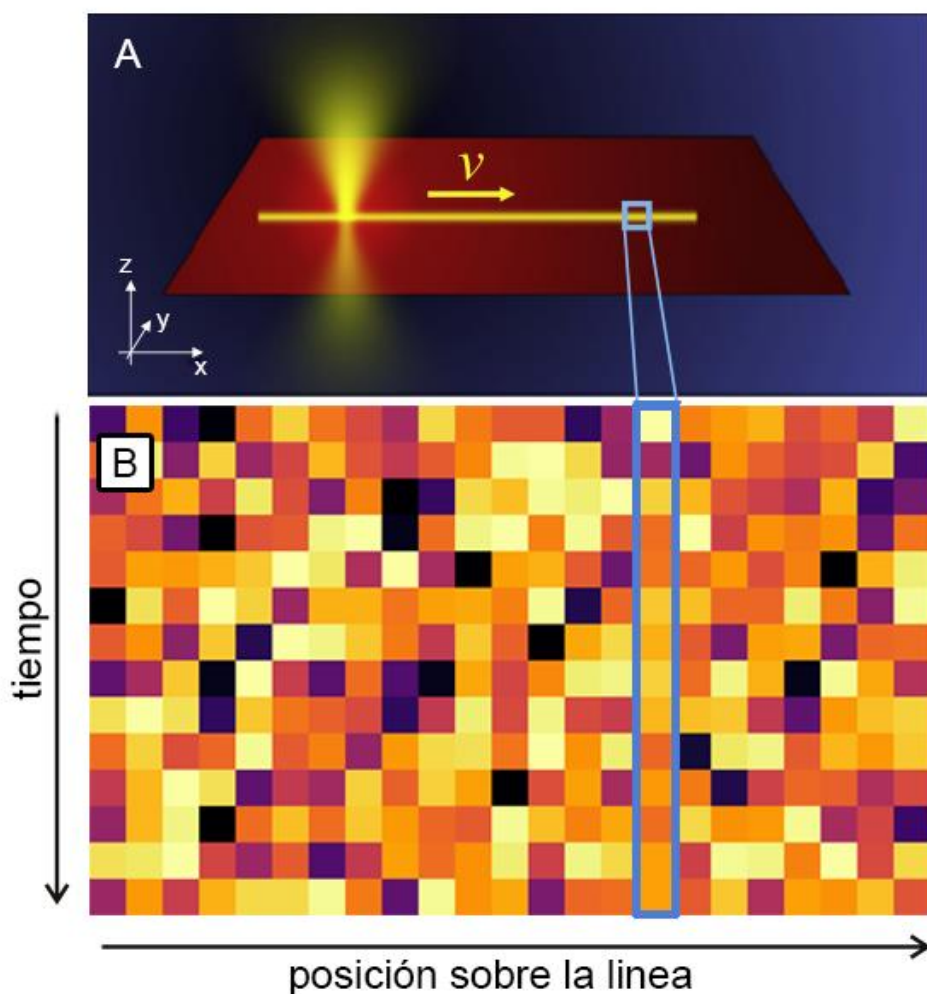


Figura 6.6: esquema de un experimento de barrido en línea. La PSF barre la muestra en línea recta (A). Los datos obtenidos se presentan como una matriz (B) en la cual se representa la intensidad (escala en pseudocolor) en función de la posición a lo largo de la línea (en píxeles) y el tiempo por línea. Adaptado de [334].

La matriz de intensidad obtenida puede ser analizada de distintas formas. Por ejemplo, se puede calcular la función de autocorrelación punto a punto dentro de una columna, mapeando así la dinámica en la región estudiada. Además, se puede correlacionar la intensidad medida en una posición con aquella obtenida en otra posición luego de un tiempo de retardo dado. Esta correlación cruzada espacio-temporal es muy utilizada para analizar la conectividad entre dos zonas de la muestra[335].

El modo más sencillo de las técnicas de escaneo es el de barrido en línea (*linescan*), en el cual la trayectoria es una línea recta. Para simular este tipo de experimentos, es necesario especificar en el archivo de configuración de FERNET el centro espacial de la

línea en las coordenadas del sistema, y el largo de la misma se calcula en base a dos parámetros: la cantidad de puntos a barrer y la separación entre los mismos. En esta rutina, incorporamos un parámetro extra (*deadtime*) para incorporar el tiempo muerto entre la adquisición de una línea y la siguiente. En microscopios confocales comerciales este tiempo es normalmente del orden de milisegundos, limitando la frecuencia de obtención de líneas a ~ 1000 Hz.

La rutina descarta los datos obtenidos durante el *deadtime*, simulando la ausencia de adquisición de datos entre ciclos de barrido en un microscopio confocal. Por lo tanto, el número de iteraciones a simular para obtener una matriz del tamaño deseado no resulta tan trivial como en los modos anteriores. En la sección 6.6.2.1 se detalla el cálculo del número de iteraciones necesarias.

6.4.5 Modo de barrido en órbitas (*orbital scan*)

Las rutinas de *orbital scanning* fueron desarrolladas para el seguimiento en tiempo real (*tracking*) de moléculas fluorescentes en un microscopio multifotónico[336, 337] y son a su vez muy utilizadas para hacer estudios de correlación con resolución espacial en forma similar a la discutida para el modo de *line scan*[338]. La ventaja de este método frente al barrido en línea recta es que, dada la naturaleza circular de la órbita escaneada, luego de llegar al final del trayecto escaneado el láser no necesita retornar a la posición original: el primer punto de la siguiente iteración es el siguiente punto de la órbita. Al no existir el *deadtime* como en el caso de las otras técnicas de escaneo se logran frecuencias de adquisición mayores, permitiendo explorar propiedades espaciotemporales de procesos rápidos. Por estos motivos, incluimos este último modo en la plataforma de simulaciones. Es necesario especificar en el archivo de configuración de FERNET el centro de la órbita en las coordenadas del sistema, además del radio y período de la órbita. El programa calcula internamente la cantidad de puntos sobre la órbita en base al período de la misma y el paso de simulación (sección 6.6.2.2).

El resultado obtenido es una matriz de intensidad de fluorescencia como en el caso anterior, de ancho igual al número de puntos sobre la órbita y largo acorde al tiempo

del experimento. Al no existir tiempo muerto entre escaneos consecutivos el cálculo de iteraciones resulta trivial y se detalla en la sección 6.6.2.2.

6.4.6 Modo de barrido de área (*raster scan*)

El modo *raster scan* permite obtener imágenes de barrido simuladas, similares a las que se obtendrían en microscopios de barrido confocales. La forma en el que la imagen es obtenida y construida es una expansión directa del modo *line scan* descrito previamente y es similar al funcionamiento de los viejos televisores de tubo de rayos catódicos: el área a escanear es dividido en líneas horizontales que son recorridas de manera consecutiva, desde la parte superior hasta la parte inferior del cuadro. Una vez que la última línea es completada, el proceso vuelve a comenzar hasta adquirir la cantidad de cuadros deseado (Figura 6.7).

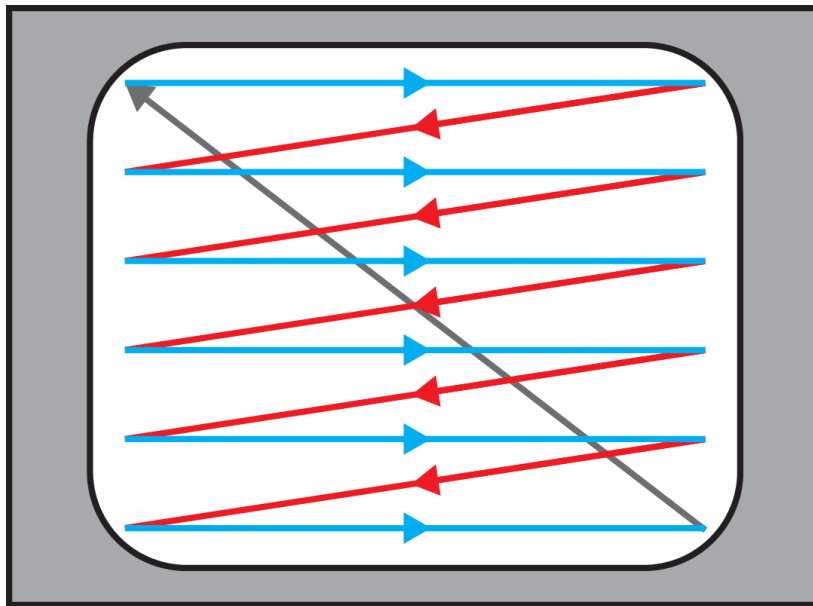


Figura 6.7: esquema de la generación de una imagen en modo *raster scan*. Las líneas azules representan las líneas recorridas de manera consecutiva en las cuales se produce la adquisición de los datos, las líneas rojas representan el salto a la posición de origen en la siguiente línea y la línea gris representa el salto a la posición inicial del siguiente cuadro.

El parámetro *deadtime* cumple la misma función que en el modo *line scan*, representando el retraso experimental entre líneas y cuadros consecutivos. El área a escanear está dada por el ancho y alto del cuadro, en píxeles, y el tamaño del pixel. El

resultado de la simulación obtenido es una secuencia de imágenes, comúnmente denominada “película”.

6.4.6.1 Ejemplo de simulación: interacción de proteínas con microtúbulos

Esta simulación fue realizada para demostrar la capacidad de FERNET para realizar películas en modo *raster scan* aprovechando un sistema conocido y estudiado en nuestro laboratorio. Las MAPs (*microtubule-associated proteins*) son proteínas que decoran los microtúbulos y cumplen diversas funciones, regulando el transporte por motores moleculares que utilizan los microtúbulos como vía de transporte y modificando la rigidez y forma de los microtúbulos[339-342].

En la Figura 6.8 se muestra una representación 3D del sistema simulado y un cuadro representativo de la película simulada. El sistema consiste de microtúbulos (cilindros grises) y dos tipos de moléculas: unas unidas irreversiblemente a los microtúbulos (por ejemplo, unidades de alfa tubulina marcadas con GFP, esferas verdes) y otras que pueden difundir libremente en el citoplasma, unirse y desprenderse de los microtúbulos y difundir sobre los mismos (proteínas MAPs, esferas rojas). Este escenario complejo es fácil de simular en MCell, demostrando la simplicidad de uso del programa y la información valiosa que permite extraer FERNET.

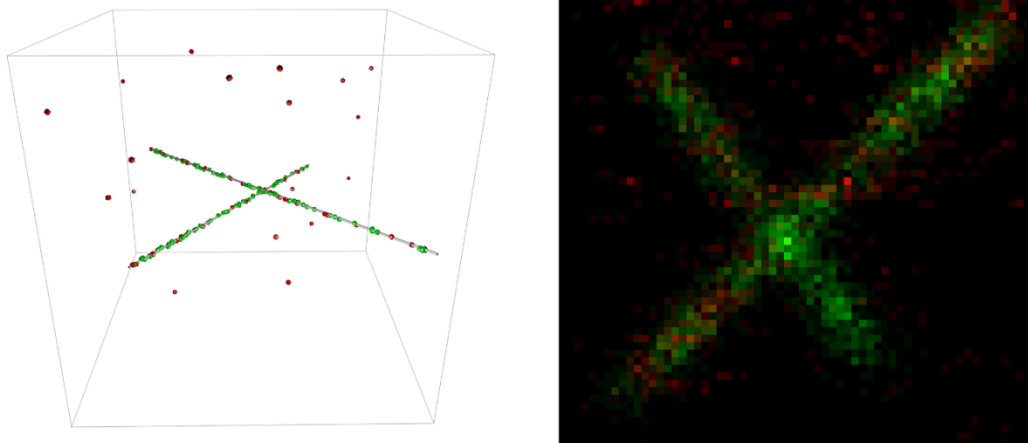


Figura 6.8: representación 3D del sistema simulado (izquierda) y un cuadro de la película obtenida (derecha). En el modelo 3D, los cilindros grises representan los microtúbulos; las esferas verdes, proteínas unidas irreversiblemente al microtúbulo y las esferas rojas, proteínas dinámicas que difunden en el citoplasma y pueden unirse y difundir sobre los microtúbulos.

6.4.7 Modo de barrido en Z (Z-stack)

La simplicidad del uso de MCell-FERNET hizo que buscásemos extender las aplicaciones del programa para analizar e interpretar experimentos realizados en nuestro laboratorio. En particular, decidimos programar el barrido 3D ya que, como veremos más adelante, es de gran utilidad para determinar la performance de rutinas de deconvolución 3D usadas en nuestro laboratorio. Este modo de adquisición es una expansión directa del modo *raster scan*. Los distintos planos son registrados de manera consecutiva, obteniendo una reconstrucción 3D de la muestra.

Los parámetros especificados en el archivo de configuración de FERNET son los mismo que en el modo *raster scan*, con la adición de la posición del plano superior e inferior y la separación entre planos (*step*).

6.4.7.1 Ejemplo de simulación: reconstrucción 3D con Z-stack

La técnica de *Z-stack* resulta útil para estudiar la estructura 3D de un sistema. Como ejemplo se construyó un sistema similar a una red de microtúbulos que parten de un punto en común, el MTOC (*microtubule-organizing center*). Dicho modelo fue elegido debido a un proyecto en colaboración con el grupo del Dr. Nicolás Plachta, que estudia

la reorganización del citoesqueleto durante la división celular en embriones vivos. Estas simulaciones resultan de gran ayuda para probar algoritmos de reconstrucción de la red de microtúbulos a partir de imágenes de fluorescencia.

Simulamos una red de microtúbulos decorada con unidades de tubulina marcadas con una sonda fluorescente (Figura 6.9). Para la simulación, consideramos que las imágenes fueron adquiridas cada $0.5\ \mu\text{m}$ a lo largo del eje óptico ya que un buen criterio para esta técnica es espaciar los planos media cintura axial de la PSF siguiendo el criterio de Nyquist-Shannon[343].

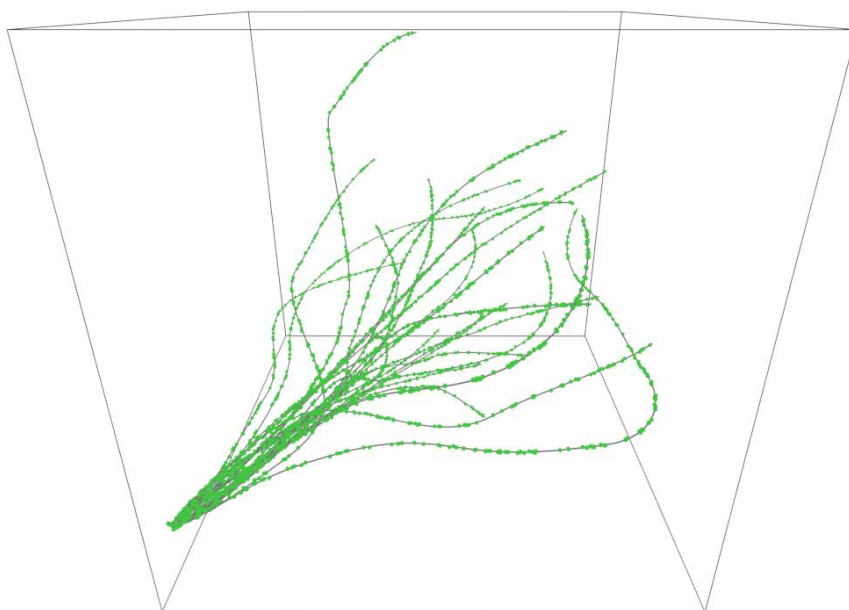


Figura 6.9: estructura similar a citoesqueleto construida en MCell. Las esferas verdes representan unidades de tubulina marcadas con una sonda fluorescente.

En la Figura 6.10 se presentan el plano superior ($+4.0\ \mu\text{m}$), inferior ($-4.0\ \mu\text{m}$) y algunos intermedios, además de la reconstrucción 3D obtenida a partir de todos los planos. Dicha reconstrucción fue realizada con el programa Avizo (FEI Visualization Sciences, Zuse Institute Berlin).

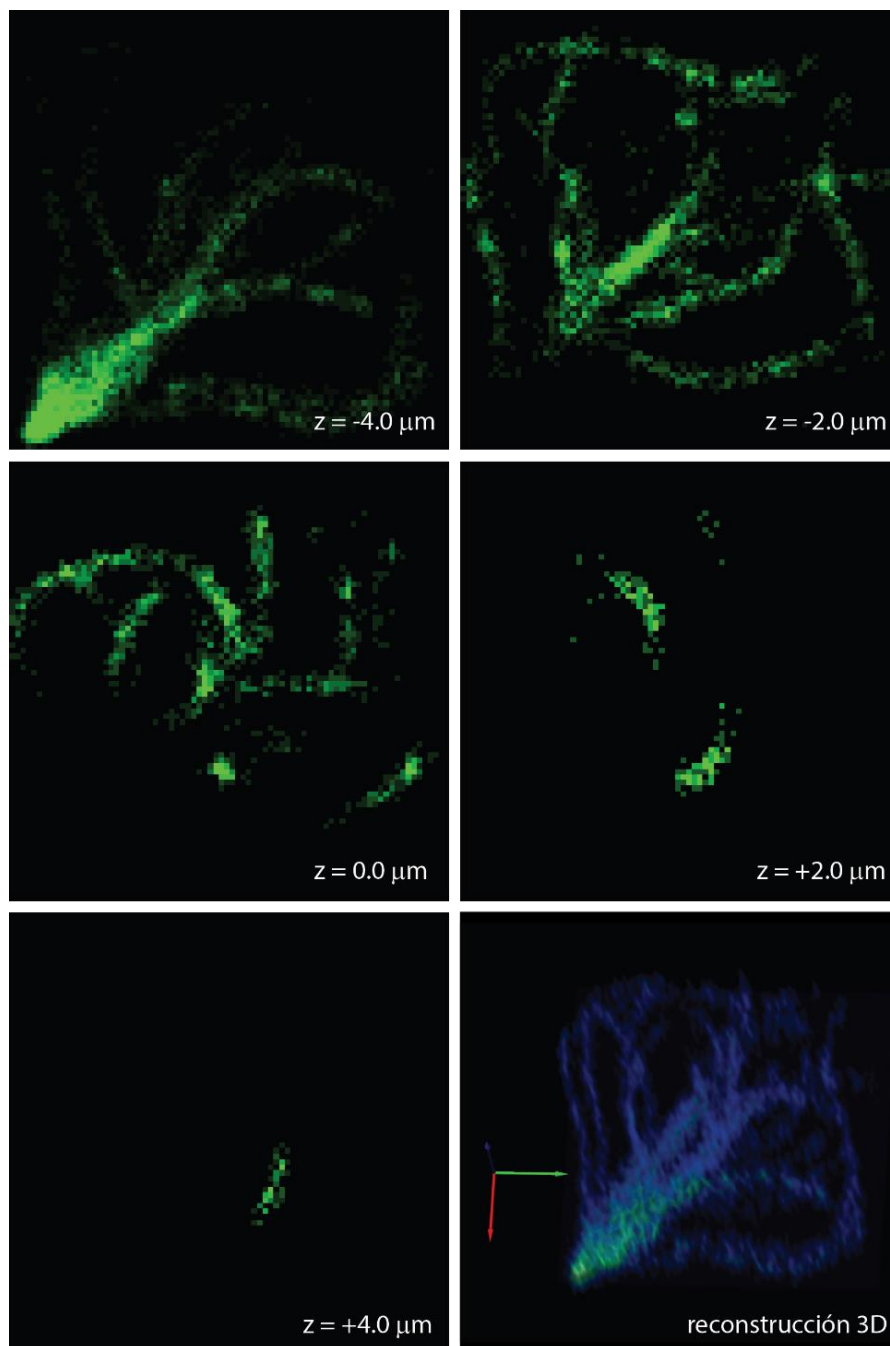


Figura 6.10: planos representativos del seccionamiento en el eje Z para el sistema simulado y reconstrucción 3D a partir de todos los planos

6.4.8 Modo de iluminación en plano (SPIM)

En la sección 1.3.2.3 describimos las técnicas de iluminación de plano único (TIRF, SPIM, HILO) y su relevancia para experimentos de *imaging FCS* o de seguimiento de molécula única. Por estos motivos, decidimos incorporar el modo *SPIM* a FERNET.

En este caso, se debe especificar ciertos parámetros en el archivo de configuración relativos a la iluminación: *NA* representa la apertura numérica del objetivo con el cual es generada dicha iluminación, *waist* representa la cintura de dicho plano de iluminación y *centerz* la posición en el eje Z del mismo. La iluminación en el plano XY se considera homogénea, por lo que la PSF del sistema es equivalente a la ecuación 6.1 considerando ω_{xy} infinito. En el modo SPIM, el valor del parámetro *waist* sobrescribe el parámetro ω_z del bloque común.

Además, es necesario especificar la longitud de onda de emisión de las moléculas (por el momento SPIM sólo permite un canal de detección), el ancho y alto de la imagen en píxeles junto con el tamaño del píxel y el tiempo de integración del cuadro. Como la adquisición de la imagen es simultánea y no existen tiempos muertos, resulta trivial calcular la cantidad de iteraciones necesarias para obtener una cantidad de cuadros deseada (sección 6.6.2.5).

6.4.8.1 Ejemplo de simulación: dinámica de sistemas heterogéneos con FCS de imágenes

Para demostrar la versatilidad de la técnica de FCS de imágenes se simuló un escenario que consiste en dos compartimientos separados por una membrana permeable en los cuales se distribuyen moléculas que poseen un coeficiente de difusión distinto en cada compartimiento. La conversión en la interfaz de los compartimientos es equiprobable, pero MCell permite separar las probabilidades para cada sentido, o anular un sentido de ser deseado. Cada compartimiento contiene inicialmente 24 partículas/ μm^3 (equivalente a 40nM) con un coeficiente de difusión de 2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ en el compartimiento superior y 0.5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ en el compartimiento inferior (Figura 6.11A). El perfil de iluminación fue considerado homogéneo en el plano XY y gaussiano con una cintura de 0.5 μm en el eje perpendicular[71]. El tiempo de adquisición de cada cuadro fue fijado en 1 ms y el tamaño de píxel en 0.24 μm .

La secuencia de imágenes obtenida fue analizada con el *plugin* imFCS para ImageJ[344], que permite calcular curvas de correlación en cada píxel, ajustarlas a un modelo de difusión pasiva y generar un mapa de coeficientes de difusión (Figura 6.11A) y el

correspondiente histograma (Figura 6.11B). Dicho histograma presenta una distribución bimodal, cada una correspondiente a cada compartimiento. Los coeficientes de difusión recuperados a partir de dichas distribuciones son $1.80 \pm 0.68 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $0.53 \pm 0.32 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (promedio $\pm$ desvío estándar), no significativamente diferentes a los simulados.

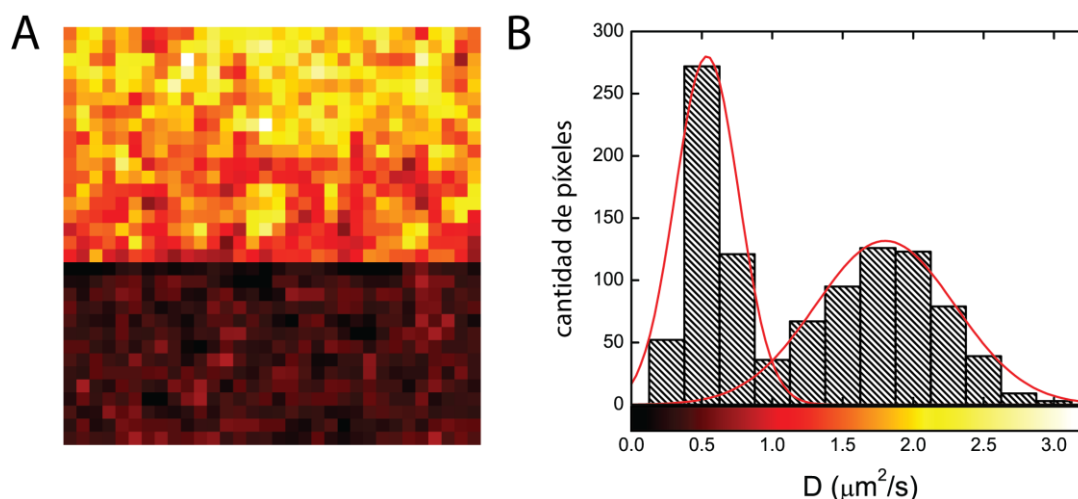


Figura 6.11: simulación de experimento de SPIM-FCS. (A) Mapa de coeficientes de difusión y (B) histograma del valor del coeficiente de difusión obtenido en cada pixel. Los compartimientos y su división se aprecian claramente en el mapa y en la forma bimodal del histograma. Ambos gráficos comparten la misma escala de colores.

6.5 Discusiones

En este capítulo, presentamos la plataforma MCell-FERNET y mostramos ejemplos para ilustrar la utilidad de esta herramienta para crear un escenario complejo y simular experimentos de fluorescencia, pudiendo aún ser adaptada para incluir procesos fotoquímicos y fotofísicos, como fotoblanqueo y/o reacciones de fotoconversión[101, 324], interacciones entre moléculas, cascadas de señalización, entre muchos otros escenarios posibles.

Como veremos en el siguiente capítulo, la posibilidad de simular experimentos en escenarios complejos resulta de gran ayuda tanto para el diseño como para la interpretación de experimentos de microscopía confocal, en especial los de correlación de fluorescencia, cuyos modelos son complejos y muchas veces carecen de solución analítica. FERNET permite proponer modelos, simular los experimentos y contrastar los resultados obtenidos con los experimentales.

Además, como FERNET fue programado de manera modular, resulta fácil incorporar nuevos modos y formas del volumen confocal. FERNET resulta de enorme ayuda para la predicción e interpretación de resultados de microscopía confocal.

6.6 Anexo

6.6.1 Archivo de configuración de FERNET

```
common:
{
  channel0: // uno de dos canales o "colores" disponibles
  {
    on = 1; // estado del canal (1 = encendido, 0 = apagado)
    molec = ("A"); // moléculas que emiten en el canal 0
    bright = (100000); // cpsm de las moléculas en el canal 0
  };

  channel1: // segundo canal, necesario para experimentos de dos colores
  {
    on = 1; // estado del canal (1 = encendido, 0 = apagado)
    molec = ("A","B"); // moléculas que emiten en el canal 1
    bright = (50000,100000); // cpsm de las moléculas en el canal 0
  };

  kappa = 200e-9; // tiempo entre eventos de emisión, en segundos
  w_xy = 0.2; // cintura radial, en  $\mu\text{m}$ 
  w_z = 1.0; // cintura axial, en  $\mu\text{m}$ 
  noise_on = 1; // agregado de ruido (1 = encendido, 0 = apagado)
};

point:
{
  centerx = 0.0; // centro de la PSF en eje X, en  $\mu\text{m}$ 
  centery = 0.0; // centro de la PSF en eje Y, en  $\mu\text{m}$ 
  centerz = 0.0; // centro de la PSF en eje Z, en  $\mu\text{m}$ 
  prefix = "point"; // prefijo del nombre del archivo de salida
};

multi:
{
  centerz = 0.0; // centro de las PSFs en eje Z, en  $\mu\text{m}$ 
  nPSFX = 5; // número de PSFs en eje X
  dx = 0.2; // separación entre las PSFs en eje X, en  $\mu\text{m}$ 
  nPSFY = 5; // número de PSFs en eje Y
  dy = 0.2; // separación entre las PSFs en eje Y, en  $\mu\text{m}$ 
  prefix = "multi"; // prefijo del nombre de los archivos de salida
};

line:
{
  deadtime = 0.001; // tiempo de retorno de la PSF, en segundos
  centerx = 0.0; // centro de la línea en eje X, en  $\mu\text{m}$ 
  centery = 0.0; // centro de la línea en eje Y, en  $\mu\text{m}$ 
```

```

centerz = 0.0; // centro de la línea en eje Z, en  $\mu\text{m}$ 
n_columns = 15; // número de píxeles de la línea en eje X
shift = 0.2; // separación entre píxeles, en  $\mu\text{m}$ 
tiffname = "linescan"; // prefijo del nombre del archivo de salida
};

orbital:
{
    centerx = 0.0; // centro de la órbita en eje X, en  $\mu\text{m}$ 
    centery = 0.0; // centro de la órbita en eje Y, en  $\mu\text{m}$ 
    centerz = 0.0; // centro de la órbita en eje Z, en  $\mu\text{m}$ 
    radius = 2.0; // radio de la órbita, en  $\mu\text{m}$ 
    period = 0.00064; // período de la órbita, en segundos
    tiffname = "orbital"; // prefijo del nombre del archivo de salida
};

raster:
{
    deadtime = 0.001; // tiempo de retorno de la PSF, en segundos
    centerz = 0.0; // centro en eje Z de la imagen, en  $\mu\text{m}$ 
    pixel = 0.05; // tamaño del pixel, en  $\mu\text{m}$ 
    width = 64; // ancho de la imagen, en píxeles
    height = 64; // alto de la imagen, en píxeles
    tiffname = "image"; // prefijo del nombre del archivo de salida
};

stack:
{
    deadtime = 0.001; // tiempo de retorno de la PSF, en segundos
    pixel = 0.05; // tamaño del pixel, en  $\mu\text{m}$ 
    width = 64; // ancho de la imagen, en píxeles
    height = 64; // alto de la imagen, en píxeles
    top_z = 1.0; // tope superior de la imagen en eje Z, en  $\mu\text{m}$ 
    bot_z = -1.0; // tope inferior de la imagen en eje Z, en  $\mu\text{m}$ 
    step = 0.1; // separación entre planos, en  $\mu\text{m}$ 
    tiffname = "image"; // prefijo del nombre del archivo de salida
};

spim:
{
    NA = 1.6; // apertura numérica del objetivo
    centerz = 0.00; // centro en eje Z de la imagen, en  $\mu\text{m}$ 
    waist = 0.5; // cintura del haz de iluminación, en  $\mu\text{m}$ 
    lambda = 500.0; // longitud de onda de emisión, en nm
    pixel = 0.1; // tamaño del pixel, en  $\mu\text{m}$ 
    width = 64; // ancho de la imagen, en píxeles
    height = 64; // alto de la imagen, en píxeles
    frame_t = 0.001; // tiempo de integración de la imagen, en
segundos
    tiffname = "image"; // prefijo del nombre del archivo de salida
};

```

6.6.2 Cálculo del número de iteraciones necesarias para cada modo

6.6.2.1 Modo de barrido en línea

Si el usuario desea simular la adquisición de N líneas, la cantidad de iteraciones a simular con MCell puede ser calculada con la siguiente fórmula

$$iteraciones = N \times \left(n_columns + round\left(\frac{deadtime}{t_s}\right) \right) \text{ Ec. (6.2)}$$

donde $round()$ es la función redondeo al entero más cercano y $n_columns$ es el número de puntos a escanear sobre la línea. En la Figura 6.12 se representa un esquema de la obtención de la matriz de intensidad.

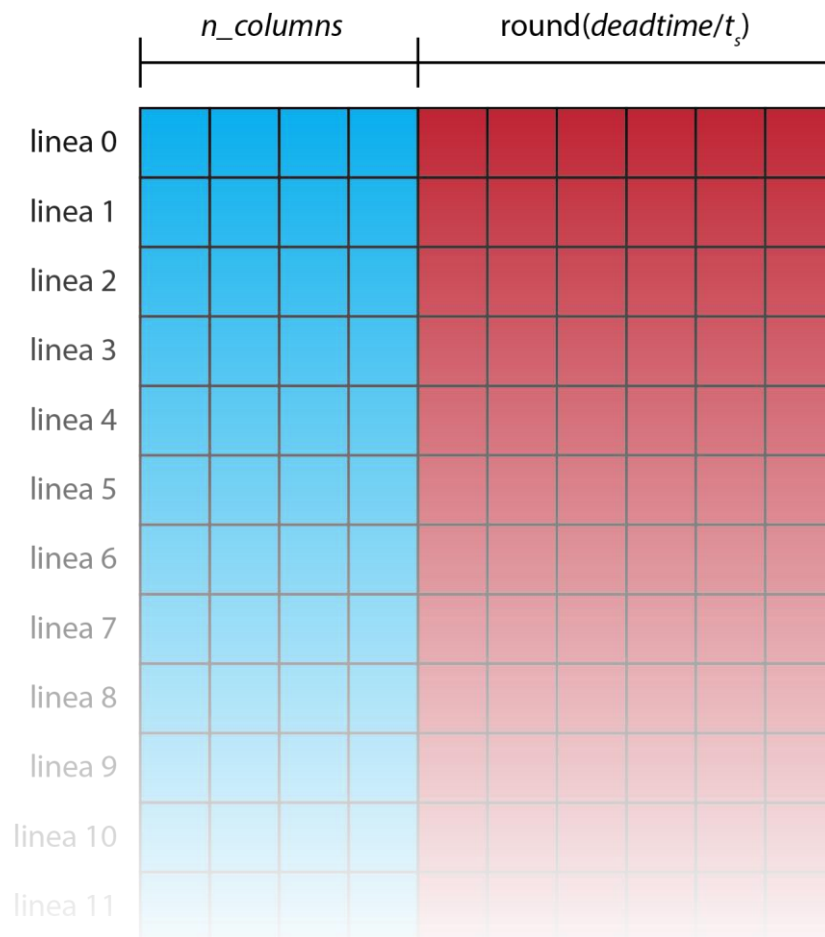


Figura 6.12: esquema de la formación de la matriz de intensidad en un experimento simulado de línea scan. La matriz final obtenida es representada por los cuadrados azules, los cuadrados rojos representan las iteraciones simuladas por MCell y descartadas por FERNET para simular el tiempo muerto.

6.6.2.2 Modo de barrido en órbita

La cantidad de puntos en la órbita (n) se puede calcular a partir del período de la órbita (p) y el paso de simulación (t_s) de acuerdo a

$$n = p/t_s \quad Ec. (6.3)$$

La distancia entre puntos de la órbita (tamaño del píxel en la matriz obtenida) es equivalente a la distancia de arco entre puntos de la órbita consecutivos y se puede calcular de acuerdo a

$$\Delta s = \theta r = \frac{2\pi}{n} r = \frac{2\pi}{p/t_s} r \quad Ec. (6.4)$$

donde r es el radio de la órbita, p el período de la órbita y t_s el paso de simulación. Como no existe tiempo muerto entre escaneos sucesivos la cantidad de iteraciones a simular en MCell para obtener una matriz de n columnas por M líneas es

$$iteraciones = n \times M = p/t_s \times M \quad Ec. (6.5)$$

6.6.2.3 Modo de barrido de área

Como en el modo de barrido en línea, si el usuario desea simular una película con N cuadros, la cantidad de iteraciones a simular con MCell puede ser calculada con la siguiente fórmula

$$iteraciones = N \times height \times \left(width + round\left(\frac{deadtime}{t_s}\right) \right) \quad Ec. (6.6)$$

donde $round()$ es la función redondeo al entero más cercano y $height$ y $width$ son el ancho y largo de la imagen en píxeles, respectivamente. En la Figura 6.13 se representa un esquema de cómo se obtiene la película.

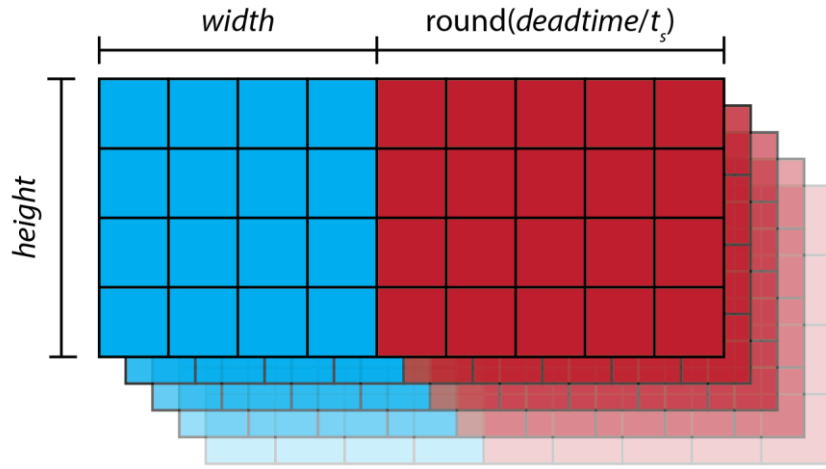


Figura 6.13: esquema de cómo es formada la película en un experimento simulado de raster scan. Las imágenes obtenidas son representadas por los cuadrados azules, los cuadrados rojos representan las iteraciones simuladas por MCell y descartadas por FERNET para simular el tiempo muerto.

6.6.2.4 Modo de barrido en Z

La cantidad de planos a escanear N_z es calculada por el programa de acuerdo a la siguiente ecuación

$$N_z = \text{round} \left(\frac{top_z - bot_z}{step} \right) \quad Ec. (6.7)$$

donde $\text{round}()$ es la función redondeo al entero más cercano, top_z y bot_z las posiciones del plano superior e inferior, respectivamente, y $step$ la separación entre planos. Como cada plano es obtenido de manera idéntica a un cuadro en el modo *raster scan*, la cantidad de iteraciones necesarias para simular la cantidad de planos deseados se puede calcular de acuerdo a

$$\text{iteraciones} = N_z \times \text{height} \times \left(\text{width} + \text{round} \left(\frac{\text{deadtime}}{t_s} \right) \right) \quad Ec. (6.8)$$

donde *round()* es la función redondeo al entero más cercano y *height* y *width* son el ancho y largo de cada plano en pixeles, respectivamente.

6.6.2.5 Modo SPIM

Al no haber tiempo muerto entre líneas la cantidad de iteraciones necesarias para simular una cantidad de cuadros deseada se puede calcular como

$$iteraciones = frames \times round\left(\frac{frame_t}{t_s}\right) \quad Ec. (6.9)$$

donde *frames* es la cantidad de cuadros deseados, *frame_t* el tiempo de integración del cuadro y *t_s* el paso de simulación.

Capítulo 7: dinámica de factores de transcripción en embriones tempranos de ratón

7.1 Motivación: difusión anómala de factores de transcripción en células madre y embriones tempranos de ratón

En el capítulo 2, hemos descrito brevemente un trabajo que sirvió como puntapié para el inicio de la colaboración con el grupo del Dr. Nicolás Plachta[168]. En dicho trabajo, se caracterizó la dinámica de ciertos factores de transcripción relevantes al desarrollo fusionados a proteínas fotoactivables utilizando FCS. Las curvas de autocorrelación experimentales fueron ajustadas con un modelo que considera dos poblaciones dinámicas distintas del factor de transcripción: una rápida con difusión libre y otra lenta con difusión anómala (Figura 7.1, panel izquierdo). Los autores explicaron dicho comportamiento como originado por interacciones con el ADN. El fenómeno de difusión anómala causado por interacciones fue discutido con más detalle en la sección 1.2.2.

Por otra parte, pudieron comprobar que tanto la proporción relativa como el tiempo característico de difusión de la población anómala variaban entre linajes celulares. La Figura 1.1 (panel derecho) muestra curvas de autocorrelación determinadas para Sox2-paGFP en células internas y externas de un blastocisto que ejemplifican el distinto comportamiento del componente anómalo.

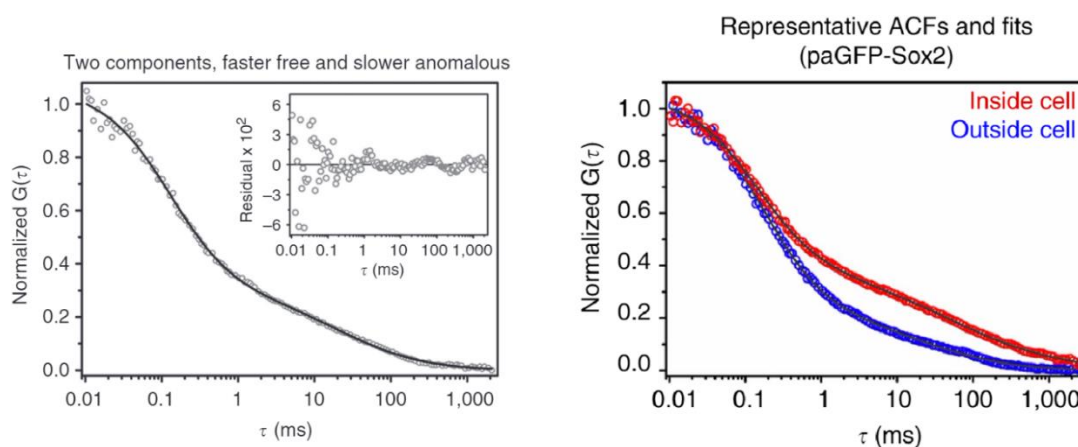


Figura 7.1: (Izquierda) Ejemplo de curva de autocorrelación de Oct4-paGFP en el núcleo de un embrión en estadio de dos células y el ajuste con el modelo propuesto consistiendo en una población con difusión

libre y otra población con difusión anómala. (Derecha) Curvas de autocorrelación para paGFP-Sox2 en el núcleo de células internas (rojo) y células externas (azul) de blastocistos. La difusión anómala se observa en la escala temporal 1-1000ms. Extraído de [168].

La variabilidad intercelular presente en este componente de la curva de autocorrelación sugiere que la dinámica presente en esa escala temporal proveería información de gran relevancia biológica. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis trabajamos en colaboración con el grupo del Dr. Plachta para estudiar en más detalle los procesos moleculares subyacentes a esta población anómala.

7.1.1 La técnica de FCS de barrido en línea permite discernir entre difusión y eventos de unión

Tal como discutimos en el capítulo 2, los factores de transcripción difunden en el núcleo e interaccionan con la cromatina. Por lo tanto, es razonable proponer que el componente anómalo observado en la Figura 7.1 sea producto de interacciones entre el factor de transcripción y la cromatina.

Para probar dicha hipótesis, realizamos experimentos de FCS variando el volumen de observación. De acuerdo a la ecuación 1.8, un aumento en el volumen de observación (ω_{xy}) ocasiona un aumento en el tiempo característico de la correlación para un proceso difusivo. En contraste, el tiempo característico de la correlación no depende del volumen en el caso de interacción lenta con blancos fijos. En este caso, dicho tiempo es la inversa de la constante cinética de despegado[60, 107]. De esta forma, variando el volumen de observación, es posible dilucidar si el proceso subyacente a las fluctuaciones es difusión o interacción con blancos. Para variar el volumen de observación realizamos experimentos de barrido en línea los cuales, como veremos más adelante, tienen grandes ventajas frente otros protocolos.

Basados en un trabajo de Gratton y colaboradores[335], utilizamos una técnica para realizar este tipo de experimentos sin modificar la óptica del sistema, la cual no siempre es fácilmente ni deseable de modificar. La técnica consiste en realizar medidas de *line FCS* y tratar los resultados de dos maneras distintas. Por un lado, se calcula la correlación en cada pixel de la línea. El análisis pixel-a-pixel de estos datos da información promedio

sobre los volúmenes individuales observados. Por otra parte, es posible integrar (sumar) la intensidad obtenida en los pixeles que conforman la línea. Este procedimiento es, en una primera aproximación, similar a analizar las fluctuaciones en un volumen que resulta de la convolución de los distintos volúmenes individuales (Figura 7.2).

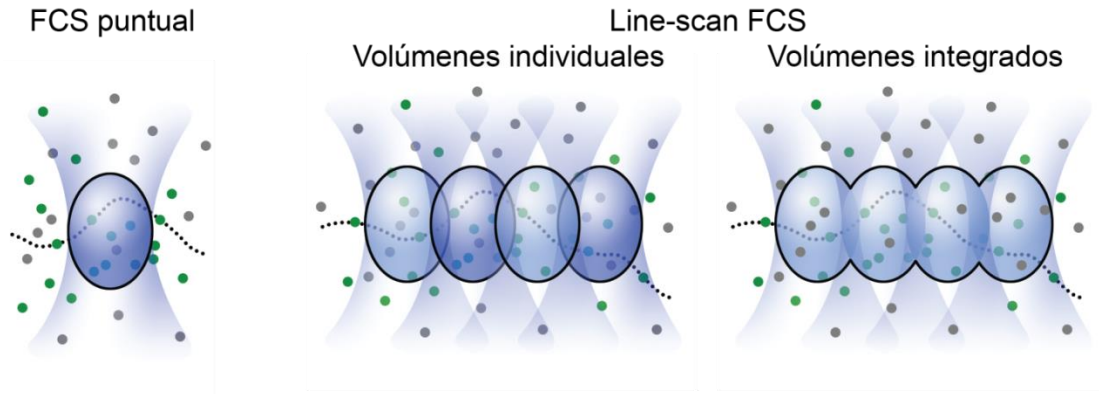


Figura 7.2: Esquema de los volúmenes analizados durante los experimentos de FCS de barrido en línea. Comparación entre un único volumen confocal (izquierda), varios volúmenes confocales considerados de manera individual (centro) y varios volúmenes confocales considerados de manera integrada (derecha). La línea punteada ilustra la trayectoria de una molécula que difunde e ilustra que, en el último caso, la molécula permanece más tiempo en el volumen de observación.

Para analizar si este procedimiento es adecuado, realizamos simulaciones numéricas con MCell-FERNET; la ventaja de este estudio es que conocemos los parámetros característicos del sistema de trabajo. En particular, simulamos dos sistemas diferentes: en el primer caso, las moléculas simuladas difundían libremente en una caja homogénea mientras que, en el segundo caso, se incluyeron blancos fijos organizados al azar con los cuales las moléculas podían interactuar. El espacio de simulación consistió en una caja de 3 μm de lado, suficientemente grande para evitar efectos de borde. Con el fin de observar y comparar ambos sistemas en la misma ventana temporal se fijó el tiempo característico de difusión del primer sistema similar al tiempo característico de disociación del complejo molécula-blanco del segundo sistema.

La dinámica de interacción con los blancos fue modelada en MCell con las siguientes ecuaciones





donde TF representa la molécula libre y TF_B la molécula unida al sitio de unión. Las cantidades iniciales de las especies y los parámetros cinéticos utilizados se detallan en la Tabla 7.1. Fueron simulados 10^7 pasos con un tiempo de paso de $10 \mu s$ para un total de 100 segundos. Los pasos previos al equilibrio fueron descartados para el cálculo de la traza de fluorescencia.

	Difusión	Difusión + unión
N_{TF}	500	500
N_B	-	10000
$D_{libre} (\mu m^2/s)$	0.1	55
$k_{off} (1/s)$	-	5
$k_{on} (1/M.s)$	-	2.0×10^7

Tabla 7.1: parámetros utilizados para las simulaciones de los sistemas.

Para los experimentos de *line scan* se barrió una línea de $1.5 \mu m$ de largo con una separación entre columnas de $0.05 \mu m$. El tiempo de línea simulado fue de 1 ms.

En la Figura 7.3 se presentan los resultados de las simulaciones. Para el caso de difusión (izquierda) se observa que la curva de autocorrelación para el volumen integrado (línea azul) posee un corrimiento a mayores valores de τ con respecto a las obtenidas analizando uno a uno los pixeles individuales (líneas grises) y el promedio de todos los pixeles (línea negra). Tal como mencionamos previamente, dicho corrimiento era esperado debido a que el tiempo característico de difusión es mayor cuanto mayor es el volumen confocal.

Contrariamente, cuando la dinámica observada en la misma ventana temporal se debe a eventos de interacción con blancos fijos (Figura 7.3, derecha), no se observa corrimiento en la curva de autocorrelación. En este caso, el tiempo característico de la curva depende de la constante de disociación, invariante con el tamaño del volumen de observación.

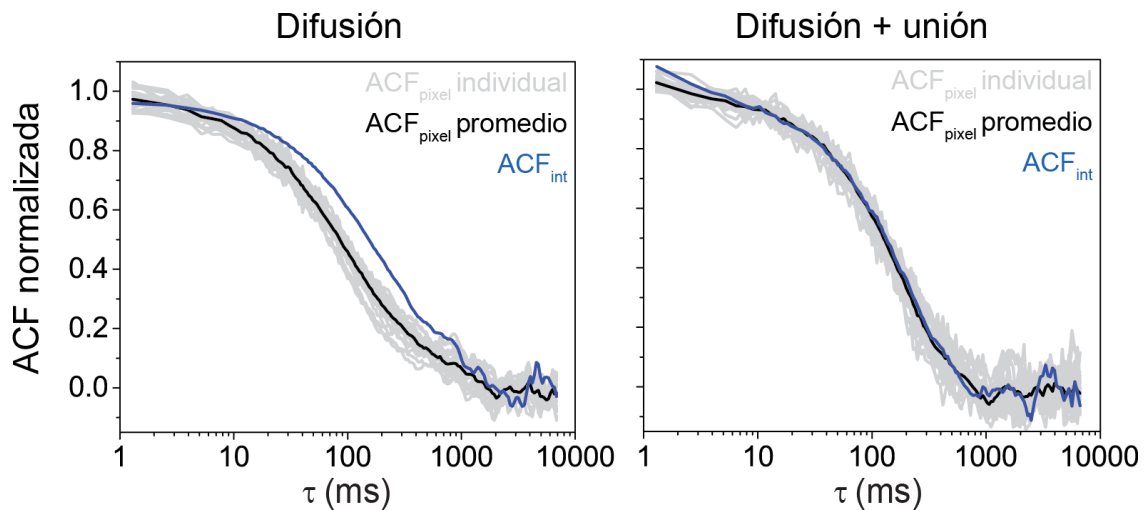


Figura 7.3: curvas de autocorrelación para los sistemas simulados: difusión (izquierda) y difusión con eventos de unión (derecha). Las ACF se calcularon siguiendo los procedimientos descritos en el texto para el volumen integrado (línea azul) y los píxeles individuales (líneas grises).

Esta técnica demostró ser una herramienta sencilla pero esencial para determinar la naturaleza de los fenómenos subyacentes a las fluctuaciones que dan origen a una curva de autocorrelación. A continuación, se detallará cómo esta estrategia fue aplicada a las curvas de correlación experimentales obtenidas en embriones de ratón para dilucidar la naturaleza del componente anteriormente denominado como difusión anómala.

7.1.2 El componente anómalo de la ACF corresponde a eventos de unión

Para estudiar la naturaleza del componente anómalo observado en la escala temporal 1-1000ms en las curvas de autocorrelación de factores de transcripción en núcleos celulares (Figura 7.1) se fotoactivó una región del núcleo de células madres embrionarias (*embryonic stem-cells, ESC*) que expresan Oct4-paGFP, una variante fotoactivable del factor de transcripción Oct4. Luego se barrió una línea de 2 μm para obtener la curva de autocorrelación en cada pixel de la línea ($\text{ACF}_{\text{pixel individual}}$). La frecuencia de barrido de la línea (~ 1000 Hz) permite observar la dinámica en una ventana temporal de 1-1000 ms por lo cual no se observará la dinámica a tiempos menores. Además de la ACF en los píxeles individuales, se calculó la curva de autocorrelación correspondiente a los volúmenes integrados (ACF_{int}).

Las curvas de autocorrelación obtenidas para ambos casos (Figura 7.4) no presentan corrimiento temporal, por lo tanto, la dinámica presente en esta escala temporal es independiente del tamaño del volumen confocal. Como fue discutido en la sección 7.1.1, esta observación sugiere que la dinámica subyacente que da origen a la curva de autocorrelación en esta escala temporal serían eventos de unión.

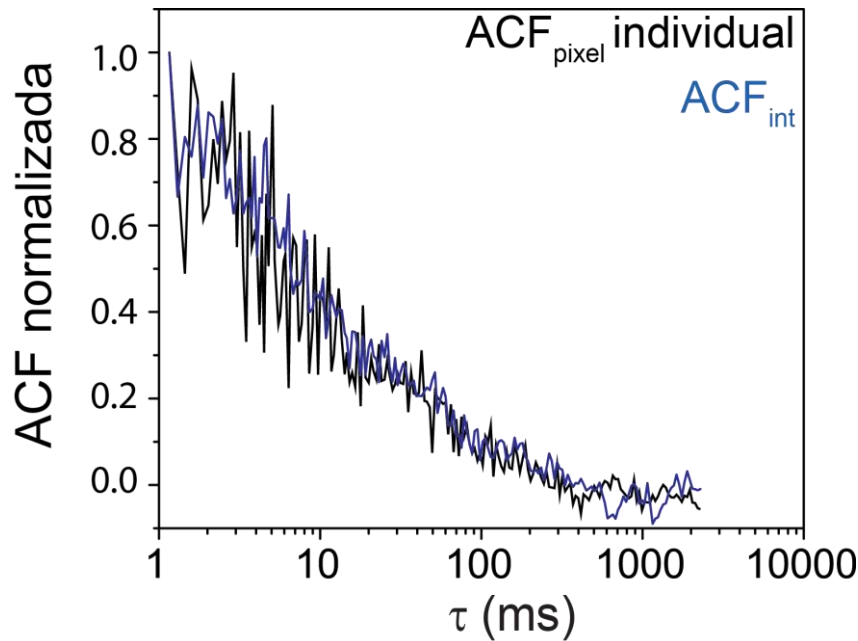


Figura 7.4: curvas de autocorrelación de Oct4-paGFP en ESC, considerando volúmenes confocales individuales (línea negra) y el volumen integrado (línea azul).

7.2 Un modelo con una única población de sitios de unión no explica las curvas experimentales

Una vez confirmada la naturaleza de la dinámica presente en la ventana temporal 1-1000ms, el siguiente paso fue intentar obtener información cuantitativa de la interacción de factores de transcripción con los blancos a partir de las curvas de autocorrelación.

En un trabajo reciente[107], Michelman-Ribeiro et al. propusieron un modelo teórico en el cual las moléculas difunden y pueden interactuar con blancos fijos; considerando que la proporción de sitios ocupados es pequeña, el modelo permite obtener parámetros cinéticos, particularmente constantes de asociación y disociación de proteínas con sitios

de interacción en el ADN, a partir de las curvas de autocorrelación. El modelo completo no tiene solución analítica, pero un proceso iterativo permite determinar los parámetros antes mencionados. Para simplificar el análisis, los autores derivaron cuatro regímenes, determinados cuando los valores de las constantes cumplen determinadas condiciones de contorno. Las soluciones analíticas de estos regímenes son más sencillas que el modelo completo, facilitando el análisis de los datos. En particular, la Tabla 7.2 resume los cuatro regímenes y los parámetros que pueden ser obtenidos a partir de las curvas experimentales. El parámetro k_{on}^* representa el producto entre la constante cinética k_{on} y la concentración de sitios de unión libres que, como mencionamos, se supone constante al ser baja la población de sitios ocupados.

Régimen	Condiciones	Parámetros medibles
Difusión pura	$k_{on}^* \ll k_{off}$	D_{libre}
Difusión efectiva	$\tau_{dif} \gg 1/k_{on}^*$	$D_{eff} = D_{libre}/(1 + k_{on}^*/k_{off})$
Modelo híbrido	$k_{on}^* \gg k_{off}$	D_{libre}/k_{on}^* y k_{off}
Dominado por reacción	$\tau_{dif} \ll 1/k_{on}^*$	D_{libre} , k_{on}^* y k_{off}

Tabla 7.2: condiciones de contorno para cada derivación del modelo de Michelman-Ribeiro et al. y los parámetros experimentales obtenibles a partir de las curvas de autocorrelación.

Con el fin de analizar nuestros datos experimentales con este modelo nos pusimos en contacto con el laboratorio del Dr. McNally, responsable del trabajo, que muy amablemente nos cedió los programas para analizar los datos experimentales. Al analizar nuestros datos experimentales con el modelo completo, pudimos verificar que los parámetros obtenidos se encontraban en el régimen “dominado por reacción”, por lo tanto, trabajamos con la ecuación derivada para este régimen:

$$G(\tau) = \frac{2^{-3/2}}{N} [f_{dif} G_{dif} + f_{unido} \exp(-\tau/\tau_{unión})] \quad Ec. (7.3)$$

donde N es el número de factores de transcripción fotoactivados dentro del volumen de observación, f_{dif} la fracción de factores de transcripción que difunden libremente, G_{dif} la función de autocorrelación para difusión normal 3D (ecuación 1.8), f_{unido} la fracción de factores de transcripción involucrados en interacciones y τ_{unido} el tiempo característico de la interacción ($1/k_{off}$), respectivamente. En la Figura 7.5 se presenta

una curva experimental de FCS en núcleos de ESC con Oct4-paGFP ajustada con la ecuación para este régimen (ecuación 7.3).

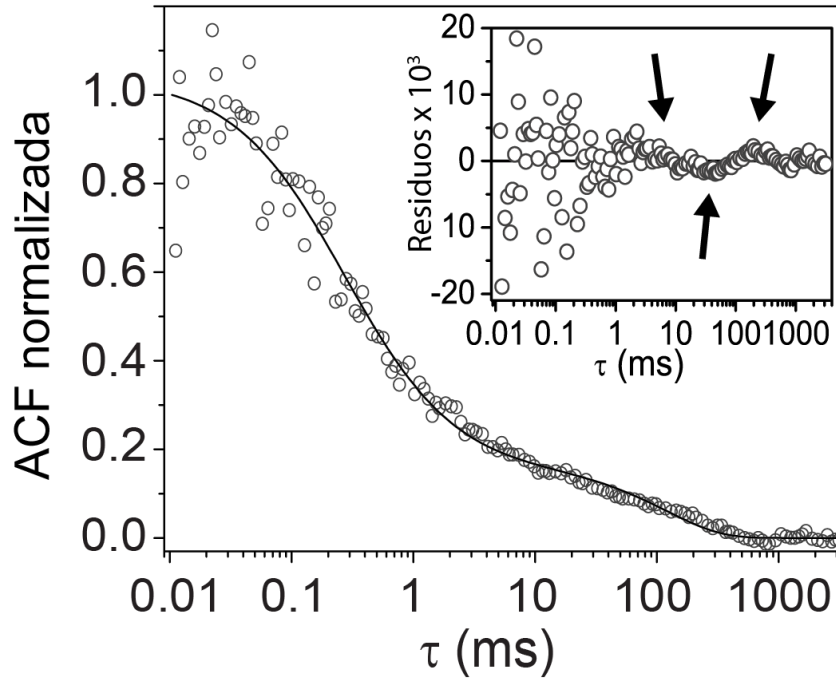


Figura 7.5: ajuste de una curva de autocorrelación de Oct4-paGFP en células madre embrionarias con el régimen dominado por reacción de Michelman-Ribeiro et al. Las flechas en el inserto de los residuos muestran las regiones donde el ajuste no resulta adecuado.

Al observar los residuos del ajuste, notamos que los mismos presentaban sesgo (Figura 7.5, flechas negras), especialmente en la ventana temporal 1-1000ms. Este resultado es esperable debido a que, como fue discutido en el capítulo 2, existen diversos tipos de interacción entre los factores de transcripción y la cromatina. Además de la interacción con su sitio de unión específico, se espera que el TF pueda interactuar inespecíficamente con la cromatina, presentar períodos de difusión unidimensional a lo largo de la hebra del ADN o realizar saltos entre segmentos o regiones del ADN, eventos descritos en la sección 2.3.2.

Por lo tanto, propusimos una expansión directa del modelo existente, incorporando una segunda población de sitios con sus propias constantes. El modelo propuesto para explicar las curvas de autocorrelación obtenidas se presenta en la Figura 7.8. En este modelo simplificado, consideramos que el factor de transcripción puede estar en tres

estados distintos: difundiendo libremente (con su correspondiente coeficiente de difusión) o interactuando con dos poblaciones distintas de sitios de unión.

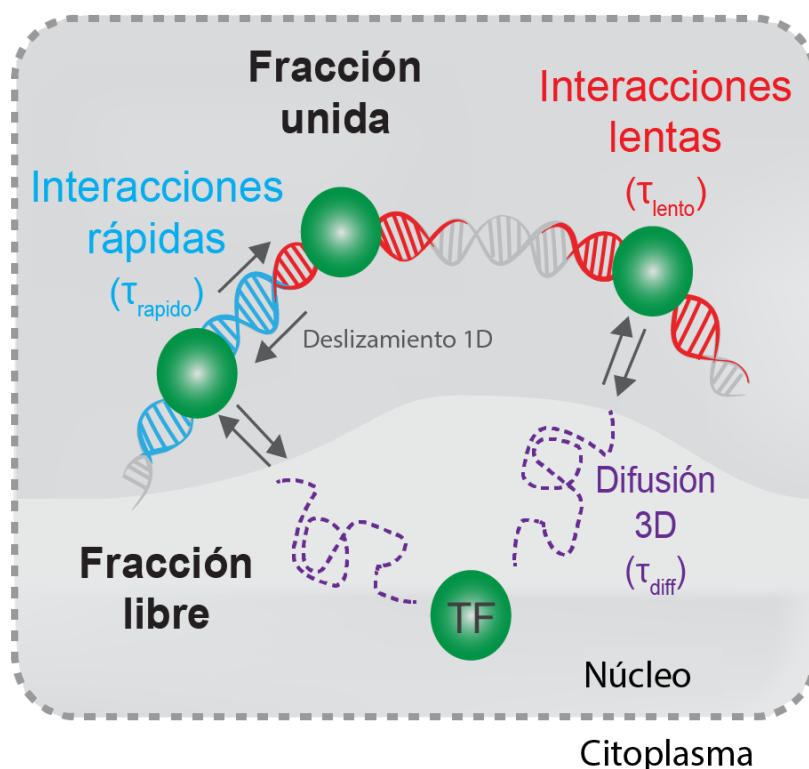


Figura 7.6: esquema del modelo propuesto con el factor de transcripción en tres posibles estados: difundiendo libremente o unido a dos poblaciones de sitios con distintos parámetros cinéticos.

En particular, las interacciones de menor vida media (de mayor k_{off}) incluirían las interacciones inespecíficas mencionadas anteriormente. Las interacciones que poseen un tiempo de residencia corto (mayor constante cinética de disociación) fueron denominados del tipo “interacciones rápidas”, mientras que los de mayor tiempo de residencia (menor constante cinética de disociación) fueron denominados del tipo “interacciones lentas”. Si bien este modelo es una reducción de un sistema complejo, más adelante veremos que este modelo simplificado describe correctamente los datos experimentales.

Como la matemática necesaria para desarrollar modelos para FCS a partir de primeros principios es muchas veces compleja y/o carece de solución analítica, decidimos adoptar

otro enfoque para el desarrollo del modelo anteriormente descrito: expandir el modelo existente de Michelman y verificarlo mediante simulaciones, utilizando la plataforma MCell-FERNET. Esta expansión directa supone que las dos poblaciones de sitios son independientes y sus tiempos característicos se encuentran temporalmente separados. Teniendo en cuenta los tres estados descritos anteriormente, propusimos la curva de autocorrelación para este modelo como

$$G(\tau) = \frac{2^{-3/2}}{N} \left[f_{dif} G_{dif} + f_{rapido} \exp\left(-\tau/\tau_{rapido}\right) + f_{lento} \exp\left(-\tau/\tau_{lento}\right) \right] \text{ Ec. (7.4)}$$

donde N es el número de factores de transcripción fotoactivados en el volumen de observación, f_{dif} , f_{rapido} y f_{lento} la fracción de factores de transcripción que difunden libremente o se involucran en interacciones rápidas y lentas, respectivamente, y τ_{dif} , τ_{rapido} y τ_{lento} los tiempos característicos de difusión, el de interacciones cortas y largas, respectivamente. Como en el caso de la ecuación 7.3, G_{dif} representa la función de autocorrelación para difusión normal 3D (ecuación 1.8).

Para validar y probar el modelo propuesto se realizaron simulaciones de *point FCS* utilizando MCell-FERNET. El espacio de simulación consistió en una caja de 3 μm de lado y se simularon 10^7 pasos con un tiempo de paso de 10 μs para un total de 100 segundos. En la Figura 7.7 se presenta la curva simulada por el modelo de una sola población existente (izquierda) y el modelo propuesto (derecha). Los parámetros cinéticos y poblaciones relativas de cada estado se detallan en la Tabla 7.3. Como se puede observar por los residuos de los ajustes, el modelo con dos poblaciones de sitios describe correctamente la curva de autocorrelación.

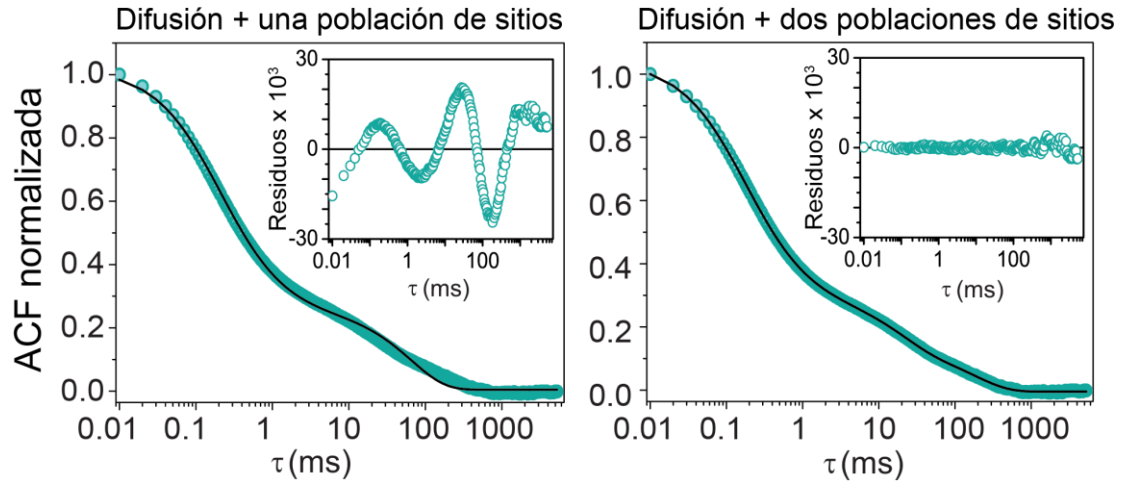


Figura 7.7: curva de autocorrelación para una simulación de un sistema con dos poblaciones de sitios de unión, ajustadas con la ecuación 7.3 (izquierda) y con el modelo propuesto representado en la ecuación 7.4 (derecha).

	Simulado	Recuperado
f_{largas} (%)	18.0	18.4 ± 0.6
τ_{largas} (ms)	200.0	211.3 ± 11.7
f_{cortas} (%)	14.1	14.5 ± 0.5
τ_{cortas} (ms)	6.7	7.0 ± 0.3
D_{libre} (μm²/s)	42	42.1 ± 0.1

Tabla 7.3: parámetros simulados y recuperados para la validación del modelo.

En la Figura 7.8 se muestra un ejemplo representativo de una curva de autocorrelación de Oct4-paGFP en células madre, el ajuste con el modelo propuesto y cada componente de la misma con el fin de facilitar la visualización de los tiempos característicos de cada componente.

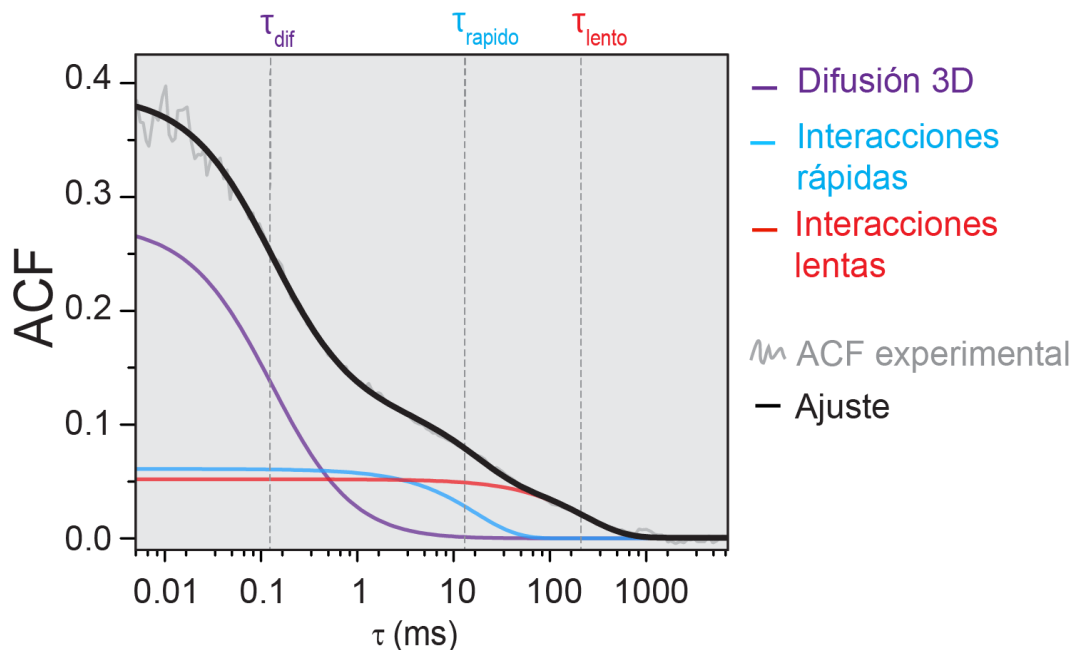


Figura 7.8: la curva experimental (línea gris) puede ser interpretada con un modelo que incluye tres componentes (líneas violeta, azul y roja). En la parte superior se destaca el tiempo característico de cada componente.

Como fue mencionado en el capítulo 5, el ajuste de las curvas de autocorrelación con el modelo propuesto se realizó utilizando una rutina de ajuste global, suponiendo que las constantes características τ_{rapido} y τ_{lento} son comunes a todas las curvas; esto considera que en el núcleo las constantes son similares (la resolución del microscopio no permite mapear regiones más o menos específicas), la diferencia se da en la cantidad de sitios rápidos o lentos dentro de cada volumen confocal observado. La ventaja de realizar un ajuste global es que las constantes de decaimiento resultan del ajuste simultáneo de todos los datos experimentales y, trabajos previos, han mostrado que esta estrategia conduce a una mayor precisión en los parámetros [316].

7.3 El grado de compactación de la cromatina modifica la fracción de factores de transcripción en eventos de unión

Para estudiar si el modelo propuesto permite censar cambios en las interacciones de los factores de transcripción con la cromatina realizamos experimentos en los cuales estudiamos la interacción de Oct4-paGFP y la cromatina en células madre transfectadas

con diversos plásmidos o tratadas con drogas, de acuerdo al protocolo descrito en la sección 5.1.2.

En una primera instancia, modulamos la compactación de la cromatina con tricostatina A (TSA), un inhibidor de la histona deacetilasa que disminuye la compactación de la cromatina promoviendo la accesibilidad al ADN [345], y actinomicina D (ActD), la cual se intercala en el ADN e impide la transcripción[346, 347].

Los resultados obtenidos (Figura 7.9 y Tabla 7.4) indican que al promover la accesibilidad al ADN con TSA aumenta la fracción de Oct4 unida a sitios rápidos y lentos, mientras que tratar las células con ActD ocasiona una disminución en la fracción unida a sitios lentos. Los tiempos de residencia de los factores de transcripción no se vieron afectados con ninguno de los tratamientos. Estos resultados sugieren que el modelo propuesto permitiría observar cambios en la interacción cuando varía la accesibilidad a la cromatina.

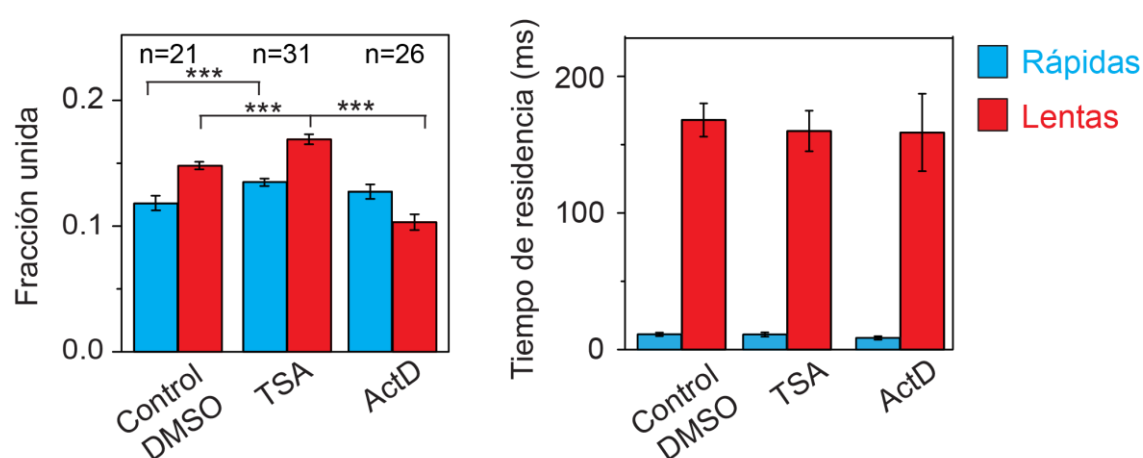


Figura 7.9: cambios en la fracción unida (izquierda) y tiempo de residencia (derecha) para Oct4-paGFP en ESC al tratarlas con drogas que alteran el grado de compactación de la cromatina: tricostatina A (TSA) y actinomicina D (ActD). Diferencias significativas: *** $p < 0.001$.

7.4 Mutaciones en los dominios de unión a ADN modifican los tiempos de residencia de los factores de transcripción

En una segunda etapa, decidimos explorar si nuestros experimentos de paFCS, en combinación con el modelo propuesto, permitían detectar modificaciones en la

interacción con la cromatina causados por cambios en la conformación del factor de transcripción. Para ello, se utilizaron mutantes del factor de transcripción Oct4 o se perturbó la interacción con reguladores epigenéticos. A continuación, se detallan las condiciones de cada experimento y los resultados obtenidos presentados en la Figura 7.10 y Tabla 7.4.

Oct4_{V234P}-paGFP posee una mutación puntual en la hélice de reconocimiento al ADN de Oct4, que causa una menor eficiencia de la transcripción[348]. La Figura 7.10 y Tabla 7.4 muestran que dicha mutación reduce el tiempo de residencia del factor de transcripción en sitios rápidos y lentos sin afectar la fracción unida.

Por otra parte, Oct4 promovería la pluripotencialidad de las células uniéndose a ESET (una metiltransferasa de histonas) mediante su *SUMOylation-interacting domain* (SIM)[349, 350]. Tanto el *knockdown* de ESET con siRNA como la mutación del dominio SIM de Oct4 (Oct4_{ΔSIM}-paGFP) reducen el tiempo de residencia del factor de transcripción en ambos tipos de sitios. Contrariamente, una mutación puntual que inhibe la SUMOilación de Oct4 por sumo-1 (Oct4K118R-paGFP)[351] no afecta los tiempos de residencia, consistente con el desarrollo normal del linaje pluripotente en embriones sin sumo1[352].

Los resultados obtenidos, en conjunto con los de la sección anterior, nos permitieron observar que al afectar la compactación de la cromatina o interferir en la interacción entre factores de transcripción y el ADN cambian la fracción unida y los tiempos de residencia, respectivamente. Estos resultados sugieren que el modelo propuesto y los análisis realizados permiten recuperar cuantitativamente información de la interacción entre factores de transcripción y cromatina en células vivas.

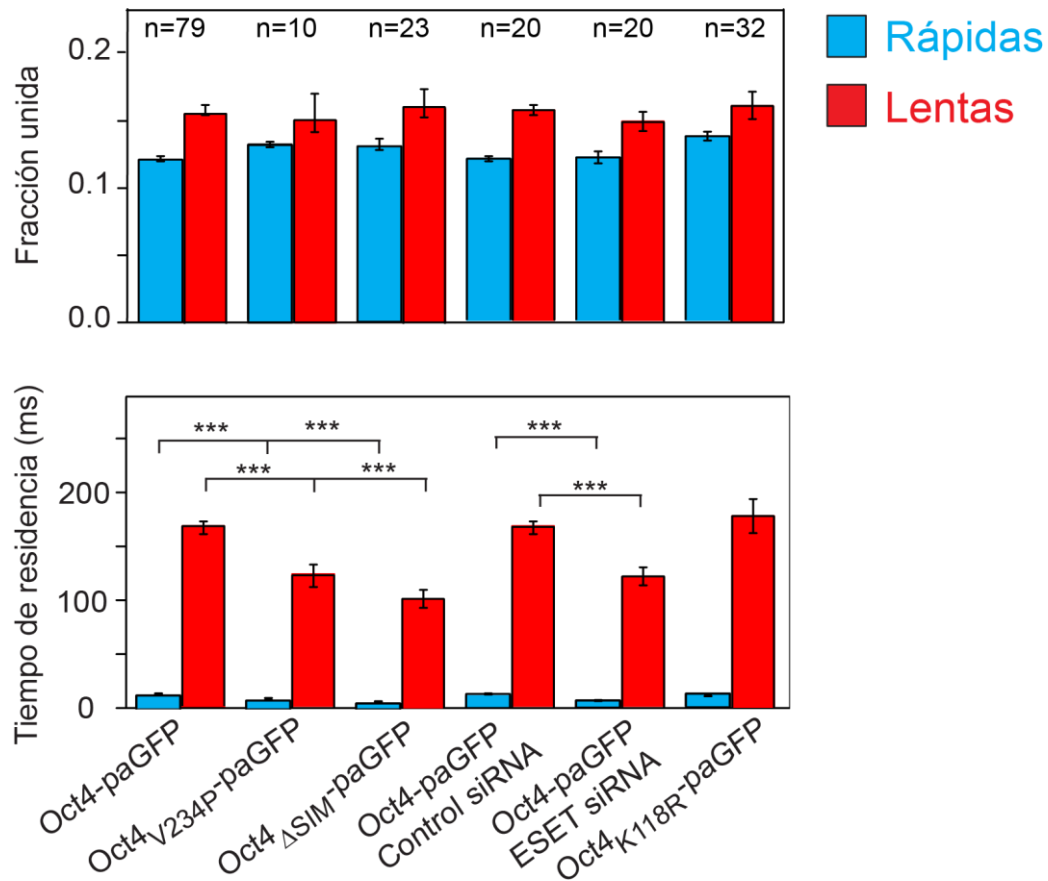


Figura 7.10: cambios en la fracción unida (arriba) y tiempo de residencia (abajo) para mutantes de Oct4-paGFP en sitios de unión al ADN y ensayos knockdown con siRNA en ESC. Diferencias significativas: *** $p < 0.001$.

	$D_{\text{libre}}(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$f_{\text{rápido}}$	$\tau_{\text{rápido}}(\text{ms})$	f_{lento}	$\tau_{\text{lento}}(\text{ms})$	N
DMSO	55.1 ± 1.5	0.118 ± 0.003	11.2 ± 1.2	0.148 ± 0.008	168 ± 12	21
TSA	$46.5 \pm 1.1^*$	$0.135 \pm 0.003^{***}$	11.0 ± 1.5	$0.169 \pm 0.004^{***}$	170 ± 15	31
ActD	$45.7 \pm 2.0^*$	0.127 ± 0.006	8.5 ± 1.2	$0.103 \pm 0.006^{***}$	159 ± 28	26
Oct4-paGFP	58.5 ± 1.5	0.119 ± 0.002	12.8 ± 0.6	0.156 ± 0.004	169 ± 6	79
Oct4 _{V234P} -paGFP	$64.4 \pm 1.0^*$	0.128 ± 0.002	$8.0 \pm 0.9^{***}$	0.151 ± 0.001	$124 \pm 10^{***}$	10
Oct4 _{ΔSIM} -paGFP	54.0 ± 2.8	0.128 ± 0.004	$5.4 \pm 0.6^{***}$	0.158 ± 0.001	$102 \pm 8^{***}$	23
Control siRNA	47.0 ± 1.1	0.118 ± 0.002	12.7 ± 0.6	0.153 ± 0.004	169 ± 6	20
ESET siRNA	$64.1 \pm 2.5^{**}$	0.119 ± 0.004	$66 \pm 4^{***}$	0.145 ± 0.007	$123 \pm 8^{***}$	20
Oct4 _{K118R} -paGFP	$40.1 \pm 1.6^*$	0.116 ± 0.001	11.9 ± 0.4	0.157 ± 0.009	203 ± 10	32

Tabla 7.4: parámetros del modelo recuperados para Oct4-paGFP, mutantes y tratamientos con drogas en ESC. Resultados presentados como (promedio $\pm$ error estándar). Diferencias significativas: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

7.5 Sox2, Oct4 y Cdx2 interactúan de manera dependiente del linaje en embriones de 16 a 32 células

Como fue mencionado en el capítulo 2, los blatocistos de mamíferos se diferencian en dos linajes, el linaje pluripotente (células internas del embrión, que forma el macizo celular interno) y el linaje extraembrionario (células externas del embrión, que forman estructuras que brindan soporte al embrión implantando). Por este motivo, exploramos la dinámica de factores de transcripción relevantes para cada linaje en estas poblaciones celulares utilizando *paFCS*. Los datos experimentales fueron ajustados con el modelo propuesto y se extrajeron los parámetros relevantes al análisis.

Las medidas de *paFCS* en embriones de 16 a 32 células revelaron que, tanto para Oct4-*paGFP* como para *paGFP*-Sox2, la fracción unida y tiempo de residencia para interacciones rápidas son similares entre linajes (Tabla 7.5). Sin embargo, para interacciones lentas, las células internas del embrión (que acaban formando el macizo celular interno), presentan una mayor fracción de unión tiempos de residencia más grandes que las células externas (Figura 7.11 y Tabla 7.5). Estos resultados sugieren que la accesibilidad a sitios específicos de unión y la afinidad de los factores de transcripción por dichos sitios está regulada de manera diferente entre linajes.

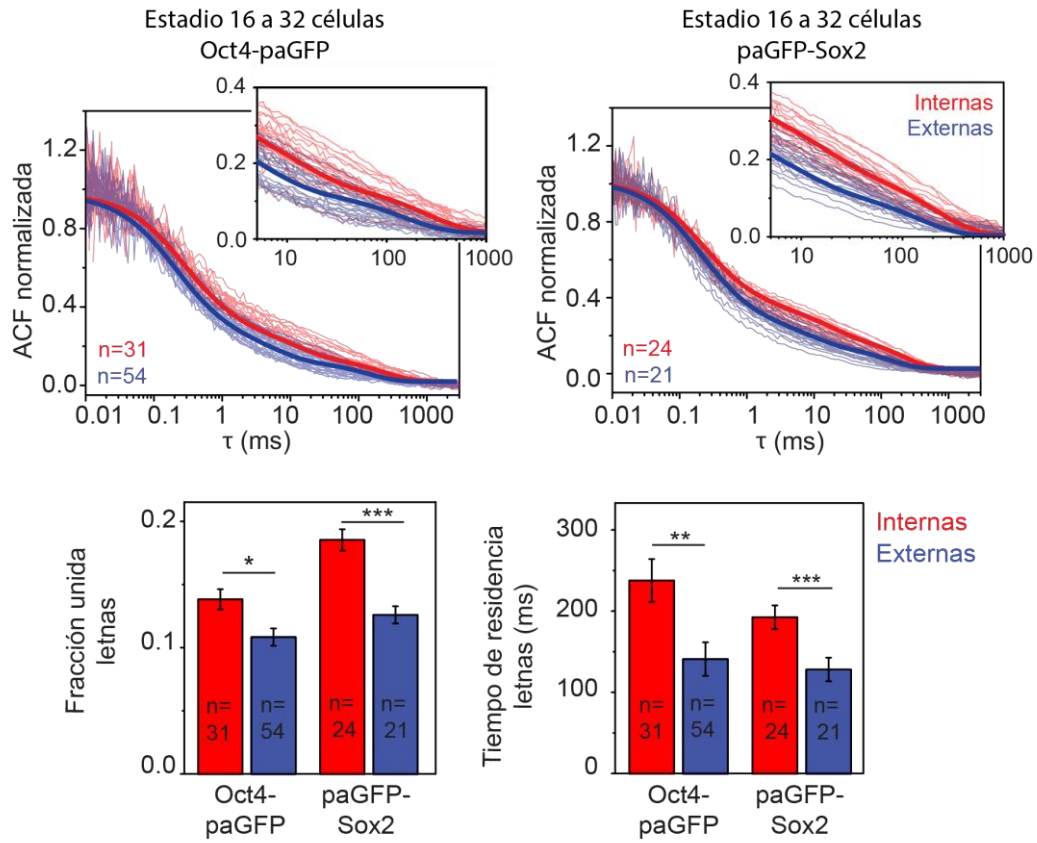


Figura 7.11: curvas de autocorrelación (arriba) para Oct4-paGFP y paGFP-Sox2 en estadios de 16 a 32 células, diferenciando células internas (líneas rojas) y células externas (líneas azules). Abajo se presentan la fracción unida y el tiempo de residencia de interacciones lentas discriminadas por la posición de la célula. Diferencias significativas: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Oct4-paGFP	$D_{\text{libre}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	$f_{\text{rápido}}$	$\tau_{\text{rápido}} (\text{ms})$	f_{lento}	$\tau_{\text{lento}} (\text{ms})$	N
4 células	61.8 ± 1.7	0.064 ± 0.006	4.3 ± 0.2	0.032 ± 0.007	60.1 ± 3.4	15
16 a 32 células (internas)	36.1 ± 1.5	0.134 ± 0.005	13.3 ± 3.1	0.141 ± 0.008	243 ± 36	31
16 a 32 células (externas)	$61.8 \pm 2.4^{**}$	0.132 ± 0.004	$9.8 \pm 1.1^*$	$0.114 \pm 0.008^*$	$145 \pm 21^{**}$	54
paGFP-Sox2						
4 células	60.9 ± 1.5	0.117 ± 0.004	9.6 ± 0.5	0.118 ± 0.008	124 ± 9	28
16 a 32 células (internas)	57.2 ± 2.6	0.139 ± 0.002	15.8 ± 1.5	0.189 ± 0.008	197 ± 15	24
16 a 32 células (externas)	61.8 ± 2.7	0.136 ± 0.005	12.6 ± 1.4	$0.128 \pm 0.006^{***}$	$131 \pm 14^{***}$	21

Tabla 7.5: parámetros del modelo recuperados para Oct4-paGFP y paGFP-Sox2 en embriones vivos. Resultados presentados como (promedio $\pm$ error estándar). Diferencias significativas: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

No sólo los factores de transcripción que regulan la pluripotencialidad exhiben este comportamiento diferencial. Cdx2, un factor de transcripción importante para las células extraembrionarias[166, 211], muestra un tiempo de residencia en interacciones largas mayor en las células externas del embrión, sugiriendo que su función es regulada por la unión a sitios específicos (Figura 7.12 y Tabla 7.6). Estos resultados, en conjunto con los de Oct4 y Sox2, muestran que los factores de transcripción relevantes para mantener la pluripotencia y formar las células extraembrionarias presentan interacciones con el ADN dependiente del linaje.

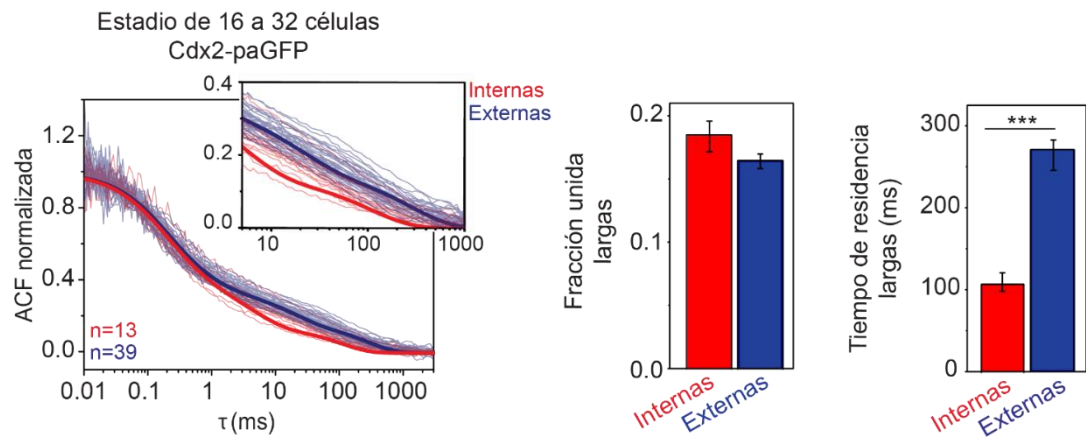


Figura 7.12: curvas de autocorrelación para Cdx2-paGFP en estadios de 16 a 32 células, diferenciando células internas (líneas rojas) y células externas (líneas azules). Los gráficos de barras presentan la fracción unida y el tiempo de residencia de interacciones lentas discriminadas por la posición de la célula. Diferencias significativas: *** $p < 0.001$.

Cdx2-paGFP	$D_{\text{libre}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	$f_{\text{rápido}}$	$\tau_{\text{rápido}} (\text{ms})$	f_{lento}	$\tau_{\text{lento}} (\text{ms})$	N
16 a 32 células (internas)	64.6 ± 3.6	0.139 ± 0.007	16.5 ± 2.8	0.164 ± 0.012	105 ± 11	13
16 a 32 células (externas)	58.6 ± 2.1	0.154 ± 0.003	20.4 ± 1.4	0.178 ± 0.005	$270 \pm 20^{***}$	39

Tabla 7.6: parámetros del modelo recuperados para Cdx2-paGFP en embriones vivos. Resultados presentados como (promedio $\pm$ error estándar). Diferencias significativas: *** $p < 0.001$.

7.6 La heterogeneidad en la interacción cromatina-Sox2 se da en el estadio de cuatro células

Trabajos previos propusieron que las heterogeneidades que guían el destino celular se presentan en estadios tempranos, aún en estadio de cuatro células[225, 353, 354]. Por estos motivos, estudiamos las propiedades de unión a la cromatina de Oct4-paGFP y paGFP-Sox2 en este estadio. Como en la sección anterior, realizamos experimentos de FCS con las variantes fotoactivables de los factores de transcripción, las curvas experimentales fueron ajustadas con el modelo propuesto (ecuación 7.4) y se extrajeron los parámetros relevantes al análisis.

La Tabla 7.5 de la sección anterior muestra que la fracción unida de Oct4-paGFP es menor en el estadio de cuatro células que en las células internas del estadio 16 a 32 células. Este resultado era esperable sabiendo que Oct4 es un factor de transcripción importante para el mantenimiento del linaje pluripotente, y que dicho linaje es originado por las células internas del embrión que forman el macizo celular interno.

Por otra parte, la fracción unida de paGFP-Sox2 es mayor que la de Oct4-paGFP, además de existir una elevada variabilidad intracelular en la fracción unida en interacciones largas en el estadio de cuatro células (Figura 7.13 y Tabla 7.5).

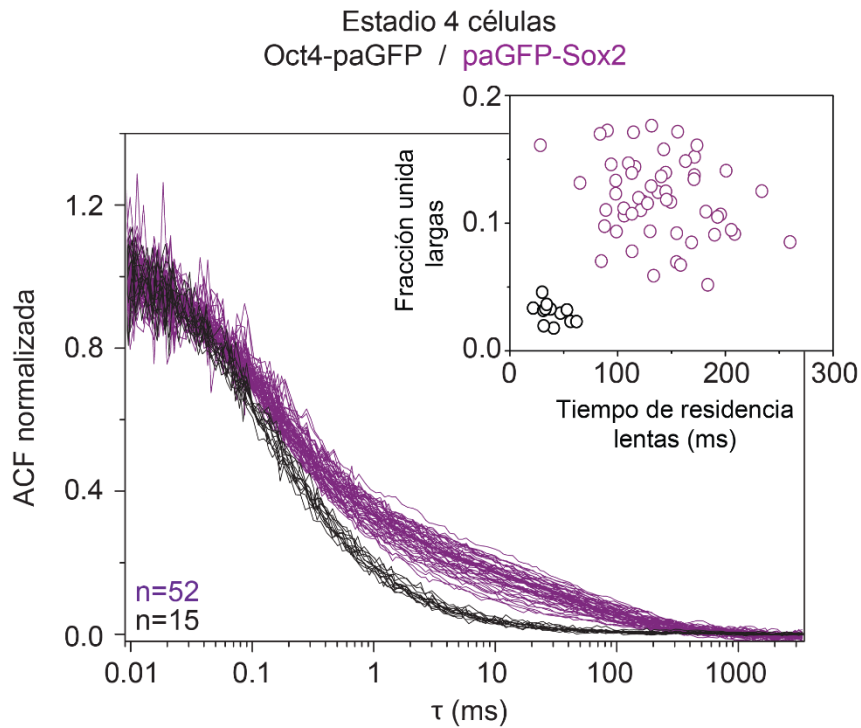


Figura 7.13: curvas de autocorrelación para Oct4-paGFP y paGFP-Sox2 en estadio de cuatro células. En el recuadro se presentan los resultados de medidas de células individuales, donde se observa una mayor dispersión y mayor valor absoluto para fracción unida y tiempo de residencia de paGFP-Sox2.

Con el fin de estudiar si esta variabilidad resulta de variaciones en el comportamiento de las distintas células que componen un embrión, realizamos experimentos de paFCS combinados con seguimiento celular. En estos experimentos, se co-inyectó RNA de paGFP-Sox2 y H2B-RFP (para marcar los núcleos) en el estadio unicelular y se siguió cada célula en la transición del estadio dos a cuatro células, realizando paFCS en el núcleo de cada célula (Figura 7.14).

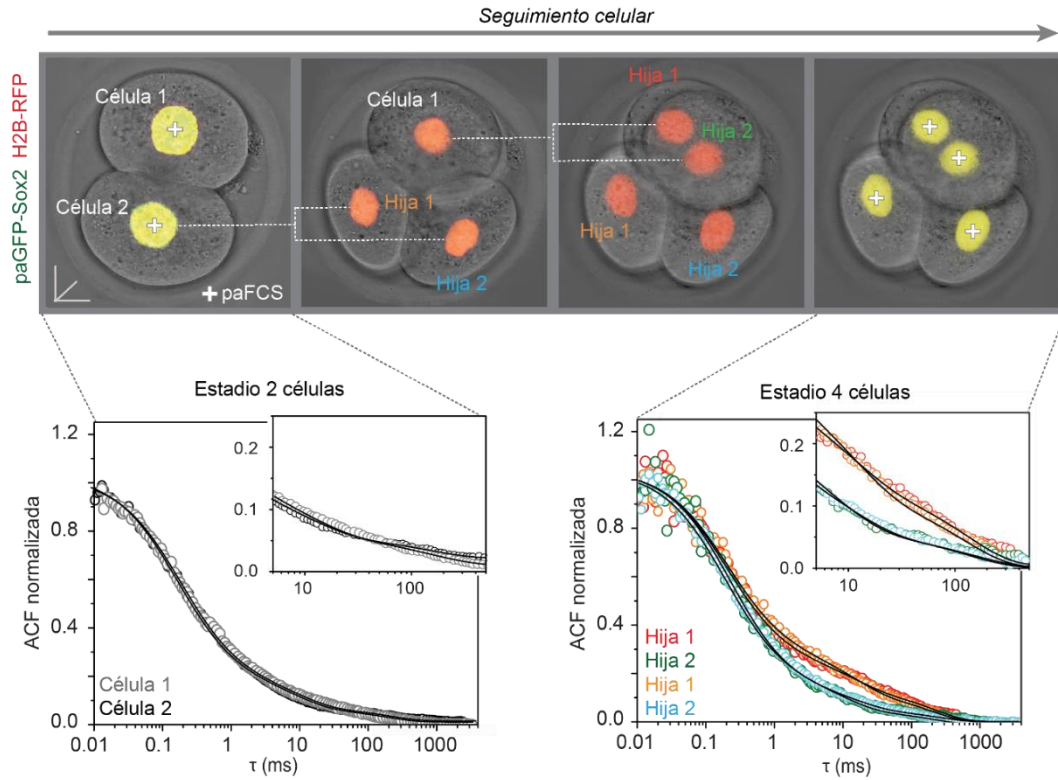


Figura 7.14: experimentos de paFCS combinados con seguimiento celular de dos a cuatro células. Las líneas punteadas denotan a qué célula madre corresponde cada par de células hijas. Las curvas de autocorrelación en estadio de dos células son prácticamente idénticas, en la siguiente división cada célula madre origina dos células hijas con propiedades diferentes. Barra de escala: 10 μm en xyz.

La Figura 7.14 muestra que, en el estadio de dos células, cada blastómero del embrión presenta propiedades similares de unión a la cromatina, tanto para interacciones rápidas y lentas (no se apreciaron diferencias significativas en las curvas de autocorrelación). Por el contrario, las curvas obtenidas en el estadio de cuatro células sugieren una variabilidad intra-embrión en las interacciones factor de transcripción-cromatina. Al ajustar las curvas experimentales con el modelo propuesto y extraer los parámetros relevantes observamos variaciones entre células hermanas en la fracción de Sox2 unida a sitios lentos (Figura 7.14, Figura 7.15 y Tabla 7.7). Por otra parte, tanto el tiempo característico de estas interacciones lentas, como los parámetros relativos a las interacciones rápidas son similares en todas las células del estadio de cuatro células (Figura 7.15 y Tabla 7.7).

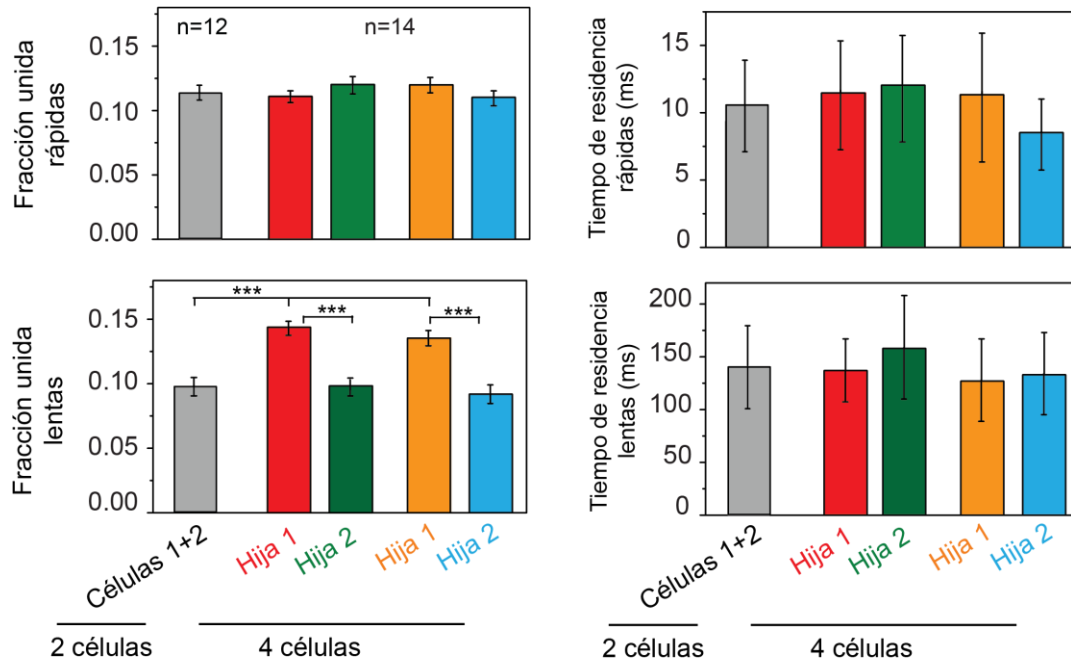


Figura 7.15: parámetros de interacción con la cromatina recuperados de las curvas de autocorrelación en función del seguimiento celular. La fracción de paGFP-Sox2 unido en interacciones lentas aumenta selectivamente en una de las dos células hijas. En estadio de dos células no se aprecian diferencias, se presenta el promedio de las dos células. Diferencias significativas: *** $p<0.001$.

	$D_{\text{libre}}(\mu\text{m}^2/\text{s})$	$f_{\text{rápido}}$	$\tau_{\text{rápido}}(\text{ms})$	f_{lento}	$\tau_{\text{lento}}(\text{ms})$	N
Célula 1 + 2	71.0 ± 6.0	0.121 ± 0.004	10.3 ± 3.2	0.101 ± 0.008	139 ± 39	12
Célula 1 – Hija 1	57.2 ± 1.8	0.111 ± 0.004	11.5 ± 3.9	$0.144 \pm 0.006^{***}$	136 ± 30	14
Célula 1 – Hija 2	61.8 ± 1.4	0.120 ± 0.006	12.0 ± 3.6	0.098 ± 0.008	158 ± 48	14
Célula 2 – Hija 1	60.9 ± 3.6	0.120 ± 0.005	11.3 ± 4.6	$0.135 \pm 0.008^{***}$	127 ± 39	14
Célula 2 – Hija 2	59.9 ± 1.7	0.110 ± 0.005	8.5 ± 2.5	0.091 ± 0.009	133 ± 37	14

Tabla 7.7: parámetros del modelo recuperados para el seguimiento celular de paGFP-Sox2 en estadios de dos y cuatro células. Resultados presentados como (promedio $\pm$ error estándar). Diferencias significativas: *** $p<0.001$.

Estos resultados sugieren que existirían heterogeneidades en la fracción unida de factores de transcripción en interacciones lentas (las que darían origen a la transcripción) de Sox2 al ADN en el estadio de cuatro células. Como vimos en la sección 7.3, la fracción unida en sitios lentos se relaciona con el grado de compactación de la cromatina, y existe un trabajo previo que sugiere que esta compactación se debe a cambios epigenéticos[228].

Además, nuestros colaboradores estudiaron por inmunomarcaciones de embriones el efecto de CARM1, proponiendo que la interacción entre Sox2 y el ADN es uno de los

procesos controlados por la metilación de H3R26. Como fue discutido anteriormente, el grado de metilación de las histonas regulan la accesibilidad de factores de transcripción a sitios específicos. Cuando se reducen los niveles de H3R26me2 al interferir CARM1, se observó que solamente se ve afectada la fracción unida a sitios lentos, sin cambios en la fracción en sitios rápidos[355]. Este hecho sugiere fuertemente que la variabilidad observada en funcional y no producto de ruido intercelular.

7.7 Las células internas del embrión en el estadio de 16 células provienen en su mayoría de células con mayor fracción unida de Sox2 en sitios de mayor tiempo de residencia en el estadio de cuatro células

Para estudiar si la heterogeneidad en la interacción Sox2-cromatina entre células del embrión de cuatro células tiene correlato con el destino celular en estadios avanzados, combinamos paFCS con imágenes 4D (secuencia temporal de reconstrucciones 3D del embrión). Con este fin, utilizamos técnicas de segmentación de imágenes desarrolladas en el programa *ilastik*[315] que nos permitieron visualizar con mayor facilidad las células y núcleos.

En estos experimentos, se utilizaron embriones en estadios de dos células y se inyectó en una de las células ARNs de paGFP-Sox2, H2B-RFP y memb-Cherry (para facilitar la visualización de las células). En el estadio de cuatro células se realizó paFCS en los núcleos de las dos células marcadas para identificar la que posee la mayor fracción unida de Sox2 en sitios lentos.

El desarrollo del embrión fue seguido en el tiempo obteniendo una imagen 3D del mismo cada 20 minutos y las membranas nucleares y celulares fueron segmentadas para facilitar el seguimiento del linaje celular (Figura 7.16). Debido a que el número de células del macizo celular interno varía bastante entre blastocistos[356, 357] analizamos la contribución a las células internas del embrión en el estadio de 16 células, que son las que eventualmente formarán el macizo interno.

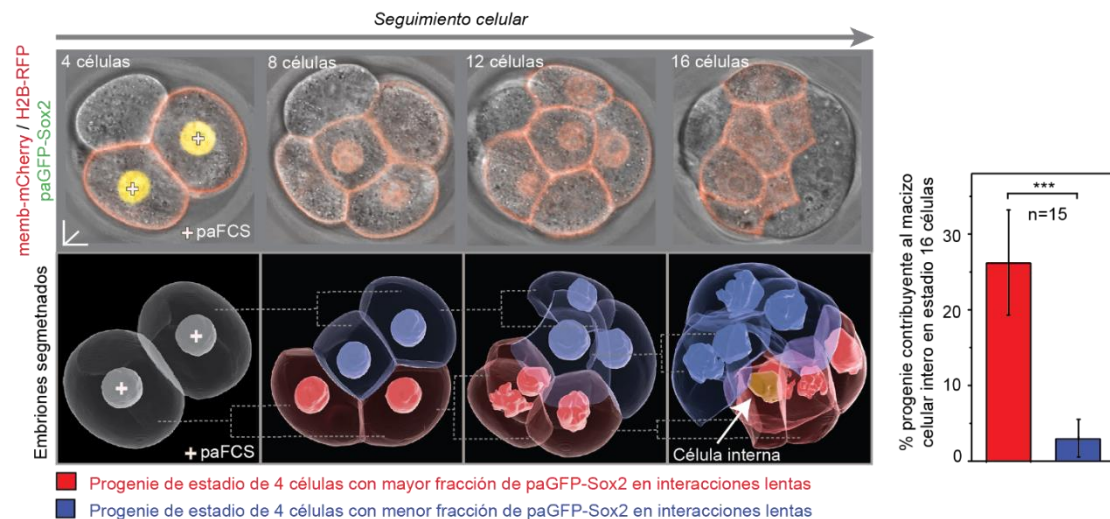


Figura 7.16: evolución temporal del embrión de cuatro células y su correlación con la interacción Sox2-cromatina. Una de las células que componen el embrión de dos células fue inyectada con RNAs de paGFP-Sox2, H2B-RFP y memb-Cherry. Se realizó paFCS en el estadio de cuatro células para identificar la que posee la mayor fracción de Sox2 unida a sitios lentos. Las células fueron segmentadas para facilitar el seguimiento de la posición y morfología. Las líneas punteadas marcan el linaje celular. En el estadio de 16 células se denota el núcleo de la célula interna en naranja.

Los resultados obtenidos demostraron que la progenie de las células con mayor fracción unida en sitios largos de Sox2 en el estadio de cuatro células contribuirían mayoritariamente a las células internas del embrión en el estadio de 16 células (Figura 7.16). Estos resultados evidencian que las diferencias en la interacción de Sox2-DNA (un factor de transcripción clave para la manutención del linaje pluripotente) en el estadio de cuatro células predicen, y pueden ser necesarias, para la generación del macizo interno celular del embrión.

7.8 Discusiones

7.8.1 Partición de los factores de transcripción en el núcleo celular

La dinámica e interacción de factores de transcripción con la cromatina *in vivo* ha sido difícil de estudiar en el pasado. Como fue mencionado en el capítulo 2, las técnicas más utilizadas en el campo, como las de inmunoprecipitación de cromatina, no permiten explorar células individuales y poseen una baja resolución temporal (superior a los minutos). [358-361]. En este contexto, nuestros resultados sugieren que las técnicas basadas en fluctuaciones de fluorescencia pueden proveer información cuantitativa relevante de la distribución nuclear de los factores de transcripción.

En particular, los datos experimentales pudieron ser interpretados considerando que los factores de transcripción difunden libremente en el núcleo y pueden interactuar con dos tipos de sitios de unión. Pudimos verificar que $\sim 70\%$ de las moléculas se rige por difusión browniana 3D, con un coeficiente de difusión esperado para moléculas del tamaño de paGFP-Sox2 en un entorno como el núcleo celular[362]. Las otras dos poblaciones representan aproximadamente el 15% cada una del total de moléculas y están compuestas por factores de transcripción participantes de eventos de unión al ADN con tiempos de residencia del orden de 10 ms y 200 ms.

Es importante destacar que nuestro modelo es claramente una simplificación de lo que se vería en el complejo entorno nuclear. En esta condición es esperable una variabilidad mayor en las interacciones factor de transcripción-cromatina dadas por variaciones en el microentorno, en la secuencia o en la estructura del complejo del cual forma parte el factor de transcripción. Si bien el modelo propuesto con dos tipos de sitios de unión es una simplificación, fue suficiente para describir los datos experimentales y provee información sobre propiedades promedio de las interacciones lentas y rápidas. Utilizar un modelo más complejo que tenga en cuenta distribuciones de constantes de afinidad ocasionaría una sobre-interpretación de los resultados experimentales.

En este contexto, las interacciones rápidas incluirían diversos mecanismos de interacción factor de transcripción-cromatina tales como adsorciones e interacciones con sitios inespecíficos, deslizamiento unidimensional sobre el ADN y saltos entre segmentos[358, 363-366]. En el caso de estos dos últimos procesos, se presume que las distancias de deslizamiento y saltos (décimas de nanómetro en la escala temporal de los experimentos de FCS[178]) serían menores a la resolución óptica ($\sim 250\text{nm}$ en los experimentos realizados), por lo cual estos fenómenos no pueden ser diferenciados de otros tipos de interacciones con la cromatina.

Nuestros resultados sugieren que antes de que el embrión comprometa claramente los distintos linajes la interacción de Sox2 con el ADN comienza a presentar heterogeneidades en el estadio de cuatro células. En contraste, sólo una pequeña fracción del Oct4 total estaría comprometido en interacciones con sitios rápidos.

7.8.2 Determinación del linaje celular en embriones vivos

Al relacionar la dinámica de interacción de Sox2-cromatina con el destino celular en embriones tempranos de ratón, pudimos demostrar que el destino celular estaría influenciado por heterogeneidades moleculares entre blastómeros del embrión de cuatro células. En la misma dirección, hemos mencionado un trabajo previo en el cual se observan heterogeneidades entre blastómeros tempranos en niveles de metilación de H3R26[367]. Más recientemente, Goolam et al.[167] observaron una pérdida total de la expresión de Sox21 al inhibir CARM1 y reducir los niveles de metilación de H3R26. Por otro lado, una sobreexpresión de CARM1 aumenta los niveles de mRNA de Sox21 en el estadio de ocho células. Estos resultados, en conjunto con los nuestros, sugieren que CARM1-Sox2-Sox21 forman un eje central para la determinación del destino celular en estadios tempranos del desarrollo.

Existen trabajos previos que estudiaron heterogeneidades entre células de embriones[225, 354], sin embargo, estos trabajos no pudieron correlacionar directamente heterogeneidades entre blastómeros tempranos con destino celular. Además, se propuso que ciertas diferencias en la retención de Oct4 en algunos núcleos anticiparían el destino celular[368], pero sólo se siguieron células entre los estadios de 8 y 16 células. Para correlacionar directamente diferencias en el comportamiento de factores de transcripción con el destino celular identificamos de manera no invasiva heterogeneidades entre blastómeros de un embrión y realizamos un seguimiento espaciotemporal de la evolución del embrión. La combinación de paFCS, simulaciones computacionales y técnicas de reconstrucción 3D nos permitió identificar diferencias en la interacción de paGFP-Sox2 con la cromatina entre blastómeros y confirmar que las células con mayor cantidad de paGFP-Sox2 comprometida en interacciones con sitios lentos contribuyen de forma mayoritaria a los blastómeros internos en el estadio de 16 células.

Capítulo 8: dinámica de sondas fluorescentes en materiales mesoporosos delgados

8.1 Motivación: estudio de difusión de moléculas en matrices inorgánicas ordenadas

En el capítulo 3 describimos algunas de las propiedades y aplicaciones más relevantes de los materiales mesoporosos y, en particular, nos focalizamos en aquellos depositados sobre films. Mencionamos además que muchas de estas aplicaciones requieren conocer cómo moléculas incorporadas al film difunden en el arreglo de poros. Trabajos previos buscaron realizar esta caracterización utilizando técnicas como RMN[282], cromatografía[283] y técnicas electroquímicas[284, 285]. Sin embargo, estas técnicas involucran la observación simultánea de numerosas moléculas en áreas grandes (1-3 cm² en las técnicas electroquímicas[285]), impidiendo obtener información sobre posibles micro-heterogeneidades de fenómeno de transporte en estos sistemas.

Es importante destacar que algunos de estos métodos (i.e. las técnicas electroquímicas) permiten obtener información difusional en la dirección perpendicular al sustrato únicamente. En este capítulo, utilizaremos técnicas de microscopía confocal no invasivas y de buena resolución espacial (FRAP y FCS, secciones 1.3.2.1 y 1.3.2.2) para estudiar la difusión de sondas fluorescentes en la dirección del sustrato. Una particularidad del sistema en estudio es que las dimensiones de la sonda fluorescente son del orden de las dimensiones de los poros y cuellos de los films estudiados, como veremos más adelante. Si bien la difusión dentro de estos materiales fue estudiada por técnicas de microscopía de fluorescencia en trabajos previos, el mismo fue realizado en muestras sin calcinar (aún con el surfactante) o con la muestra seca (sección 3.5). Por lo tanto, desarrollamos un protocolo que permita trabajar con soluciones sin secar la muestra, para evitar la adsorción o agregación irreversible de la sonda.

En paralelo, para buscar comprender los resultados experimentales y contribuir a la generación de modelos teóricos de difusión en estas condiciones experimentales, realizamos simulaciones de Monte Carlo en sistemas ordenados periódicos.

8.2 Elección de la sonda fluorescente

Para realizar los experimentos de FCS la sonda debe cumplir tres requisitos: ser excitable a las longitudes de onda de los láseres disponibles en el microscopio confocal, poseer un rendimiento cuántico aceptable y ser capaz de ser incluida y difundir dentro del film. En una primera instancia, los láseres disponibles en el microscopio, 488 y 543 nm, inclinaron nuestra elección de sondas a fluoresceína y rodamina B, las cuales estaban disponibles en nuestro laboratorio. La Figura 8.1 muestra la estructura de las mismas y las dimensiones características de Rodamina B, la cual cumplió un papel central en este capítulo.

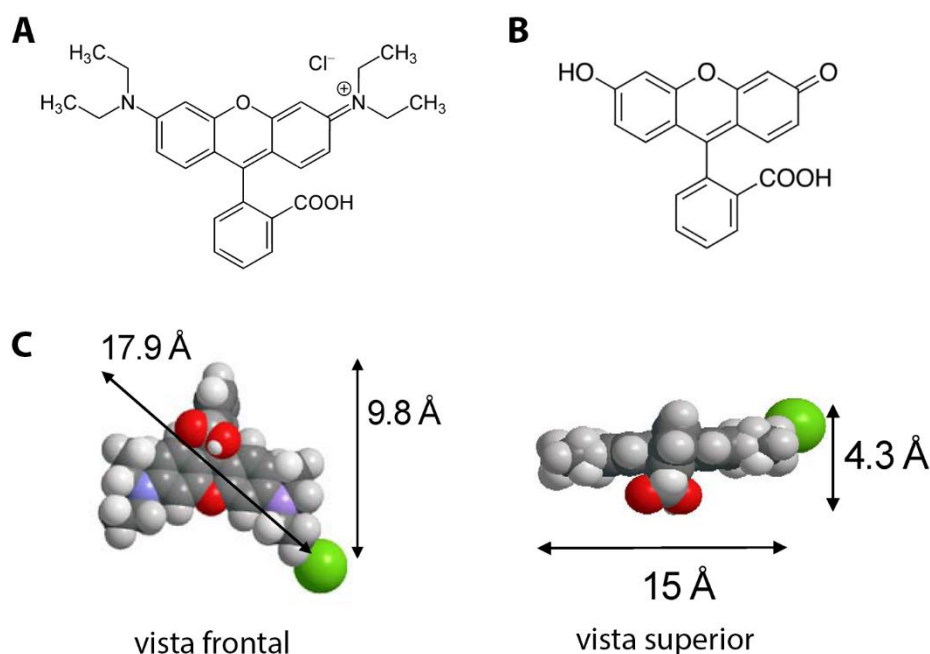


Figura 8.1: (A) estructura de la rodamina B. (B) estructura de la fluoresceína. (C) dimensiones características de la rodamina B. Adaptado de [369].

Tanto la rodamina B[370] como la fluoresceína[371] presentan un elevado rendimiento cuántico a pH mayor a 8.0, por lo tanto ambas sondas podrían ser utilizadas para estudiar la difusión dentro de los films. Para decidir cuál sonda utilizar realizamos un experimento cualitativo en el cual un film fue incubado con ambas sondas (con el protocolo similar al descrito en la sección 8.3) y se observó la incorporación de ambas sondas. En la Figura 8.2 se presentan los resultados obtenidos.

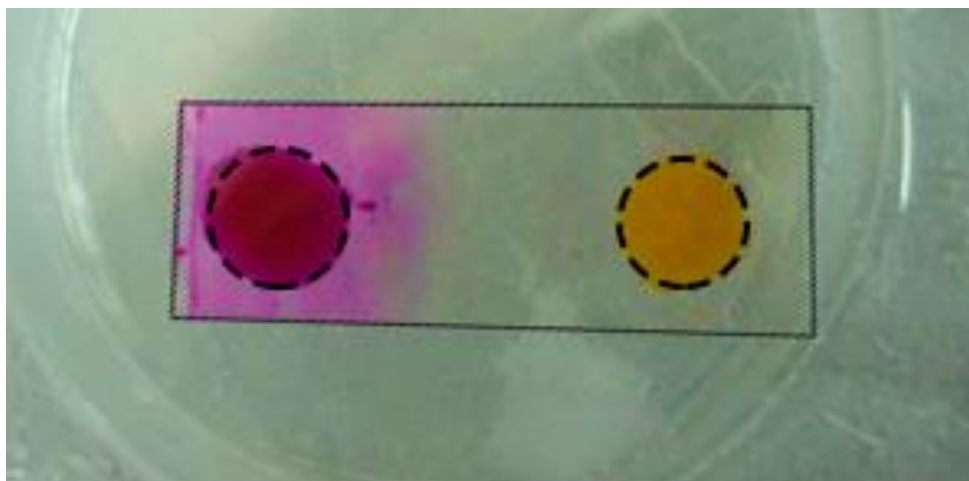


Figura 8.2: film rectangular (recuadro negro) incubado con soluciones concentradas de rodamina B (izquierda) y fluoresceína (derecha) a pH 8.0. El círculo punteado muestra la zona de siembra de la gota. Se observó que la sonda rodamina B penetra y difunde en el film en mayor. Los valores del tamaño de poro y cuello para el film utilizado (TB200) son 1.13 nm y 0.88 nm, respectivamente.

La capacidad de la sonda de incorporarse y difundir en el material depende, entre otros factores, del tamaño de la sonda y su carga. La comparación entre las dimensiones mostradas en la Figura 8.1 y los tamaños de poro y cuello para este fin en particular (Tabla 5.2) muestra que ambas sondas son de menor tamaño que los poros y cuellos del film, sugiriendo que ambas podrían penetrar en el arreglo de poros. Sin embargo, es importante considerar en este análisis las posibles interacciones electrostáticas que pueden existir entre el film y la sonda. El punto isoeléctrico del film de TiO_2 depende de su estructura y rugosidad, pero generalmente adquiere valores inferiores a 6.0[372], indicando que a pH cercano a 8.0 el film presentará una carga superficial negativa. Por otra parte, la fluoresceína, en su forma dianónica a ese pH, presenta la misma carga que el film, generando una repulsión electrostática que limitaría la incorporación de la sonda a los poros del material. Por otro lado, la rodamina B presenta una forma zwitteriónica a pH básico[373]; dicha forma permitiría la incorporación de la sonda al material y su difusión dentro del mismo.

En base a las consideraciones previas y el resultado cualitativo mostrado en esta sección, se decidió utilizar rodamina B en los ensayos que mostraremos más adelante.

8.3 Preparación de las muestras

Previo a la incubación con la sonda fluorescente, los films fueron sumergidos en etanol con agitación por 10 minutos y lavados con agua destilada. La hidratación de los poros fue realizada depositando los films durante una hora en una cámara sellada, conteniendo también un reservorio con una solución saturada de KNO_3 . De esta forma, se garantiza que la humedad relativa de la cámara sea de 93%[374]. Este valor de humedad garantiza una hidratación completa de los poros[375]. Luego, una de las caras del film fue recubierta con una solución 50nM de rodamina B en buffer Tris 20mM pH 8 con agregado de 100mM o 500mM de NaCl, dependiendo del caso. Al cabo de 2 minutos la gota fue retirada y el film colocado nuevamente en la cámara de humedad controlada por un período mayor a 12 horas para garantizar la total evaporación de la película acuosa que pueda haber quedado en la superficie del film y promover una distribución homogénea de la sonda en el film.

Como mencionamos previamente, las mediciones requerirán mantener la humedad relativa alta para garantizar la hidratación de los poros. En la Figura 8.3 se muestra el dispositivo utilizado para realizar las mediciones de FCS. El mismo consiste en un espacio hermético entre el film incubado y un portaobjetos generado con un marco de PDMS (polidimetilsiloxano). La humedad dentro de la cámara es mantenida adhiriendo al portaobjeto un trozo de papel embebido en solución saturada de KNO_3 , con especial cuidado de que el mismo no entre en contacto el film. El marco de PDMS tiene una buena adherencia al vidrio y evita la pérdida de humedad, pudiendo realizar medidas durante horas con el mismo film.

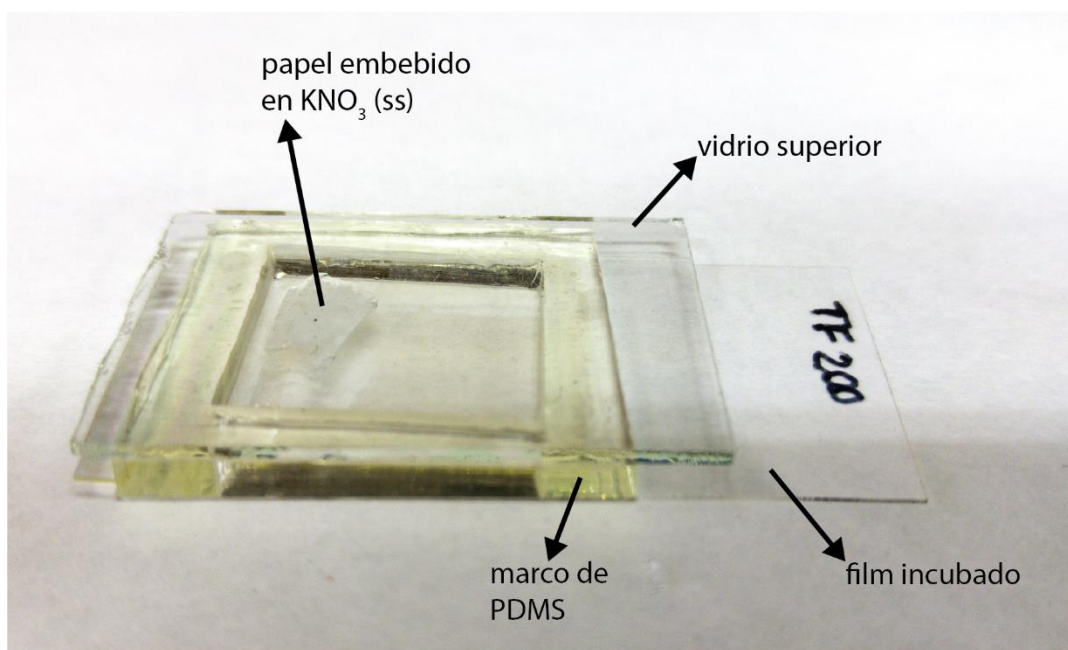


Figura 8.3: cámara de humedad controlada utilizada para las mediciones de microscopía confocal.

8.4 FRAP revela una fracción inmóvil minoritaria

En un principio, utilizamos la técnica de FRAP (sección 1.3.2.2) para estudiar la difusión de la sonda dentro del film y determinar si existe una población de moléculas irreversiblemente adsorbidas al film. Como la mayoría de los modelos que ajustan las curvas experimentales de FRAP son empíricos, solamente se hizo énfasis en el valor de la fracción móvil, la cual nos permite inferir sobre el grado de adsorción irreversible de la sonda al material.

En la Figura 8.4 se presentan tres estadios característicos del experimento de FRAP: antes del fotoblanqueo (izquierda), el instante posterior al fotoblanqueo y un tiempo posterior donde se aprecia la recuperación parcial de la intensidad en la zona fotoblanqueada.

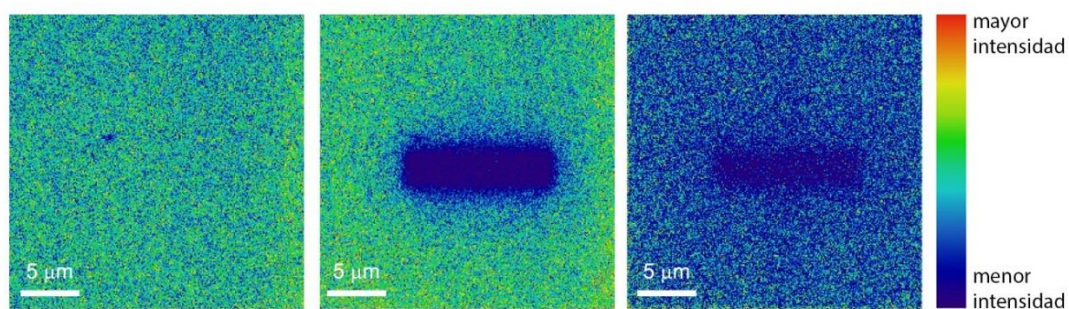


Figura 8.4: tres imágenes representativas obtenidas durante un experimento de FRAP en un film TF400. A la izquierda se presenta el área de observación homogénea previo al fotoblanqueo, en el centro el instante del fotoblanqueo y a la derecha un tiempo posterior. La escala de colores representa la intensidad de fluorescencia.

La intensidad promedio dentro de la zona fotoblanqueada es registrada en cada cuadro y normalizada de acuerdo a la ecuación 5.3 para obtener la curva de recuperación de la intensidad (Figura 8.5).

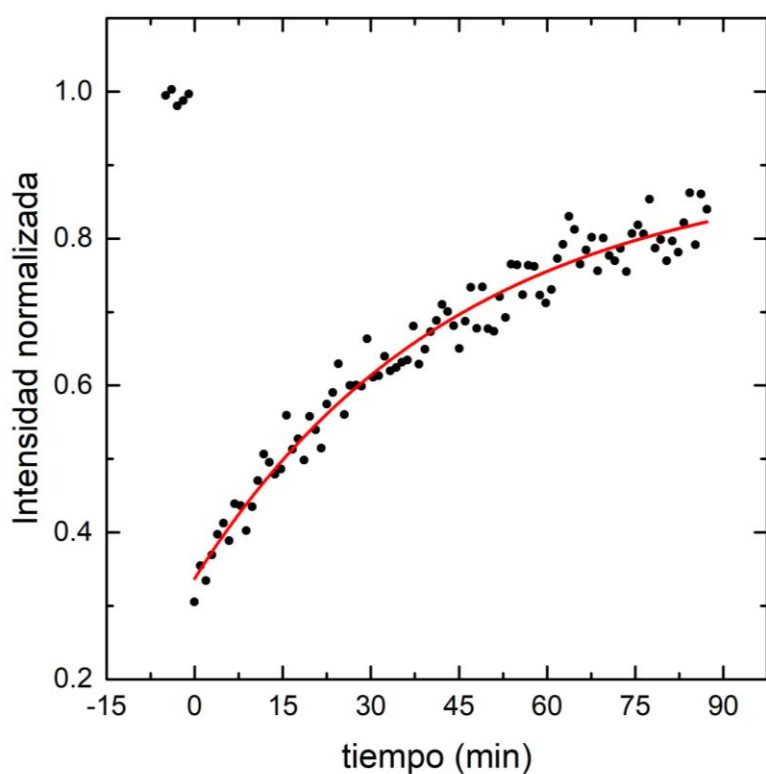


Figura 8.5: curva representativa de la recuperación de intensidad de fluorescencia en un experimento de FRAP para rodamina B en el film TF400. La línea roja representa el ajuste de los datos experimentales con la ecuación 5.4.

Las curvas experimentales de recuperación de intensidad de fluorescencia ($n = 12$) fueron ajustadas con la ecuación 5.4, obteniendo un valor promedio de $(89 \pm 4)\%$ para la fracción móvil (ecuación 5.5). Este elevado valor para la fracción móvil indica que la mayoría de las moléculas de rodamina B difunden libremente dentro del film. La fracción restante (fracción inmóvil) corresponde a moléculas fotoblanqueadas que no se intercambian en la ventana temporal estudiada, probablemente debido a interacciones fuertes con el material.

8.5 Determinación del plano focal de la muestra para los experimentos de FCS

Trabajos previos de FCS en muestras extremadamente finas, como bicapas lipídicas, demostraron que el foco del láser debe estar muy cerca del centro de la bicapa para que las medidas de FCS sean precisas. En particular, debido a la forma del volumen confocal, el tiempo característico de difusión crece parabólicamente con la distancia focal al alejarse de la bicapa[376], de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \left(1 + \frac{\lambda_0^2 \Delta z^2}{\pi^2 n^2 \omega_0^4} \right) \quad Ec. (8.1)$$

donde τ_D es el tiempo característico de difusión, D el coeficiente de difusión, ω_0 la cintura del volumen confocal en el plano focal, λ_0 la longitud de onda del láser de excitación, n el índice de refracción del medio y Δz es la distancia entre la posición de la muestra y el mínimo de la parábola. Teniendo en cuenta estos antecedentes y el espesor reducido de los films (100-200 nm, Tabla 5.2), resulta clave realizar las medidas de FCS a la distancia focal adecuada, para obtener el tiempo característico de difusión de manera correcta.

Por lo tanto, realizamos experimentos control de FCS variando la altura del objetivo (z) en pasos sub-micrométricos y analizamos la dependencia de la intensidad media de fluorescencia y de τ_D obtenido por el ajuste de la ecuación 5.1 a los datos experimentales en función de la posición del objetivo. La Figura 8.6 muestra que el

tiempo característico de difusión posee una dependencia parabólica con z . Por otra parte, el valor es aproximadamente constante en un rango de ± 0.2 - $0.3 \mu\text{m}$ en posiciones cercanas al plano de la muestra.

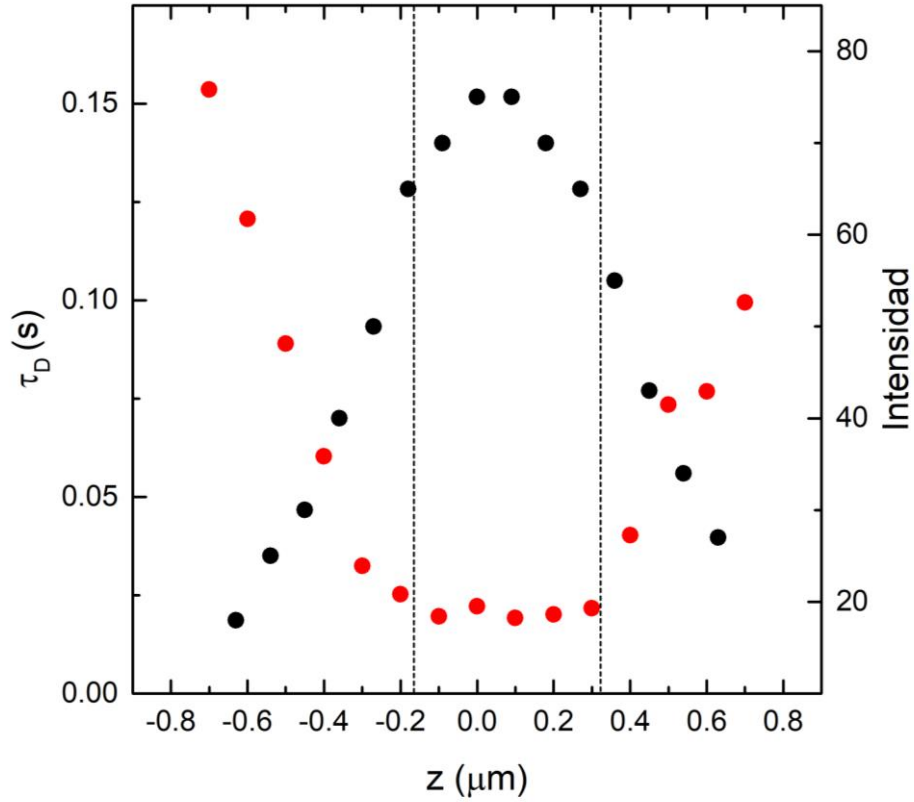


Figura 8.6: tiempo característico de difusión (eje izquierdo, puntos rojos) e intensidad de fluorescencia (eje derecho, puntos negros) en función de la posición en z del foco. Se observa un rango en z (entre líneas punteadas) en el cual el tiempo de difusión es mínimo y constante y coincide con la región de máxima intensidad.

Los resultados experimentales no fueron analizados de manera cuantitativa con el modelo descrito anteriormente (ecuación 8.1) debido a que el espesor de los films (100-200 nm, Tabla 5.2) no es despreciable frente a la cintura axial del volumen confocal ($\sim 1 \mu\text{m}$), a diferencia de las bicapas lipídicas ($\sim 5 \text{ nm}$). Sin embargo, pudimos observar que en el rango en el cual el valor de τ_D es constante y mínimo coincide con los valores en z que proveen valores máximos de intensidad de fluorescencia. Estos resultados sugieren que el plano adecuado para la realización de los experimentos de FCS puede ser encontrado de manera rápida y precisa buscando aquella posición en z en la cual se registra un máximo en la intensidad.

8.6 Resultados experimentales de FCS en films mesoporosos

Por otra parte, realizamos experimentos de FCS siguiendo los protocolos optimizados y descritos en el capítulo 5. La Figura 8.7 muestra una curva representativa de los resultados obtenidos en uno de los films estudiados (TF400); a modo comparativo, se incluye una curva simulada para la sonda en H₂O (420 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, [377]).

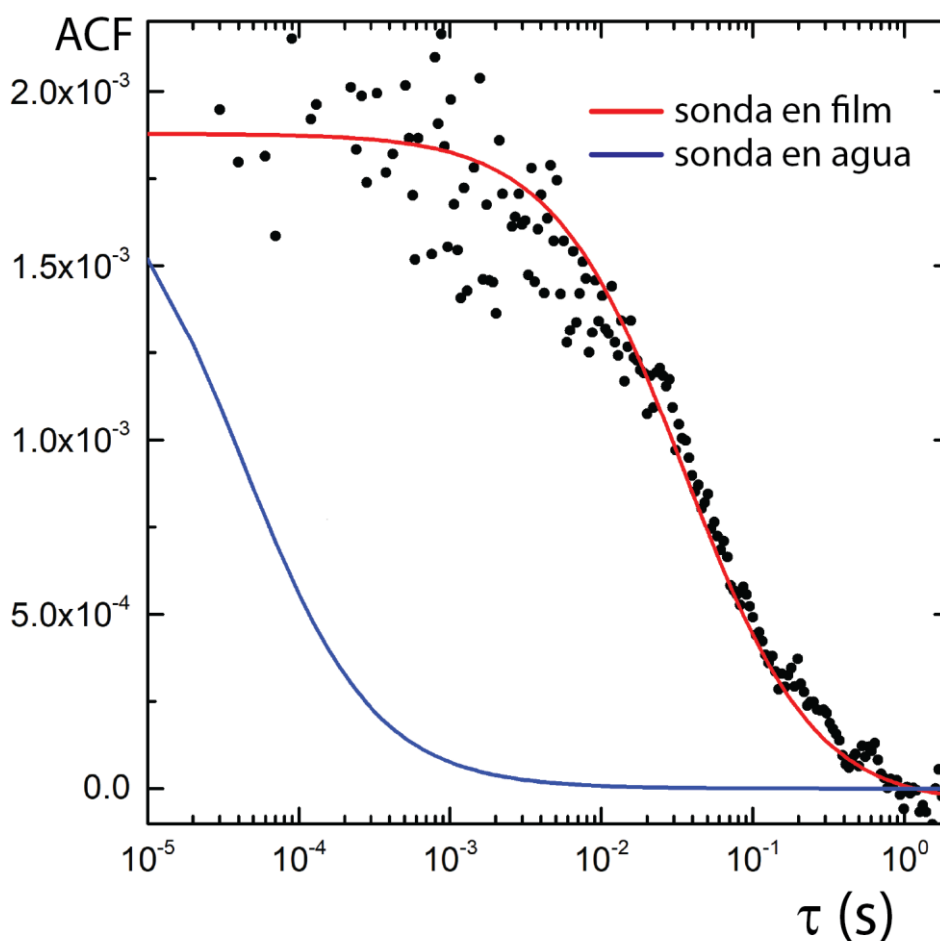


Figura 8.7: curva de autocorrelación (puntos negros) y ajuste con el modelo de difusión 2D (línea roja) para la difusión de rodamina B dentro del material mesoporoso (TF400). Se observa un corrimiento a tiempos mayores con respecto a la curva esperada para la difusión de la sonda libre en agua (línea azul).

Las curvas experimentales presentan un corrimiento hacia tiempos mayores, entre 3 y 4 órdenes de magnitud respecto al comportamiento esperado para la sonda en H₂O. Este hecho evidencia una difusión muy retrasada dentro del material, probablemente debido a la geometría del sistema y a interacciones de la sonda con el material.

8.6.1 El tamaño de poro y cuello modulan la difusión

Los resultados preliminares de FRAP y FCS (secciones 8.4 y 8.6) mostraron una dinámica de difusión libre y órdenes de magnitud más lenta dentro de los films mesoporosos, en comparación con la sonda libre en agua. Para estudiar el efecto del tamaño de poro y cuello en la difusión de rodamina B dentro de los films, realizamos experimento de FCS en los films descritos en la Tabla 5.2 y se obtuvo el tiempo característico de difusión ajustando las curvas de autocorrelación con la ecuación 5.1. Estas primeras medidas fueron realizadas en un medio con alta fuerza iónica (500 mM NaCl), para minimizar las interacciones de la sonda con el material. La Figura 8.8 muestra los resultados obtenidos para los seis films.

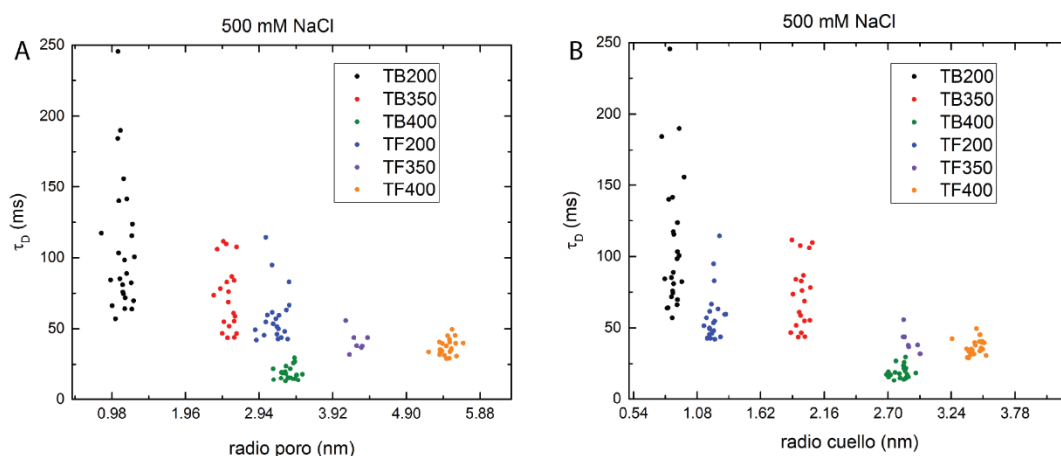


Figura 8.8: tiempo característico de difusión en función del tamaño del poro (A) y el tamaño de cuello (B) para los seis films estudiados en una solución acuosa con alta fuerza iónica. La dispersión de los datos en el eje X es solamente para fines representativos de los datos.

Otra forma de representar los datos es graficar el tamaño del poro y del cuello en cada eje y el valor del tiempo característico de difusión en escala de colores. Esta representación permite visualizar la dependencia de τ_D con ambos parámetros (Figura 8.9).

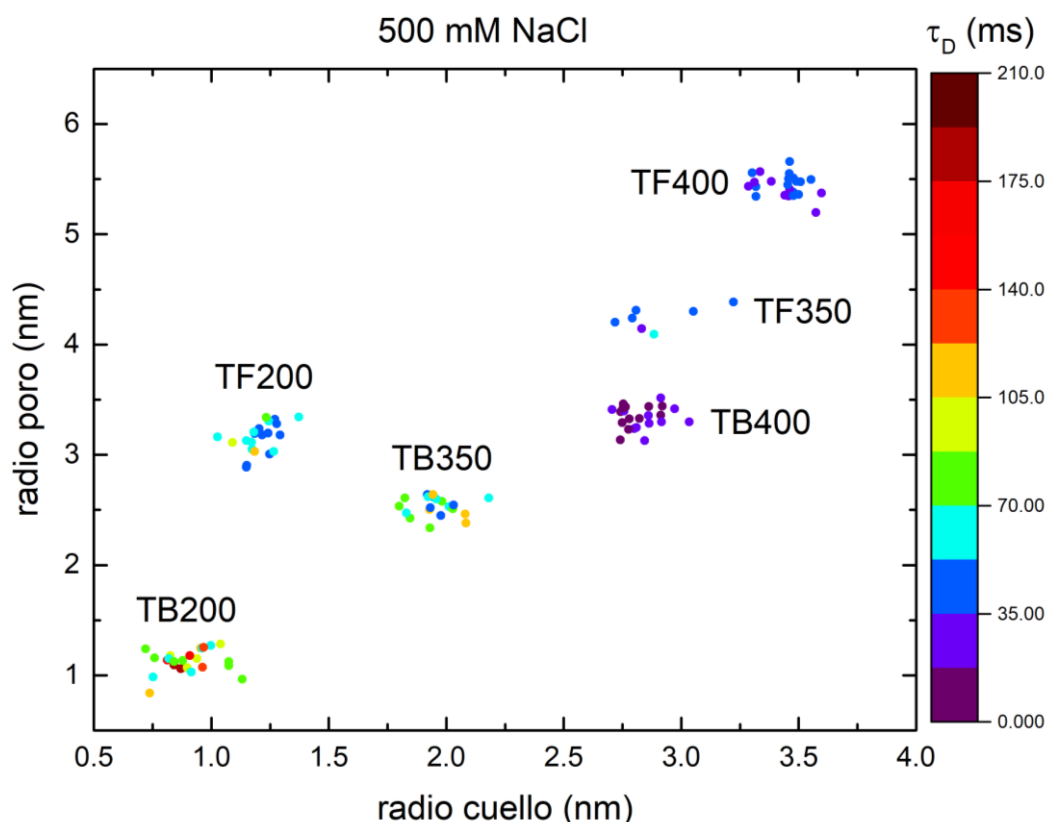


Figura 8.9: tiempo característico de difusión (escala de colores) en función del tamaño de poro y de cuello para la sonda rodamina B en films a alta fuerza iónica. La dispersión de los datos en los ejes X e Y es solamente para facilitar la visualización de los mismos.

Los tiempos característicos de difusión de rodamina B obtenidos en films mesoporosos con alta fuerza iónica se encuentran en el rango de 20-200 ms. El coeficiente de difusión correspondientes a estos tiempos característicos, $0.085\text{-}0.85\ \mu\text{m}^2/\text{s}$, son del orden de los valores obtenidos por SMT en films no calcinados de SiO_2 [293, 378]. Nuevamente, los valores son tres a cuatro órdenes de magnitud menores que el valor del coeficiente de difusión de la sonda en agua, como fue observado en la Figura 8.7.

Un análisis más detallado de la Figura 8.8 y Figura 8.9 revelan que el tiempo característico de difusión decrece cuando aumentan el tamaño del poro y del cuello. Además, el tiempo característico de difusión adquiere un valor constante aproximado de 25 ms cuando el tamaño del cuello es mayor a 2.7 nm (Figura 8.8B). Los tamaños de poro en estos films (TB400, TF350 y TF400) varían en un rango relativamente amplio (3-6 nm), sugiriendo que la difusión de la sonda en los mismos depende fundamentalmente del tamaño del cuello. La dinámica más rápida en los films con tamaño de poro similar,

pero cuellos mayores (TB400 vs TF200, Figura 8.9), enfatizan la relevancia del tamaño del cuello en la dinámica de difusión dentro de materiales mesoporosos.

8.6.2 Modulación de la difusión por interacciones sonda-sustrato

Es de esperar que en un sistema tan confinado como los films mesoporosos, las interacciones electrostáticas puedan influenciar la movilidad de la sonda [379]. Por ejemplo, las cargas superficiales de films mesoporosos de TiO_2 son capaces de suprimir la respuesta electroquímica de mediadores redox[380]. En este sentido, esperamos que la fuerza iónica de la solución acuosa dentro de los films mesoporosos de TiO_2 influya y module la dinámica de difusión de la sonda[380].

Con el fin de estudiar el efecto de las cargas superficiales en la difusión, repetimos los experimentos anteriormente descritos, pero reduciendo la fuerza iónica; para ello trabajamos con un agregado de 100mM NaCl. En la Figura 8.10 se presentan los resultados obtenidos para los films estudiados, en el medio de baja fuerza iónica.

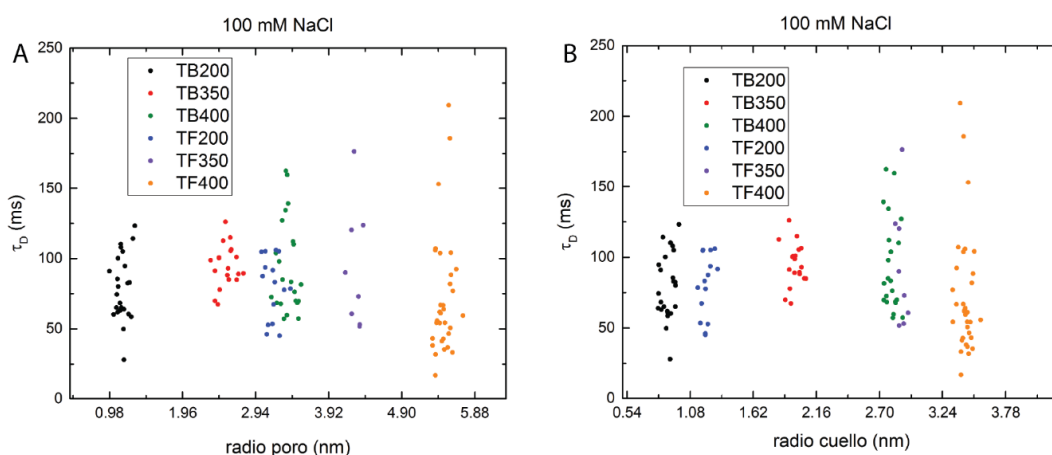


Figura 8.10: tiempo característico de difusión en función del tamaño del poro (A) y el tamaño de cuello (B) para los seis films estudiados en una solución acuosa con baja fuerza iónica. La dispersión de los datos en el eje X es solamente para fines representativos de los datos.

Como en los experimentos anteriores, resulta práctico representar los resultados en función de ambos parámetros para observar tendencias (Figura 8.11).

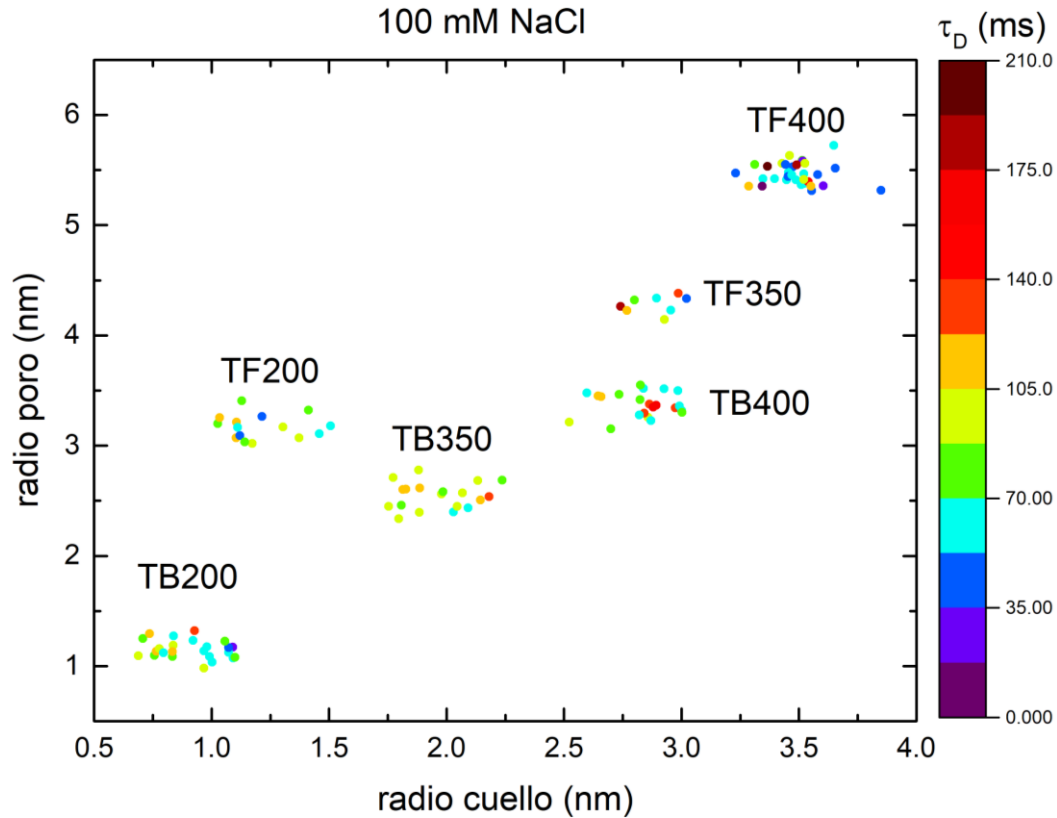


Figura 8.11: tiempo característico de difusión (escala de colores) en función del tamaño de poro y de cuello para la sonda rodamina B en films a baja fuerza iónica. La dispersión de los datos en los ejes X e Y es solamente para facilitar la visualización de los mismos.

El efecto de la interacción entre la sonda y las paredes del material es evidente en la Figura 8.10 y Figura 8.11. Estas figuras muestran que el tiempo característico de difusión no depende de los parámetros geométricos del sistema, además de observar una mayor dispersión en los datos correspondientes a poro y cuello grande. Por otra parte, la difusión de la sonda en estas condiciones no difiere significativamente de la observada en films con cuello menor a 2.7 nm en alta fuerza iónica (Figura 8.8B), sugiriendo que la interacción con las paredes también retrasa el movimiento de la sonda en esas condiciones.

Como fue mencionado en el capítulo 1, muchas veces la interpretación de experimentos de FCS en sistemas complejos puede ser facilitada con simulaciones que permiten corroborar hipótesis o modelos propuestos. Si bien no pudimos utilizar la plataforma MCell-FERNET para simular estos escenarios debido al tamaño del sistema a simular y la

necesidad de incorporar interacciones con el material, desarrollamos rutinas simples apelando a la simetría periódica del sistema que se detallan a continuación.

8.7 Simulaciones de difusión de moléculas en materiales mesoporosos

8.7.1 Construcción de la geometría del sistema

La construcción de la celda unidad que genera la geometría del sistema fue descrita en la sección 5.2.4.

8.7.2 Generación de las trayectorias de las partículas

Una vez construida la geometría del sistema, las trayectorias de las moléculas dentro del mismo fueron generadas con el algoritmo de Monte Carlo utilizando el criterio de Metropolis como criterio de aceptación[103, 106]. Brevemente, el algoritmo consiste en proponer un paso de una dada longitud y aceptarlo si el movimiento de la partícula es energéticamente favorable ($\Delta E < 0$). Si un paso propuesto ocasiona que la energía del sistema aumente, el paso es aceptado con una probabilidad proporcional a la diferencia energética: $p(\Delta E) = \exp(-\Delta E/kT)$, donde k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura del sistema. Para una partícula que difunde de manera isotrópica en un espacio 2D, el desplazamiento cuadrático medio de la misma se relaciona con su coeficiente de difusión de acuerdo a la ecuación 1.3.

En las simulaciones, la longitud del paso fue seleccionada en base al coeficiente de difusión de una sonda fluorescente en H_2O ($420 \mu m^2/s$, [377]) y un tiempo por paso de simulación de 10^{-10} segundos. Considerando estos parámetros y la ecuación 1.3, la distancia media obtenida en un paso de simulación (0.4 nm) es un orden de magnitud menor que la geometría del sistema, garantizando que la partícula no realice trayectorias físicamente imposibles, como atravesar obstáculos, o que la energía de la misma sufra variaciones bruscas.

El siguiente paso consistió en definir el campo de energía del sistema con el cual interactúan las partículas, que además de definir las interacciones entre las partículas y la matriz, cumple la función de realizar la sintonía fina de la geometría del sistema, como

se detallará a continuación. El campo de energía del sistema es generado considerando que las paredes del mismo están compuestas por generadores puntuales de potencial de Lennard-Jones[381], de la forma

$$V(r) = \epsilon \left(\left(\frac{r_m}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r} \right)^6 \right) \quad Ec. (8.2)$$

donde r_m es la distancia donde se encuentra el mínimo de potencial y $-\epsilon$ es el valor del potencial en dicha posición. Este potencial fue elegido debido a su simplicidad para simular interacciones del tipo atracción-repulsión y ya fue utilizado anteriormente para simular difusión e interacciones en sistemas periódicos[106].

El valor de r_m , en conjunto con la geometría previamente definida, determina los parámetros fundamentales del sistema, el poro y el cuello que los conecta. Para valores de distancia menores que r_m la energía aumenta asintóticamente a infinito, generando una región impenetrable para las moléculas. Por lo tanto, un aumento de r_m ocasiona que el mínimo del potencial y dicha región impenetrable se alejen de las paredes y los puntos generadores de potencial.

Cuando se trabaja con sistemas extensos de geometría repetitiva se apela a algoritmos de condiciones de contorno periódicas (*periodic boundary conditions*, PBC) para simplificar los cálculos y ahorrar poder de cómputo. Esta técnica permite definir el sistema en torno a una celda unidad que, mediante translaciones y/o rotaciones, genera un espacio de simulación infinito. La implementación clásica de PBC consiste en restringir la partícula a la celda unidad: cuando la misma abandona la celda unidad por una frontera es destruida y reintroducida en la frontera opuesta. Esta metodología no permite realizar análisis de MSD u obtener propiedades de las trayectorias, ya que las mismas quedan confinadas dentro de la celda durante toda la simulación. Una implementación alternativa que permite realizar los análisis pertinentes consiste en dejar que la molécula difunda libremente fuera de la celda unidad, pero las interacciones son calculadas con coordenadas trasladadas a la celda unidad. Para evitar efectos de borde el mapa de energía de la celda unidad fue calculado tomando en cuenta las celdas

adyacentes, formando una grilla de 3x3. Un ejemplo de la celda unidad con el mapa de energía se presenta en la Figura 8.12.

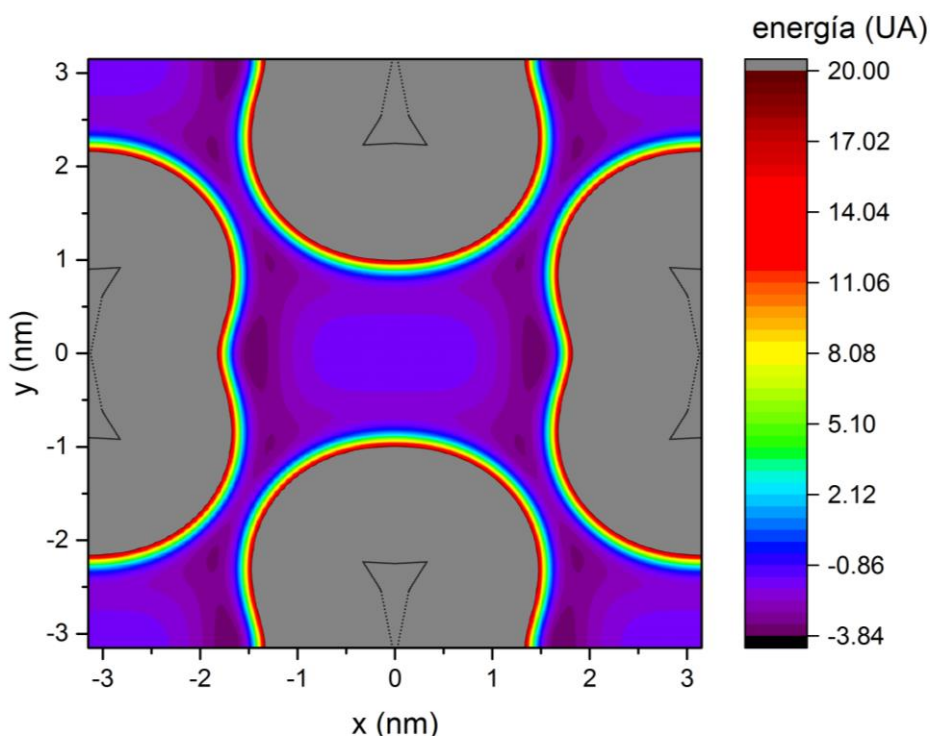


Figura 8.12: mapa de energía (en unidades arbitrarias) dentro de una celda unidad para el caso de $r_m = 1.7$ nm. Los puntos negros corresponden a los puntos generadores de potencial.

Un parámetro importante que influye en la difusión de las moléculas dentro de los materiales mesoporosos es el tamaño del cuello que forma los canales de conexión entre los poros. Por lo tanto, para presentar los resultados de las simulaciones se utilizó como parámetro el cociente entre el diámetro efectivo de cuello y el diámetro geométrico del cuello (p). El diámetro efectivo del cuello fue calculado utilizando el mapa de potencial con un corte en la energía en 20 U.A. Dicho valor se eligió tomando en cuenta los parámetros utilizados para las simulaciones y el criterio de Metropolis: la probabilidad de que una molécula adquiriera o supere ese valor de potencial es, para $kT = 1$, (Tabla 8.1) $p(20) = \exp(-20) \sim 10^{-9}$, un valor altamente improbable de ser aceptado por el criterio.

Los parámetros pertinentes al potencial de Lennard-Jones y al criterio de Metropolis utilizados para las simulaciones se detallan en la Tabla 8.1.

Parámetro	Valor
ϵ	0.02
kT	1
r_m (nm)	1.65; 1.7; 1.75; 1.8; 1.825; 1.85; 1.875

Tabla 8.1: parámetros utilizados para las simulaciones

8.7.3 Análisis de las trayectorias en dos escalas temporales distintas

Para estudiar la difusión de moléculas dentro de estos materiales y el efecto que impone la geometría en las propiedades de difusión estudiamos dos escalas temporales del proceso. La hipótesis planteada es que la difusión de estos materiales está limitada por el tiempo de residencia dentro del poro, esto es, el pasaje entre poros es casi instantáneo. Por lo tanto, una de las primeras propiedades que estudiamos con las simulaciones es cómo el tiempo de residencia dentro del poro se relaciona con la geometría del sistema.

Para el cálculo del tiempo de residencia dentro del poro se simularon trayectorias de 3×10^5 pasos registrados con una resolución temporal de 10^{-10} segundos (igual al paso de simulación). Un ejemplo de dichas trayectorias se presenta en la Figura 8.13, donde en el panel derecho se observa la trayectoria dentro del poro y el transporte entre los mismos.

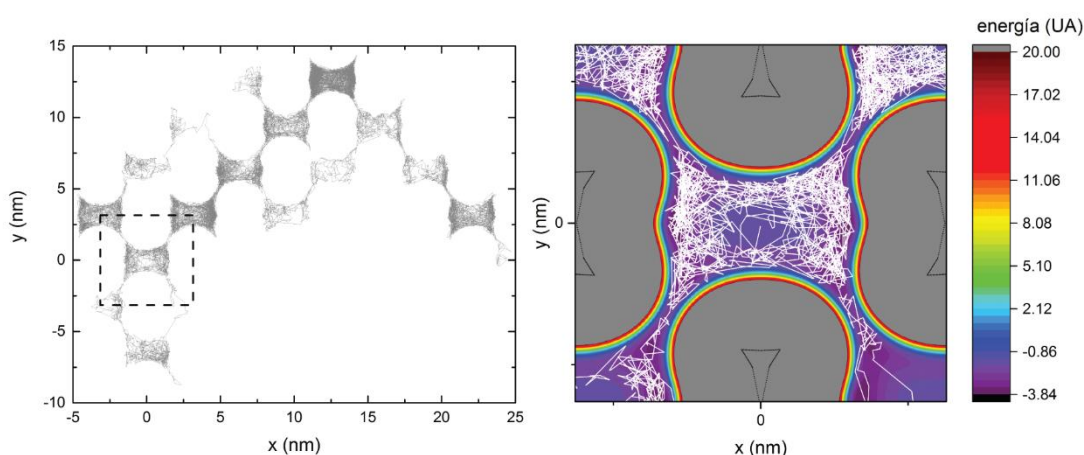


Figura 8.13: trayectoria de la molécula dentro de la grilla periódica simulada (izquierda) y detalle de la trayectoria dentro de una celda unidad con el mapa de energía correspondiente (derecha).

El tiempo de residencia dentro del poro fue calculado contando la cantidad de pasos de simulación que la trayectoria permanecía confinada dentro de un poro antes de pasar a otro poro o a la interfaz entre poros. Para este análisis, se consideraron áreas ovaladas de radios un poco menor a los radios geométricos de los poros (Figura 8.14). La trayectoria fue seguida paso a paso registrando en qué óvalo se encontraba, no considerando aquellos pasos en los que se encontraba en la interfaz (intersección de óvalos en la Figura 8.14). De esta manera se distingue si la partícula entró y salió del poro más de una vez, evitando sobreestimar el tiempo de residencia si solamente se cuenta la cantidad de pasos dentro de cada poro.

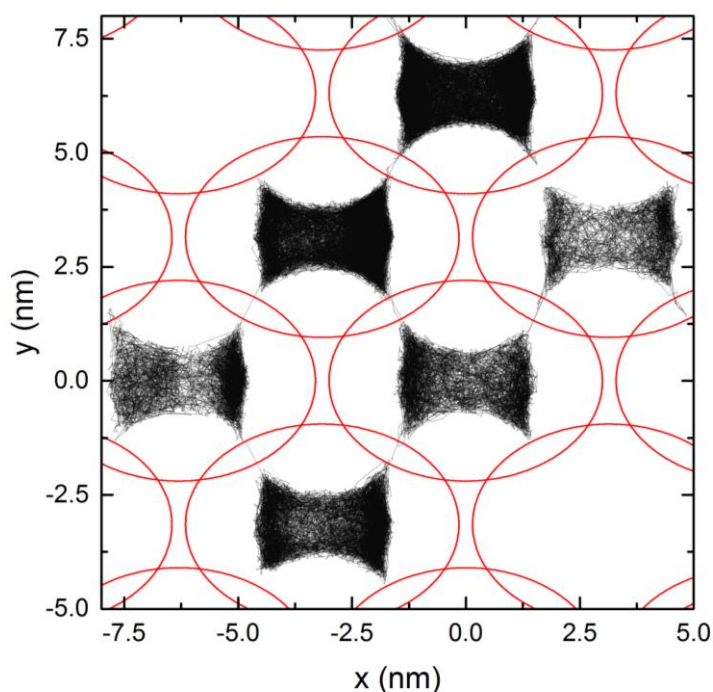


Figura 8.14: detalle de la trayectoria de la partícula (línea negra) y las regiones consideradas como poros (óvalos rojos). Los puntos en la intersección de los óvalos son considerados como tránsito entre poros y son descartados para el análisis.

Se realizaron simulaciones para cada valor de r_m (Tabla 8.1) y se analizaron los resultados de acuerdo a lo descrito anteriormente. El tiempo de residencia fue calculado como el producto de la cantidad de pasos dentro del poro y el tiempo de paso de simulación. En la Figura 8.15 y Tabla 8.2 se presentan los resultados obtenidos para las simulaciones.

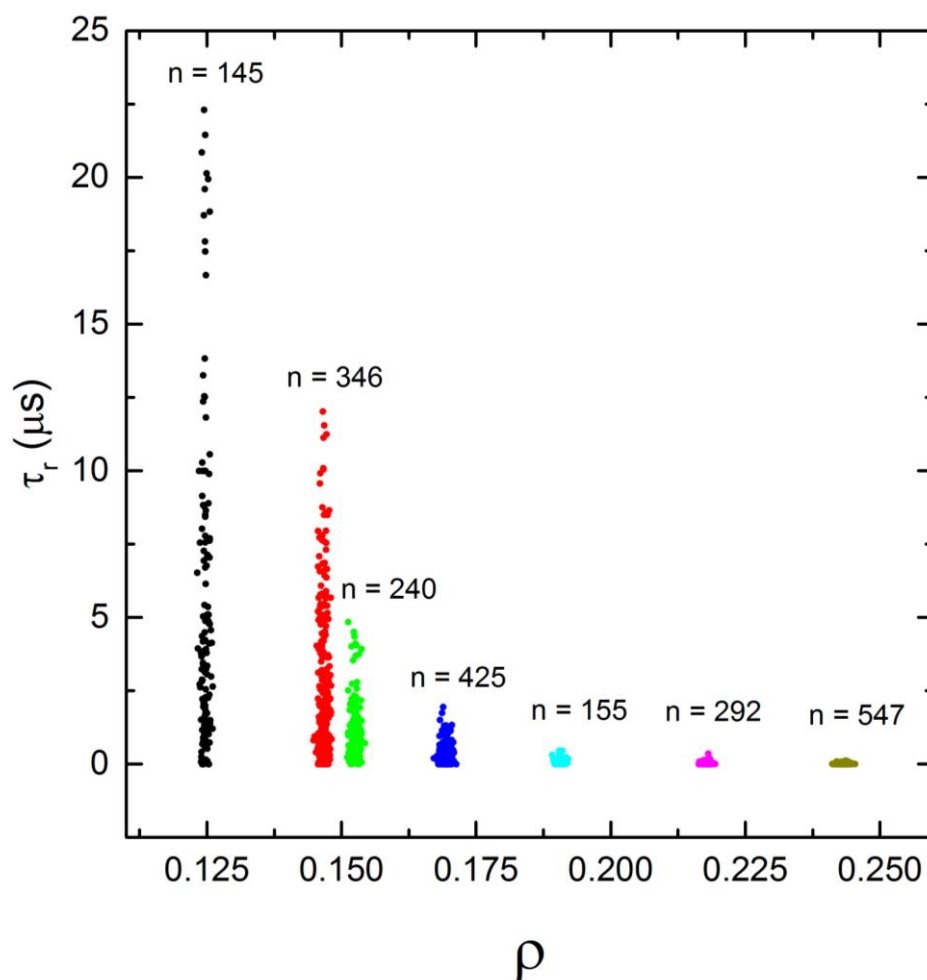


Figura 8.15: tiempo de residencia dentro del poro en función del parámetro geométrico ρ . Se observó un mayor tiempo de residencia medio y una mayor dispersión para valores pequeños de ρ (menor cuello). La dispersión de los datos en el eje X es solamente para fines representativos de los datos.

ρ	τ_r (μs)	N
0.125	5.584 ± 0.464	145
0.147	2.452 ± 0.132	346
0.152	0.918 ± 0.059	240
0.169	0.299 ± 0.015	425
0.191	0.082 ± 0.007	155
0.218	0.038 ± 0.002	292
0.243	0.020 ± 0.001	547

Tabla 8.2: resultados de tiempo de residencia para cada valor de ρ . Los resultados se expresan como (promedio $\pm$ error estándar).

Observamos dos tendencias claras en los resultados obtenidos. Al disminuir el valor de ρ (cuello más estrecho), el valor medio del tiempo de residencia y su dispersión aumenta. El aumento del valor medio es razonable, ya que al estrechar el cuello que conecta los poros el tránsito de moléculas entre los mismos es más dificultoso,

ocasionando que la molécula explore durante más tiempo el poro antes de que pase a otro. El aumento en la dispersión de los valores se puede explicar por la naturaleza poissoniana del proceso observado: la salida del poro es un proceso al azar y, por ende, la dispersión aumenta cuanto mayor es el tiempo dentro del poro.

Una vez explorada la escala de tiempo corta (difusión dentro de los poros), el siguiente paso fue explorar la escala de tiempo larga, para poder calcular el coeficiente de difusión “macroscópico” del sistema (i.e. el coeficiente de difusión que se observaría, por ejemplo, en un experimento de FCS). Sin embargo, simular trayectorias largas (del orden de segundos) con la metodología descrita anteriormente demanda un tiempo de cómputo excesivo.

Para obtener las trayectorias largas fue necesario realizar una modificación en la adquisición de los datos simulados. En particular, buscamos obtener trayectorias largas que exploren una mayor superficie del sistema (i.e. el film simulado) y cuya resolución temporal asemeje a la de los experimentos en FCS (10^{-6} s). Sin embargo, no es posible extrapolar la metodología descrita previamente a este caso en particular. Como fue mencionado en la sección 8.7.2, el tamaño del paso está relacionado con el coeficiente de difusión y el paso de simulación. Si se aumenta el paso de simulación para obtener trayectorias largas aumentaría el tamaño del paso, ocasionando trayectorias ficticias que no se adecúan a las restricciones energéticas del sistema simulado. Por ejemplo, una molécula podría atravesar de un poro a otro por la pared en vez de por el cuello. Este paso, ilógico desde un punto de vista geométrico, podría ser aceptado por el criterio de Monte Carlo.

Por lo tanto, la solución utilizada fue simular el sistema con un paso de simulación de 10^{-10} s para no obtener trayectorias ficticias, pero registrar la posición de la molécula solamente cada 10^{-6} s para no tener una cantidad de pasos excesiva que no aportan información en la escala temporal deseada. Como deseábamos trayectorias de 10^5 puntos registrados cada 10^{-6} s, fue necesario simular 10^9 pasos con resolución de 10^{-10} s, efectivamente registrando la posición de un solo paso cada 10^4 .

Una vez calculadas las trayectorias, el MSD de cada trayectoria fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación

$$MSD(\tau) = \langle (x(t + \tau) - x(t))^2 + (y(t + \tau) - y(t))^2 \rangle \quad Ec. (8.3)$$

donde x e y son las coordenadas de la partícula, τ el tiempo de retardo (*lag time*) y los corchetes representan el promedio temporal. El análisis fue realizado para $\tau < 25\%$ del tiempo total[382]. Para el caso de difusión 2D, el MSD se relaciona con el coeficiente de difusión de acuerdo a la ecuación 1.3. Luego, graficando en MSD en función del *lag time* se puede obtener en coeficiente de difusión a partir de la pendiente del gráfico (Figura 8.16).

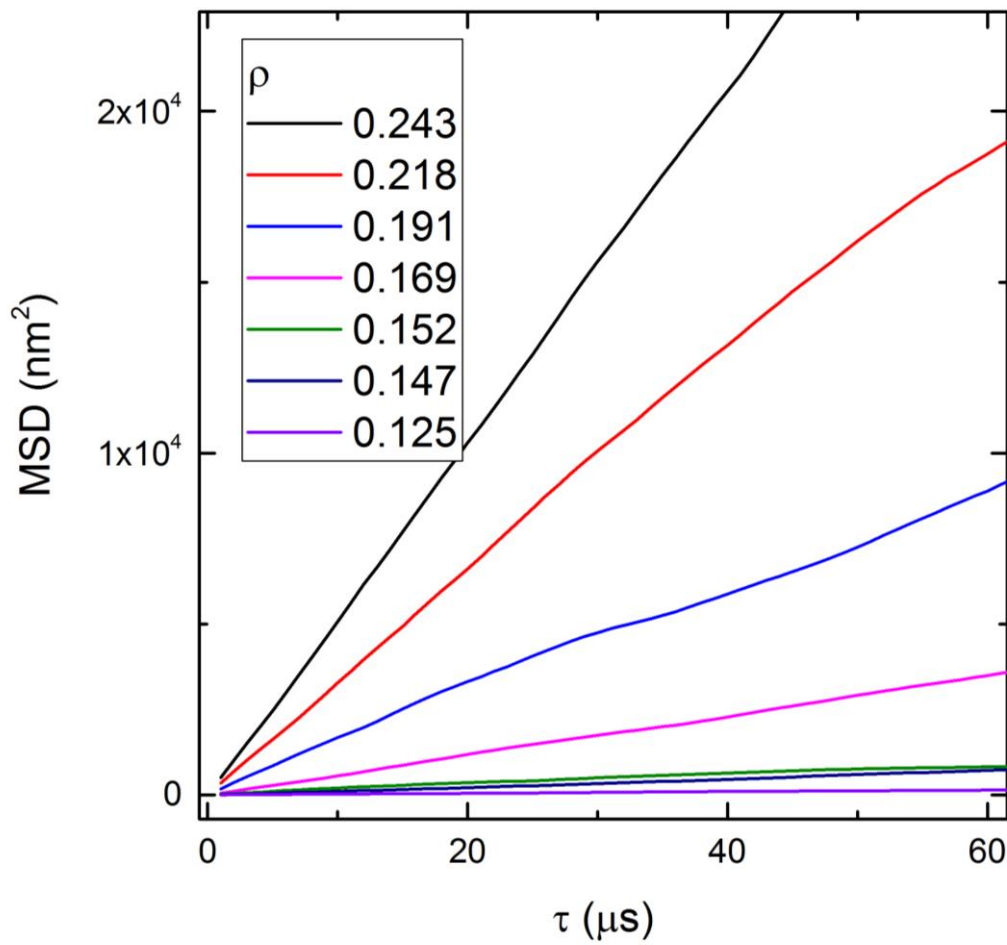


Figura 8.16: curvas representativas de MSD para cada valor de ρ simulado.

Se observa que la pendiente de la curva aumenta a mayor ρ (mayor diámetro de cuello) sugiriendo que la difusión de la molécula se ve menos obstruida y el valor del coeficiente de difusión se acerca al valor límite de la sonda en agua (mayor pendiente en el gráfico). Una vez confirmada esta tendencia, se corrieron varias réplicas de cada simulación, se calculó el MSD para cada una y se extrajo el coeficiente de difusión del gráfico para cada uno de los valores de ρ . En la Figura 8.17 y Tabla 8.3 se presentan los resultados obtenidos.

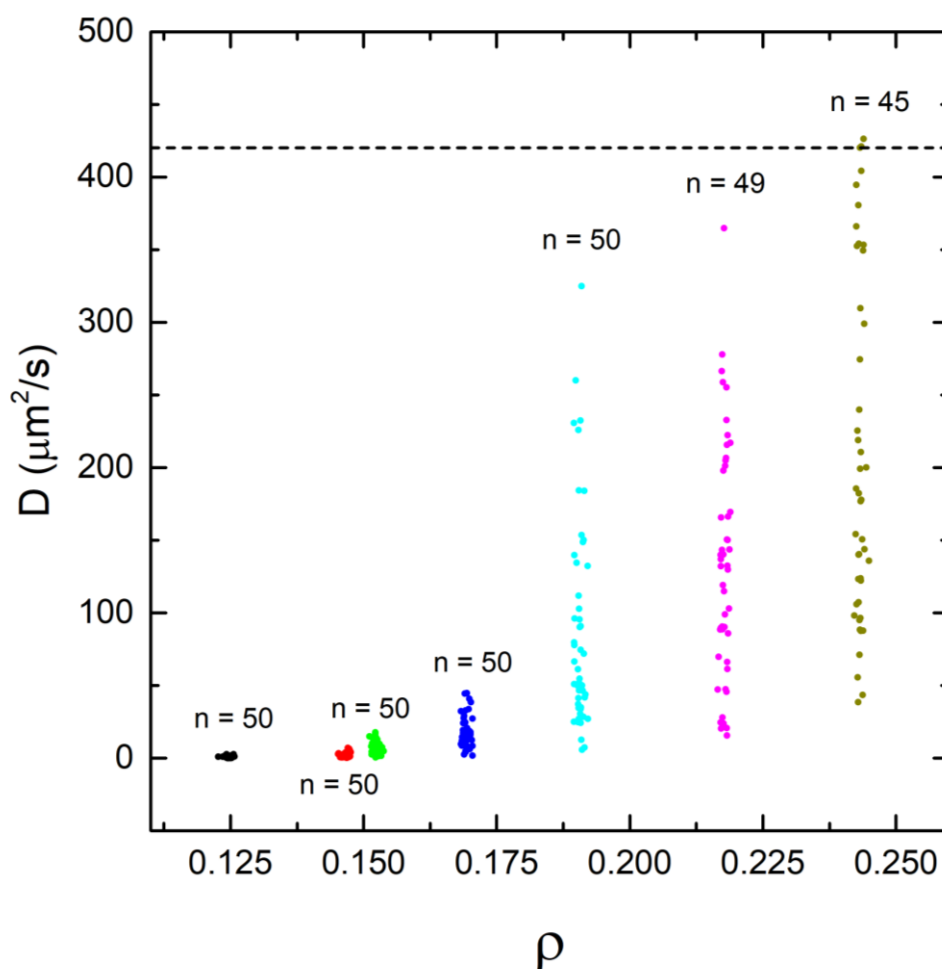


Figura 8.17: coeficiente de difusión de las trayectorias largas en función del parámetro geométrico ρ . Se observó un mayor coeficiente de difusión y una mayor dispersión para valores grandes de ρ (mayor cuello). Se introdujo dispersión de los datos en el eje X es solamente para facilitar su visualización. La línea punteada representa el valor del coeficiente de difusión de la sonda en agua.

ρ	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	N
0.125	1.08 ± 0.09	50
0.147	2.03 ± 0.21	50

0.152	6.38 ± 0.62	50
0.169	17.3 ± 1.51	50
0.191	87.7 ± 10.3	50
0.218	133 ± 11	49
0.243	207 ± 17	45

Tabla 8.3: coeficiente de difusión obtenido a partir de trayectorias largas para cada valor de ρ . Los resultados se expresan como (promedio $\pm$ error estándar).

La Figura 8.17 muestra que tanto el coeficiente de difusión como la dispersión de los datos aumentan con ρ . La tendencia del valor medio es esperable, debido que a mayor ρ la difusión de la molécula se ve menos entorpecida por la geometría del sistema, acercándose al valor límite en agua.

8.7.4 Relación entre el tiempo de residencia y el coeficiente de difusión

Una forma de verificar la hipótesis de que la difusión macroscópica en estos sistemas se relaciona con la permanencia de la sonda dentro del poro es analizar los parámetros “micro” y “macro” del sistema: el tiempo de residencia dentro del poro y el coeficiente de difusión. Si el tiempo de pasaje entre poros es despreciable, la ecuación del desplazamiento cuadrático medio puede ser escrita como

$$d_p^2 = 4D\tau_r \quad Ec. (8.4)$$

donde d_p es la distancia entre poros, D el coeficiente de difusión y τ_r el tiempo de residencia dentro del poro. Reordenando la ecuación se obtiene

$$\tau_r = \frac{d_p^2}{4} \frac{1}{D} \quad Ec. (8.5)$$

Por lo tanto, graficando τ_r en función del coeficiente de difusión para cada valor de ρ simulado (Figura 8.18) se puede obtener el valor de la distancia entre poros.

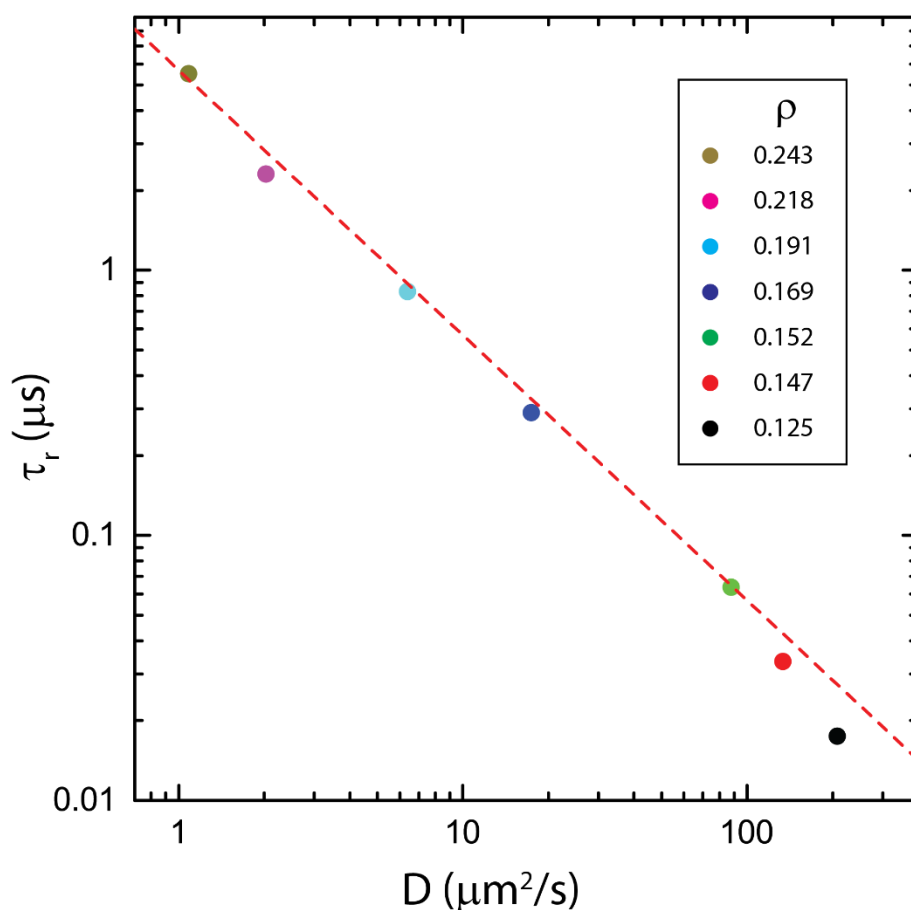


Figura 8.18: gráfico del tiempo de residencia dentro del poro en función del coeficiente de difusión para cada valor de ρ . La línea de puntos roja representa el ajuste con la ecuación 8.5.

Al ajustar los resultados con la ecuación 8.5 se obtiene un valor para la distancia entre poros de (4.34 ± 0.14) nm, el cual no es significativamente diferente al valor geométrico de 4.42 nm, verificando la hipótesis planteada.

8.8 Discusiones

8.8.1 La geometría del sistema y las interacciones sonda-sustrato modulan la difusión

Los resultados experimentales permitieron describir empíricamente cómo la geometría del sistema, en particular el tamaño del poro y el tamaño del cuello, y la interacción con las paredes del material modulan la difusión de una sonda fluorescente dentro de los poros de films mesoporosos hidratados. La primera evidencia es el valor del tiempo característico de difusión obtenido por FCS, 3-4 órdenes menor al de la sonda en solución. Al trabajar con alta fuerza iónica se observó una tendencia esperable: la

difusión se hacía más rápida al aumentar los tamaños de poro y de cuello, debido a que la sonda no se ve entorpecida por el material. Un análisis más detallado de los resultados permitió concluir que el tamaño del cuello es muy importante para la modulación de la difusión, reforzando la hipótesis de que el paso limitante es el tránsito entre poros.

Al disminuir la fuerza iónica se observó que las interacciones entre la sonda y el material cobraban más importancia y comenzaban a modular la difusión. En este contexto, poros con un radio mayor a dos longitudes de Debye pueden ser considerados en el dominio de las teorías continuas electrolíticas (*domain of the continuum theories of electrolytes*)[383]. Para las soluciones acuosas utilizadas, 100 y 500 mM NaCl, las longitudes de Debye son 0.96 nm y 0.21 nm, respectivamente. En una primera aproximación, podemos suponer que estas distancias disminuyen el tamaño efectivo del poro. Este hecho implica que el tamaño efectivo del cuello a baja fuerza iónica para todos los films se encuentra por debajo del umbral de 2.7 nm observado en la Figura 8.9. En consecuencia, los valores de los tiempos característicos de difusión en medios de baja fuerza iónica son similares en todos los films. Trabajos previos demostraron que una fracción significativa del agua se encuentra estructurada en una capa a no más de 2.5 nm de la pared del poro en films de TiO₂, mientras que el agua libre se encuentra más allá de esa distancia[384, 385]. Luego, los efectos observados en films donde los tamaños de cuellos son mayores a este tamaño son atribuibles a la electrostática, mientras que podemos especular que la estructura del agua debido al confinamiento juega un rol en la difusión de la sonda para tamaños de cuellos menores a ese valor. Recordando que las dimensiones de la rodamina B (Figura 8.1) son comparables con el tamaño del poro de TB200 y TF200, suponemos que las interacciones entre la sonda y las paredes del material influyen el proceso de difusión[290].

8.8.2 Las simulaciones arrojan información sobre la dinámica micro y macro del sistema

Las simulaciones computacionales realizadas resultaron de vital ayuda a la hora de interpretar los resultados experimentales obtenidos y postular modelos para explicar las tendencias observadas. El primer paralelismo observado fue al momento de aplicar el potencial de interacción para terminar de definir la geometría. Si bien tanto el tamaño

del poro y el cuello disminuyen al aumentar r_m (parámetro que define el pozo del potencial de Lennard-Jones) el efecto en el cuello es más evidente. Pequeñas variaciones en el mismo pueden estrangular el cuello completamente o ensancharlo hasta que deje de convertirse en un obstáculo para las moléculas.

El análisis del tiempo de residencia dentro del poro nos permitió postular hipótesis en la escala micro del sistema, escala que, debido a las limitaciones en resolución temporal y espacial, nos fue imposible de estudiar de manera experimental. La tendencia observada fue semejante a los resultados experimentales, donde una geometría de mayores dimensiones impone menos restricciones a la sonda y se observa una difusión más libre. El estudio de la escala macro del sistema nos permitió observar la relación entre el coeficiente de difusión obtenido por el análisis del MSD de las trayectorias con la geometría del sistema, nuevamente observando la misma tendencia que los datos experimentales. Si bien los coeficientes de difusión obtenidos fueron mayores a los experimentales, la tendencia se mantuvo. Esta discrepancia era esperable debido al modelo reducido empleado en el cual, por ejemplo, no se consideran interacciones electrostáticas entre la sonda y el material ni asimetrías en el tamaño y carga de la sonda, por lo que optamos por un análisis cualitativo. Al relacionar el entorno macro con el micro observamos que el paso limitante de la difusión es el tiempo de residencia en el poro, por lo que el sistema puede interpretarse como una grilla periódica, donde los saltos entre posiciones son instantáneos y el tiempo de residencia determina cuánto tiempo transcurre entre saltos.

Conclusiones y perspectivas

Capítulo 9: conclusiones y perspectivas futuras

En esta tesis, hemos estudiado diversos aspectos de procesos de difusión anómala en sistemas complejos. Como describimos en la introducción, y particularmente en el capítulo 1, este estudio cobra especial relevancia en el entendimiento de procesos químicos en sistemas complejos y fue de gran relevancia para dilucidar aspectos dinámicos en los dos sistemas experimentales de estudio: embriones vivos y films mesoporosos.

En el capítulo 6 profundizamos en el desarrollo de una herramienta para la simulación e interpretación de experimentos de microscopía confocal, denominada FERNET³. El desarrollo de este programa buscó subsanar la carencia de programas existentes para la simulación de experimentos de microscopía de fluorescencia en escenarios complejos y con modos de adquisición de información no estándares. Debemos destacar que éstas son normalmente las condiciones de la mayoría de los experimentos de microscopía confocal realizados, por ejemplo, en células. En particular, en nuestro laboratorio utilizamos microscopía confocal para estudiar diversos sistemas; poseer una herramienta para simular experimentos y contrastarlos con resultados experimentales es de gran ayuda.

En vez de diseñar un programa que realice tanto la simulación de las trayectorias moleculares como la simulación del proceso de absorción/excitación (como la mayoría de los programas existentes), optamos por un enfoque que resultó satisfactorio: buscar una herramienta ya existente, robusta y validada para la generación de las trayectorias moleculares y acoplarle la parte de generación de fluorescencia. En esta búsqueda encontramos MCell, una plataforma sencilla de usar que en conjunto con Blender, permite diseñar escenarios complejos en tres dimensiones y poblarlo de moléculas que difunden en él e interactúan entre ellas.

La ventaja de haber elegido este formato es que FERNET puede funcionar con otros programas o rutinas caseras para la generación de las trayectorias moleculares. Por

³ Al fin y al cabo, la parte más divertida de desarrollar un programa es elegir el nombre.

ejemplo, en nuestro laboratorio estamos actualmente realizando experimentos de *line FCS* para dilucidar la dinámica de motores moleculares. La comparación de estos datos experimentales con aquellos obtenidos combinando rutinas de MATLAB y FERNET son de vital importancia para la interpretación de estos resultados. Otros colaboradores están utilizando MCell-FERNET para simular experimentos de SMT en receptores de glucocorticoides, debido a la facilidad para construir estos escenarios en MCell.

En el capítulo 7 presentamos los resultados pertinentes al primer sistema en estudio: la dinámica de factores de transcripción en embriones tempranos de ratón. FERNET resultó ser de vital ayuda para interpretar las curvas de autocorrelación experimentales. Estas simulaciones nos permitieron proponer un modelo para explicar las curvas experimentales y obtener información cuantitativa de la interacción entre factores de transcripción y la cromatina. El modelo propuesto considera dos poblaciones de sitios de unión con distintos tiempos característicos de interacción.

Pudimos observar que estos parámetros varían al modular el grado de compactación de la cromatina, facilitando o dificultando el acceso de los factores de transcripción a la misma. Además, observamos cómo estos parámetros varían durante el desarrollo embrionario y pudimos correlacionar estas variaciones con el destino celular. Nuestros resultados sugieren que la interacción entre Sox2 y la cromatina comienza a presentar heterogeneidades en el estadio de cuatro células y que células con mayor fracción de Sox2 comprometido en interacciones con sitios lentos (aquellos de mayor tiempo de residencia) contribuyen mayoritariamente a la formación del macizo celular interno.

Actualmente, continuamos trabajando con nuestros colaboradores en el amplio e “inquieto” mundo del desarrollo embrionario. En particular, nuestros estudios se centran en el rol del citoesqueleto durante el desarrollo embrionario y cómo el mismo influye en el posicionamiento del núcleo celular. Para estos experimentos, FERNET resulta una herramienta valiosa especialmente en sus modos de imágenes y *Z-stack*.

En el capítulo 8 presentamos los resultados pertinentes a la difusión de sondas fluorescentes en el segundo sistema en estudio: materiales mesoporosos. Este sistema

fue elegido debido a su relevancia e implicancias tecnológicas dando importancia al estudio de la difusión de materia dentro del mismo. A diferencia de las técnicas anteriormente utilizadas que promedian un área grande y estudian la difusión en la dirección perpendicular al sustrato, optamos por utilizar microscopía confocal para estudiar la difusión en la dirección del sustrato.

Una vez evidenciada la difusión dentro del material, procedimos a estudiarla en más detalle utilizando FCS pudiendo así determinar el tiempo característico de difusión dentro de cada uno de los seis materiales sintetizados. Cada uno de estos films poseen dos dimensiones que los caracterizan y modulan la difusión: el tamaño del poro y el tamaño del cuello. Al analizar las curvas de correlación, la primera observación fue un retraso evidente de la difusión de hasta 3-4 órdenes, al compararlo con la sonda libre en agua, evidenciando que la geometría del sistema modula el movimiento de la sonda. Un análisis más detallado permitió concluir que el tamaño del cuello es muy importante para este efecto, reforzando la hipótesis planteada de que el paso limitante es el tránsito entre poros. Al cambiar la fuerza iónica del sistema también se observaron cambios en el tiempo característico de difusión, evidenciando que la interacción entre la sonda y el material también juega un rol en la modulación de la difusión.

Si bien no pudimos utilizar FERNET para simular este sistema debido a limitaciones computacionales para simular un sistema tan extenso, desarrollamos herramientas computacionales sencillas para obtener trayectorias moleculares en sistemas periódicos. Estas simulaciones permitieron estudiar dos escalas temporales distintas del sistema: un entorno microscópico donde observamos el tiempo de residencia dentro del poro y su relación con el tamaño del cuello y un entorno macroscópico comparable a los experimentos de FCS realizados, donde observamos el transporte a larga escala y exploramos la relación entre las dimensiones características del sistema y el coeficiente de difusión de la sonda.

El trabajo en este sistema está lejos de estar terminado. Una de las mejoras a realizar es incorporar interacciones electrostáticas en las simulaciones, para ver si los coeficientes de difusión recuperados en las simulaciones se asemejan más a los obtenidos en los

experimentos de FCS. Además, esperamos poder aplicar otras técnicas para estudiar la difusión dentro de los films, como técnicas de seguimiento de partícula única o técnicas de correlación espacio-temporal con imágenes obtenidas con cámaras CCD, como iMSD[386].

Referencias

Referencias

1. Grinstein, G. and J.F. Fernandez, *Equilibration of random-field Ising systems*. Physical Review B, 1984. **29**(11): p. 6389-6392.
2. Courtens, E., et al., *Brillouin-scattering measurements of phonon-fracton crossover in silica aerogels*. Physical Review Letters, 1987. **58**(2): p. 128-131.
3. Stanley, H.E. and P. Meakin, *Multifractal phenomena in physics and chemistry*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 405-409.
4. Lenormand, R. and C. Zarcone, *Capillary fingering: Percolation and fractal dimension*. Transport in Porous Media, 1989. **4**(6): p. 599-612.
5. Baum, M., et al., *Retrieving the intracellular topology from multi-scale protein mobility mapping in living cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4494.
6. Di Rienzo, C., et al., *Probing short-range protein Brownian motion in the cytoplasm of living cells*. Nature Communications, 2014. **5**: p. 1-8.
7. Di Rienzo, C., et al., *Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(30): p. 12307-12.
8. Guigas, G. and M. Weiss, *Sampling the cell with anomalous diffusion - the discovery of slowness*. Biophys J, 2008. **94**(1): p. 90-4.
9. Saxton, M.J., *Anomalous diffusion due to obstacles: a Monte Carlo study*. Biophysical Journal, 1994. **66**(2 Pt 1): p. 394-401.
10. Havlin, S. and D. Ben-Avraham, *Diffusion in disordered media*. Advances in Physics, 1987. **36**(6): p. 695-798.
11. Ellis, R.J., *Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(1): p. 114-9.
12. Cervantes-Pahm, S., et al., *Comparison of Two Different In Vivo Models and an In Vitro Model for Caloric Determination of Four Novel Fiber Ingredients*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(50): p. 12374-12379.
13. García-Contreras, R., et al., *Why in vivo may not equal in vitro – new effectors revealed by measurement of enzymatic activities under the same in vivo-like assay conditions*. FEBS Journal, 2012. **279**(22): p. 4145-4159.
14. Yang, S.W. and H.A. Nash, *Comparison of protein binding to DNA in vivo and in vitro: defining an effective intracellular target*. EMBO J, 1995. **14**(24): p. 6292-300.

15. von Smoluchowski, M., *Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen*. Annalen der Physik, 1906. **326**(14): p. 756-780.
16. Einstein, A., *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*. Annalen der Physik, 1905. **322**(8): p. 549-560.
17. Feynman, R.P., R.B. Leighton, and M.L. Sands, *The Feynman lectures on physics*. 1963, Reading, Mass.: Addison-Wesley Pub. Co.
18. *Science Photo*. Available from: <http://www.sciencephoto.com/>.
19. Einstein, A. and R. Fürth, *Investigations on the theory of Brownian movement*. 1956, New York, N.Y.: Dover Publications.
20. Fick, A., *On liquid diffusion*. Journal of Membrane Science, 1995. **100**(1): p. 33-38.
21. Havlin, S. and D. Ben-Avraham, *Diffusion in disordered media*. Advances in Physics, 2002. **51**(1): p. 187-292.
22. Robert, D., et al., *Magnetic nanomanipulations inside living cells compared with passive tracking of nanoprobe to get consensus for intracellular mechanics*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2012. **85**(1 Pt 1): p. 011905.
23. De Rossi, M.C., et al., *When size does matter: organelle size influences the properties of transport mediated by molecular motors*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2013. **1830**(11): p. 5095-5103.
24. Stauffer, D. and A. Aharony, *Introduction To Percolation Theory*. 1994: Taylor & Francis.
25. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-5.
26. Saxton, M.J., *Anomalous diffusion due to binding: a Monte Carlo study*. Biophysical Journal, 1996. **70**(3): p. 1250-1262.
27. Platani, M., et al., *In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells*. J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1561-74.
28. Platani, M., et al., *Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(7): p. 502-8.
29. Marcovitz, A. and Y. Levy, *Obstacles May Facilitate and Direct DNA Search by Proteins*. Biophysical Journal, 2013. **104**(9): p. 2042-2050.
30. Minsky, M., *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. Scanning, 1988. **10**(4): p. 128-138.

31. Marvin, M., *Microscopy apparatus*. 1961, Marvin, Minsky: United States.
32. Brakenhoff, G.J., et al., *Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy*. *Nature*, 1985. **317**(6039): p. 748-749.
33. Paddock, S.W., *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*. 2013: Springer New York.
34. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006.
35. Axelrod, D., et al., *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*. *Biophysical journal*, 1976. **16**(9): p. 1055-69.
36. Koppel, D.E., et al., *Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility*. *Biophysical Journal*, 1976. **16**(11): p. 1315-1329.
37. Peters, R., et al., *A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1974. **367**(3): p. 282-294.
38. Wachsmuth, M., *Molecular diffusion and binding analyzed with FRAP*. *Protoplasma*, 2014. **251**(2): p. 373-82.
39. Pawley, J.B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2014. 1-5.
40. Miyawaki, A., *Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(10): p. 656-668.
41. Lanni, F. and B.R. Ware, *INTENSITY DEPENDENCE OF FLUOROPHORE PHOTOBLEACHING BY A STEPPED-INTENSITY SLOW-BLEACH EXPERIMENT*. *Photochemistry and Photobiology*, 1981. **34**(2): p. 279-281.
42. Song, L., et al., *Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy*. *Biophys J*, 1996. **70**(6): p. 2959-68.
43. Harms, G.S., et al., *Autofluorescent proteins in single-molecule research: applications to live cell imaging microscopy*. *Biophys J*, 2001. **80**(5): p. 2396-408.
44. Im, K.B., et al., *Diffusion and binding analyzed with combined point FRAP and FCS*. *Cytometry A*, 2013. **83**(9): p. 876-89.
45. Song, L., et al., *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. *Biophys J*, 1995. **68**(6): p. 2588-600.
46. Sprague, B.L., et al., *Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching*. *Biophysical journal*, 2004. **86**(6): p. 3473-95.

47. Phair, R.D., et al., *Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(14): p. 6393-6402.
48. Carrero, G., et al., *Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins*. Methods, 2003. **29**(1): p. 14-28.
49. Beaudouin, J., et al., *Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins*. Biophys J, 2006. **90**(6): p. 1878-94.
50. Braga, J., J.M.P. Desterro, and M. Carmo-Fonseca, *Intracellular Macromolecular Mobility Measured by Fluorescence Recovery after Photobleaching with Confocal Laser Scanning Microscopes*. Molecular Biology of the Cell, 2004. **15**(10): p. 4749-4760.
51. Kang, M., et al., *A generalization of theory for two-dimensional fluorescence recovery after photobleaching applicable to confocal laser scanning microscopes*. Biophys J, 2009. **97**(5): p. 1501-11.
52. McNally, J.G., *Quantitative FRAP in analysis of molecular binding dynamics in vivo*. Methods Cell Biol, 2008. **85**: p. 329-51.
53. Mueller, F., P. Wach, and J.G. McNally, *Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching*. Biophys J, 2008. **94**(8): p. 3323-39.
54. Wachsmuth, M., M. Caudron-Herger, and K. Rippe, *Genome organization: balancing stability and plasticity*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(11): p. 2061-79.
55. Weiss, M., *Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments*. Traffic (Copenhagen, Denmark), 2004. **5**(9): p. 662-71.
56. Haustein, E. and P. Schwille, *Trends in fluorescence imaging and related techniques to unravel biological information*. HFSP J, 2007. **1**(3): p. 169-80.
57. Oleg, K. and B. Grégoire, *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*. Reports on Progress in Physics, 2002. **65**(2): p. 251.
58. Hess, S.T., et al., *Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review*. Biochemistry, 2002. **41**(3): p. 697-705.
59. Elson, E.L., *Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future*. Biophys J, 2011. **101**(12): p. 2855-70.
60. Elson, E.L., *Brief introduction to fluorescence correlation spectroscopy*. Methods Enzymol, 2013. **518**: p. 11-41.

61. Krichevsky, O. and G. Bonnet, *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*. Rep Prog Phys, 2002. **65**: p. 251-297.
62. Schwille, P. and E. Haustein, *Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications*. Biophysics Textbook Online, 2001: p. 1-33.
63. Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. Eur Biophys J, 1993. **22**: p. 169-175.
64. Ries, J. and P. Schwille, *New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes*. Phys Chem Chem Phys, 2008. **10**(24): p. 3487-97.
65. Dertinger, T., et al., *Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements*. Chemphyschem, 2007. **8**(3): p. 433-43.
66. Ruan, Q., et al., *Spatial-temporal studies of membrane dynamics: scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCS)*. Biophys J, 2004. **87**(2): p. 1260-7.
67. Ries, J., S. Chiantia, and P. Schwille, *Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS*. Biophys J, 2009. **96**(5): p. 1999-2008.
68. Inoue, M., et al., *Partitioning of NaPi cotransporter in cholesterol-, sphingomyelin-, and glycosphingolipid-enriched membrane domains modulates NaPi protein diffusion, clustering, and activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49160-71.
69. Schneckenburger, H., *Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications*. Curr Opin Biotechnol, 2005. **16**(1): p. 13-8.
70. Huisken, J., et al., *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*. Science, 2004. **305**(5686): p. 1007-9.
71. Wohland, T., et al., *Single Plane Illumination Fluorescence Correlation Spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments*. Optics Express, 2010. **18**(10): p. 10627-10641.
72. Hassler, K., et al., *Total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy (TIR-FCS) with low background and high count-rate per molecule*. Opt Express, 2005. **13**(19): p. 7415-23.
73. Guo, S.-M., et al., *Bayesian total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy reveals hIAPP-induced plasma membrane domain organization in live cells*. Biophysical journal, 2014. **106**(1): p. 190-200.
74. Chen, H., E.R. Farkas, and W.W. Webb, *Chapter 1: In vivo applications of fluorescence correlation spectroscopy*. Methods Cell Biol, 2008. **89**: p. 3-35.

75. Chen, Y., L.N. Wei, and J.D. Muller, *Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15492-7.
76. Brameshuber, M. and G.J. Schutz, *How the sum of its parts gets greater than the whole*. Nat Meth, 2008. **5**(2): p. 133-134.
77. Perez, C.E. and R.L. Gonzalez, *In vitro and in vivo single-molecule fluorescence imaging of ribosome-catalyzed protein synthesis*. Current opinion in chemical biology, 2011. **15**(6): p. 853-863.
78. Elenko, M.P., J.W. Szostak, and A.M. van Oijen, *Single-molecule imaging of an in vitro-evolved RNA aptamer reveals homogeneous ligand binding kinetics*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(29): p. 9866-7.
79. Bieling, P., et al., *Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1100-5.
80. Izeddin, I., et al., *Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus*. Elife, 2014. **3**.
81. Gebhardt, J.C., et al., *Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells*. Nat Methods, 2013. **10**(5): p. 421-6.
82. Cho, W.K., et al., *RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells*. Elife, 2016. **5**.
83. Katz, Z.B., et al., *Mapping translation 'hot-spots' in live cells by tracking single molecules of mRNA and ribosomes*. Elife, 2016. **5**.
84. Paakinaho, V., et al., *Single-molecule analysis of steroid receptor and cofactor action in living cells*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15896.
85. Wang, Y., et al., *Fluorescence imaging with one-nanometer accuracy (FIONA)*. J Vis Exp, 2014(91): p. 51774.
86. Mortensen, K.I., et al., *Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy*. Nat Methods, 2010. **7**(5): p. 377-81.
87. Tokunaga, M., N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa, *Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells*. Nat Methods, 2008. **5**(2): p. 159-61.
88. Hu, Y.S., et al., *Light-sheet Bayesian microscopy enables deep-cell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells*. Optical Nanoscopy, 2013. **2**(1): p. 7.
89. Elf, J., G.W. Li, and X.S. Xie, *Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1191-4.

90. Manley, S., et al., *High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy*. Nat Methods, 2008. **5**(2): p. 155-7.
91. Mazza, D., et al., *A benchmark for chromatin binding measurements in live cells*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e119.
92. Speil, J., et al., *Activated STAT1 transcription factors conduct distinct saltatory movements in the cell nucleus*. Biophys J, 2011. **101**(11): p. 2592-600.
93. Mueller, F., et al., *Quantifying transcription factor kinetics: at work or at play?* Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2013. **48**(5): p. 492-514.
94. Presman, D.M., et al., *Quantifying transcription factor binding dynamics at the single-molecule level in live cells*. Methods, 2017. **123**(Supplement C): p. 76-88.
95. Liu, Z., et al., *3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells*. eLife, 2014: p. 1-29.
96. Gebhardt, J.C.M., et al., *Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells*. Nat Meth, 2013. **10**(5): p. 421-426.
97. Izeddin, I., et al., *Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus*. eLife, 2014. **3**: p. e02230.
98. Morisaki, T., et al., *Single-molecule analysis of transcription factor binding at transcription sites in live cells*. Nature Communications, 2014. **5**: p. 4456.
99. Grünwald, D., et al., *Probing Intranuclear Environments at the Single-Molecule Level*. Biophysical Journal, 2008. **94**(7): p. 2847-2858.
100. Cornelis, H., A.D. Coop, and J.M. Bower, *A federated design for a neurobiological simulation engine: the CBI federated software architecture*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e28956.
101. Dix, J.A., E.F.Y. Hom, and A.S. Verkman, *Fluorescence correlation spectroscopy simulations of photophysical phenomena and molecular interactions: a molecular dynamics/Monte Carlo approach*. The Journal of Physical ..., 2006. **110**(4): p. 1896-1906.
102. Feng, L., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy of repulsive systems: theory, simulation, and experiment*. The Journal of chemical physics, 2013. **138**(21): p. 214902-214902.
103. Nicholas Metropolis, A.W.R., Marshall N. Rosenbluth, Augusta H. Teller, and Edward Teller, *Equation of State Calculations by Fast Computing Machines*. The Journal of Chemical Physics, 1953. **21**(6): p. 1087-1092.
104. Shimoni, Y., et al., *Multi-scale stochastic simulation of diffusion-coupled agents and its application to cell culture simulation*. PloS one, 2011. **6**(12): p. e29298-e29298.

105. Plante, I. and F. Cucinotta, *Monte-Carlo Simulation of Particle Diffusion in Various Geometries and Application to Chemistry and Biology*. Theory and Applications of Monte Carlo Simulations, 2013: p. 193-225.
106. Luo, L.S., et al., *Brownian motion on a square Lennard-Jones lattice: Trapping, hopping, and diffusion*. Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics, 1995. **51**(1): p. 43-52.
107. Michelman-Ribeiro, A., et al., *Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical journal, 2009. **97**(1): p. 337-46.
108. Gaiselmannb, G., et al., *Extraction of curved fibers from 3D data*. Image Analysis and Stereology, 2013. **32**(1): p. 57-63.
109. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
110. Cook, P.R., *A Model for all Genomes: The Role of Transcription Factories*. Journal of Molecular Biology, 2010. **395**(1): p. 1-10.
111. Cook, P.R., *The organization of replication and transcription*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1790-5.
112. Misteli, T., *Beyond the sequence: cellular organization of genome function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 787-800.
113. Misteli, T., *The concept of self-organization in cellular architecture*. J Cell Biol, 2001. **155**(2): p. 181-5.
114. Lanctot, C., et al., *Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(2): p. 104-15.
115. Hemmerich, P., L. Schmiedeberg, and S. Diekmann, *Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance*. Chromosome Research, 2011. **19**(1): p. 131-151.
116. Sirri, V., et al., *Nucleolus: the fascinating nuclear body*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(1): p. 13-31.
117. Scheer, U. and R. Hock, *Structure and function of the nucleolus*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(3): p. 385-90.
118. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 605-12.
119. Bernardi, R. and P.P. Pandolfi, *Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 1006-16.

120. Borden, K.L., *Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(15): p. 5259-69.
121. Morris, G.E., *The Cajal body*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(11): p. 2108-15.
122. Spector, D.L., *Macromolecular Domains within the Cell Nucleus*. Annual Review of Cell Biology, 1993. **9**(1): p. 265-315.
123. Sleeman, J.E. and L. Trinkle-Mulcahy, *Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance*. Current Opinion in Cell Biology, 2014. **28**(Supplement C): p. 76-83.
124. Bolzer, A., et al., *Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes*. PLOS Biology, 2005. **3**(5): p. e157.
125. Cremer, T. and C. Cremer, *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(4): p. 292-301.
126. Cremer, M., et al., *Multicolor 3D Fluorescence In Situ Hybridization for Imaging Interphase Chromosomes*, in *The Nucleus: Volume 1: Nuclei and Subnuclear Components*, R. Hancock, Editor. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. p. 205-239.
127. Reddy, K.L., et al., *Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 243-7.
128. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a000547.
129. Campbell, N.A., et al., *Biology: Concepts & Connections*. 1994: Benjamin/Cummings Publishing Company.
130. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
131. Berezney, R. and K.W. Jeon, *Nuclear Matrix: Structural and Functional Organization*. 1995: Academic Press.
132. Gunjan, A., et al., *Effects of H1 histone variant overexpression on chromatin structure*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37950-6.
133. Dworkin-Rastl, E., H. Kandolf, and R.C. Smith, *The Maternal Histone H1 Variant, H1M (B4 Protein), Is the Predominant H1 Histone in Xenopus Pregastrula Embryos*. Developmental Biology, 1994. **161**(2): p. 425-439.
134. Brown, D.T., B.T. Alexander, and D.B. Sittman, *Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(3): p. 486-93.

135. Kim, Y.Z., *Altered histone modifications in gliomas*. Brain Tumor Res Treat, 2014. **2**(1): p. 7-21.
136. Jackson, D.A., *The Cell Nucleus: Biogenesis, Structure, and Function*, in *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
137. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. **128**(4): p. 669-81.
138. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-12.
139. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
140. Kuo, M.-H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. BioEssays, 1998. **20**(8): p. 615-626.
141. Golebiowski, F. and K.S. Kasprzak, *Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel(II)*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2005. **279**(1): p. 133-139.
142. Bedford, M.T. and S. Richard, *Arginine methylation an emerging regulator of protein function*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 263-72.
143. Wang, Y. and S. Jia, *Degrees make all the difference: The multifunctionality of histone H4 lysine 20 methylation*. Epigenetics, 2009. **4**(5): p. 273-276.
144. Chen, D., et al., *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. Science, 1999. **284**(5423): p. 2174-7.
145. Lee, Y.H., et al., *Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3611-6.
146. Yang, Y. and M.T. Bedford, *Protein arginine methyltransferases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(1): p. 37-50.
147. Fuhrmann, J., K.W. Clancy, and P.R. Thompson, *Chemical Biology of Protein Arginine Modifications in Epigenetic Regulation*. Chemical Reviews, 2015. **115**(11): p. 5413-5461.
148. Jackson, D.A., et al., *Visualization of focal sites of transcription within human nuclei*. The EMBO Journal, 1993. **12**(3): p. 1059-1065.
149. Eskiw, C.H., et al., *RNA polymerase II activity is located on the surface of protein-rich transcription factories*. Journal of Cell Science, 2008. **121**(12): p. 1999.
150. Rieder, D., Z. Trajanoski, and J.G. McNally, *Transcription factories*. Front Genet, 2012. **3**: p. 221.

151. Sexton, T., et al., *The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(5): p. 691-7.
152. Marenduzzo, D., I. Faro-Trindade, and P.R. Cook, *What are the molecular ties that maintain genomic loops?* Trends in Genetics. **23**(3): p. 126-133.
153. Cook, P.R., *Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 347-52.
154. Vaquerizas, J.M., et al., *A census of human transcription factors: function, expression and evolution*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(4): p. 252-63.
155. Nikolov, D.B. and S.K. Burley, *RNA polymerase II transcription initiation: a structural view*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 15-22.
156. Roeder, R.G., *The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(9): p. 327-35.
157. Amoutzias, G.D., et al., *Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors*. Trends in Biochemical Sciences. **33**(5): p. 220-229.
158. Hochschild, A., N. Irwin, and M. Ptashne, *Repressor structure and the mechanism of positive control*. Cell. **32**(2): p. 319-325.
159. Shvartsman, S.Y. and R.E. Baker, *Mathematical models of morphogen gradients and their effects on gene expression*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 2012. **1**(5): p. 715-730.
160. Ptashne, M. and A. Gann, *Transcriptional activation by recruitment*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 569-77.
161. Mitchell, P.J. and R. Tjian, *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins*. Science, 1989. **245**(4916): p. 371-8.
162. Warnmark, A., et al., *Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(10): p. 1901-9.
163. Matys, V., et al., *TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D108-10.
164. Misteli, T., *The cell biology of genomes: bringing the double helix to life*. Cell, 2013. **152**(6): p. 1209-12.
165. Friedman, J.R. and K.H. Kaestner, *The Foxa family of transcription factors in development and metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(19-20): p. 2317-28.

166. Jedrusik, A., et al., *Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo*. Genes Dev, 2008. **22**(19): p. 2692-706.
167. Goolam, M., et al., *Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos*. Cell, 2016. **165**(1): p. 61-74.
168. Kaur, G., et al., *Probing transcription factor diffusion dynamics in the living mammalian embryo with photoactivatable fluorescence correlation spectroscopy*. Nature communications, 2013. **4**: p. 1637-1637.
169. Look, A.T., *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias*. Science, 1997. **278**(5340): p. 1059-64.
170. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
171. Darnell, J.E., *Transcription factors as targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 740-749.
172. Dunker, A.K. and V.N. Uversky, *Drugs for 'protein clouds': targeting intrinsically disordered transcription factors*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(6): p. 782-8.
173. Perlmann, T., P. Eriksson, and O. Wrange, *Quantitative analysis of the glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17222-9.
174. Hager, G.L., J.G. McNally, and T. Misteli, *Transcription dynamics*. Mol Cell, 2009. **35**(6): p. 741-53.
175. Chen, J., et al., *Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1274-85.
176. Gebhardt, J.C.M., et al., *Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells*. Nature methods, 2013. **10**(5): p. 421-6.
177. Normanno, D., M. Dahan, and X. Darzacq, *Intra-nuclear mobility and target search mechanisms of transcription factors: A single-molecule perspective on gene expression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2012. **1819**(6): p. 482-493.
178. Gorman, J. and E.C. Greene, *Visualizing one-dimensional diffusion of proteins along DNA*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 768-774.
179. Misteli, T., *Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression*. Science, 2001. **291**(5505): p. 843-7.
180. Mauch, T.J. and G.C. Schoenwolf, *Developmental Biology. Sixth Edition. By Scott F. Gilbert*. American Journal of Medical Genetics, 2001. **99**(2): p. 170-171.

181. Rossant, J. and P.P. Tam, *Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse*. Development, 2009. **136**(5): p. 701-13.
182. Zernicka-Goetz, M., S.A. Morris, and A.W. Bruce, *Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(7): p. 467-77.
183. Edwards, R.G., *Ethics and moral philosophy in the initiation of IVF, preimplantation diagnosis and stem cells*. Reprod Biomed Online, 2005. **10 Suppl 1**: p. 1-8.
184. Handyside, A., *Prospects for the clinical application of preimplantation diagnosis: the tortoise or the hare?* Hum Reprod, 1992. **7**(10): p. 1481-3.
185. Handyside, A.H., *Abnormalities of human preimplantation development in vitro*. Reprod Fertil Dev, 1992. **4**(5): p. 481-95.
186. Tarin, J.J., et al., *Human embryo biopsy on the 2nd day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of embryo retards cleavage*. Fertil Steril, 1992. **58**(5): p. 970-6.
187. Slack, J.M.W., *Essential Developmental Biology*. 2005: Wiley.
188. Hochedlinger, K. and R. Jaenisch, *Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(6): p. 741-8.
189. Grubb, B.J., *Developmental Biology, Eighth Edition*. Scott F. Gilbert, editor. Integrative and Comparative Biology, 2006. **46**(5): p. 652-653.
190. Slack, J.M.W., *From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development*. 1991: Cambridge University Press.
191. Plachta, N., et al., *Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 117-23.
192. Dietrich, J.E. and T. Hiiragi, *Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo*. Development, 2007. **134**(23): p. 4219-31.
193. Scholer, H.R., et al., *Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex*. EMBO J, 1990. **9**(7): p. 2185-95.
194. Rosner, M.H., et al., *A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo*. Nature, 1990. **345**(6277): p. 686-92.
195. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
196. Remenyi, A., H.R. Scholer, and M. Wilmanns, *Combinatorial control of gene expression*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(9): p. 812-5.

197. Boyer, L.A., D. Mathur, and R. Jaenisch, *Molecular control of pluripotency*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(5): p. 455-62.
198. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
199. Kim, J.B., et al., *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 649-3.
200. Kim, J.B., et al., *Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells*. Cell, 2009. **136**(3): p. 411-9.
201. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
202. Guo, G., et al., *Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst*. Dev Cell, 2010. **18**(4): p. 675-85.
203. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
204. Mitsui, K., et al., *The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 631-642.
205. Masui, S., et al., *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 625-35.
206. Rodda, D.J., et al., *Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24731-7.
207. Kuroda, T., et al., *Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(6): p. 2475-2485.
208. Sun, Y., et al., *Mechanisms controlling embryonic stem cell self-renewal and differentiation*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2006. **16**(3): p. 211-31.
209. Niwa, H., et al., *Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation*. Cell, 2005. **123**(5): p. 917-929.
210. Yamanaka, Y., et al., *Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst*. Dev Dyn, 2006. **235**(9): p. 2301-14.
211. Strumpf, D., et al., *Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst*. Development, 2005. **132**(9): p. 2093.
212. Deschamps, J., et al., *Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(7): p. 635-50.

213. Beck, F., et al., *Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes*. Dev Dyn, 1995. **204**(3): p. 219-27.
214. van den Akker, E., et al., *Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation*. Development, 2002. **129**(9): p. 2181-2193.
215. Chawengsaksophak, K., et al., *Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(20): p. 7641-7645.
216. Tolkunova, E., et al., *The caudal-related protein cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(1): p. 139-44.
217. Tarkowski, A.K., *Experiments on the Development of Isolated Blastomeres of Mouse Eggs*. Nature, 1959. **184**(4695): p. 1286-1287.
218. Hillman, N., M.I. Sherman, and C. Graham, *The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1972. **28**(2): p. 263-278.
219. Rossant, J., *Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1976. **36**(2): p. 283-290.
220. Tarkowski, A.K. and J. Wróblewska, *Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1967. **18**(1): p. 155-180.
221. Dietrich, J.-E. and T. Hiiragi, *Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo*. Development, 2007. **134**(23): p. 4219-4231.
222. Motosugi, N., et al., *Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned*. Genes & Development, 2005. **19**(9): p. 1081-1092.
223. Louvet-Vallée, S., S. Vinot, and B. Maro, *Mitotic Spindles and Cleavage Planes Are Oriented Randomly in the Two-Cell Mouse Embryo*. Current Biology, 2005. **15**(5): p. 464-469.
224. Kurotaki, Y., et al., *Blastocyst Axis Is Specified Independently of Early Cell Lineage But Aligns with the ZP Shape*. Science, 2007. **316**(5825): p. 719-723.
225. Piotrowska-Nitsche, K., et al., *Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties*. Development, 2005. **132**(3): p. 479-490.
226. Shi, J., et al., *Dynamic transcriptional symmetry-breaking in pre-implantation mammalian embryo development revealed by single-cell RNA-seq*. Development, 2015. **142**(20): p. 3468-3477.

227. Gardner, R.L., *Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development*. Development, 2001. **128**(6): p. 839-847.
228. Torres-Padilla, M.-E., et al., *Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo*. Nature, 2007. **445**(7124): p. 214-218.
229. Buzea, C., I.I. Pacheco, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity*. Biointerphases, 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
230. Ozin, G.A., et al., *Nanochemistry: A Chemical Approach to Nanomaterials*. 2009: Royal Society of Chemistry.
231. Njoki, P.N., et al., *Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(40): p. 14664-14669.
232. Rouquerol, J., et al., *Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report)*, in *Pure and Applied Chemistry*. 1994. p. 1739.
233. Soler-Illia, G.J.A.A. and O. Azzaroni, *Multifunctional hybrids by combining ordered mesoporous materials and macromolecular building blocks*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(2): p. 1107-1150.
234. Soler-Illia, G.J.d.A.A., et al., *Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures*. Chemical Reviews, 2002. **102**(11): p. 4093-4138.
235. Beck, J.S., et al., *A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(27): p. 10834-10843.
236. Chen, C.-Y., H.-X. Li, and M.E. Davis, *Studies on mesoporous materials*. Microporous Materials, 1993. **2**(1): p. 17-26.
237. Monnier, A., et al., *Cooperative Formation of Inorganic-Organic Interfaces in the Synthesis of Silicate Mesostructures*. Science, 1993. **261**(5126): p. 1299.
238. Beck, J.S., et al., *Molecular or Supramolecular Templating: Defining the Role of Surfactant Chemistry in the Formation of Microporous and Mesoporous Molecular Sieves*. Chemistry of Materials, 1994. **6**(10): p. 1816-1821.
239. Huo, Q., et al., *Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 317-321.
240. Antonelli, D.M. and J.Y. Ying, *Synthesis of a Stable Hexagonally Packed Mesoporous Niobium Oxide Molecular Sieve Through a Novel Ligand-Assisted Templating Mechanism*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1996. **35**(4): p. 426-430.

241. Ulagappan, N. and C.N.R. Rao, *Evidence for supramolecular organization of alkane and surfactant molecules in the process of forming mesoporous silica*. Chemical Communications, 1996(24): p. 2759-2760.
242. Ciesla, U., et al., *Formation of a Porous Zirconium Oxo Phosphate with a High Surface Area by a Surfactant-Assisted Synthesis*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1996. **35**(5): p. 541-543.
243. Tanev, P.T. and T.J. Pinnavaia, *A Neutral Templating Route to Mesoporous Molecular Sieves*. Science, 1995. **267**(5199): p. 865.
244. Bagshaw, S.A., E. Prouzet, and T.J. Pinnavaia, *Templating of Mesoporous Molecular Sieves by Nonionic Polyethylene Oxide Surfactants*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1242.
245. Attard, G.S., J.C. Glyde, and C.G. Goltner, *Liquid-crystalline phases as templates for the synthesis of mesoporous silica*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 366-368.
246. Zhao, D., et al., *Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores*. Science, 1998. **279**(5350): p. 548.
247. Bruinsma, P.J., et al., *Mesoporous Silica Synthesized by Solvent Evaporation: Spun Fibers and Spray-Dried Hollow Spheres*. Chemistry of Materials, 1997. **9**(11): p. 2507-2512.
248. Yang, P., et al., *Triblock-Copolymer-Directed Syntheses of Large-Pore Mesoporous Silica Fibers*. Chemistry of Materials, 1998. **10**(8): p. 2033-2036.
249. Yang, P., et al., *Hierarchically Ordered Oxides*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2244.
250. Ogawa, M., *Formation of Novel Oriented Transparent Films of Layered Silica-Surfactant Nanocomposites*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(17): p. 7941-7942.
251. Hillhouse, H.W., et al., *Preparation of Supported Mesoporous Silica Layers in a Continuous Flow Cell*. Chemistry of Materials, 1997. **9**(7): p. 1505-1507.
252. Lu, Y., et al., *Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol-gel dip-coating*. Nature, 1997. **389**(6649): p. 364-368.
253. Zhao, D., et al., *Synthesis of continuous mesoporous silica thin films with three-dimensional accessible pore structures*. Chemical Communications, 1998(22): p. 2499-2500.
254. Brinker, C.J., et al., *Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy*. Advanced Materials, 1999. **11**(7): p. 579-585.
255. Wan, Y. and D. Zhao, *On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates*. Chemical Reviews, 2007. **107**(7): p. 2821-2860.

256. Muller, P., *Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994)*, in *Pure and Applied Chemistry*. 1994. p. 1077.
257. Chandrasekhar, S., *Liquid Crystals*. 2 ed. 1992, Cambridge: Cambridge University Press.
258. Israelachvili, J.N., *Intermolecular and surface forces*. 1992, London: Academic Press.
259. Wright, J.D. and N.A.J.M. Sommerdijk, *Sol-Gel Materials: Chemistry and Applications*. 2000: Taylor & Francis.
260. Brinker, C.J., *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*, ed. G.W. Scherer and C.J. Brinker. 1990, Boston: Academic Press.
261. Soler-Illia, G.J.A.A. and P. Innocenzi, *Mesoporous Hybrid Thin Films: The Physics and Chemistry Beneath*. *Chemistry – A European Journal*, 2006. **12**(17): p. 4478-4494.
262. Soler-Illia, G.J.d.A.A. and C. Sanchez, *Interactions between poly(ethylene oxide)-based surfactants and transition metal alkoxides: their role in the templated construction of mesostructured hybrid organic-inorganic composites*. *New Journal of Chemistry*, 2000. **24**(7): p. 493-499.
263. Boissiere, C., et al., *Porosity and mechanical properties of mesoporous thin films assessed by environmental ellipsometric porosimetry*. *Langmuir*, 2005. **21**(26): p. 12362-71.
264. Muniz, E.C., et al., *Synthesis and characterization of mesoporous TiO₂ nanostructured films prepared by a modified sol–gel method for application in dye solar cells*. *Ceramics International*, 2011. **37**(3): p. 1017-1024.
265. Liu, K., et al., *Large-pore mesoporous nanocrystalline titania thin films synthesized through evaporation-induced self-assembly*. *Materials Letters*, 2005. **59**(26): p. 3308-3310.
266. Choi, S.Y., et al., *Thermally Stable Two-Dimensional Hexagonal Mesoporous Nanocrystalline Anatase, Meso-nc-TiO₂: Bulk and Crack-Free Thin Film Morphologies*. *Advanced Functional Materials*, 2004. **14**(4): p. 335-344.
267. Huang, M.H., B.S. Dunn, and J.I. Zink, *In Situ Luminescence Probing of the Chemical and Structural Changes during Formation of Dip-Coated Lamellar Phase Sodium Dodecyl Sulfate Sol–Gel Thin Films*. *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(15): p. 3739-3745.
268. Grosso, D., et al., *Two-Dimensional Hexagonal Mesoporous Silica Thin Films Prepared from Block Copolymers: Detailed Characterization and Formation Mechanism*. *Chemistry of Materials*, 2001. **13**(5): p. 1848-1856.

269. Cagnol, F., et al., *Humidity-controlled mesostructuration in CTAB-templated silica thin film processing. The existence of a modulable steady state*. Journal of Materials Chemistry, 2003. **13**(1): p. 61-66.
270. Doshi, D.A., et al., *Peering into the Self-Assembly of Surfactant Templated Thin-Film Silica Mesophases*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(38): p. 11646-11655.
271. Sanchez, C., et al., *Design, Synthesis, and Properties of Inorganic and Hybrid Thin Films Having Periodically Organized Nanoporosity*. Chemistry of Materials, 2008. **20**(3): p. 682-737.
272. Antonietti, M. and G.A. Ozin, *Promises and Problems of Mesoscale Materials Chemistry or Why Meso?* Chemistry – A European Journal, 2004. **10**(1): p. 28-41.
273. Innocenzi, P., et al., *Electrical responses of silica mesostructured films to changes in environmental humidity and processing conditions*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2005. **351**(24–26): p. 1980-1986.
274. Wagner, T., et al., *Mesoporous materials as gas sensors*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(9): p. 4036-4053.
275. Ying, J.Y., C.P. Mehnert, and M.S. Wong, *Synthesis and Applications of Supramolecular-Templated Mesoporous Materials*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. **38**(1-2): p. 56-77.
276. Ritchie, J.E., *Electronic and Electrochemical Applications of Hybrid Materials, in Hybrid Materials*. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 401-432.
277. Stein, A., B.J. Melde, and R.C. Schrodén, *Hybrid Inorganic–Organic Mesoporous Silicates—Nanoscopic Reactors Coming of Age*. Advanced Materials, 2000. **12**(19): p. 1403-1419.
278. Sayari, A. and S. Hamoudi, *Periodic Mesoporous Silica-Based Organic–Inorganic Nanocomposite Materials*. Chemistry of Materials, 2001. **13**(10): p. 3151-3168.
279. Fuertes, M.C., et al., *Photonic Crystals from Ordered Mesoporous Thin-Film Functional Building Blocks*. Advanced Functional Materials, 2007. **17**(8): p. 1247-1254.
280. Choi, S.Y., et al., *Mesoporous Bragg Stack Color Tunable Sensors*. Nano Letters, 2006. **6**(11): p. 2456-2461.
281. Liu, N., et al., *Photoresponsive Nanocomposite Formed by Self-Assembly of an Azobenzene-Modified Silane*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(15): p. 1731-1734.
282. Kärger, J., *Transport phenomena in nanoporous materials*. ChemPhysChem, 2015. **16**(1): p. 24-51.

283. Teixeira, A.R., et al., *Dominance of surface barriers in molecular transport through silicalite-1*. Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(48): p. 25545-25555.
284. Etienne, M., et al., *Molecular transport into mesostructured silica thin films: Electrochemical monitoring and comparison between p6m, P63//WWIC, and Pm3n structures*. Chemistry of Materials, 2007. **19**(4): p. 844-856.
285. Wei, T.-C. and H.W. Hillhouse, *Mass Transport and Electrode Accessibility Through Periodic Self-Assembled Nanoporous Silica Thin Films*. Langmuir, 2007. **23**(10): p. 5689-5699.
286. Mahurin, S.M., S. Dai, and M.D. Barnes, *Probing the Diffusion of a Dilute Dye Solution in Mesoporous Glass with Fluorescence Correlation Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(48): p. 13336-13340.
287. Fu, Y., et al., *Single Molecule Spectroscopy Studies of Diffusion in Mesoporous Silica Thin Films*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(18): p. 9164-9170.
288. Higgins, D.A., et al., *Single-Molecule Investigations of Morphology and Mass Transport Dynamics in Nanostructured Materials*. Annual Review of Analytical Chemistry, 2015. **8**(1): p. 193-216.
289. Mei, E., et al., *Single-Molecule Studies of Sol-Gel-Derived Silicate Films. Microenvironments and Film-Drying Conditions*. The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(43): p. 9973-9980.
290. Park, S.C., T. Ito, and D.A. Higgins, *Dimensionality of Diffusion in Flow-Aligned Surfactant-Templated Mesoporous Silica: A Single Molecule Tracking Study of Pore Wall Permeability*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(46): p. 26101-26110.
291. Ye, F., D.A. Higgins, and M.M. Collinson, *Probing Chemical Interactions at the Single-Molecule Level in Mesoporous Silica Thin Films*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(18): p. 6772-6780.
292. Rühle, B., et al., *Review. Fluorescence Microscopy Studies of Porous Silica Materials*, in *Zeitschrift für Naturforschung B*. 2013. p. 423.
293. Feil, F., et al., *Direct Visualization of Dye and Oligonucleotide Diffusion in Silica Filaments with Collinear Mesopores*. Nano Letters, 2012. **12**(3): p. 1354-1361.
294. Zurner, A., et al., *Visualizing single-molecule diffusion in mesoporous materials*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 705-708.
295. Wirth, M.J. and D.J. Swinton, *Single-Molecule Probing of Mixed-Mode Adsorption at a Chromatographic Interface*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(24): p. 5264-5271.

296. Wirth, M.J., M.D. Ludes, and D.J. Swinton, *Analytic Solution to the Autocorrelation Function for Lateral Diffusion and Rare Strong Adsorption*. Applied Spectroscopy, 2001. **55**(6): p. 663-669.
297. Wirth, M.J., D.J. Swinton, and M.D. Ludes, *Adsorption and Diffusion of Single Molecules at Chromatographic Interfaces*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(26): p. 6258-6268.
298. McCain, K.S., D.C. Hanley, and J.M. Harris, *Single-Molecule Fluorescence Trajectories for Investigating Molecular Transport in Thin Silica Sol–Gel Films*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p. 4351-4359.
299. Ito, S., et al., *Microscopic Structure and Mobility of Guest Molecules in Mesoporous Hybrid Organosilica: Evaluation with Single-Molecule Tracking*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(27): p. 11884-11891.
300. Viteri, C.R., J.W. Gilliland, and W.T. Yip, *Probing the Dynamic Guest–Host Interactions in Sol–Gel Films Using Single Molecule Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(7): p. 1980-1987.
301. Zhou, Y. and W.T. Yip, *Balance between Coulombic Interactions and Physical Confinement in Silica Hydrogel Encapsulation*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(17): p. 5720-5727.
302. Zhong, Z., et al., *Probing Strong Adsorption of Solute onto C18-Silica Gel by Fluorescence Correlation Imaging and Single-Molecule Spectroscopy under RPLC Conditions*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(8): p. 2303-2310.
303. Kirkeminde, A.W., et al., *Multiple Diffusion Pathways in Pluronic F127 Mesophases Revealed by Single Molecule Tracking and Fluorescence Correlation Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 2011. **115**(44): p. 12736-12743.
304. Liao, Y., et al., *Heterogeneous Single-Molecule Diffusion in One-, Two-, and Three-Dimensional Microporous Coordination Polymers: Directional, Trapped, and Immobile Guests*. Nano Letters, 2012. **12**(6): p. 3080-3085.
305. Tran-Ba, K.-H., et al., *Single-Molecule Tracking Studies of Millimeter-Scale Cylindrical Domain Alignment in Polystyrene–Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymer Films Induced by Solvent Vapor Penetration*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2012. **3**(15): p. 1968-1973.
306. Yorulmaz, M., A. Kiraz, and A.L. Demirel, *Motion of Single Terrylene Molecules in Confined Channels of Poly(butadiene)–Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymer*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(29): p. 9640-9643.
307. Cooper, J.T., E.M. Peterson, and J.M. Harris, *Fluorescence Imaging of Single-Molecule Retention Trajectories in Reversed-Phase Chromatographic Particles*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(19): p. 9363-9370.

308. Jung, C., et al., *Diffusion of Oriented Single Molecules with Switchable Mobility in Networks of Long Unidimensional Nanochannels*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(5): p. 1638-1648.
309. Park, S.C., T. Ito, and D.A. Higgins, *Single Molecule Tracking Studies of Flow-Aligned Mesoporous Silica Monoliths: Aging-Time Dependence of Pore Order*. The Journal of Physical Chemistry B, 2013. **117**(16): p. 4222-4230.
310. Kirstein, J., et al., *Exploration of nanostructured channel systems with single-molecule probes*. Nat Mater, 2007. **6**(4): p. 303-310.
311. Ba, K.H.T., et al., *Trajectory angle determination in one dimensional single molecule tracking data by orthogonal regression analysis*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(5): p. 1827-1835.
312. Nelson, J.J., T.J. Amick, and C.M. Elliott, *Mass Transport of Polypyridyl Cobalt Complexes in Dye-Sensitized Solar Cells with Mesoporous TiO₂ Photoanodes*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(46): p. 18255-18263.
313. Song, D., et al., *Toward Higher Energy Conversion Efficiency for Solid Polymer Electrolyte Dye-Sensitized Solar Cells: Ionic Conductivity and TiO₂ Pore-Filling*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2014. **5**(7): p. 1249-1258.
314. Yella, A., et al., *Dye-sensitized solar cells using cobalt electrolytes: the influence of porosity and pore size to achieve high-efficiency*. Journal of Materials Chemistry C, 2017. **5**(11): p. 2833-2843.
315. Sommer, C., et al. *Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit*. in *2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. 2011.
316. Beechem, J.M., *Global analysis of biochemical and biophysical data*. Methods in enzymology, 1992. **210**.
317. Gillespie, D.T., *A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions*. Journal of Computational Physics, 1976. **22**(4): p. 403-434.
318. Stiles, J.R. and T.M. Bartol, *Monte Carlo methods for simulating realistic synaptic microphysiology using MCell*, in *Computational Neuroscience: Realistic modeling for experimentalists*, E. De Schutter, Editor. 2001, CRC Press: Boca Raton. p. 87-127.
319. Stiles, J.R., et al., *Miniature endplate current rise times less than 100 microseconds from improved dual recordings can be modeled with passive acetylcholine diffusion from a synaptic vesicle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5747-52.

320. Stiles, J. and T. Bartol, *Monte Carlo Methods for Simulating Realistic Synaptic Microphysiology Using MCell*, in *Computational Neuroscience*. 2000, CRC Press.
321. Bartol, T.M., M. Dittrich, and J.R. Faeder, *MCell*, in *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, D. Jaeger and R. Jung, Editors. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 1-5.
322. Krieger, J.W., et al., *Imaging fluorescence (cross-) correlation spectroscopy in live cells and organisms*. *Nature Protocols*, 2015. **10**(12): p. 1948-1974.
323. Kettling, U., et al., *Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1416-20.
324. Kolin, D.L., S. Costantino, and P.W. Wiseman, *Sampling effects, noise, and photobleaching in temporal image correlation spectroscopy*. *Biophys J*, 2006. **90**(2): p. 628-39.
325. Cattin, P.D.P. *Image Restoration: Introduction to Signal and Image Processing*. 2016; Available from: <https://miac.unibas.ch/SIP/06-Restoration.html>.
326. Mazza, D., et al., *Monitoring dynamic binding of chromatin proteins in vivo by fluorescence correlation spectroscopy and temporal image correlation spectroscopy*. *Methods Mol Biol*, 2012. **833**: p. 177-200.
327. Weidemann, T., et al., *Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*. *Single Molecules*, 2002. **3**(1): p. 49-61.
328. Li, L., Z. Li, and D.B. Sacks, *The transcriptional activity of estrogen receptor-alpha is dependent on Ca²⁺/calmodulin*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(13): p. 13097-104.
329. Cifuentes, E., et al., *Physical and functional interaction of androgen receptor with calmodulin in prostate cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(2): p. 464-9.
330. Ratman, D., et al., *How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **380**(1-2): p. 41-54.
331. Maddox, P.S., et al., *Spinning disk confocal microscope system for rapid high-resolution, multimode, fluorescence speckle microscopy and green fluorescent protein imaging in living cells*. *Methods Enzymol*, 2003. **360**: p. 597-617.
332. Nakano, A., *Spinning-disk confocal microscopy -- a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic*. *Cell Struct Funct*, 2002. **27**(5): p. 349-55.
333. Dertinger, T., et al., *The optics and performance of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy*. *Opt Express*, 2008. **16**(19): p. 14353-68.

334. Ries, J., S. Chiantia, and P. Schwille, *Accurate Determination of Membrane Dynamics with Line-Scan FCS*. Biophysical Journal, 2009. **96**(5): p. 1999-2008.
335. Digman, M.a. and E. Gratton, *Lessons in fluctuation correlation spectroscopy*. Annual review of physical chemistry, 2011. **62**: p. 645-68.
336. Levi, V., et al., *Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope*. Biophys J, 2005. **89**(6): p. 4275-85.
337. Levi, V., Q. Ruan, and E. Gratton, *3-D particle tracking in a two-photon microscope: application to the study of molecular dynamics in cells*. Biophys J, 2005. **88**(4): p. 2919-28.
338. Digman, M.A. and E. Gratton, *Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions*. Biophysical Journal, 2009. **97**(2): p. 665-673.
339. Trinczek, B., et al., *Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles*. Journal of cell science, 1999. **112** (Pt 1): p. 2355-67.
340. Nobutaka Hirokawa, Y.S.S.O., *Tau Proteins : The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules*. Journal of Cell Biology, 1988. **107**(October): p. 1449-1459.
341. Konzack, S., et al., *Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(37): p. 9916-27.
342. Hinrichs, M.H., et al., *Tau protein diffuses along the microtubule lattice*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(46): p. 38559-68.
343. Shannon, C.E., *Communication in the Presence of Noise*. Proceedings of the IRE, 1949. **37**(1): p. 10-21.
344. Sankaran, J., et al., *ImFCS: a software for imaging FCS data analysis and visualization*. Opt Express, 2010. **18**(25): p. 25468-81.
345. Yoshida, M., S. Horinouchi, and T. Beppu, *Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function*. Bioessays, 1995. **17**(5): p. 423-30.
346. Sobell, H.M., *Actinomycin and DNA transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(16): p. 5328-31.
347. Paramanathan, T., et al., *Force spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(11): p. 4925-32.

348. Vigano, M.A. and L.M. Staudt, *Transcriptional activation by Oct-3: evidence for a specific role of the POU-specific domain in mediating functional interaction with Oct-1*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(11): p. 2112-8.
349. Yeap, L.S., K. Hayashi, and M.A. Surani, *ERG-associated protein with SET domain (ESET)-Oct4 interaction regulates pluripotency and represses the trophectoderm lineage*. Epigenetics Chromatin, 2009. **2**(1): p. 12.
350. Yuan, P., et al., *Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells*. Genes Dev, 2009. **23**(21): p. 2507-20.
351. Wei, F., H.R. Scholer, and M.L. Atchison, *Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21551-60.
352. Zhang, F.P., et al., *Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(17): p. 5381-90.
353. Bischoff, M., D.-E. Parfitt, and M. Zernicka-Goetz, *Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions*. Development, 2008. **135**(5): p. 953-962.
354. Tabansky, I., et al., *Developmental Bias in Cleavage-Stage Mouse Blastomeres*. Current Biology. **23**(1): p. 21-31.
355. White, Melanie D., et al., *Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo*. Cell, 2016. **165**(1): p. 75-87.
356. Samarage, C.R., et al., *Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo*. Dev Cell, 2015. **34**: p. 435–447.
357. Morris, S.A., et al., *Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6364-9.
358. Chen, J., et al., *Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1274-85.
359. Normanno, D., et al., *Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7357.
360. Morisaki, T., et al., *Single-molecule analysis of transcription factor binding at transcription sites in live cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4456.
361. Liu, Z., et al., *3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells*. Elife, 2014. **3**: p. e04236.
362. Haustein, E. and P. Schwille, *Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy*. Methods, 2003. **29**(2): p. 153-66.

363. Hammar, P., et al., *The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells*. Science, 2012. **336**(6088): p. 1595-8.
364. Doucleff, M. and G.M. Clore, *Global jumping and domain-specific intersegment transfer between DNA cognate sites of the multidomain transcription factor Oct-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 13871-6.
365. Gorman, J., et al., *Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(8): p. 932-8.
366. Mueller, F., et al., *Quantifying transcription factor kinetics: at work or at play?* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(5): p. 492-514.
367. Torres-Padilla, M.E., et al., *Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo*. Nature, 2007. **445**(7124): p. 214-8.
368. Plachta, N., et al., *Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo*. Nature cell biology, 2011. **13**(2): p. 117-23.
369. Canning, J., et al., *Percolation Diffusion into Self-Assembled Mesoporous Silica Microfibrils*. Nanomaterials, 2014. **4**(1): p. 157.
370. Kubin, R.F. and A.N. Fletcher, *Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes*. Journal of Luminescence, 1982. **27**(4): p. 455-462.
371. Sjöback, R., J. Nygren, and M. Kubista, *Absorption and fluorescence properties of fluorescein*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(6): p. L7-L21.
372. Borghi, F., et al., *Nanoscale roughness and morphology affect the IsoElectric Point of titania surfaces*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68655.
373. Stephenson, C.J. and K.D. Shimizu, *A fluorescent diastereoselective molecular sensor for 1,2-aminoalcohols based on the rhodamine B lactone-zwitterion equilibrium*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010. **8**(5): p. 1027-1032.
374. Greenspan, L., *Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions*. JOURNAL OF RESEARCH of the National Bureau of Standards- A. Physics and Chemistry 1977. **81 A**(1).
375. Soler-Illia, G.J.A.A., et al., *Critical aspects in the production of periodically ordered mesoporous titania thin films*. Nanoscale, 2012. **4**(8): p. 2549-2566.
376. Benda, A., et al., *How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy*. Langmuir, 2003. **19**(10): p. 4120-4126.
377. Gendron, P.O., F. Avaltroni, and K.J. Wilkinson, *Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient-Nuclear*

- Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Journal of Fluorescence, 2008. **18**(6): p. 1093.
378. Ye, F., D.A. Higgins, and M.M. Collinson, *Probing chemical interactions at the single-molecule level in mesoporous silica thin films*. Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(18): p. 6772-6780.
 379. Tagliazucchi, M. and I. Szleifer, *How Does Confinement Change Ligand–Receptor Binding Equilibrium? Protein Binding in Nanopores and Nanochannels*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(39): p. 12539-12551.
 380. Taffa, D.H., et al., *Pore size and surface charge control in mesoporous TiO₂ using post-grafted SAMs*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(7): p. 1473-1482.
 381. Jones, J.E., *On the Determination of Molecular Fields. II. From the Equation of State of a Gas*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, 1924. **106**(738): p. 463.
 382. Saxton, M.J. and K. Jacobson, *Single-particle tracking: applications to membrane dynamics*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997. **26**: p. 373-99.
 383. Corry, B., S. Kuyucak, and S.H. Chung, *Invalidity of continuum theories of electrolytes in nanopores*. Chemical Physics Letters, 2000. **320**(1-2): p. 35-41.
 384. Solveyra, E.G., et al., *Structure, dynamics, and phase behavior of water in TiO₂ nanopores*. Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(7): p. 3330-3342.
 385. Velasco, M.I., et al., *Water confined in mesoporous TiO₂ aerosols: insights from NMR experiments and molecular dynamics simulations*. Journal of Physical Chemistry C, 2017. **121**(13): p. 7533-7541.
 386. Di Rienzo, C., et al., *Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(30): p. 12307-12.