Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Análisis y modelado de experimentos de fluorescencia. Aplicación a señales de calcio

Pérez Ipiña, Emiliano

2015-10-22

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:
Pérez Ipiña, Emiliano. (2015-10-22). Análisis y modelado de experimentos de fluorescencia. Aplicación a señales de calcio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Pérez Ipiña, Emiliano. "Análisis y modelado de experimentos de fluorescencia. Aplicación a señales de calcio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-10-22.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

Análisis y modelado de experimentos de fluorescencia. Aplicación a señales de calcio

Emiliano Perez Ipiña

Dra. Silvina Ponce Dawson

Directora

Dra. Marta Ferraro

Consejero de estudios

Buenos Aires, Agosto de 2015.

... a mis padres ...

"¿de en serio?" N.G.

Resumen

En este trabajo se estudian, desde un punto de vista teórico, distintas técnicas ópticas que permiten observar *in vivo* procesos que ocurren en células y embriones. Todas ellas involucran la obtención de registros o imágenes de fluorescencia. Uno de los objetivos del trabajo es determinar cómo analizar los datos experimentales para extraer información cuantitativa sobre parámetros biofísicos relevantes para los fenómenos observados. En particular, se analiza cómo hacerlo cuando las moléculas observadas difunden e interactúan (reaccionan) con otras especies. En los distintos casos analizados las fluctuaciones de los registros o imágenes cumplen un rol fundamental ya que se usan para extraer información. En base al conocimiento construido a partir del estudio de las fluctuaciones en experimentos de fluorescencia, en el presente trabajo se avanza también sobre otro aspecto relevante para los procesos de señalización biológica como es el tiempo que le lleva a un mecanismo celular endógeno "sensar" la concentración de un ligando con un dado nivel de error.

En la primera parte de la Tesis se hace foco en el estudio de la técnica conocida como Espectroscopía por Correlación de Fluorescencia (*FCS*, por su nombre en inglés). En los experimentos de FCS se obtienen registros de fluorescencia en un pequeño volumen a partir de los cuales se calcula la función de autocorrelación (ACF) de las fluctuaciones de la fluorescencia. Ajustando la ACF es posible extraer los tiempos de correlación que la caracterizan y los pesos con que entran dichos tiempos. Usando un modelo dinámico de los procesos que subyacen a las observaciones es posible pasar de los parámetros de ajuste a parámetros biofísicos. En particular, a partir de los tiempos de correlación

pueden estimarse las tasas de transporte de las moléculas marcadas y, a partir de los pesos, puede obtenerse información sobre la concentración de las moléculas observadas. En el Capítulo 2 se estudia de qué modo, para un sistema de moléculas marcadas que reaccionan y difunden, los tiempos de correlación dependen de los parámetros del sistema y de los del experimento. Se muestra, en particular, cómo variando el volumen de observación los tiempos característicos pasan de estar determinados exclusivamente por los coeficientes de difusión libre de las especies involucradas a depender de coeficientes efectivos que son función de las tasas de reacción. En el Capítulo 3 se estudia la variación de la ACF dependiendo de si las moléculas marcadas interactúan con sitios móviles o inmóviles. Se observa que en el caso de sitios inmóviles hay un tiempo de correlación cuyo peso se anula lo que tiene implicancias directas sobre la estimación de concentraciones a partir de los experimentos. En este Capítulo se estudia también con qué precisión es posible estimar concentraciones dependiendo de la longitud de los registros analizados.

En el Capítulo 4 se estudia la precisión de los mecanismos de "lectura" endógenos que involucran la ligadura de moléculas "efectoras" a sitios en la célula y la posterior generación de una respuesta que depende de la concentración "leída". Se presentan, en particular, expresiones que permiten estimar el error en la concentración sensada como función del tiempo de observación y los tiempos característicos del sistema. Uno de los mayores aportes de esta parte del trabajo radica en que, a diferencia de estudios anteriores, las expresiones describen el decaimiento del error para todo el rango de tiempos de observación, no sólo en el límite asintótico. Por otro lado, incorpora una correción que tiene en cuenta la no linealidad del sistema que es relevante para tiempos tempranos cuando se estudia el comportamiento de sitios de ligadura únicos. En el trabajo se muestra cómo esta corrección "no lineal" permite interpretar la reducción en las fluctuaciones observada en experimentos realizados en embriones de la mosca *Drosophila melanogaster* cuando se comparan las asociadas a la producción instantánea de mRNA con las de la proteína correspondiente acumulada a lo largo del tiempo. A partir de la descripción de las fluctuaciones tempranas se presenta también en este Capítulo una estimación de la distribución de tiempos de espera entre eventos de ligadura consecutivos. La distribución obtenida permite interpretar observaciones experimentales

de la actividad de enzimas a nivel de molécula única sin recurrir a modelos que suponen que la molécula fluctúa entre un sinnúmero de estados conformacionales distintos.

La observación de fenómenos *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia es en gran parte factible debido a que pueden manipularse los organismos en estudio para que expresen algunas proteínas de interés con una cola fluorescente. Esto permite, por ejemplo, estudiar las propiedades espacio-temporales de gradientes de proteínas involucrados en morfogénesis. Un caso analizado con gran detalle es el del desarrollo embrionaria temprano de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, en particular, el del gradiente de la proteína Bicoid (Bcd) a lo largo del eje antero-posterior. En muchos trabajos se interpretan las observaciones experimentales en el marco de un modelo (*SDD*) en el que el Bcd es *sintetizado* en un extremo del embrión desde donde *difunde* a lo largo de éste a la vez que se *degrada*. El modelo SDD no logra explicar cuantitativamente las características observadas del gradiente. En el Capítulo 5 se analiza de qué modo varía la información que puede extraerse de las imágenes al tener en cuenta que Bcd no sólo difunde sino que también se liga a sitios internos y que la fluorescencia observada no distingue entre Bcd libre y Bcd ligado. Se introduce para tal fin una extensión del modelo SDD al que llamamos *SDID* ya que incluye la *interacción* con sitios de ligadura con el que se estudia tanto la dinámica espacio-temporal de la concentración de Bcd como su habilidad para actuar como factor de transcripción. El modelo logra reproducir las observaciones experimentales con parámetros biofísicos razonables y abre la puerta a una reinterpretación de la relación existente entre Bcd y la proteína Hunchback para cuya producción el Bcd es factor de transcripción.

Finalmente, en el Capítulo 6 se analiza la validez y limitaciones de un modelo que describe las fluctuaciones de fluorescencia en imágenes donde se observa la distribución de Ca^{2+} intracelular utilizando fluoróforos que cambian su intensidad al ligar a este ión (*single-wavelength* Ca^{2+} dyes). El modelo es la base de un método que permite comparar cuantitativamente entre sí experimentos de señales de Ca^{2+} realizados en distintas condiciones experimentales y que ayuda, por otro lado, a identificar parámetros experimentales óptimos para cada "set-up". El análisis detallado presentado en este Capítulo muestra que el modelo reproduce correctamente las fluctuaciones observadas

aunque no siempre para un conjunto unívoco de parámetros.

Palabras claves: *Modelado de técnicas ópticas, análisis fluctuaciones, sistemas de reacción-difusión, fluorescencia, correlación*

Analysis and modeling of fluorescence experiments. Application to calcium signals

Abstract

In this Thesis we study, from a theoretical point of view, different optical techniques that allow the observation *in vivo* of processes that occur in cells and embryos. In all the techniques that we explore, fluorescence records or images are obtained. One of the aims of the work is to determine how to analyze the experimental data so as to extract quantitative information about biophysical parameters that are relevant for the observed processes. In particular, we analyze how to do it when the observed molecules diffuse and interact (react) with other species. In the various cases that we analyze, fluctuations play a key role since they are used to extract information. Based on the knowledge obtained through the study of fluctuations in fluorescence microscopy experiments in this Thesis we also advance on another aspect that is relevant within the realm of biological signaling such as the time it takes for a cellular endogenous mechanism to "sense" the concentration of a ligand with a certain accuracy level.

In the first part of the Thesis we focus on the study of the technique known as Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). In FCS experiments one obtains records of the fluorescence coming from a small volume from which one computes the autocorrelation function (AFC) of the fluorescence fluctuations. Fitting the ACF it is possible to determine the correlation times and the weights with which they enter the

ACF. Using a dynamical model of the processes that underlie the observations it is possible to go from the fitting to biophysical parameters. In particular, the transport rate of the marked molecules can be determined from the correlation times and their concentrations from the weights. In Chapter 2 we study how the correlation times depend on the parameters of the system and of the experiment in a case in which the marked molecules diffuse and react. In particular, we show that the correlation times change from being determined exclusively by the free diffusion coefficients of the species involved to depend on the reaction rates. In Chapter 3 we study how the ACF varies depending on whether the marked molecules interact with mobile or immobile sites. We find that, when the sites are immobile, there is one correlation time whose weight becomes exactly equal to zero. This finite change has implications on how to estimate concentrations from the ACF. In this Chapter we also study what is the accuracy with which concentrations can derived from the experiments depending on the length of the analyzed records.

In Chapter 4 we study the precision of the endogenous "reading" mechanisms that involve the binding of effectors to sites on the cell that subsequently induce an end response that depends on the "read" concentration. We present, more specifically, expressions that allow us to estimate the error in the sensed concentration as a function of the observation and characteristic times of the system. One the main contributions of this part of the work is that, differently from previous studies, our expressions describe the decay of the error for all observation times, not just the asymptotic behavior. On the other hand, we incorporate a correction that takes into account the nonlinearity of the system which is relevant for the early behavior of single binding sites. We show in the Thesis how this "nonlinear" correction allows us to interpret the reduction in the fluctuation size observed in experiments performed in the fly *Drosophila melanogaster* when comparing those associated to the instantaneous production of mRNA with those of the accumulated corresponding protein. Having an expression that describes the behavior of the early fluctuations allows us to obtain an approximation of the waiting time distribution between consecutive bindings of a single binding site. This approximated distribution allows us to interpret experimental observations on the

activity of enzymes at the single molecule level without the need of assuming that the molecule fluctuates among innumerous different conformers.

The observation of processes *in vivo* by means of fluorescence microscopy is doable to a great extent because it is possible to manipulate organisms and cells so that the proteins of interest are expressed with a fluorescent tag. This allows the direct study of the spatio-temporal properties of gradients of proteins involved in morphogenesis. A case that has been analyzed with great detail is that of the early embryonic development of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, particularly, of the gradient of the Bicoid (Bcd) protein along the antero-posterior axis. In several studies the experimental observations of this gradient is interpreted within the *SDD* model in which Bcd is *synthesized* at one end of the embryo from which it *diffuses* while it is *degraded*. The SDD model cannot explain quantitatively all the observed characteristics of the gradient. In Chapter 5 we analyze in which ways the information that can be extracted from the images changes if we take into account that Bcd not only diffuses but binds to sites on its way as well. To this end we introduce an extension of the SDD model which we call *SDID* because it includes the *interaction* with binding sites with which we study the spatio-temporal dynamics of the concentration of Bcd as well as its ability to act as transcription factor. The model reproduces the observations with realistic parameter values and opens up the possibility of re-interpreting the relationship between Bcd and the protein, Hunchback, for which production Bcd is a transcription factor.

Finally, in Chapter 6 we analyze the validity and limitations of a model that describes the fluorescence fluctuations of Ca^{2+} images obtained using dyes that change their intensity of emission upon Ca^{2+} binding (*single-wavelength* Ca^{2+} dyes). The model is the basis of a method that allows the quantitative comparison of Ca^{2+} imaging experiments performed under different conditions and which helps with the choice of experimental parameters for each set-up. The detailed analysis presented en this Chapter shows that the model reproduces correctly the observed fluctuations albeit not always for a unique set of parameter values.

keywords: *Modeling of Optical Techniques, Fluctuation Analysis, Reaction-diffusion Systems, fluorescence, correlation*

Índice general

Resumen **v**

Abstract **ix**

Índice general **xvi**

1 Introducción **1**

1.1 Sistemas biofísicos de referencia 2

1.1.1 Formación del eje antero-posterior a partir del gradiente de bicoid 2

1.1.2 Señales de Calcio 6

1.2 Microscopía de fluorescencia 9

1.2.1 Imágenes de fluorescencia 13

1.2.2 Cuantificación de parámetros biofísicos 15

1.3 Modelado matemático 18

1.3.1 Sistemas de reacción-difusión 19

1.3.2 Modelos estocásticos 24

1.4 Fluctuaciones en el ambiente celular: fuentes de información que limitan la precisión de los procesos endógenos 25

1.4.1 Modelado y análisis de experimentos de FCS 25

1.4.2 Límites físicos a la lectura endógena de concentraciones en un medio fluctuante 31

1.5 Motivaciones y preguntas 35

2 Interpretación de resultados de FCS en sistemas de reacción difusión - límites de reacciones rápidas y difusión rápida 39

2.1 FCS en sistemas de reacción difusión: del límite de reacciones rápidas al de difusión rápida. 40

2.1.1 Límite reacciones rápidas 40

2.1.2 Límite de difusión rápida 41

2.2 Cuantificación de parámetros mediante el ajuste de la ACF 42

2.2.1 Cómputo de la ACF numérica 42

2.2.2 Ajuste de la ACF numérica con diferentes modelos 44

2.2.3 Componentes de la ACF 48

2.2.4 Dependencia de los parámetros ajustados con las concentraciones 51

2.3 Desde la difusión libre hacia la difusión efectiva en experimentos 53

3 Cuantificación de concentraciones a partir de FCS 57

3.1 ACF de un sistema con moléculas marcadas y sin marcar 58

3.2 Efecto de las correlaciones iniciales en los pesos de la ACF 62

3.2.1 ACF para sistemas con sitios de ligadura inmóviles 63

3.2.2 ACF para sistemas que difunden en volúmenes confinados . . . 65

3.3 Precisión en los pesos de la ACF en experimentos de FCS 66

3.3.1 Especies difundiendo a tasas muy disímiles 69

4 Lectura endógena de concentraciones en el fluctuante ambiente intracelular 75

4.1 Estimación de concentraciones a partir de las fluctuaciones en el número de moléculas 76

4.1.1 ACF de las fluctuaciones en el número de moléculas 78

4.1.2 Varianza y errores relativos 83

4.1.3 Comparación con expresiones de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu 85

4.1.4 Más allá del límite asintótico 87

4.2 Validación de las expresiones a través de simulaciones numéricas estocásticas 89

4.2.1 Función de autocorrelación del número de partículas 90

4.2.2 Precisión en el número de moléculas en función del tiempo de observación . . . 93
4.3 Aplicaciones . . . 97
4.3.1 Ecuación de Michaelis-Menten a nivel de molécula única . . . 97
4.3.2 Precisión en la transcripción de ADN . . . 101

5 El rol de las reacciones en la formación del gradiente de Bicoid 107
5.1 Modelo *SDID* . . . 110
5.1.1 Un modelo con varias alternativas . . . 111
5.1.2 Estimaciones analíticas: Modelo *SDID* bajo la aproximación de reacciones rápidas . . . 113
5.1.3 Resolución Numérica del Modelo *SDID* . . . 114
5.2 Reproducción del gradiente . . . 115
5.2.1 Elección de parámetros . . . 115
5.2.2 Resultados de las simulaciones numéricas . . . 118
5.3 Interpretación de las observaciones: las consecuencias de tener en cuenta las reacciones. . . . 124
5.3.1 Escala espacial: Gradiente de Bcd libre *vs* gradiente de Bcd total 126
5.3.2 Escala temporal: coeficientes de difusión efectivos *vs.* coeficiente de difusión libre . . . 129
5.3.3 La distinción entre Bcd libre y Bcd total y el rol de Bcd como factor de transcripción. . . . 132

6 Fluctuaciones en imágenes de señales de Ca^{2+} 137
6.1 Modelo de fluctuaciones de fluorescencia en señales de Ca^{2+} . . . 139
6.2 Experimentos en condiciones basales para cuantificar los parámetros del modelo de fluctuaciones . . . 141
6.2.1 Experimentos en condiciones estándar cambiando de región en el ovocito . . . 143
6.2.2 Experimentos variando la potencia de iluminación . . . 145
6.2.3 Experimentos variando la concetración de Ca^{2+} citosólico . . . 146

7 Conclusiones **149**

A Cálculos auxiliares de la ACF para un sistema con moléculas marcadas y sin marcar que interactúan con trampas **157**

B Simulaciones numéricas **161**

B.1 Simulaciones estocásticas 161

B.2 Simulaciones deterministas usando diferencias finitas 163

Agradecimientos **165**

Bibliografía **175**

1

Introducción

La célula es el menor elemento que puede considerarse vivo y, pese a ello, presenta una gran complejidad [Alberts et al., 2014]. Para entender su funcionamiento es necesario observar su interior lo cual no es una tarea sencilla. La mayoría de los tipos celulares son microscópicos, incoloros y translúcidos. Además su interior está constituido por una gran diversidad de elementos y estructuras que se encuentran en constante interacción entre sí y con el medio extra celular. Las técnicas ópticas proveen una herramienta poco invasiva que permite observar la composición y el funcionamiento del interior celular. Sin embargo este tipo de abordaje al mundo intracelular es indirecto. Para obtener información confiable a partir de estas observaciones, los datos deben ser interpretados correctamente. Es necesario entonces estudiar las técnicas ópticas y de esta manera contar con un marco teórico que permita hacer interpretaciones confiables de los datos obtenidos.

En esta tesis se estudian técnicas ópticas empleadas para observar el interior celular *in vivo* a través de indicadores y/o proteínas fluorescentes, y se desarrollan modelos que permiten analizar la correcta interpretación de datos experimentales.

1.1 Sistemas biofísicos de referencia

Para estudiar y analizar los modelos que se presentan en esta tesis, se tuvieron en cuenta dos sistemas biofísicos de distintas características. El primero, es el asociado a la distribución espacio-temporal de la proteína Bicoid, un morfógeno involucrado en el desarrollo embrionario de la mosca *Drosophila melanogaster*, en particular en la formación temprana de su eje antero-posterior. El segundo sistema es el de las señales de Ca^{2+}, en particular, aquéllas que se observan en el interior de ovocitos de *Xenopus laevis*. El calcio es conocido por ser un señalizador universal debido a que se encuentra involucrado en una gran diversidad de procesos celulares. La versatilidad de estas seãles, por lo tanto, es un objeto de estudio de gran interés.

1.1.1 Formación del eje antero-posterior a partir del gradiente de bicoid

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario la diferenciación celular ocurre por la regulación transcripcional de la expresión génica mediada por morfógenos. Estos compuestos forman gradientes que determinan el destino celular: las células obtienen información de su localización espacial leyendo la concentración de estos morfógenos [Wolpert, 1969, Crick, 1970]. Un caso ampliamente estudiado, es el del factor de transcripción Bicoid (Bcd) en embriones de *D. melanogaster*. Bicoid es responsable, junto con otros factores de transcripción, de la formación del eje antero-posterior (AP) del organismo. Bcd actúa como factor de transcripción de unos 20 genes involucrados en la morfología y desarrollo del embrión. En particular, Bcd regula la transcripción de otro factor llamado Hunchback (Hb), que también cumple un rol fundamental en los primeros momentos de la embriogénesis. Luego de la fecundación, la cigota experimenta una serie de ciclos de divisiones nucleares (c.n.) formando un sincitio. Hasta el c.n. 7 los

núcleos se encuentran en el centro del embrión, y a partir de entonces, se mueven hacia la superficie. Para el ciclo 14 hay unos 6000 núcleos en la superficie. En ese momento tiene lugar el proceso de citocinesis [Gregor et al., 2007a].

El ARN mensajero del *bicoid (bcd)* es depositado maternalmente en el extremo anterior del embrión [St Johnston et al., 1989], donde comienza a ser traducido a proteína (Bcd). Luego de un cierto tiempo se establece gradiente de concentración de Bcd a lo largo del eje antero-posterior del embrión cuando este último tiene un tamaño de unos $\sim 500\mu m$. Recientemente, imágenes *in vivo* de embriones de *D. melanogaster* que expresan Bcd fluorescente permitieron observar la dinámica espacio-temporal del gradiente. De estas observaciones se determinó que el gradiente se establece dentro del c.n. 10, ~ 100 minutos luego de la deposición del huevo. Entre los ciclos 10 y 14, el gradiente permanece estable, prácticamente sin cambios. Luego, la concentración comienza a decrecer [Gregor et al., 2007a]. En el mismo trabajo se observó también que el perfil del gradiente de Bcd es altamente reproducible en distintos embriones y que "escalea" con el tamaño del embrión, el cual puede variar entre $2 - 3\,\%$.

Modelos para la formación del gradiente de Bcd y controversias en la estimación de su coeficiente de difusión

Mientras las causas que generan la diferenciación celular se conocen en detalle, los mecanismos que explican la formación del gradiente aún no están totalmente determinados. Un modelo propuesto para la formación del gradiente de Bcd se basa en que éste es sintetizado en el polo anterior del embrión para luego difundir mientras es degradado [Crick, 1970, Lacalli, 1991]. Debido a su sencillez, este modelo, conocido con el nombre de síntesis-difusión-degradación (SDD), fue rápidamente aceptado como descripción para la formación de gradientes de concentración de morfógenos. Lo atractivo del modelo SDD es que reduce los mecanismos que controlan la formación del gradiente y por ende, la diferenciación celular, a la medición de un número reducido de parámetros biofísicos como el tiempo de vida media del morfógeno y su coeficiente de difusión. De acuerdo a este modelo, una vez que el gradiente llega a su estado estacionario, la

concetración del morfógeno (*e.g.*, Bcd) se distribuye según la siguiente expresión,

$$[Bcd](z) = [Bcd]_o \exp(-z/z_o), \tag{1.1}$$

donde la notación de corchetes indica concentración, $[Bcd_o]$ es la concentración de Bcd en el polo anterior, z es la distancia al polo anterior sobre el eje antero-posterior y $z_o \equiv \sqrt{D/\alpha}$ es la longitud característica del gradiente, siendo D el coeficiente de difusión del Bcd y α su tasa de degradación [Houchmandzadeh et al., 2002].

Si bien el modelo SDD se destaca por su sencillez, hay incertidumbre sobre si realmente es suficiente para explicar la formación del gradiente. Una primera estimación del valor del coeficiente de difusión de Bcd durante la mitosis fue realizada en [Gregor et al., 2007a] usando la técnica de Recuperación de Fluorescencia tras Fotoblanqueo (FRAP por sus siglas en inglés) que se encuentra detallada en la sección de técnicas ópticas 1.2 obteniéndose el valor $D_{FRAP} \sim 0{,}3\mu m^2/s$. Por otro lado, la longitud característica del gradiente observado en este trabajo es $z_o \sim 100\mu m$. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el tiempo que le lleva al gradiente alcanzar el valor estacionario ($\sim 100min$) debería ser mucho mayor que $1/\alpha$ y que $z_o^2 \sim 10^4\mu m^2 = D/\alpha$ se deduce que debería ser $D > 2\mu m^2/s$, es decir, un orden de magnitud mayor que el obtenido por FRAP.

En [Bergmann et al., 2007] se propone entonces un modelo en el cual el gradiente no llega al estado estacionario durante los primeros 14 ciclos por lo que la ecuación (1.1) no es válida para estimar el coeficiente de difusión del Bcd, D. Se han propuesto otras alternativas al modelo SDD, entre ellas las que incluyen transporte activo [Gregor et al., 2007b] y advectivo [Hecht et al., 2009] de la proteína Bicoid. Otro modelo propone que la conformación del gradiente se debe a un gradiente de ARNm a lo largo del eje AP [Spirov et al., 2009], aunque luego la distribución de ARNm fue medida en [Little et al., 2011], determinando que se encuentra mayormente localizado en una región de $20\mu m$ alrededor del polo anterior. En cuanto a la difusión, el coeficiente de Bcd fue medido nuevamente en un trabajo más reciente [Abu-Arish et al., 2010] usando otra técnica, llamada Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS por sus siglas en inglés, y que también se encuentra detallada en la sección 1.2. El valor estimado para el coeficiente de difusión mediante esta técnica fue $D_{FCS} \sim 7\mu m^2/s$. Además en el mismo trabajo, el mismo coeficiente, D, fue estimado usando la técnica FRAP encontrando

que $D_{FRAP} \sim 1\mu m^2/s$. Si bien el resultado de FCS es compatible con las estimaciones del modelo SDD, surge la pregunta de por qué existe esa discrepancia entre los valores en ambas técnicas y cuál es el correcto. En [Sigaut et al., 2014], basándose en resultados previos de transporte en sistemas de reacción-difusión [Pando et al., 2006, Sigaut et al., 2010], se mostró que ambas estimaciones del coeficiente de difusión por FRAP y FCS pueden ser correctas si se considera que la proteína Bcd interactúa con sitios de ligadura ("trampas") inmóviles o que difunden lentamente. En la sección 1.3.1 se muestran los detalles del trabajo de [Pando et al., 2006] y la interpretación de los coeficientes de difusión.

Precisión en la conformación del gradiente de Bcd y Hb

Dos aspectos que se destacan del sistema Bicoid son la precisión y reproducibilidad del establecimiento de su gradiente y de la respuesta de sus genes blanco. En [Gregor et al., 2007b] se estudiaron en detalle estas propiedades del sistema. Se observó que, una vez establecido el gradiente, la concentración de Bcd en una posición a lo largo del eje AP correspondiente a una dada fracción de la longitud del embrión varía $\sim 10\,\%$ entre distintos embriones independientemente de cuál sea dicha fracción. La misma variación fue encontrada entre núcleos ubicados en dos posiciones contiguas a lo largo del eje AP. La primera de estas observaciones ilustra la reproducibilidad del gradiente de Bcd en los embriones de *D. melanogaster*. La segunda se relaciona con la precisión con la que los genes cuya transcripción es regulada por Bcd pueden "leer" la concentración de este factor.

Uno de los genes blanco principales de Bcd es *hunchback* (*hb*). De igual manera que *bcd*, *hb* es un gen maternal. En la primera etapa del desarrollo del embrión el ARNm de *hb* es aportado por ARN transcripto en la cigota, cuya producción es regulada por el Bcd. La distribución de la proteína resultante, Hb, presenta bordes bien pronunciados, como si se tratase de un patrón de estado "on/off", ver figura 1.1. Esto indica la existencia de una relación no lineal entre [Hb] y [Bcd]. En [Struhl et al., 1989, Driever and Nusslein-Volhard, 1989] fueron localizados 7 sitios promotores de la transcripción de *hb* capaces de ligar Bcd. Se supone entonces que hay un proceso cooperativo de

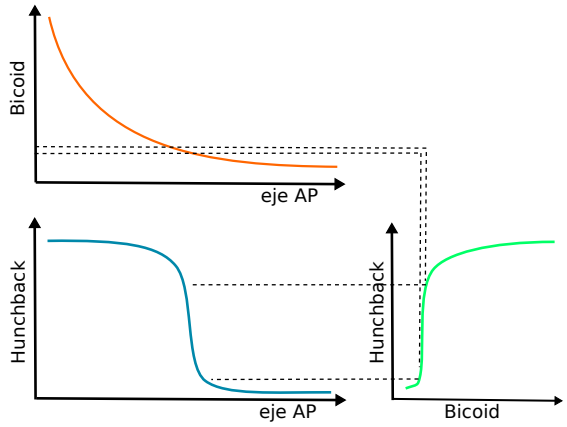

Figura 1.1: Representación esquemática de las distribuciones de Bcd y Hb a lo largo del eje antero-posterior (AP). La figura muestra como la proteína Hb pasa de un estado de alta concentración a baja concentración, en una región del eje AP, donde la proteína Bcd cambia su concentración $\sim 10\,\%$.

ligado de Bcd que promueve dicha transcripción lo que permite explicar los bordes tan pronunciados de $[Hb]$ y relacionar las concentraciones de Hb y Bcd por:

$$[Hb]/[Hb]_{max} = \frac{[Bcd]^n}{[Bcd]^n + [Bcd]^n_{1/2}}, \tag{1.2}$$

donde n es el coeficiente de Hill y $[Bcd]_{1/2}$ es la concentración de Bcd a la cual [Hb] alcanza la mitad de su concentración máxima. En [Gregor et al., 2007b] también se estudió cuán sensible era el Hb a las variaciones de la concentración de Bcd midiendo la relación entre Bcd y Hb. De sus observaciones determinaron un coeficiente de Hill $n = 5$. Por otro lado, teniendo en cuenta que la ubicación de la zona de transición entre el estado "on" y "off" de Hb es reproducible entre distintos embriones y que la concentración, [Bcd], en dos núcleos en posiciones contiguas a lo largo del eje AP sólo difiere en $\sim 10\,\%$, en [Gregor et al., 2007b] concluyeron que Hb es capaz de "sensar" la concentración de Bcd con una precisión del orden de $\sim 10\,\%$.

1.1.2 Señales de Calcio

El ión calcio, Ca^{2+}, es conocido como un señalizador universal debido a que se encuentra involucrado en una gran diversidad de procesos en distintos tipos celulares. Entre estos procesos se encuentran la fecundación, la reproducción y la muerte celular,

la contracción muscular y las sinapsis neuronales [Berridge et al., 1998]. Puede actuar localmente, a lo largo de una zona extendida en el interior de la célula o incluso abarcando varias células distintas, dando lugar a señales intra e intercelulares. La información transmitida por el calcio está codificada en la distribución espacio-temporal de su concentración dentro de la célula. Por lo tanto, para poder actuar en forma tan diversa, las células cuentan con mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} en su interior. El Ca^{2+} intracelular se encuentra principalmente almacenado en reservorios como las mitrocondrias, el retículo sarco o endoplasmático (ER). Dentro de estos reservorios la concentración de calcio, $[Cac]$, es alta ($\sim 1mM$), mientras que en el citoplasma es $\sim 0{,}1\mu M$. Por otro lado, la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular es también del orden de $1mM$.

El ingreso de Ca^{2+} al citosol puede ocurrir desde el medio extracelular, a través de canales en la membrana plasmática, o desde el interior a través de canales ubicados en la membrana de sus reservorios internos. Existen varios tipos de canales en la membrana plasmática: en algunos la apertura es controlada por la diferencia de potencial eléctrico (importantes en la generación de oscilaciones rápidas en células cardíacas y en los mecanismos de comunicación neuronal en la célula pre-sináptica), en otros por la unión de un ligando externo (como los receptores de NMDA presentes en sinapsis de algunas neuronas), y en otros es incluso controlada por estímulos mecánicos. La liberación desde reservorios internos, se produce principalmente a través de dos tipos de canales ubicados en la membrana de los retículos sarco y/o endoplasmático: los receptores de rianodina y los receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3R). Los receptores de rianodina juegan un papel importante en la contracción del múcsulo cardíaco. Los receptores de IP_3 se encuentran predominantemente en células no musculares [Choe and Ehrlich, 2006, Lechleiter and Clapham, 1992, Foskett et al., 2007, Busa et al., 1985].

Ante un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico existen proteínas especializadas que bombean calcio hacia el exterior de la célula o lo reingresan en los reservorios internos. Ambos métodos requieren un gasto de energía ya que implican el transporte de una sustancia en contra de su grandiente de concentración. Ejemplos del primer tipo son el intercambiador de $Na^+ - Ca^{2+}$, que usa la energía electroquímica almacenada

en el gradiente de sodio a expensas de la entrada de iones Na^+ o la $Ca^{2+}c-$ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), que consume energía entregada por la hidrólisis de moléculas de ATP. Uno de los mecanismo principales está constituido por la Ca^{2+}-ATPasa del retículo endoplasmático, o bomba SERCA, por sus siglas en inglés, que recaptura iones de Ca^{2+} presentes en el citosol hacia el retículo endoplasmático [Keener and Sneyd, 1998, Berridge et al., 1998]. Sin embargo, la forma más rápida de reducir la concentración citosólica de Ca^{2+} es proporcionada por sustancias llamadas "buffers", típicamente proteínas que ligan Ca^{2+} y están presentes en la mayoría de los tipos celulares. Se estima que el 99 % del calcio citoplasmático total se encuentra ligado a buffers. Hay una gran diversidad de buffers que atrapan Ca^{2+} con diferentes afinidades y cinéticas. Estas sustancias regulan tanto la concentración como la tasa a la que difunde. Proteínas de este tipo también están presentes dentro de los reservorios internos.

Señales de Calcio en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *Xenopus laevis* son ideales para el estudio de las señales de calcio ya que son células fáciles de manipular debido a su gran tamaño ($\sim 1mm$) y a que presentan una gran variedad de señales. En estas células el calcio es liberado desde el retículo endoplasmático a través de canales que son receptores de IP_3, IP_3R [Choe and Ehrlich, 2006, Lechleiter and Clapham, 1992, Foskett et al., 2007, Busa et al., 1985]. Los IP_3Rs están distribuidos sobre la membrana del retículo en forma inhomogénea, agrupados en lo que se conoce como "clusters" de aproximadamente $50 - 200nm$ de lado [Swillens et al., 1999] separados entre sí por unos $\sim 2 - 3\mu m$. Los mismos se encuentran concentrados en una región delgada de unos $\sim 6\mu m$ de ancho, cercana a la membrana plasmática [Callamaras et al., 1998].

Tanto el Ca^{2+} como el IP_3 juegan un rol importante en la dinámica de los IP_3R. Para abrirse, estos canales necesitan estar unidos a Ca^{2+} e IP_3. Se encontró que a altas concentraciones el calcio inhibe a estos canales mientras que, a bajas concentraciones, aumenta su probabilidad de apertura [I. Bezprozvanny and Erlich, 1991, J. Watras and Erlich, 1991]. Esto último da lugar al fenómeno conocido como "liberación de calcio inducida por calcio" (CICR por sus siglas en inglés). El hecho de que la apertura de los

canales receptores de IP_3 esté modulada por la concentración de Ca^{2+} hace del citosol un medio excitable en lo que se refiere a la propagación de las señales de calcio. La apertura de un canal y la subseguiente liberación de Ca^{2+} pueden inducir la apertura de canales vecinos. Dependiendo de la concentración citosólica de IP_3, esto da lugar a una serie de eventos elementales, como se muestra en la figura 1.2 [Berridge et al., 1998, Parker and Yao, 1996, Sun et al., 1998]. Si la apertura espontánea de un canal individual no induce la apertura de otros canales, este evento se conoce con el nombre de *"blip"*. Estos eventos son frecuentes cuando la concentración de IP_3 es baja. En cambio, si la concentración de IP_3 es un poco más elevada, el número de canales en condiciones de abrirse es mayor y la liberación de Ca^{2+} por la apertura espontánea de un primer canal puede inducir la apertura de algunos canales vecinos dentro de un mismo cluster dando lugar a un *"puff"*. Si la concentración de IP_3 es suficientemente alta puede ocurrir que casi la totalidad de los canales dentro del cluster estén activos. En esta situación, la liberación de Ca^{2+} por la apertura espontánea de un canal puede provocar una liberación masiva de Ca^{2+} que llegue por medio de difusión a clusters vecinos induciendo la apertura de sus canales dando lugar a una *"onda"*.

1.2 Microscopía de fluorescencia

La microscopía se ha convertido en una herramienta fundamental para avanzar en la comprensión de los sistemas biológicos. El desarrollo de nuevas técnicas ópticas, de manipulación genética y de marcado de componentes celulares ha permitido revelar el interior de la célula, su composición y funcionamiento. La microscopía de fluorescencia está en la base de estos avances. La misma explota la propiedad de las sustancias fluorescentes de absorber luz a una determinada longitud de onda y emitirla en otra de mayor valor [Lakowicz, 2006] por lo cual, mediante un sistema de filtros es posible separar la luz de excitación de la emitida obteniendo imágenes de gran contraste. Por otro lado, a diferencia de las técnicas de microscopía por transmisión y reflexión de la luz, la microscopía de fluorescencia permite observar sólo la estructura de lo que fue específicamente marcado con sondas fluorescentes. Esta propiedad, convierte a la mi-

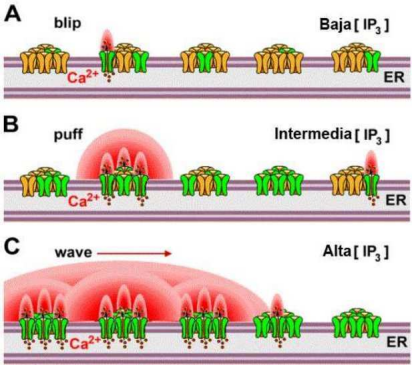

Figura 1.2: Esquema que muestra la actividad de canales y clusters de canales modulados por IP_3 en presencia de concentraciones crecientes de dicha sustancia. (A) Para bajas concentraciones, pocos receptores ligan IP_3, entonces la retroalimentación debida al calcio liberado por un solo canal está restringida a ese canal, produciendo una señal de calcio pequeña y localizada (blip). (B) Para concentraciones intermedias de IP_3, el calcio liberado a través de la apertura espontánea de un canal causa la apertura de muchos otros canales dentro del mismo cluster y origina un puff, pero no logra activar clusters adyacentes. (C) Altas concentraciones de IP_3 provocan ondas de propagación de calcio mediante el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR).

croscopía de fluorescencia en idónea para observar el interior y la estructura de muestras biológicas. Existen varios métodos por los cuales es posible marcar fluorescentemente componentes específicos de una muestra. Entre ellos se encuentran el marcado mediante moléculas llamadas fluoróforos, la inmunofluorescencia y la expresión de proteínas fluorescentes.

Los fluoróforos son moléculas fluorescentes que se unen químicamente a diferentes moléculas blanco de interés. Existe una gran variedad de fluoróforos, entre los que se encuentran las familias derivadas de la fluoresceína y la rodamina. Estos fluoróforos se desarrollan para tener afinidad por aquellas moléculas que se quiere observar. Algunos son introducidos en la célula mediante microinyecciones y otros permean la membrana por lo que es posible usarlos en células vivas para observar procesos dinámicos. Otra manera de marcar moléculas blanco es mediante la técnica de inmunofluorescencia, la que hace uso de la alta especificidad del ligado de los anticuerpos a sus respectivos antígenos. En la inmunofluorescencia primaria se usa un único anticuerpo que está ligado a un fluoróforo. El anticuerpo se liga a su antígeno por lo que la fluorescencia da

información sobre la distribución de este último. En la inmunofluorescencia secundaria se usan dos anticuerpos, uno no marcado (primario) que se pega al antígeno y otro marcado (secundario) que se pega al primario. Como habitualmente pueden pegarse varios anticuerpos secundarios al primario la inmunofluorescencia secundaria provee señales con mayor intensidad. La mayor limitación de la inmunofluorescencia es que sólo puede usada en células fijadas (es decir, muertas) por lo que sólo proveen información sobre distribuciones estáticas, no sobre procesos dinámicos. La técnica más utilizada en los últimos años para observar la distribución espacio-temporal de proteínas en el interior celular consiste en introducir una modificación genética para que la proteína de interés sea expresada por la célula con una cola fluorescente. De este modo se obtienen muestras que "vienen" con la proteína marcada. Para que la técnica sea útil es necesario comprobar que la proteína sigue siendo funcional y que su distribución no se ve alterada por la presencia de la cola fluorescente. Por otro lado, le lleva un tiempo a la cola madurar y ser efectivamente fluorescente, por lo que la marcación abarca generalmente un subconjunto de la población de proteínas. Finalmente, la técnica de hibridación fluorescente *in situ* permite el marcado de sitios específicos en el ADN como así también marcar moléculas de ARN.

Los microscopios de fluorescencia son, en general, epifluorescentes. Esto significa que la luz de excitación del fluoróforo y la debida a la fluorescencia viajan por el mismo camino. La luz de excitación se enfoca en la muestra a través del objetivo del microscopio el cual también es utilizado para enfocar la fluorescencia sobre el detector. Para permitir que la luz de excitación llegue a la muestra minimizando a su vez la fracción reflejada de la misma que llega al detector se usa una combinación de filtros y espejo dicroico. En la microscopía de fluorescencia convencional se colecta luz de una región de gran grosor de la muestra, es decir, la resolución axial no es buena. Existen distintas técnicas para mejorar esta resolución. Una de ellas es la la microscopía confocal. En esta técnica la muestra es iluminada por el "spot" de un láser que la va recorriendo ("escaneando") mediante un sistema de espejos. Esto otorga una resolución espacial relativamente buena en las direcciones contenidas en el plano focal. Para mejorar la resolución axial (transversal al plano focal) se hace pasar a la luz emitida por un

pequeño diafragma o "pinhole" antes de que ingrese al detector. De esta manera sólo se colecta la luz proveniente de una región delgada alrededor del plano focal cuyo espesor (típicamente, del orden del μm) depende del ancho del diafragma y de la longitud de onda. Esta combinación de iluminación y recolección de luz localizadas permite obtener la fluorescencia proveniente de un volumen del orden del femtolitro. Por otro lado, los microscopios confocales cuentan con un sistema de espejos que permiten realizar un barrido sobre un área de la muestra en un tiempo relativamente pequeño obteniendo así imágenes 2D. Cambiando la ubicación del plano focal se pueden obtener "stacks" de imágenes 2D y construir visualizaciones en 3D [Pawley, 2010]. La combinación de la versatilidad de la espectroscopía de fluorescencia junto con la buena resolución de la microscopía confocal hacen posible estudiar el interior celular con un mínimo de disrupción.

Otras alternativas al microscopio confocal que permiten recolectar la luz proveniente de una región pequeña y así obtener buena resolución espacial son la microscopía de dos fotones, la microscopía de reflexión total interna (TIRFM) y la microscopía de lámina de luz (LSFM). El microscopio de dos fotones usa la propiedad de las moléculas de poder absorber dos fotones simultáneamente. Se ilumina entonces la muestra con fotones de la mitad de la energía necesaria para excitar la molécula fluorescente. La probabilidad de una molécula de absorber dos fotones simultáneamente es muy baja, por lo que sólo se excitarán aquellas moléculas que se encuentren donde la luz hace foco. El volumen focal típico de un microscopio de dos fotones es $\sim$ 1fl. La ventaja respecto del microscopio confocal es que permite observar regiones más profundas dentro de la muestra y con menor fotoblanqueo [Periasamy et al., 1999]. La microscopía de reflexión total interna y la de lámina de luz, a diferencia del microscopio confocal y del de dos fotones, iluminan una región plana de la muestra con gran resolución axial. En TIRFM se usa la propiedad de que cuando se ilumina con luz de excitación que incide en la interfaz entre el objetivo y la muestra con un ángulo mayor al de reflexión total interna se genera una onda evanescente que penetra sobre la muestra sólo unas centenas de nanómetros. La mayor desventaja es que sólo pueden observarse componentes que se encuentren suficientemente cerca de la membrana celular. En LSFM, en cambio, se

ilumina una capa delgada en el interior de la muestra que puede estar alejada de la membrana. Para ello se incide con luz que tiene un frente de onda de forma particular y que viaja en dirección ortogonal a la axial a lo largo de la cual la fluorescencia es recolectada. Con este tipo de microscopio es posible obtener una resolución axial de $100 - 200nm$.

Dentro de las técnicas ópticas se pueden encontrar aquéllas que permiten obtener imágenes de distribuciones estáticas o de señales y las que permiten la cuantificación de parámetros biofísicos. A continuación se detallan las características de las de interés en la presente Tesis.

1.2.1 Imágenes de fluorescencia

Combinando la ingeniería de los indicadores de fluorescencia con la microscopía confocal es posible observar señales *in situ* con buena resolución espacial y temporal. Por un lado, la gran variedad de indicadores fluorescentes y los diferentes mecanismos de marcado hacen posible ver desde moléculas únicas, estructuras intracelulares hasta tejidos. Por el otro, la posibilidad de realizar con el micoscropio confocal barridos en las direcciones X-Y del plano focal permite optar por recolectar luz de un área (imagen 2D) o de una línea de distintos tamaños. Si esto se realiza en forma iterada a lo largo del tiempo es posible observar la variación temporal de la luz lo que permite estudiar señales espacio-temporales. La resolución espacial típica de un microscopio confocal es del orden de $\sim 0,2\mu m$ en la dirección del plano focal y de $\sim 1\mu m$ en la dirección axial. El tiempo que le toma al láser recorrer la región escaneada pone un límite a la resolución temporal. De esta manera hay un compromiso entre el tamaño de la imagen escaneada y la resolución temporal.

Observación de la distribución de proteínas fluorescentes

El descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) revolucionó la biología molecular [Tsien, 1998]. A partir de aislar el gen que codifica para esta proteína y fusionarlo a una gran variedad de moléculas blanco fue posible monitorear procesos en sistemas vivos mediante microscopía óptica. Los avances en las

técnicas genéticas hicieron posible modificar la GFP con el fin de producir un gran número de variantes de colores, proteínas de fusión y biosensores, los cuales son en general referidos como proteínas fluorescentes. Más aún, otras proteínas fluorescentes de otras especies han sido identificada, resultando en una mayor extensión de la paleta de colores disponibles. Una de las propiedades que se destaca de las proteínas fluorescentes es que son expresadas de manera endógena sin necesidad de ser introducidas a las células. Sin embargo, las proteínas fluorescentes deben madurar para volverse fluorescentes, lo que impide su observación desde el instante en que son sintetizadas [Remington, 2006]. Por otro lado, el hecho de modificar la proteína "salvaje" o endógena para que sea fluorescente puede alterar su funcionalidad.

Observación de señales de Ca^{2+}

El calcio es observado en células vivas o tejidos a través de lo que se conoce como *indicadores de calcio*, moléculas que se ligan químicamente al ión Ca^{2+} y, al hacerlo, modifican sus propiedades de emisión de fluorescencia [Nuccitelli, 1994]. Existen dos grandes tipos de indicadores de calcio. Los químicos que se introducen en la muestra mediante microinyección haciendo que permeen la membrana y los genéticamente codificados (GECI). Los indicadores químicos son moléculas fluorescentes pequeñas tales que, cuando están ligadas a Ca^{2+}, aumentan la intensidad de emisión de la fluorescencia (indicadores de única longitud de onda) o sufren un corrimiento en el espectro de emisión o excitación (indicadores radiométricos). Los primeros tienen la ventaja de que el incremento en la intensidad de la fluorescencia está directamente relacionado con un incremento en la concentración de calcio. Sin embargo, la distribución de la fluorescencia observada es el resultado de la dinámica de pegado/despegado del fluoróforo al Ca^{2+} y de su transporte, procesos que no son fáciles de "deconvolucionar" de la imagen obtenida. Los indicadores radiométricos estiman la concentración de calcio mediante el cociente entre la emisión del indicador libre y el ligado a Ca^{2+}, con lo que evitan los problemas asociados a las variaciones en la fluorescencia absoluta que están presentes en los indicadores de única longitud de onda. Sin embargo, el uso de estos indicadores requiere de una microscopia más compleja que permita cambiar rápidamente la longitud de onda

de excitación y emisión y detectores veloces. Por otro lado, los indicadores genéticamente codificados (GECI) son proteínas fluorescentes fusionadas con calmodulina (CaM), una proteína presente en células eucariotas que actúa como receptor de Ca^{2+}. A diferencia de los indicadores químcos, los GECI no necesitan ser cargados en el interior de la célula ya que son expresados directamente. Su desventaja es que son de cinética más lenta que los químicos por lo que no son útiles para observar procesos con dinámicas de Ca^{2+} rápidas. Independientemente de su tipo, todos estos indicadores proveen una manera poco invasiva de ver señales de Ca^{2+} en células intactas. Las células se cargan con el indicador fluorescente o son modificadas genéticamente para que lo expresen y mediante microscopía de fluorescencia se excita el indicador y se colecta la fluorescencia emitida. De esta manera, es posible obtener imágenes de la distribución de Ca^{2+} en el interior de la célula y seguir su evolución temporal. Sin embargo, es importante resaltar el hecho de que lo que se observa es la fluorescencia que proviene del indicador ligado al calcio y no la del calcio libre por lo cual se requiere de un cuidado especial en la interpretación de estas observaciones.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* constituyen un sistema paradigmático para el estudio de señales intracelulares de Ca^{2+} que involucran la liberación desde el retículo endoplasmático a través de receptores de IP3. Un modo de inducir la apertura de los IP_3Rs experimentalmente es mediante la microinyección de IP_3 enjaulado que luego es liberado por medio de un pulso de luz UV. Una vez liberado, el IP_3 puede ligarse a los receptores y activar los canales de Ca^{2+} en el retículo [Callamaras et al., 1998]. Las señales son luego observadas usando algún indicador fluorescente. En esta Tesis se analizan señales de Ca^{2+} evocadas de esta forma en ovocitos y observadas usando indicadores de longitud de onda única y microscopía confocal en el modo de *linescan* (*e.g.*, donde la región escaneada es una línea).

1.2.2 Cuantificación de parámetros biofísicos

Las técnicas ópticas, además de brindar la posibilidad de observar señales, permiten cuantificar diversos parámetros biofísicos tales como coeficientes de difusión o concentraciones. Hay técnicas que se han desarrollado específicamente con estos fines. Las de

interés en esta Tesis son la espectroscopía por correlación de fluorescencia (FCS) (que posee una gran cantidad de variantes), la de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) que son utilizadas principalmente para estimar coeficientes de difusión y concentraciones y la de Número y Brillo (N&B) que permite estudiar agregación de moléculas fluorescentes. A continuación se describen sus principios fundamentales.

Número y Brillo de moléculas fluorescentes

El método Número y Brillo, N&B, permite obtener un mapa del número medio de moléculas (típicamente proteínas) fluorescentes de una imagen con resoluv ción pixel a pixel [Digman et al., 2008]. Para ello se estudia cómo fluctúa la fluorescencia en cada pixel a lo largo del tiempo (o cómo lo hace en una región pequeña) distinguiendo entre dos fuentes de fluctuaciones: la variación del número de moléculas que emite fluorescencia en cada pixel y la variación en el número de fotones detectados. La contribución de estos dos procesos a la varianza en el número de cuentas, k, del detector depende de un modo diferente de la intensidad de fotones emitidos por cada molécula, ε. Sea n el número de moléculas fluorescentes cuya luz emitida es recogida en un pixel durante el tiempo de recolección, Δt. Suponiendo que n sigue una distribución de Poisson ($\mathrm{var}(n) = \langle n \rangle$) y que todas las moléculas emiten un número suficientemente alto de fotones de modo que siempre llegan ε al detector durante Δt por cada una de ellas, las fluctuaciones en n contribuyen a la varianza en k con un término de la forma $\sigma_n^2 = \varepsilon^2 \langle n \rangle$. Por otro lado, dado que llegan εn fotones al detector en cada Δt, si la detección introduce un nuevo error de tipo Poissoniano, la varianza en la fluorescencia (k) introducida por este último efecto será $\sigma_d^2 = \varepsilon \langle n \rangle$. Llamando $\sigma^2 = \mathrm{var}(k)$ se concluye que:

$$\sigma^2 = \sigma_n^2 + \sigma_d^2 = \varepsilon^2 \langle n \rangle + \varepsilon \langle n \rangle, \tag{1.3}$$

de donde se deduce que:

$$\begin{aligned} \langle n \rangle &= \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2 - \langle k \rangle} \\ \varepsilon &= \frac{\sigma^2 - \langle k \rangle}{\langle k \rangle}. \end{aligned} \tag{1.4}$$

Es decir, a partir de la fluorescencia media, $\langle k \rangle$, y de su varianza, σ^2, en un pixel o región pequeña es posible estimar el número medio de moléculas fluorescentes en la

región observada. Adicionalmente, es posible hacer experimentos variando la potencia del láser de modo de variar ε. De las ecuaciones anteriores se deduce que la curva σ^2 vs $\langle k \rangle$ en estos experimentos debe seguir una ecuación de la forma:

$$\sigma^2 = \frac{\langle k \rangle^2}{\langle n \rangle} + \langle k \rangle, \tag{1.5}$$

a partir de cuyo ajuste puede deducirse $\langle n \rangle$ y validar el método. Esta técnica se utiliza principalmente en imágenes estáticas de muestras que contienen proteínas fluorescentes para identificar si incrementos en la fluorescencia observada se deben a un cambio en el número de moléculas que se encuentran emitiendo o en su brillo. Distinguiendo entre número y brillo es posible obtener un mapa pixel a pixel del número y agregación de las moléculas fluorescentes de la imagen. N&B permite distinguir también entre las fracciones móviles e inmóviles de las moléculas fluorescentes, debido a que la fracción inmóvil no contribuye a la varianza de la fluorescencia.

Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP)

La recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo es una técnica óptica muy usada para la determinación de coeficientes de difusión y para el estudio de interacciones de proteínas en células. Existe una extensa lista de bibliografía sobre este tema, dentro de la que se destacan [Axelrod et al., 1976] [Jacobson and Wojcieszyn, 1984] y [Sprague and McNally, 2005]. La técnica de FRAP consiste en fotoblanquear, por destrucción fotoquímica del fluorofóro, a las moléculas fluorescentes que están dentro de un volumen de detección y observar cómo se recupera en el tiempo la intensidad de fluorescencia. Este tiempo depende de los procesos de difusón y/o reacción en los que intervienen las moléculas fluorescentes. La curva de recuperación puede ser descripta de la siguiente forma:

$$f(t) = \frac{F(t) - F_o}{F_\infty - F_o} \tag{1.6}$$

donde $F(t)$ es la fluorescencia en el volumen de detección, F_o es la fluorescencia inmediatamente después de fotoblanquear y F_∞ la fluorescencia a tiempos largos. Con un adecuado modelo matemático que describa teóricamente cómo es la función $f(t)$ se

puede obtener información de parámetros biofísicos del sistema observado tales como el coeficiente de difusión o el tiempo de vida media de las moléculas.

Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

La espectroscopía por correlación de fluorescencia, FCS, es una técnica que permite cuantificar parámetros biofísicos *in situ* a través del estudio de las fluctuaciones de la fluorescencia proveniente de un volumen de observación. Estas fluctuaciones se producen debido a la dinámica de los procesos bajo estudio por lo que contienen información sobre los mismos. Su análisis permite cuantificar concentraciones, constantes de difusión y tasas de reacción, entre otros parámetros biofísicos y bioquímicos [Magde et al., 1972] [Kim and Schwille, 2003] [Krichevsky and Bonnet, 2002] [Grünwald et al., 2005]. La técnica se basa en el marcado fluorescente de alguna especie de moléculas de interés y la recolección de su fluorescencia, $F(t)$, en un volumen muy pequeño, del orden del femtolitro, de manera que el número de moléculas dentro de éste sea muy pequeño y las fluctuaciones, grandes. Luego se calculan las fluctuaciones, $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$, y, a partir de ellas, la función de autocorrelación,

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \tag{1.7}$$

donde $\langle F(t) \rangle$ es el promedio temporal de la señal de fluorescencia registrada. El valor que toma la función de autocorrelación o ACF para el tiempo $\tau = 0$, se denomina *peso de la ACF*, $G_o \equiv G(\tau = 0)$, y es importante notar que es el cociente entre la varianza y el cuadrado del valor medio de la fluorescencia,

$$G_o = \frac{\mathrm{var}(F)}{\langle F(t) \rangle^2}. \tag{1.8}$$

Una vez obtenida la función de autocorrelación, $G(\tau)$, ésta se ajusta con algún modelo matemático adecuado para extraer parámetros.

1.3 Modelado matemático

Para obtener información de los sistemas de estudio y ayudar a la interpretación de las observaciones es necesario contar con modelos matemáticos para la dinámica de

los elementos involucrados. En el caso de los sistemas de estudio en esta tesis, Bicoid y Ca^{2+}, las ecuaciones de reacción-difusión posibilitan modelar la dinámica espacio temporal de estas especies y, a partir de éstas, construir modelos para interpretar las observaciones obtenidas mediantes distintas técnicas ópticas.

1.3.1 Sistemas de reacción-difusión

En muchos casos las moléculas presentes en el interior celular se mueven aleatoriamente, sin fuerzas motoras que las impulsen en ninguna dirección, mientras interactúan con moléculas de otras especies. La dinámica de estos procesos se describe adecuadamente, dentro de ciertos límites, con ecuaciones de reacción-difusión [Berg, 1993] [Crank et al., 1975] [Turing, 1952]. Si no se tiene en cuenta la interacción entre moléculas, el movimiento aleatorio de cada molécula sigue un movimiento browniano, mientras que el conjunto de moléculas se puede modelar en forma determinista usando la ley de Fick a partir de la cual se obtiene la ecuación de difusión,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c, \tag{1.9}$$

donde c es la concentración o densidad de moléculas de la especie que difunde y D es su coeficiente de difusión. Esta descripción determinista de la densidad de moléculas es válida en la medida en que las fluctuaciones en el número de moléculas en un determinado volumen sea pequeño comparado con el número medio de moléculas dentro del mismo. De no ser así es necesario utilizar una descripción estocástica que pueda reproducir las fluctuaciones en la densidad de moléculas. Ambos enfoques son válidos dependiendo del nivel de detalle con el que se quiera estudiar el problema. En ese sentido, la ecuación (1.9) describe adecuadamente la dinámica macroscópica de la población de moléculas, mientras que la dinámica microscópica debe ser estudiada con modelos estocásticos. La ecuación de difusión, por otro lado, es válida en la medida en que las escalas espacial y temporal de variación de la concentración son, respectivamente, mucho mayores que el camino libre medio y el tiempo entre colisiones de las moléculas. En cuanto a las reacciones, éstas son modeladas usando ecuaciones de cinética química (reaction rate equation, RRE, en inglés). Del mismo modo que la ecuación de Fick, las

RRE describen la dinámica macroscópica de la población de moléculas que interactúan. Una descripción microscópica debe hacerse en términos de la probabilidad de que las reacciones ocurran. De todos modos, tanto para la difusión como para las reacciones, existe una conexión entre los parámetros que describen la dinámica macroscópica y la microscópica. Por ejemplo, el coeficiente de difusón es proporcional al cociente entre el cuadrado del camino libre medio y el tiempo entre colisiones de las moléculas, mientras que las probabilidades de reacción entre dos especies se relacionan con las tasas de reacción. En conjunto, la ley de Fick y las ecuaciones RRE permiten modelar la dinámica macroscópica de un sistema de varias especies que difunden e interactúan. A continuación se presenta el formalismo matemático de los sistemas de reacción-difusión en forma determinista y, más adelante, en forma estocástica.

Esquema de reacción

Dado un sistema de M ecuaciones químicas acopladas entre N especies diferentes es posible representarlo esquemáticamente como:

$$\sum_{i=1}^{N} \nu_{i\mu}^{-} S_i \xrightarrow{k_\mu} \sum_{i=1}^{N} \nu_{i\mu}^{+} S_i \quad \forall \mu = 1, \cdots, M \tag{1.10}$$

donde $\nu^- = [\nu_{i\mu}^-]$ y $\nu^+ = [\nu_{i\mu}^+]$ son las matrices de $N \times M$ de coeficientes estequiométricos de reactivos y productos respectivamente, S_i es la $i-$ésima especie que reacciona y k_μ es la tasa a la que dicha reacción se produce.

Ecuación de cinética química - Ley de acción de masas

Siguiendo un razonamiento termodinámico se llega a la siguiente expresión, conocida como *ley de acción de masas*:

$$\frac{d\phi}{dt} = (\nu^+ - \nu^-)\mathbf{T}_0(\phi) \tag{1.11}$$

donde ϕ es el vector de concentraciones y $(\mathbf{T}_0)_\mu = k_\mu \prod_{i=1}^{N} \phi_i^{\nu_{i\mu}^-}$. Esta ecuación permite encontrar la evolución de un sistema de reacciones químicas con N especies diferentes. Especializamos ahora esta descripción al sistema que estudiamos reiteradamente en la presente Tesis. Se trata de un sistema con una especie de moléculas, P_f, que difunden

libremente con coeficiente D_f y que interactúan con sitios de ligadura o "trampas", S, formando el compuesto P_b. Las trampas, S, son mucho más masivas que las moléculas, P_f, de manera que S y P_b difunden con el mismo coeficiente $D_S \ll D_f$. El esquema de reacción es el siguiente,

$$P_f + S \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} P_b, \tag{1.12}$$

donde k_{on} y k_{off} son las tasas de reacción que definen la constante de disociación, $K_D \equiv k_{off}/k_{on}$. Este esquema es representativo de los dos sistemas de estudio que se tratan en esta Tesis. En un caso la especie P_f representa al Ca^{2+} libre y la especie S a un buffer único o a un buffer efectivo que tiene en cuenta el efecto neto de todos los buffers que interactúan con el Ca^{2+} [Duffy et al., 1998] [Smith, 1996]. En el otro caso la especie P_f representa a la proteína Bicoid y S a los sitios de ligadura con los que interactúa que pueden ser sitios promotores de la transcripción de genes u otras "trampas" presentes en el interior celular. La reacción del esquema (1.10) corresponde a los siguientes pasos elementales:

$$\begin{aligned} P_f + S &\xrightarrow{k_{on}} P_b \\ P_b &\xrightarrow{k_{off}} P_f + S, \end{aligned} \tag{1.13}$$

lo que permite identificar los parámetros que entran en las ecuaciones (1.10)–(1.11) como:

$$\phi = \begin{pmatrix} [P_f] \\ [S] \\ [P_b] \end{pmatrix}, \quad \nu^+ - \nu^- = \begin{pmatrix} -1 & 1 \\ -1 & 1 \\ 1 & -1 \end{pmatrix}, \quad \mathbf{T}_0 = \begin{pmatrix} k_{on}[P_f][S] \\ k_{off}[P_b] \end{pmatrix} \tag{1.14}$$

Usando la ecuación (1.11) y teniendo en cuenta la difusión según la ecuación (1.9) se llega a que la evolución temporal de las concentraciones está dada por el siguiente sistema de reacción-difusión:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [P_f]}{\partial t} &= D_f \nabla^2 [P_f] - k_{on}[P_f][S] + k_{off}[P_b], \\ \frac{\partial [S]}{\partial t} &= D_S \nabla^2 [S] - k_{on}[P_f][S] + k_{off}[P_b], \\ \frac{\partial [P_b]}{\partial t} &= D_S \nabla^2 [P_b] + k_{on}[P_f][S] - k_{off}[P_b]. \end{aligned} \tag{1.15}$$

Las soluciones estacionarias de este sistema son las que satisfacen $\frac{d\phi}{dt} = 0$. En particular, en esta Tesis se estudian muchas situaciones en las que el sistema se encuentra en un equilibrio espacialmente uniforme. En ese caso las concentraciones están relacionadas por:

$$\begin{aligned} &[P_f]_{(eq)}[S]_{(eq)} = K_D[P_b]_{(eq)}, \qquad &&[P_b]_{(eq)} = \frac{[P_f]_{(eq)}[S_T]}{[P_f]_{(eq)} + K_D}, \\ &[P_f]_{(eq)} + [P_b]_{(eq)} = [P_T], \qquad &&[S]_{(eq)} + [P_b]_{(eq)} = [S_T], \end{aligned} \tag{1.16}$$

donde $[P_T]$ y $[S_T]$ son las concentraciones totales de partículas y de sitios de ligadura, respectivamente. Como en el caso de las ecuaciones (1.15), en general, el sistema (1.11) es no lineal y no tiene una solución analítica. Para encontrar sus soluciones se suelen utilizar métodos numéricos.

Aproximación de reacciones rápidas y difusión efectiva

Es posible reducir el número de ecuaciones del sistema de ecuaciones (1.15) si se supone que inicialmente la concentración total de sitios de ligadura, $[S_T] = [S] + [P_b]$, es espacialmente uniforme. Dado que S y P_b difunden a la misma tasa se deduce entonces que $[S_T]$ permanecerá espacialmente uniforme e igual al valor inicial para todo tiempo. De esta manera la ecuación (1.15) se reduce a:

$$\begin{aligned} \frac{d[P_f]}{dt} &= D_f \nabla^2 [P_f] - k_{on}[P_f][S] + k_{off}([S_T] - [S]), \\ \frac{d[S]}{dt} &= D_S \nabla^2 [S] - k_{on}[P_f][S] + k_{off}([S_T] - [S]). \end{aligned} \tag{1.17}$$

Si se considera, por otro lado, que no todos los procesos ocurren en la misma escala temporal, sino que hay algunos más rápidos que otros, se puede hacer una aproximación "cuasi-estacionaria" que permite reducir el sistema de ecuaciones aún más. En particular, si las reacciones entre las trampas, S, y las moléculas, P_f, ocurren en una escala temporal mucho más rápida que la de la difusión se puede considerar que a cada instante las reacciones están localmente en equilibrio en cada punto del espacio:

$$[S] \approx \frac{K_D[S_T]}{K_D + [P_f]}. \tag{1.18}$$

De esta manera las ecuaciones (1.17) se pueden reducir a una única ecuación de reacción-difusión para $[P_f]$ con un coeficiente de difusión efectivo que depende de las

concentraciones de las especies [Duffy et al., 1998, Duffy et al., 2001, Wagner and Keizer, 1994, Smith, 1996, Strier and Dawson, 2000, Strier et al., 2003],

$$D_{eff} = \frac{D_f + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]} D_S}{1 + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]}}. \tag{1.19}$$

En el ámbito de las señales de calcio esta reducción es conocida como la *aproximación de buffers rápidos*. El coeficiente de difusión efectivo dado por la ecuación (1.19) es un promedio pesado entre los coeficientes de difusión libres D_f y D_S que tiende a D_f si la concentración de partículas libres, $[P_f]$, es mucho mayor que la de sitios de ligadura libres, $[S]$, mientras que tiende a D_S en el límite opuesto. Dado que $D_S < D_f$ esto significa que D_{eff} es una función creciente de $[P_f]$ o, equivalentemente, de $[P_f] + [P_b]$. Esta dependencia se observó en el caso del Ca^{2+} en [Allbritton et al., 1992] donde se utilizó Ca^{2+} radioactivo para estimar su coeficiente de difusión en extractos citosólicos de ovocitos de *Xenopus laevis*. Agregando previamente Ca^{2+} en distintas concentraciones al extracto se encontró que el coeficiente de difusión crecía con la concentración de calcio en el medio. Esto fue interpretado como una consecuencia de que el calcio no difunde libremente sino que interactúa también con buffers presentes en el extracto que difunden a una tasa menor que la del calcio libre.

En [Pando et al., 2006] se estudió la difusión efectiva en un sistema cuya descripción macroscópica está dada por la ecuación (1.17) analizando casos en que un subconjunto de las partículas, P_f y P_b, del sistema están marcadas (*e.g.*, son fluorescentes o radioactivas) y otros en que no existe dicha marcación. Se encontró que, a diferencia de la difusión libre, en el caso de la difusión efectiva no hay un único coeficiente de difusión. En particular, se identificaron dos coeficientes, D_{sm} y D_{coll}, a los que se llamó de "molécula única" (sm por sus siglas en inglés) y colectivo, respectivamente y que se escriben como:

$$D_{sm} = \frac{D_f + \frac{[S]}{K_D} D_S}{1 + \frac{[S]}{K_D}}, \tag{1.20}$$

$$D_{coll} = \frac{D_f + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]} D_S}{1 + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]}}. \tag{1.21}$$

Ambos son promedios pesados de los coeficientes de difusión libre de las partículas y las trampas, pero es D_{coll} el que coincide con el que se obtiene en la aproximación

de reacciones rápidas (Eq. (1.19)). Como es $D_S < D_f$ siempre resulta $D_{sm} < D_{coll}$. Más aún, dependiendo de los parámetros, D_{sm} y D_{coll} pueden tomar valores numéricos muy distintos entre sí. D_{sm} determina la dependencia temporal del desplazamiento cuadrático medio de una partícula marcada (*e.g.*, fluorescente) que difunde en un medio de trampas en equilibrio con partículas sin marcar. Es también el que puede estimarse en experimentos de FRAP [Sprague et al., 2004, Sprague and McNally, 2005] donde se observa la tasa a la que difunden las moléculas fluorescentes hacia adentro de un medio donde inicialmente sólo hay moléculas que han sido fotoblanqueadas. D_{coll} determina la tasa a la que una perturbación al equilibrio entre partículas y trampas, localizada espacialmente, se "desparrama" en el tiempo en un caso en que no hay partículas marcadas. Identificando a las partículas individuales, P_f, con los mensajeros y a las perturbaciones en su concentración con los mensajes se concluye de este resultado que los mensajes difunden más rápidamente que los mensajeros. Como se discutió en [Sigaut et al., 2014] para el caso de Bicoid y se discute más adelante en esta Tesis, esto implica que las estimaciones de coeficientes de difusión mediante técnicas ópticas deben ser interpetadas con cuidado si las partículas que se observan interactúan con otras.

1.3.2 Modelos estocásticos

Las ecuaciones de reacción-difusión deterministas han demostrado ser un excelente modelo para estos procesos. Sin embargo existen situaciones donde no proveen una descripción del todo adecuada. Por ejemplo, cuando se busca describir la dinámica dentro de volúmenes donde el número de moléculas es muy pequeño las fluctuaciones en las concentraciones se vuelven importantes produciendo comportamientos no triviales que no pueden ser descriptos en el marco de las ecuaciones macroscópicas válidas para los valores medios. En esos casos es necesario recurrir a modelos que incluyen alguna descripción de la estocasticidad. Estos modelos pueden dividirse en dos grandes grupos: aquéllos en donde se simula la dinámica de las variables aleatorias directamente (es decir, se generan realizaciones estocásticas del proceso en estudio) y aquéllos que modelan la dependencia espacio-temporal de las densidades de probabilidad, como la ecuación de Chapman-Kolgomorov o la ecuación maestra. En esta Tesis usamos ambos

procedimientos, dependiendo del problema. Por un lado utilizamos algoritmos numéricos conocidos como SSA por sus siglas en inglés (stochastic simulation algorithm) como se describe en el Apéndice B. Por otro lado, para el estudio teórico de los experimentos de FCS usamos las ecuaciones de reacción-difusión linealizadas como modelo de la dinámica de la densidad de probabilidad de las fluctuaciones alrededor del equilibrio.

1.4 Fluctuaciones en el ambiente celular: fuentes de información que limitan la precisión de los procesos endógenos

1.4.1 Modelado y análisis de experimentos de FCS

Análisis de experimentos de FCS: Difusión de partículas libres

La interpretación de los resultados obtenidos en experimentos de FCS realizados en sistemas con una única especie de moléculas fluorescentes que difunde libremente es sencillo [Krichevsky and Bonnet, 2002]. La intensidad de la fluorescencia se puede escribir como:

$$F(t) = \int d^3\vec{r} I(\vec{r}) q c(\vec{r}, t), \tag{1.22}$$

donde $I(\vec{r})$ combina el perfil de iluminación y detección del sistema óptico, $c(\vec{r}, t)$ es la densidad de moléculas fluorescentes en la posición $\vec{r}$ al tiempo t que incluye las fluctuaciones respecto del equilibrio, $c_{eq} \equiv \bar{c}$, al que se supone uniforme y estacionario y q es un parámetro que tiene en cuenta la eficiencia de absorción y emisión del fluoróforo, la intensidad de la iluminación y la sección eficaz del detector de la señal. Si las moléculas difunden con coeficiente, D, y se utiliza un microscopio confocal, a partir de la Eq. (1.22) se puede calcular analíticamente la función de autocorrelación obteniendo [Krichevsky and Bonnet, 2002]:

$$G(\tau) = \frac{G_o}{\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)\left(1 + \frac{t}{w^2 \tau_D}\right)^{1/2}}, \tag{1.23}$$

donde se tuvo en cuenta el perfil de iluminación/detección del microscopio, $I(\vec{r}) = exp\left(-2\frac{x^2}{w_r^2} - 2\frac{y^2}{w_r^2} - 2\frac{y^2}{w_z^2}\right)$ con (x, y, z) las coordenadas cartesianas y w_r y w_z los anchos medios en la dirección radial y axial, respectivamente, que definen $w \equiv w_z/w_r$. G_o y τ_D en 1.23 se expresan como:

$$G_o = \frac{1}{V_{obs}c_{eq}} = \frac{1}{\langle N \rangle}, \quad \tau_D = \frac{w_r^2}{4D}, \tag{1.24}$$

donde $V_{obs} = \int d^3\vec{r}I(\vec{r}) = \pi^{3/2}w_r^2 w_z$ es el volumen de observación y $\langle N \rangle$ es el número medio de moléculas fluorescentes en su interior. Esta expresión es utilizada, en primer lugar, para calibrar el set-up experimental. Para tal fin se hacen experimentos de FCS en solución utilizando una concentración conocida de moléculas fluorescentes cuyo coeficiente de difusión es también conocido. Ajustando la expresión (1.23) a la ACF obtenida experimentalmente es posible determinar entonces V_{obs}, w_r y w. Una vez obtenidos estos valores la expresión (1.23) puede usarse para estimar la concentración, c_{eq}, y el coeficiente de difusión, D, de moléculas fluorescentes que difunden libremente en cualquier medio a partir de experimentos de FCS realizados con el mismo set-up.

Análisis de experimentos de FCS: Muchas especies difundiendo e interactuando

Si se consideran m especies con concentraciones, c_i, que fluorescen con eficiencia, q_i, la intensidad de la fluorescencia al instante t se expresa como:

$$F(t) = \int d^3r I(\vec{r}) \sum_i^m q_i c_i(\vec{r}, t). \tag{1.25}$$

Si cada una de las especies difunde libremente con coeficiente, D_i, y no hay interacciones, procediendo como en el caso de una sola especie es posible obtener la ACF. La misma es la suma de tantos términos de la forma (1.23) como especies:

$$G(\tau) = \sum_{i=1}^m \frac{G_{oi}}{\left(1 + \frac{t}{\tau_{D_i}}\right)\left(1 + \frac{t}{w^2\tau_{D_i}}\right)^{1/2}}, \tag{1.26}$$

cada uno caracterizado por un tiempo de difusión $\tau_{D_i} = w_r^2 4D_i$ y un peso, $G_{oi} = q_i^2\langle N_i \rangle/(\sum_i q_i\langle N_i \rangle)^2$, donde $\langle N_i \rangle = \bar{c}_i V_{obs}$ es el número medio de moléculas fluorescentes

de la especie i en el volumen de observación, V_{obs}, y $\bar{c_i}$ es la concentración de equilibrio de la especie. Si las especies interactúan entre sí el cálculo de la ACF resulta más complicado. A partir de las ecuaciones (1.7) y (1.25) se llega a:

$$G(\tau) = \langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle = \int d^3 r I(\vec{r}) \int d^3 r' I(\vec{r'}) \sum_{i,j} q_i q_j \langle \delta c_i(\vec{r}, t) \delta c_j(\vec{r'}, t+\tau) \rangle, \quad (1.27)$$

donde $\delta c_i(\vec{r}, t)$ es la diferencia de la concentración de la especie i en el punto $\vec{r}$ al tiempo t respecto del valor de equilibrio, $c_{i,eq} \equiv \bar{c_i}$. Para obtener $G(\tau)$ es necesario determinar $\delta c_j(\vec{r'}, t+\tau)$ para cada especie j como función de las perturbaciones, $\delta c_i(\vec{r}, t)$ $\forall \vec{r}, i$. Como se describió previamente, la dinámica de un conjunto de moléculas de diferentes especies que difunden e interactúan entre sí está descripta por un sistema no lineal. Sin embargo, dado que lo que interesa son las perturbaciones respecto de un equilibrio uniforme, se suele trabajar con las ecuaciones linealizadas alrededor de dicho equilibrio. De este modo se puede suponer que

$$\delta c_j(\vec{r'}, t+\tau) = \sum_i \int d^3 r \Gamma_{ji}(\tau, \vec{r'} - \vec{r}) \delta c_i(\vec{r}, t). \quad (1.28)$$

Por lo tanto, para obtener $\langle \delta c_i(\vec{r}, t) \delta c_j(\vec{r'}, t+\tau) \rangle$ no es sólo necesario determinar $\Gamma_{ji}(\tau, \vec{r'} - \vec{r})$ a partir de las ecuaciones de evolución linealizadas sino también hacer alguna suposición sobre $\langle \delta c_i(\vec{r}, t) \delta c_j(\vec{r'}, t) \rangle$, es decir, sobre las correlaciones iniciales. En [Krichevsky and Bonnet, 2002] se supone que las correlaciones instantáneas son de corto alcance (menores a la distancia media entre moléculas) y que el número de moléculas de una especie dentro de un volumen sigue una estadística de Poisson. Con estas dos suposiciones se puede escribir:

$$\langle \delta c_i(\vec{r}, t) \delta c_j(\vec{r'}, t) \rangle = \bar{c_j} \delta_{ij} \delta(\vec{r} - \vec{r'}). \quad (1.29)$$

En [Krichevsky and Bonnet, 2002] calculan el propagador, $\Gamma_{ji}(\tau, \vec{r'} - \vec{r})$, a partir de las ecuaciones de reacción-difusión linealizadas transformadas al espacio de Fourier. De este modo la ACF se puede escribir en términos de autovalores y autovectores que son función de la coordenada conjugada a $\vec{r}$ en el espacio de Fourier, $\vec{\xi}$, como:

$$G(\tau) = \frac{(2\pi)^{-3}}{(\sum q_i \bar{c_i})^2} \int d^3 \vec{\xi} I(\vec{\xi}) \sum_{j,l} q_j q_l \sum_s X_{l,s} \exp(\lambda_s \tau) X^{-1}_{s,j} \quad (1.30)$$

donde X es la matriz de autovectores y los λ_s son los autovalores. La ecuación (1.30) muestra que la ACF, $G(\tau)$, es la suma de varias componentes, una por cada rama de autovalores del sistema linealizado.

Si bien contar con una expresión genérica para la ACF como la Eq. (1.30) puede ser útil, no lo es demasiado si el objetivo es ajustar datos experimentales para estimar parámetros biofísicos. Para tal fin es mejor contar con expresiones algebraicas sencillas como la Eq. (1.26). En [Sigaut et al., 2010] se siguió la estrategia de [Krichevsky and Bonnet, 2002] para derivar la ACF en el caso de un sistema descripto por las ecuaciones (1.15) en el que tanto las partículas libres, P_f, como las ligadas, P_b, son igualmente fluorescentes. Posteriormente se estudió el límite de "reacciones rápidas" en el que la ACF puede ser aproximada por una expresión no integral. Linealizando alrededor del equilibrio uniforme (1.16) se obtuvieron para este problema la matriz:

$$M = \begin{bmatrix} -D_f\xi^2 - k_{on}[S]_{(eq)} & -k_{on}[P_f]_{(eq)} & k_{off} \\ -k_{on}[S]_{(eq)} & -D_s\xi^2 - k_{on}[P_f]_{(eq)} & k_{off} \\ k_{on}[S]_{(eq)} & k_{on}[P_f]_{(eq)} & -D_s\xi^2 - k_{off} \end{bmatrix}, \tag{1.31}$$

que describe la evolución temporal de las perturbaciones a las concentraciones de equilibrio en el espacio de Fourier, $\dot{\delta P(\xi)} = M\delta P(\xi)$, y sus autovalores:

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= -D_s\xi^2 \\ \lambda_2 &= -\frac{1}{2}\left(k_{off}(a+h) + (D_f + D_s)\xi^2\right) + \\ &\quad \frac{1}{2}\sqrt{(a+h)^2k_{off}^2 + 2(D_s - D_f)(h-a)k_{off}\xi^2 + (D_s - D_f)^2\xi^4} \\ \lambda_3 &= -\frac{1}{2}\left(k_{off}(a+h) + (D_f + D_s)\xi^2\right) - \\ &\quad \frac{1}{2}\sqrt{(a+h)^2k_{off}^2 + 2(D_s - D_f)(h-a)k_{off}\xi^2 + (D_s - D_f)^2\xi^4} \end{aligned} \tag{1.32}$$

donde $a = \frac{[S]_{(eq)}}{K_D}$, $c = \frac{[P_f]_{(eq)}}{K_D}$, $h = 1 + c$. Definiendo

$$\sqrt{\eta} = \sqrt{(a+h)^2k_{off}^2 + 2(D_s - D_f)(h-a)k_{off}\xi^2 + (D_s - D_f)^2\xi^4},$$

para simplificar las expresiones, es posible escribir la matriz de autovectores, X, que

entra en la expresión (1.30) como:

$$X = \begin{bmatrix} 0 & \frac{\alpha+\sqrt{\eta}}{2k_{off}a} & \frac{\alpha-\sqrt{\eta}}{2k_{off}a} \\ \frac{1}{c} & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}, \tag{1.33}$$

donde $\alpha = (h-a)k_{off} + (D_s - D_f)\xi^2$. Reemplazando las ecuaciones (1.33) y (1.32) en la ecuación (1.30) se obtiene la ACF como la suma de tres términos de la forma:

$$\begin{aligned} G_1(\tau) =& \frac{G_{o_S}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_S}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_S}}}, \\ G_2(\tau) =& (2\pi)^{-3}\frac{[P_f]_{(eq)}}{2h[P_T]^2}\int d^3\vec{\xi} I(\vec{\xi})\left(\frac{\alpha(h-a)+4k_{off}ah}{\sqrt{\eta}}+h+a\right)e^{\lambda_2(\vec{\xi})\tau}, \\ G_3(\tau) =& (2\pi)^{-3}\frac{[P_f]_{(eq)}}{2h[P_T]^2}\int d^3\vec{\xi} I(\vec{\xi})\left(-\frac{\alpha(h-a)+4k_{off}ah}{\sqrt{\eta}}+h+a\right)e^{\lambda_3(\vec{\xi})\tau}, \end{aligned} \tag{1.34}$$

donde $G_{o_S} = \frac{[P_b]^2_{(eq)}}{V_{obs}[P_T]^2[S_T]}$ y $\tau_S = \frac{w_r^2}{4D_S}$. De estas tres componentes, la única que tiene una expresión análitica es la asociada a λ_1, que depende del tiempo como la ACF de un conjunto de moléculas difundiendo libremente con el coeficiente de difusión de los sitios de ligadura, D_S. Las componentes $G_1(\tau)$ y $G_2(\tau)$ no están asociadas a autovectores y autovalores que puedan expresarse en forma sencilla en un caso general. En [Sigaut et al., 2010] se estudió el límite de "reacciones rápidas" en el que es posible obtener una aproximación analítica para $G_1(\tau)$ y $G_2(\tau)$. Esta aproximación consiste en suponer que las reacciones ocurren en una escala de tiempo mucho más rápida que la asociada a la difusión de las moléculas dentro del volumen de observación. En ese límite los autovalores λ_2 y λ_3 pueden aproximarse como:

$$\begin{aligned} \lambda_2 &\simeq -D_{coll}\xi^2, \\ \lambda_3 &\simeq -\nu - D_{ef2}\xi^2, \end{aligned} \tag{1.35}$$

donde $\nu = (a+h)k_{off}$, $D_{ef2} = \frac{a/hD_f+D_s}{a/h+1}$ y D_{coll} es el coeficiente efectivo colectivo definido en (1.21) con $[S] = [S]_{(eq)}$. Estas expresiones se pueden obtener a partir de (1.32) tomando el límite $\xi^2 \to 0$. Más rigurosamente, definiendo los tiempos característicos de reacción como $\tau_r = \nu^{-1}$ y de difusión como $\tau_{D_i} = \frac{w_r^2}{4D_i}$, el límite de reacciones rápidas se satisface si $\tau_r \ll \tau_{D_i}$. Por lo tanto, $w_r^2 \gg \frac{D}{\nu}$, condición que se cumple cuando $\xi \to 0$. En

este límite resulta:

$$
\begin{aligned}
G_1(\tau) =& \frac{G_{o_S}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_S}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_S}}}, \\
G_2(\tau) \simeq& \frac{G_{o_{coll}}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{coll}}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_{coll}}}}, \\
G_3(\tau) \simeq& 0,
\end{aligned}
\tag{1.36}
$$

con $G_{o_{coll}} = \frac{[P_f]_{(eq)}}{V_{obs}[P_T]^2}\left(1+\frac{[S]^2_{(eq)}}{K_D[S_T]}\right)$ y $\tau_{coll} = \frac{w_r^2}{4D_{coll}}$. Por lo tanto la ACF en el límite de reacciones rápidas se puede aproximar como la suma de dos componentes difusivas, una asociada al coeficiente de difusión de las trampas D_S y otro al coeficiente efectivo, D_{coll}, de la Eq. (1.21) con $[S]$ la concentración de trampas libres en el equilibrio. En [Sigaut et al., 2010] se estudió también el caso en que no todas las partículas son fluorescentes, sino que hay una fracción, f, de las mismas que permanecen "oscuras". Procediendo como en el caso anterior se obtuvo una ACF que es la suma de tres componentes difusivas, una asociada a D_S, otra asociada a D_{coll} y una tercera asociada al coeficiente de difusión efectivo de molécula única definido en (1.21). Este cálculo se explica en más detalle en el Capítulo 3. En [Sigaut et al., 2014] se usaron estas aproximaciones a la ACF para interpretar los resultados de experimentos de FCS presentados en [Abu-Arish et al., 2010] donde se estima el coeficiente de difusión de Bicoid en embriones de la mosca *D. melanogaster*. Para tal fin se supuso que Bcd interactuaba con sitios de ligadura de acuerdo al esquema (1.12) con $P = Bcd$. Asociando los 3 tiempos de correlación obtenidos en [Abu-Arish et al., 2010] con los de los coeficientes de difusión de trampas y los efectivos, D_{sm} y D_{coll}, se pudieron estimar los coeficientes libres, D_S y D_f, concentraciones y la constante de disociación de la reacción (1.12). Más aún, este modelo permitió explicar de un modo unificado los valores aparentemente disímiles para la difusión de Bicoid determinados usando FCS [Abu-Arish et al., 2010] y FRAP [Gregor et al., 2007a]. En el Capítulo 5 se estudian las consecuencias que tiene un modelo en donde Bcd difunde e interactúa con sitios sobre la formación y observación de su gradiente.

1.4.2 Límites físicos a la lectura endógena de concentraciones en un medio fluctuante

Muchos procesos celulares dependen de la lectura de concentración de algún agente para dar una determinada respuesta. Para ello la célula cuenta con mecanismos que le permiten estimar la concentración en sus alrededores o en su interior. Una manera de estimar la concentración es sensando el grado de ocupación de receptores capaces de ligar a las moléculas de este agente. En ciertas situaciones la concentración del agente es muy pequeña, siendo muy poca la cantidad de moléculas alrededor de los receptores y sus fluctuaciones estadísticas muy grandes. Sin embargo las células, en estos casos, pueden responder con gran precisión frente al entorno fluctuante. En [Berg and Purcell, 1977], y luego en [Bialek and Setayeshgar, 2005, Kaizu et al., 2014], se estudiaron las limitaciones que impone la física sobre la precisión en la determinación de la concentración de agentes mediante receptores ligantes. En particular, en [Berg and Purcell, 1977] se considera el caso de un microorganismo que necesita determinar la concentración en su entorno de moléculas de un ligando, X, para lo cual cuenta con un receptor capaz de ligar a las moléculas de X. Se compara la medición que puede derivarse del estado de ocupación del receptor con la situación ideal en la que la célula puede contar instantáneamente el número de moléculas, $N(t)$, de X que se encuentran dentro de la región de interacción del receptor, de volumen V. El número, $N(t)$, es una variable aleatoria, ya que las moléculas de X pueden entrar y salir del volumen debido a la difusión. En esta situación ideal se puede estimar el número de moléculas dentro de V luego de un tiempo de observación, T_{obs}, como:

$$\overline{N}(T_{obs}) = \frac{1}{T_{obs}} \int_0^{T_{obs}} dt N(t). \tag{1.37}$$

En condiciones estacionarias, a medida que el tiempo de observación, T_{obs}, aumenta, $\overline{N}(T_{obs})$ convergerá a su valor medio, $\langle N \rangle$, que se relaciona con la concentración del ligando, c, como $c = \langle N \rangle / V$. La varianza de $\overline{N}(T_{obs})$ da una medida del error que se comete si se usa $\overline{N}(T_{obs})$ para estimar $\langle N \rangle$:

$$\text{var}\left(\overline{N}(T_{obs})\right) = \left\langle \left(\overline{N}(T_{obs}) - \langle N \rangle\right)^2 \right\rangle. \tag{1.38}$$

La varianza del promedio se relaciona directamente con la función de autocorrelación [Berg and Purcell, 1977]

$$G(\tau) = \left\langle \left(\overline{N}(t) - \langle N \rangle\right) \left(\overline{N}(t+\tau) - \langle N \rangle\right) \right\rangle, \tag{1.39}$$

mediante:

$$\mathrm{var}\left(\overline{N}(T_{obs})\right) = \frac{1}{T_{obs}^2} \int_0^{T_{obs}} dt' \int_0^{T_{obs}} dt G(t'-t). \tag{1.40}$$

Vale aclarar que la definición de la ACF de la ecuación (1.39) carece del factor de normalización, $\langle N \rangle^2$, que se incluye en la expresión utilizada para el caso de FCS. Teniendo en cuenta que $G(\tau)$ es una función par, si se supone que T_{obs} es mucho mayor que todos los tiempos de correlación que caracterizan a G, la Eq. (1.40) puede aproximarse por:

$$\mathrm{var}\left(\overline{N}(T_{obs})\right) \approx \frac{2}{T_{obs}} \int_0^{\infty} d\tau G(\tau). \tag{1.41}$$

En general puede obtenerse una expresión analítica para la integral de esta ecuación aun cuando no se la tenga para G. En particular, en el caso ideal del ligando que difunde libremente con D resulta [Berg and Purcell, 1977]:

$$\frac{\Delta N}{\langle N \rangle} \equiv \left(\frac{\mathrm{var}\left(\overline{N}(T_{obs})\right)}{\langle N \rangle^2} \right)^{1/2} = \frac{1}{\sqrt{5/3\pi D a c T_{obs}}}, \tag{1.42}$$

donde se consideró un volumen $V = 4/3\pi a^3$. Teniendo en cuenta que este cálculo corresponde a la situación ideal en que todas las moléculas de X que entran en V son "contadas", la ecuación (1.42) define una cota inferior para la precisión en la determinación de la concentración, $c = \langle N \rangle / V$, de X.

En [Berg and Purcell, 1977] también se estudia con qué error se infiere la concentración de X a partir de "medir" el estado de ocupación de un receptor que lo liga. Si se asume un volumen de observación que encierra a un único receptor, definiendo la variable aleatoria, $N^{(b)}$, como el número de sitios ocupados (o, equivalentemente, de partículas ligadas) en dicho volumen, $N^{(b)}$ puede tomar sólo dos valores: 1 si el receptor está ligado a X y 0 si está libre. La probabilidad estacionaria de que el receptor esté ocupado, $f_b \equiv \langle N^{(b)} \rangle$, es el valor que se vincula con $[X]$. Identificando al receptor con la especie S en el esquema (1.12) y a X con P_f, f_b se relaciona con la concentración de

equilibrio de X, c, mediante (ver *e.g.* las Eqs. (1.16)):

$$f_b = \frac{c}{c + K_D}. \tag{1.43}$$

Suponiendo que una molécula de X se liga al receptor apenas queda a una distancia a de éste y teniendo en cuenta que el número medio de moléculas de X que llegan a esta distancia por unidad de tiempo es $\sim cDa$, en [Berg and Purcell, 1977] obtienen:

$$\frac{\delta f_b}{f_b} \equiv \frac{\sqrt{\mathrm{var}\,(N^{(b)})}}{f_b} = \sqrt{\frac{(1 - f_b)}{2aDcT_{obs}}}, \tag{1.44}$$

en el límite en que el tiempo de observación T_{obs} es suficientemente grande (ver más adelante). La incerteza en la concentración de ligando, c, se puede obtener propagando el error en f_b dado por (1.44) a través de la Eq. (1.43). Se obtiene [Berg and Purcell, 1977]:

$$\frac{\delta c}{c} = \frac{dc}{df_b}\frac{\delta f_b}{c} = \frac{1}{\sqrt{2acD(1 - f_b)T_{obs}}}. \tag{1.45}$$

La expresión (1.45) no tiene en cuenta que las moléculas pueden llegar al receptor y no ligarse, ni tampoco que una molécula que se disocia del receptor se puede volver a ligar.

En [Bialek and Setayeshgar, 2005] se busca generalizar el resultado de [Berg and Purcell, 1977] incorporando la dinámica de pegado y despegado entre el receptor y X suponiendo un esquema de reacción como el de la Eq. (1.12). Linealizando el sistema de ecuaciones no-lineal de reacción-difusión correspondientes y usando el teorema de fluctuación-disipación en [Bialek and Setayeshgar, 2005] se obtiene:

$$\frac{\delta c}{c} = \sqrt{\frac{1}{\pi acDT_{obs}} + \frac{2}{k_{off} f_b T_{obs}}}, \tag{1.46}$$

donde a es el radio de interacción entre el receptor y el ligando. A diferencia de la expresión (1.45) [Berg and Purcell, 1977], la ecuación (1.46) tiene dos términos, el primero asociado a la llegada estocástica de las moléculas de X a la vecindad del receptor y el segundo asociado a la estocasticidad de la reacción. El primer término de la ecuación (1.46) difiere respecto del obtenido en [Berg and Purcell, 1977]. Por un lado existe una diferencia menor debida a la distinta geometría considerada en cada problema. Por otro lado hay un factor $1 - f_b$ de diferencia que puede llegar a ser

significativo dependiendo del valor de f_b. Este resultado deja la pregunta abierta de cuál es la expresión que describe adecuadamente la precisión con que pueden determinarse las concentraciones. En [Kaizu et al., 2014] se hace una revisión de los resultados obtenidos en [Berg and Purcell, 1977, Bialek and Setayeshgar, 2005]. Siguiendo el abordaje de [Agmon and Szabo, 1990] para el caso de reacciones limitadas por difusión obtienen:

$$\frac{\delta c}{c} = \sqrt{\frac{1}{2\pi acD(1-f_b)T_{obs}} + \frac{2}{k_{off} f_b T_{obs}}}. \tag{1.47}$$

Esta expresión tiene dos términos como la Eq. (1.46), el asociado a las reacciones es idéntico al hallado en [Bialek and Setayeshgar, 2005] mientras que el de difusión es similar al encontrado en [Berg and Purcell, 1977], es decir, difiere en el factor $1 - f_b$ respecto del de [Bialek and Setayeshgar, 2005]. Independientemente de estas diferencias, las expresiones derivadas en estos tres trabajos son válidas para tiempos de observación mucho mayores que el tiempo de correlación promedio del problema, τ_N, definido por:

$$\tau_N = \frac{1}{\mathrm{var}(N)} \int_0^\infty G(t)dt, \tag{1.48}$$

donde G es la función de autocorrelación dada por la ecuación (1.39) y N es el número de moléculas de la especie en interés (las del ligando en el caso en que se obtiene la Eq. (1.42) y $N^{(b)}$ en el de la Eq. (1.45)). En el caso tratado en [Berg and Purcell, 1977, Bialek and Setayeshgar, 2005, Kaizu et al., 2014], de un receptor único que liga un agente o ligando, X, se puede reescribir la expresión de la incerteza en la concentración, c, del ligando a partir del tiempo de correlación promedio como:

$$\frac{\delta c}{c} = \frac{f_b}{c}\frac{dc}{df_b}\sqrt{\frac{2\tau_{f_b}}{T_{obs}}}, \tag{1.49}$$

con τ_{f_b} dado por la ecuación (1.48) con $N = N^{(b)}$. De esta última expresión se puede ver que las diferencias entre las expresiones de Berg (1.45), Bialek (1.46) y Kaizu (1.47) se deben a diferencias en el cálculo del tiempo de correlación promedio del sistema receptor-ligando.

1.5 Motivaciones y preguntas

Esta Tesis tiene como objetivo estudiar y desarrollar modelos que permitan extraer información cuantitativa a partir de experimentos de microscopía de fluorescencia realizados en células y organismos vivos. Más específicamente, se enfoca sobre métodos de análisis que explotan las fluctuaciones para extraer dicha información. En particular, se estudia el rol de las reacciones y la difusión sobre las fluctuaciones y de qué modo impactan en la cuantificación e interpretación de los resultados experimentales. Para tal fin se usa un sistema modelo sencillo con un único tipo de partículas que difunde y reacciona con sitios de ligadura más masivos que difunden más lentamente o permanecen inmóviles. Este modelo sencillo es aplicable a los dos problemas biofísicos que se abordan con más detalle en la Tesis, el de la distribución de la proteína Bicoid en embriones de mosca y el de las señales intracelulares de Ca^{2+}.

La primera parte de la Tesis se enfoca sobre la técnica de FCS. En el Captítulo 2 se analiza qué información es posible extraer, a partir de esta técnica, en un sistema donde moléculas fluorescentes difunden e interactúan con sitios de ligadura o trampas, más allá del límite de reacciones rápidas estudiado en [Sigaut et al., 2010]. Se intenta determinar qué parámetros se obtienen cuando se realiza un ajuste de la función de autocorrelación, ACF, de la fluorescencia usando distintas expresiones. Por un lado, se estudia cuáles son las que describen más adecuadamente la ACF. Por el otro, se analiza cómo se interpretan los parámetros obtenidos a partir de los ajustes en términos de los parámetros biofísicos del sistema como los coeficientes de difusión, las concentraciones de las diferentes especies y las constantes de reacción. En el Capítulo 3 se continúa estudiando la técnica de FCS cuando es aplicada a sistemas de reacción-difusión analizando de qué modo la ACF varía dependiendo de si los sitios de ligadura difunden o están inmóviles. Se encuentra que en el caso de sitios inmóviles las especies del sistema están correlacionadas, correlación que desaparece apenas los sitios difunden. Es decir, el límite de difusión nula es singular lo que hace que la ACF pueda variar en una cantidad finita relevante dependiendo de si los sitios difunden o no. Se estudia, por otro lado, cómo es posible estimar concentraciones a partir de los pesos de la ACF y de qué modo

estas estimaciones se ven afectadas dependiendo de la difusión de los sitios de ligadura. Luego, teniendo en cuenta que los experimentos se realizan durante un tiempo finito de observación se estudia con qué precisión es posible obtener parámetros biofísicos a partir de ajustar la ACF experimental dependiendo de este tiempo. Se encuentra que para estimar concentraciones a partir de los pesos con una precisión del 10-20 %, el tiempo de observación debe ser órdenes de magnitud mayor que los tiempos de correlación.

Los resultados previos junto con las observaciones de sistemas biológicos que son capaces de "leer" pequeños cambios en las concentraciones de moléculas efectoras en ambientes fluctuantes llevan a la pregunta de cuál es el cambio mínimo en la concetración que puede ser leído por un mecanismo celular endógeno en un tiempo dado de observación. En el capítulo 4 se avanza en la respuesta a esta pregunta. En particular, en base a los resultados de los Capítulos anteriores, se estudia el problema en el marco de una sustancia efectora que difunde y reacciona con los sitios que "leen" su concentración. Al calcular la precisión en la concentración en términos de la varianza en el número de moléculas promedio, y teniendo en cuenta que dicha varianza puede escribirse como una integral de la ACF del número de moléculas de cada especie, y que, además, se cuenta con expresiones analíticas para la ACF en dos límites opuestos, es posible obtener expresiones para el error que son válidas para todo tiempo de observación, y no sólo para tiempos largos como en [Berg and Purcell, 1977, Bialek and Setayeshgar, 2005, Kaizu et al., 2014]. Por otro lado, la habilidad de relacionar la precisión con la varianza del número de moléculas de cada especie, permite incorporar efectos debidos a la relación no lineal entre las distintas especies, que podrían explicar la co-existencia de una actividad transcripcional instantánea altamente fluctuante y una rápida convergencia de la concentración de ARN a valores relativamente precisos.

La posibilidad de pasar, en experimentos de FCS, de parámetros de ajuste a parámetros de un modelo biofísico permitió describir resultados aparentemente contradictorios sobre la difusión de la proteína Bicoid (Bcd) en el marco de un modelo unificador [Sigaut et al., 2014]. Esta descripción unificada supone que Bicoid, proteína fundamental para el establecimiento del eje antero-posterior en embriones de *D. melanogaster*, no sólo difunde sino que también reacciona con sitios de ligadura dentro del embrión.

En el Capítulo 5 se estudia de qué modo un modelo de este tipo impacta sobre la interpretación de los experimentos de fluorescencia en los que se observa la distribución de Bcd y de la de la proteína, Hunchback, de la que Bcd es factor de transcripción. Motivados en las controversias sobre cuáles son los mecanismos que determinan las propiedades del gradiente de Bcd en embriones, en este Capítulo se estudia también la dinámica espacio-temporal de Bcd en un modelo (SDID) que incluye su síntesis en un extremo, su difusión, la interacción con sitios y su degradación. Se muestra que, usando los parámetros derivados en [Sigaut et al., 2014], es posible obtener una distribución con una escala espacial similar a la experimental dentro de los tiempos observados experimentalmente. Se estudia también qué coeficiente de difusión efectivo de Bcd da una mejor estimación de la longitud característica y del tiempo de formación del gradiente de esta proteína clave en la vida del embrión.

En el Capítulo 6 se analiza el modelo introducido en [Piegari et al., 2014] para describir las fluctuaciones de fluorescencia en experimentos donde se obtienen imágenes de Ca^{2+} usando fluoróforos de longitud de onda única. El modelo fue desarrollado para ser usado en combinación con una serie de experimentos de calibración y así poder estimar *a priori* la relación señal-ruido esperada durante la observación de señales intracelulares de Ca^{2+}. Una calibración de este tipo brinda la posibilidad de comparar distintas condiciones experimentales en términos de su habilidad para detectar señales y así elegir parámetros experimentales óptimos. El modelo, por otro lado, combinado con simulaciones numéricas de la dinámica del Ca^{2+} intracelular, permite generar imágenes numéricas de señales de Ca^{2+} con ruido realista. En el Capítulo 6 se estudia la validez del modelo propuestos y su posible aplicación para cuantificar parámetros biofísicos y bioquímicos.

Finalmente en el capítulo 7, se presentan las conclusiones generales de la tesis y las perspectivas de trabajo futuro.

2

Interpretación de resultados de FCS en sistemas de reacción difusión - límites de reacciones rápidas y difusión rápida

En los experimentos de Espectroscopía por Correlación de Fluorescencia (FCS) se observan y caracterizan las fluctuaciones de la fluorescencia emitida desde un pequeño volumen en una muestra biológica. A partir de las observaciones se derivan tiempos de correlación que, combinados con algún modelo, brindan estimaciones de algunos de los parámetros que caracterizan a los procesos que subyacen a las observaciones. Para poder derivar dichos tiempos es necesario ajustar la función de auto-correlación

(ACF), idealmente, usando una expresión algebraica sencilla. En la Introducción se mostró que cuando las moléculas fluorescentes difunden y reaccionan la ACF predicha por la teoría tiene una expresión integral que puede aproximarse por una expresión algebraica si los tiempos que caracterizan a las reacciones son muchos menores que los de la difusión en el volumen de observación. En este Capítulo se analizan en detalle las condiciones bajo las cuales esta aproximación de "reacciones rápidas" es válida. Se analiza también el límite contrario, de "difusión rápida", y se estudia de qué modo se modifican los tiempos de correlación al ir de uno a otro límite. Se proponen finalmente estrategias experimentales que permitan explorar uno y otro límite y así extraer mayor información sobre los procesos dinámicos que caracterizan a los sistemas bajo estudio.

2.1 FCS en sistemas de reacción difusión: del límite de reacciones rápidas al de difusión rápida.

En este Capítulo se considera el sistema de partículas que difunden con coeficiente D_f y reaccionan de acuerdo al esquema (1.12) con sitios de ligadura, S, que difunden con coeficiente D_S descripto en la Introducción. Los tiempos de reacción y difusión son, respectivamente, $\tau_r \equiv k_{off}^{-1}(1 + [P_f]_{(eq)}/K_D + [S]_{(eq)}/K_D)^{-1}$ y $\tau_{D_i} \equiv \frac{w_r^2}{4D_i}$ $(i = f, S)$. La ACF de este sistema cuando todas las partículas libres, P_f, y ligadas, P_b, son igualmente fluorescentes está dada por:

$$G(\tau) = G_1(\tau) + G_2(\tau) + G_3(\tau), \tag{2.1}$$

con las componentes G_i definidas en las Eqs. (1.34). Sólo la primera componente tiene una expresión analítica sencilla.

2.1.1 Límite reacciones rápidas

En el límite de reacciones rápidas, $\tau_r \ll \tau_{D_i}$, las componentes de la ACF pueden aproximarse por las Eqs. (1.36). Este límite corresponde a una situación en la que las partículas, P_f, al atravesar el volumen de iluminación, reaccionan varias veces antes de abandonarlo. Por lo tanto, una manera de alcanzar este límite es aumentando el

volumen de observación. Aumentar el volumen de observación permite hacer más largos los tiempos característicos de la difusión, logrando así que se cumpla la condición de que las reacciones deben ocurrir en una escala temporal más rápida. Claro que aumentar el volumen de iluminación no es siempre viable, dado que se aumenta el número de moléculas fluorescentes y las fluctuaciones se vuelven menores. Otra manera de alcanzar este límite es aumentando la concenctración de las especies. Es interesante notar que, debido a que los coeficientes efectivos de difusión dependen de las concentraciones, cambiar la concentración de alguna de las especies en un experimento puede ser una manera de comprobar si el límite de reacciones rápidas se satisface.

2.1.2 Límite de difusión rápida

En el caso en que los tiempos característicos de la difusión son mucho más rápidos que los de la reacción, $\tau_{D_i} \ll \tau_r$, el sistema se encuentra nuevamente en un régimen límite al que se define como de *difusión rápida*. Este límite, opuesto al de reacciones rápidas, tiene la particularidad de que la ACF del sistema también puede ser expresada en forma analítica. Para hallar su expresión, se calculan los autovalores dados por las ecuaciones (1.32) cuando $\xi^2 \to \infty$,

$$\begin{aligned} \lambda_2 &\simeq -D_S\xi^2, \\ \lambda_3 &\simeq -D_f\xi^2. \end{aligned} \tag{2.2}$$

Ambos autovectores corresponden al tipo difusivo dando lugar a componentes que tienen la forma de la ecuación (1.23). Dado que λ_1 y λ_2 son iguales en este límite, sus componentes asociadas se unen formando una sola componente. Por lo tanto, integrando las ecuaciones (1.34), la ACF se escribe,

$$G(\tau) \simeq \frac{G_{o1}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_S}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_S}}} + \frac{G_{o2}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_f}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tau_f}}}, \tag{2.3}$$

donde $G_{o1} = \frac{[P_b]_{(eq)}}{V_{eff}[P_V]^2}$, $G_{o2} = \frac{[P_b]_{(eq)}}{V_{eff}[P_V]^2}$, $\tau_s = w_r^2/(4D_S)$ y $\tau_f = w_r^2/(4D_f)$.

Concluimos entonces que en los límites de difusión rápida y de reacciones rápidas se tienen expresiones analíticas para la ACF, las cuales permiten ajustar observaciones experimentales y cuantificar parámetros biofísicos. Si bien la forma funcional de la

expresión de la ACF en ambos límites es la misma, lo que cambia es la relación de los parámetros de ajuste (los tiempos de correlación y los pesos de las componentes) con los parámetros biofísicos (los coeficientes de difusión, las concentraciones y las tasas de reacción). Por lo tanto, para hacer una correcta interpretación de los parámetros del ajuste es necesario saber en cuál de los límites se encuentra el sistema observado. Por otro lado, el sistema podría encontrarse en un régimen intermedio, en el que la ACF no tiene una expresión análitica.

2.2 Cuantificación de parámetros mediante el ajuste de la ACF

2.2.1 Cómputo de la ACF numérica

Para explorar la función de autocorrelación fuera del límite de reacciones rápidas y de difusión rápida se integró numéricamente la ecuación (1.30) variando un parámetro que permita cambiar la relación de las escalas temporales de difusión y reacción. Esta función, que se obtuvo de la integración númerica, es denominada *ACF numérica*, dado que es la solución exacta de la función de autocorrelación para el sistema de ecuaciones (1.15). Los parámetros usados fueron extraídos en [Sigaut et al., 2010], a partir de mediciones de la concentración de Bcd-eGFP realizadas en embriones de *D. melanogaster* usando FCS [Abu-Arish et al., 2010] y se muestran en la tabla 2.1. El parámetro que se utilizó para ir de un límite al otro fue k_{off}, ya que en el análisis de [Abu-Arish et al., 2010] no hay información precisa sobre su valor. Dado que el tiempo de reacción depende de k_{off}, es posible ir de un límite a otro variando este parámetro. Si k_{off} es pequeño, las reacciones son lentas, y los tiempos difusivos dominan la dinámica, correspondiendo al límite de difusión rápida. En cambio, cuando k_{off} es grande, es probable que las moléculas reaccionen muchas veces mientras atraviesan el volumen de iluminación. Con lo cual, los coeficientes efectivos de difusión dominan la dinámica, correspondiendo al límite de reacciones rápidas. k_{off} se varió manteniendo constante K_D. Dado que K_D y el resto de los parámetros se mantienen constantes al ir de un límite al otro, los

Parámetros biofísicos	
D_f	$19\mu m^2 s^{-1}$
D_S	$0{,}38\mu m^2 s^{-1}$
$[P_T]$	$35nM$
$[S_T]$	$77nM$
K_D	$32nM$
k_{off}	$\in [10^{-4}s^{-1}, 10^5 s^{-1}]$
Parámetros iluminacón	
w_r	$0{,}4\mu m$
w	5
V_{eff}	$1{,}78\mu m^3$

Tabla 2.1: Parámetros usados para generar ACF numérica dada por las ecuaciones (1.34). La constante de disociación, k_{off}, se varía en el rango de valores que se muestra. El valor de k_{on} también varía, de manera de mantener K_D constante. Esto garantiza que los coeficientes de difusión efectivos se mantengan constantes e iguales a $D_{sm} = 7{,}3\mu m^2 s^{-1}$, $D_{coll} = 8{,}8\mu m^2 s^{-1}$ y $D_{ef2} = 10{,}6\mu m^2 s^{-1}$.

coeficientes de difusión efectivos no cambian, $D_{coll} = 8,8\mu m^2 s^{-1}$ y $D_{sm} = 7,3\mu m^2 s^{-1}$. Los tiempos de difusión tampoco cambian, los cuales son $\tau_f = w_r^2/(4D_f) = 2 \times 10^{-3}s$ y $\tau_S = w_r^2/(4D_S) = 0{,}1s$. Para valores de $k_{off} = [10^{-4} - 10^5]s$ los tiempos de reacción, $\tau_r = 1/(k_{off}(1 + [P_f]_{(eq)}/K_D + [S]_{(eq)}/K_D))$, varían entre $3{,}23 \times 10^{-6}s$ y $3{,}23 \times 10^3 s$ ($\tau_r = 0{,}32\, k_{off}^{-1}$). De manera que se garantiza que $\tau_r \gg \tau_{D_i}$ cuando k_{off} es pequeño, y $\tau_r \ll \tau_{D_i}$ cuando k_{off} es grande, de acuerdo con las condiciones para los límites de difusión y reacciones rápidas respectivamente. En la figura 2.1 se muestran la ACF numérica calculada a través de la integración numérica de la ecuación (1.30) para distintos valores de k_{off}. Ambos límites se ven claramente y están representados por la línea sólida ($k_{off} = 10^{-3}s^{-1}$) y la línea de trazos con puntos ($k_{off} = 10^5 s^{-1}$), que representan la difusión rápida y las reacciones rápidas, respectivamente. La discrepancia entre estas curvas se da para valores $10^{-4}s < \tau < 10s$, mientras que para el resto de los valores de τ se hacen indistinguibles. La líneas de trazos y la línea punteada, corresponden a valores de $k_{off} = 10s^{-1}$ y $k_{off} = 100s^{-1}$ respectivamente, los cuales no cumplen con ninguno de los dos límites.

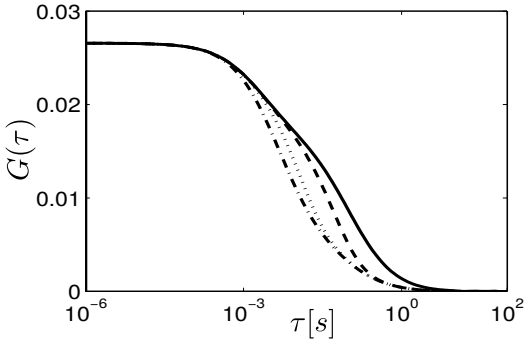

Figura 2.1: ACF numérica integrada usando los valores de los parámetros de la tabla 2.1 y $k_{off} = 10^{-3}s^{-1}$ (línea continua), $k_{off} = 10s^{-1}$ (línea a trazos), $k_{off} = 100s^{-1}$ (línea punteada) y $k_{off} = 10^{-5}s^{-1}$ (línea de trazos con punto). Las ACFs para $k_{off} \leq 1/s$ son práctimcamente indistinguibles de aquella con $k_{off} = 10^{-3}s^{-1}$. Algo similar pasa con aquellas con $k_{off} \geq 1000/s$ y $k_{off} = 10^{5}s^{-1}$. Estos comportamientos extremos están asociados a los dos límites: difusión rápida (k_{off} pequeño) y reacciones rápidas (k_{off} grande).

2.2.2 Ajuste de la ACF numérica con diferentes modelos

Se recuerda que en los experimentos de FCS se calcula la ACF a partir de las fluctuaciones de la fluorescencia y luego esta última es ajustada para obtener parámetros biofísicos y bioquímicos. La idea es que la ACF numérica, $G(\tau)$, cumpla el rol de la ACF medida en experimentos de FCS, y luego ajustarla con distintas funciones, $\tilde{G}(\tau)$, que son típicamente utilizadas en FCS, de manera de relacionar los parámetros que se obtienen del ajuste con parámetros biofísicos del problema.

Para el ajuste se consideran funciones que suelen ser usadas para analizar los datos obtenidos en experimentos de FCS. Primero se prueba con una superposición de dos términos del tipo difusivo, debido a que incluye los casos de difusión rápida y reacciones rápidas,

$$G(\tau) \approx \tilde{G}(\tau) = \sum_{i=1}^{2} \frac{\tilde{G}_{o_i}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tilde{\tau}_i}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2\tilde{\tau}_i}}} \tag{2.4}$$

donde $\tilde{G}_{o_i}$ y $\tilde{\tau}_i$ son los pesos y los tiempos del ajuste. De los tiempos $\tilde{\tau}_i$ es posible derivar coeficientes de difusón $\tilde{D}_i = w_r^2/4\tilde{\tau}_i$ para luego compararlos con los coeficientes libres o efectivos del sistema.

Luego, motivado en el tercer autovalor en el límite de reacciones rápidas, $\lambda_3 = \nu + D_{ef2}\xi^2$, se ajustó con un expresión que incorpora una nueva componente que tiene un término tipo difusivo multiplicado por una función exponencial decayendente,

$$G(\tau) \approx \tilde{G}(\tau) = \frac{\tilde{G}_{o_1}}{\left(1+\frac{\tau}{\tilde{\tau}_1}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tilde{\tau}_i}}} + \frac{\tilde{G}_{o_2}}{\left(1+\frac{\tau}{\tilde{\tau}_2}\right)\sqrt{1+w^2\frac{\tau}{w^2\tilde{\tau}_2}}} + \frac{\tilde{G}_{o_3}}{\left(1+\frac{\tau}{\tilde{\tau}_3}\right)\sqrt{1+\frac{\tau}{w^2\tilde{\tau}_3}}}e^{-\tilde{\nu}\tau}. \tag{2.5}$$

Este tipo de solución para la ACF fue utilizada en [Bismuto et al., 2001] donde también se estudia un sistema de una especie fluorescente que difunde y reacciona.

También se probó el ajuste con un modelo similar a los anteriores, en el que, además, se considera que la difusión puede ser anómala. Debido a que los resultados no se distinguían de los correspondientes a los modelos (2.4) y (2.5), no se incluyen en lo que sigue.

Para el ajuste se minimizó $|G - \tilde{G}|$ mediante un método de cuadrados mínimos no lineal usando la rutina *lsqcurvefit* de MATLAB [MATLAB, 2010]. Los resultados del ajuste fueron analizaron mediante el cálculo de χ^2,

$$\chi^2 = \sum_j \left(G(t_j) - \tilde{G}(t_j)\right)^2, \tag{2.6}$$

donde t_j son los tiempos para los cuales se calculó el valor de G. Dado que la gran cantidad de tiempos t_j para los cuales fue evaluada la funcion G, los grados de libertad entre los distintos modelos prácticamente no cambian.

En la tablas 2.2-2.3 se muestran los resultados de los ajustes usando ambos modelos dados por las ecuaciones (2.4)-(2.5) respectivamente, para diferentes valores de k_{off}. El valor de χ^2 se muestra como referencia para evaluar la calidad del ajuste. Los pesos $\tilde{G}_{oi}$ se muestran como la fracción total de $\tilde{G}_o$. En la figura 2.2 se muestran las diferencias entre la ACF numérica y los ajustes. Como se puede ver en la figura 2.2(a), la diferencia entre la ACF numérica y el ajuste usando la ecuación (2.4) es despreciable para valores grandes y pequeños de k_{off}, ($k_{off} \gg 100/s$ and $k_{off} \ll 10/s$, respectivamente). Para valores intermedios, $10/s \leq k_{off} \leq 100/s$, los ajustes no son tan buenos, aunque de cualquier manera, las diferencias nunca superan el 10 % en la región más relevante de τ

$k_{off}[\frac{1}{s}]$	$\frac{\chi^2}{10^{-8}}$	$\tilde{D}_1[\frac{\mu m^2}{s}]$	$\tilde{D}_2[\frac{\mu m^2}{s}]$	$\frac{\tilde{G}_{o_1}}{\tilde{G}_o}$	$\frac{\tilde{G}_{o_2}}{\tilde{G}_o}$
0,0001	1,26	0,38	18,95	0,63	0,37
0,001	1,28	0,38	18,96	0,63	0,37
0,01	1,70	0,38	19,00	0,63	0,37
0,1	18,0	0,40	19,43	0,64	0,36
1	320	0,50	22,31	0,67	0,33
5	645	0,82	27,92	0,72	0,28
10	495	1,08	30,96	0,75	0,25
25	177	1,59	33,10	0,79	0,21
50	249	2,00	28,20	0,79	0,21
100	587	1,16	7,82	0,39	0,61
250	126	0,31	6,36	0,14	0,86
500	320	0,31	7,10	0,15	0,85
1000	7,37	0,33	7,71	0,16	0,84
10000	0,73	0,37	8,57	0,18	0,82
100000	0,41	0,38	8,68	0,18	0,82

Tabla 2.2: Parámetros obtenidos usando la expresión (2.4) para ajustar la ACF numérica para distintos valores de k_{off} junto con su correspondiente valor de χ^2. Mientras más pequeño χ^2 mejor es el resultado del ajuste. En el límite de las reacciones rápidas, $k_{off} > 100s^{-1}$, los parámetos obtenidos concuerdan con los de [Sigaut et al., 2010]. En el límite de difusión rápida, $k_{off} \leq 10^{-1}s^{-1}$, los coeficientes de difusión estimados son similares a los coeficientes de difusión de las especies libres, $D_f = 19\mu m^2/s$ y $D_S = 0{,}38\mu m^2/s$.

($\tau \leq 0{,}1s$). Si se observan los valores de los parámetros ajustados (table 2.2), se ve una transición en la medida que k_{off} crece, de una situación en donde uno de los coeficientes de difusión es $\tilde{D}_2 \sim 19\mu m^2/s$ a otra situación en la cual éste resulta $\tilde{D}_2 \sim 8{,}5\mu m^2/s$. $\tilde{D}_1$ no varía significativamente, $\tilde{D}_1 \sim 0{,}4\mu m^2/s$, para la mayoría de los valores de k_{off}. $\tilde{D}_1$ corresponde al coeficiente de difusión de las trampas, $D_S = 0{,}38\mu m^2/s$. Para valores grandes de k_{off} (*i.e.* para reacciones rápidas), $\tilde{D}_2 \approx D_{coll} = 8{,}8\mu m^2$. Tanto los tiempos, $\tilde{\tau}_i$, como los pesos, $\tilde{G}_{oi}$, estimados del ajuste concuerdan con las predichos analíticamente en el límite de reacciones rápidas (1.36). Para valores pequeños de k_{off}, $\tilde{D}_2 \approx D_f = 19\mu m^2/s$, el coeficiente de difusión de las moléculas libres. En este caso,

se recupera la aproximación de la ACF para el límite de difusión rápida (2.3). Entre los límites, los coeficientes de difusión que se obtienen del ajuste no se parecen ni a los libres ni a los efectivos. $\tilde{D}_1$ difiere un factor 3 con respecto al coeficiente de las trampas, D_S, mientras $\tilde{D}_2$ se mantiene un poco más parecido a D_f o D_{coll}. El régimen en el que el sistema más difiere de los modelos de ajuste, se da para $k_{off} = 10/s$, en el cual $\tilde{D}_2$ es 1.5 veces más grande que D_f. Este valor de k_{off} corresponde a $\tau_r \approx 0{,}03s$ el cual es del orden del valor de τ_f que es obtenido cuando se usa la longitud de escala más larga del volumen de iluminación ($\tau_f = (ww_r)^2/(4D_f) = 0{,}05s$).

Los ajustes con el modelo dado por la ecuación (2.5) da muy pequeñas diferencias a lo largo de los distintos valores de k_{off}, como se puede ver en la figura 2.2 (b). Para $k_{off} \geq 10^4/s$ los pesos de la componente con parte exponencial, G_{o_3}, son cero, y el ajuste coincide con el primer modelo (2.4). Los coeficientes de difusión que se obtienen en este caso son el libre de las trampas D_S y el efectivo D_{coll}, como en el caso de las reacciones rápidas. Para $k_{off} \leq 0{,}1/s$, el peso $\tilde{G}_{o_1}$ se vuelve cero. De la tabla 2.3 se puede observar que para $k_{off} \leq 0{,}1/s$ el tiempo característio de decaimiento, $\tilde{\nu}^{-1}$, asociado a la tercer componente de la ecuación (2.5), es mucho más largo que los demás tiempos característicos ($\tilde{\nu}^{-1} \gg \tau_{max} = w_r^2/(4D_{min}) \sim 0{,}1s$). No solo eso, además se corresponde con el tiempo en la cual la ACF tiene un valor del 10 % de su máximo. Por lo tanto, $\exp(-\tilde{\nu}\tau) \approx 1$ para $\tau \leq 0{,}1s$ y la función de ajuste de la ecuación (2.5) se aproxima a la misma que en caso del otro modelo, dada por la ecuación (2.4) en la región relevante de τ. Los coeficientes de difusión obtenidos para $k_{off} \leq 0{,}1/s$ son aproximadamente iguales a los libres D_f and D_S. Para $0{,}1/s < k_{off} \leq 1000/s$, los ajustes con este modelo dan errores más pequeños que el primer modelo. De cualquier modo, no siempre los coeficientes de difusión ajustados pueden ser relacionados con los verdaderos del problema, los libres o los efectivos por ejemplo, si se comparan los valores obtenidos para $k_{off} = 1000/s$ con los de la tabla 2.1. Más aún, a pesar de que para $k_{off} \leq 1/s$ o $k_{off} \geq 10^4/s$ la ACF ajusta con un término puramente difusivo con un tiempo asociado al coeficiente de difusión D_S, ($\tilde{G}_3$ para $k_{off} \leq 0{,}1/s$ y $\tilde{G}_1$ para $k_{off} = 1/s$ y $k_{off} \geq 10^4/s$), ese mismo término no aparece para $10/s \leq k_{off} \leq 100/s$. Según la ecuación (1.34) ese término debería estar presente para todo valor de k_{off}.

Para $k_{off} \geq 10^4/s$ el ajuste da los mismos resultados que el caso previo (2.4) en el límite de reacciones rápidas con $\tilde{D}_1 \approx D_S$ y $\tilde{D}_2 \approx D_{coll}$.

k_{off}	$\frac{\chi^2}{10^{-9}}$	$\tilde{D}_1$	$\tilde{D}_2$	$\tilde{D}_3$	$\tilde{\nu}^{-1}$	$\frac{\tilde{G}_{o_1}}{\tilde{G}_o}$	$\frac{\tilde{G}_{o_2}}{\tilde{G}_o}$	$\frac{\tilde{G}_{o_3}}{\tilde{G}_o}$
0,0001	8,12	-	18,95	0,38	28,54	0,00	0,37	0,63
0,001	8,02	-	18,95	0,38	28,51	0,00	0,37	0,63
0,01	6,98	-	18,94	0,38	25,93	0,00	0,37	0,63
0,1	2,32	-	18,96	0,38	11,00	0,00	0,36	0,64
1	4,70	0,39	19,10	0,37	0,76	0,21	0,36	0,43
5	11,5	0,48	19,72	0,31	0,15	0,26	0,35	0,39
10	14,5	0,56	20,33	0,25	0,08	0,31	0,34	0,36
25	18,1	0,60	21,66	0,21	0,03	0,31	0,31	0,38
50	23,5	0,60	23,73	0,51	0,02	0,31	0,26	0,43
100	35,0	0,61	28,55	1,54	0,02	0,31	0,19	0,50
250	51,2	0,62	54,14	4,30	0,02	0,32	0,06	0,62
500	49,1	0,61	140,8	6,28	0,02	0,31	0,01	0,68
1000	33,3	0,34	4,42	9,30	0,01	0,15	0,53	0,31
10000	2,65	0,38	8,34	-	-	0,18	0,80	0,02
100000	2,60	0,38	8,53	-	-	0,18	0,81	0,01

Tabla 2.3: Similar a la tabla 2.2 pero usando la expresión (2.5) para ajustar la ACF numérica. Todas las cantidades están expresadas en las mismas unidades que las de la tabla 2.2.

2.2.3 Componentes de la ACF

Para entender la transición entre los límites de difusión rápida y reacciones rápidas se analiza qué pasa con las componentes de la ACF por separado. Para lo cual se integra numéricamente las ecuaciones (1.34) para distintos valores de k_{off}, de la misma manera que se hizo antes con la ecuación (1.30). De la misma manera que en el caso anterior de la ACF numérica, a las componentes integradas, $G_i(\tau)$, se las ajusta por expresiones tipo:

$$\tilde{G}_i(\tau) = \frac{\tilde{G}_{o_i}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tilde{\tau}_i}\right)\sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2\tilde{\tau}_i}}} e^{-\tilde{\nu}_i \tau}. \tag{2.7}$$

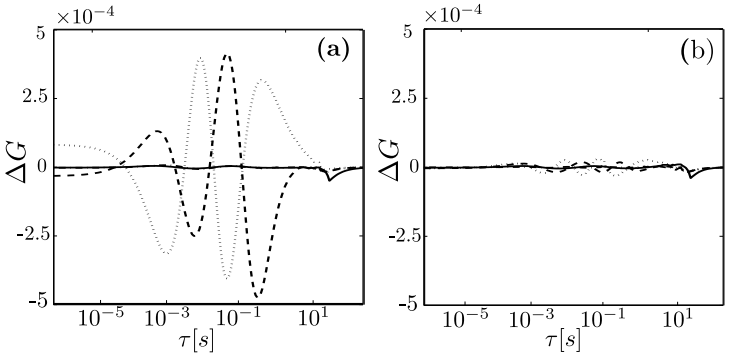

Figura 2.2: Diferencias, ΔG, entre la ACF numérica y los modelos aproximados utilizados para el ajuste para$k_{off} = 0{,}001/s$ (línea continua), $k_{off} = 10/s$ (línea a trazos), $k_{off} = 100/s$ (línea punteada) y $k_{off} = 10^5/s$ (línea de trazos y puntos). (a). El modelo dado por la ecuación (2.4). (b). El modelo dado por la ecuación (2.5). En todos los casos, ΔG es despreciable para valores pequeños y grandes de k_{off}, mientras que para valores intermedios, las diferencias se hacen considerables, aunque nunca exceden el 10 % de la ACF numérica para $\tau \leq 0{,}1s$.

Como se mostró anteriormente, cada componente está asociada a un autovalor diferente del problema linealizado (1.30) y por ende, a una escala temporal distinta. La componente $G_1(\tau)$ puede expresarse analíticamente, por lo que no es necesaria su integración numérica. Además, esta $G_1(\tau)$ no depende de k_{off}. Las componentes $G_2(\tau)$ y $G_3(\tau)$, en cambio, sí dependen de k_{off}. En la figura 2.3 se muestran las tres componentes para valores crecientes de k_{off} de (a) a (d). Mientras que en la figura 2.4 se muestran los tiempos ($\tilde{\tau}_i$ y $\tilde{\nu}_i^{-1}$) y los pesos ($\tilde{G}_i$), que resultan del ajuste para los distintos valores de k_{off} usando (2.7). Se observa que, en el límite de difusión rápida, que corresponde a la figura 2.3 (a), ambas componentes G_1 y G_2 tienen aproximadamente el mismo tiempo de correlación. Esto se puede verificar en la figura 2.4 (a), donde se ve que ambas componentes están caracterizadas por el mismo coeficiente de difusión, el cual se corresponde con el de las trampas libres D_S, ($\tilde{D}_1 \approx \tilde{D}_2 \approx D_S$) para $k_{off} \leq 1s^{-1}$. Por otro lado, el ajuste de la componente G_2, además de un tiempo asociado a la difusión 2.4 (a), tiene un decaimiento exponencial, que se puede observar en la figura 2.4 (b). Este tiempo característico asociado al decaimiento exponencial es por lo menos un orden de magnitud mayor que el difusión ($\tilde{\nu}_2^{-1} \geq 0{,}78s$ y $\tilde{\tau}_2 \sim 0{,}1s$ para $k_{off} \leq 1s^{-1}$). Con lo cual, el decaimiento de G_2 está dominado por la difusión. Esto se ve claramente

en la figura 2.3 (a) donde para $\tau \sim \tilde{\nu}_2^{-1}(k_{off} = 10^{-3}s^{-1}) = 250s$ el valor de G_2 ya es prácticamente despreciable. En el mismo sentido, algo similar pasa con G_3 para el cual $\tilde{\nu}_3^{-1} \geq 0{,}13s$ mientras $\tilde{\tau}_3 \sim 2{,}1\ 10^{-3}s$ para $k_{off} \leq 1s^{-1}$. Por lo tanto, para $k_{off} \leq 1s^{-1}$ el decaimiento de G_3 está dominado por la difusión y su tiempo característico asociado se corresponde con la difusión de las partículas libres $\tau_f = w_r^2/(4D_f)$, como se puede observar en la figura 2.4 (a). Teniendo en cuenta los ajustes de cada componentes por separado para el caso de $k_{off} \leq 1/s$, en conjunto se obtiene que la ACF es básicamente la suma de componentes puramente difusivas, asociadas a los coeficientes de difusión libres de las moléculas y las trampas. Lo que indica que el límite de difusión rápida se sostiene hasta valores de $k_{off} = 1/s$, para el cual $\tau_r = 0{,}32s$ mientras $\tau_f = w_r^2/(4D_f) = 2 \times 10^{-3}s$. El caso para $k_{off} = 10/s$ no es muy distinta, para el cual $\tilde{\nu}_2^{-1} = 0{,}12s$, $\tau_2 = 0{,}075s$, $\tilde{\nu}_3^{-1} = 0{,}016s$ y $\tau_3 = 0{,}002s$. Esto lleva a pensar que la ACF también puede ajustarse como la suma de dos componentes puramente difusivas asociadas a los coeficientes D_S y D_f. Sin embargo, si se tiene en cuenta el valor de χ^2 que se obtiene del ajuste de G_2, se ve que es mucho mayor al caso $k_{off} \leq 1/s$. De hecho, en el ajuste de la con dos componentes difusivas de la ACF numérica para $k_{off} = 10/s$, se ve que no converge a los coeficientes de difusión libres como se ve en la tabla 2.2. A medida que k_{off} crece, y las reacciones se vuelven más rápidas, el tiempo característico de decaimiento de G_2 disminuye (el coeficiente de difusión crece) mientras que el peso relativo de su componente, $\tilde{G}_{02}/\tilde{G}_o$, crece (ver figuras 2.3 (b)-(c) y figura 2.4). Para $k_{off} = 100/s$, el ajuste de cada componente por separado da términos que no son puramente difusivos. Es decir, tanto para G_2 como para G_3 el término del decaimiento exponencial se vuelve relevante, dado que sus tiempos característicos no son mucho mayores a los de tiempos asociados a la difusión ($\tilde{\nu}_2^{-1} = 6{,}7\ 10{-}2s$, $\tilde{\tau}_2 = 1{,}4\ 10^{-2}s$, $\tilde{\nu}_3^{-1} = 2{,}95\ 10^{-3}s$, $\tilde{\tau}_3 = 1{,}74\ 10{-}3s$). Por otro lado, a pesar de que $\tilde{D}_3 \approx D_f$, $\tilde{D}_2$, no se puede asociar a algún coeficiente relacionado con los parámetros biofísicos del sistema. Igualmente la calidad del ajuste no es bueno, lo que se puede ver en que el valor que toma χ^2 es mucho mayor que para el caso de $k_{off} \leq 1/s$. Para $k_{off} \geq 10^3s^{-1}$ el peso relativo $\tilde{G}_{o3}/\tilde{G}_o$ es despreciable, como se puede observar en las figuras 2.3 (d)-2.4 (d). Por otro lado, G_2 se ajusta bien por un término puramente difusivo ($\tilde{\tau}_2 \sim 5\ 10^{-3}$

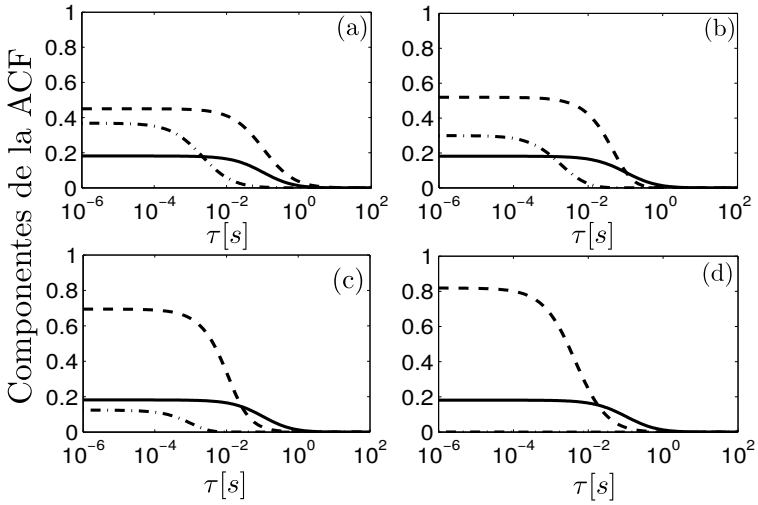

Figura 2.3: Componentes de la ACF numérica para diferentes valores de k_{off} normalizadas de manera que la suma de los pesos sea igual a 1, $G_o \equiv \sum_{i=1}^{3} .G_i(\tau = 0)$: G_1/G_o (línea continua), G_2/G_o (línea de trazos) y G_3/G_o (línea de trazos y puntos). (a). $k_{off} = 10^{-3}s^{-1}$, que corresponde al límite de difusión rápida. G_1 y G_2 decaen aproximadamente al mismo tiempo, por lo que ajustan al mismo coeficiente de difusión, $D_1 = D_2 = D_S$. (b). $k_{off} = 10s^{-1}$. En este caso, el tiempo característico de la componente G_2, es menor que en (a). (c) $k_{off} = 10^2 s^{-1}$. En este caso, el peso relativo de G_2 es mayor que en (b), mientras que el de G_3 disminuye. El tiempo característico de G_2 es menor que en (b). (d). $k_{off} = 10^5 s^{-1}$, que corresponde al límite de reacciones rápidas. En este caso, el peso relativo de la componente G_3, se vuelve despreciable.

mientras $\tilde{\nu}_2 \geq 0{,}33s$) asociado al coeficiente efectivo de difusión D_{coll}, como se ve en la figura 2.4 (a).

2.2.4 Dependencia de los parámetros ajustados con las concentraciones

Un aspecto importante de los límites de reacciones rápidas y difusión rápida es que la ACF se expresa como la suma de dos componentes difusivas. Es decir, en ambos casos la función de ajuste es la misma, pero la interpretación que debe darse a los parámetros que se obtienen, no lo es. En el caso de la difusión rápida se recuperan los coeficientes libres de las especies, mientras que en las reacciones rápidas se obtienen coeficientes efectivos. Estos últimos dependen de las concentraciones y la constante de equilibrio de

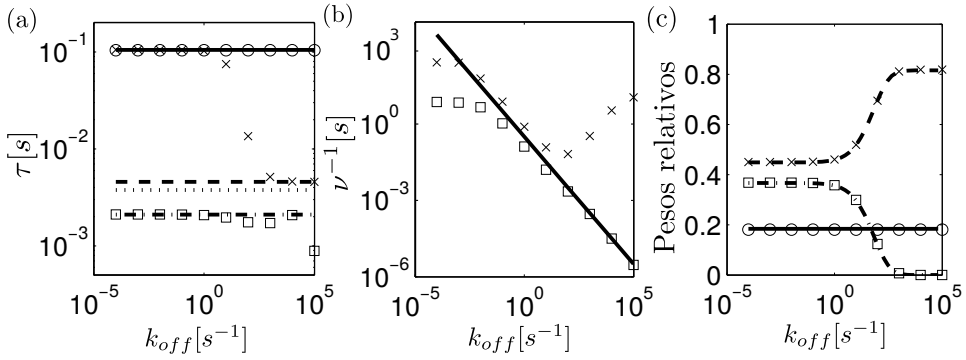

Figura 2.4: Tiempo característico y pesos obtenidos por el ajuste de cada componente, G_i, de la ACF numérica usando una expresión de la forma de (2.7). (a). Tiempos de difusión ajustados, $\tilde{\tau}_1$ (círculos), $\tilde{\tau}_2$ (cruces), $\tilde{\tau}_3$ (cuadrados) y tiempos de difusión analíticos, $\tau_S = w_r^2/(4D_S)$ (línea continua), $\tau_{coll} = w_r^2/(4D_{coll})$ (línea de trazos), $\tau_{ef2} = w_r^2/(4D_{ef2})$ (línea punteada) y $\tau_f = w_r^2/(4D_f)$ (línea de trazos punteada). (b). Tiempos que caracterizan los decaiminetos exponenciales, que se obtienen a partir del ajuste $\tilde{\nu}_2^{-1}$ (cruces) y $\tilde{\nu}_3^{-1}$ (cuadrados) y los analíticos ν_{uu}^{-1} dados por la ecuación (1.35) (línea continua). (c). Pesos relativos G_{o_1}/G_o (línea continua), G_{o_2}/G_o (línea a trazos) y G_{o_3}/G_o (línea a trazos punteada) junto con los valores ajustados.

la reacción. El hecho de que, en un límite los coeficientes dependen de las concentraciones mientras que en otro no, abren la posibilidad de variar las concentraciones para evaluar la dependencia de los mismos y así determinar en que régimen se encuentra el sistema. Para evaluar como dependen los coeficientes de difusión que se derivan del ajuste con las concentraciones, se integró numéricamente la ecuación (1.30) variando la concentración total de moléculas fluorescentes $[P_T]$, para distintos valores de k_{off}. El resto de los parámetros se mantuvo igual que en los casos anteriores 2.1. Teniendo en cuenta que los tiempos característicos de reacción están dados por $\tau_r = (k_{off} + k_{on}[P_f]_{(eq)} + k_{on}[S]_{(eq)})^{-1}$, variar la concentración puede cambiar la relación entre τ_r y los tiempos de difusión libres, $\tau_f = w_r^2/(4D_f)$. En la figura 2.5 se muestran las curvas de la ACF numérica para distintos $[P_T]$ y para distintos valores de k_{off} que fueron elegidos de manera que fuera posible variar la concentración $[P_T]$ manteniendo constante la relación entre τ_f y τ_r a lo largo de cada subfigura. Es decir, $\tau_f = 2\,10^{-3}s$ para todos los casos, mientras que $6{,}2\,10^2 s \leq \tau_r \leq 7{,}6\,10^3 s$ en (a), $6{,}2\,10^{-3}s \leq \tau_r \leq 7{,}6\,10^{-2}s$ en (b), $6{,}2\,10^{-4}s \leq \tau_r \leq 7{,}6\,10^{-3}s$ en (c) y $6{,}2\,10^{-7}s \leq \tau_r \leq 7{,}6\,10^{-6}s$ en (d). τ_r decrece a

medida que $[P_T]$ aumenta. En la figura 2.5 se muestran en símbolos los coeficientes de difusión derivados de ajustar la ACF numérica con el modelo de la ecuación (2.4) para los distintos valores de $[P_T]$ y k_{off}. Los cuadros (a) y (d) de la figura muestran los límites de difusión rápida y reacciones rápidas respectivamente, mientras que los cuadros (b) y (c) corresponden a casos intermedios. En líneas de distintos trazos están representados los coeficientes de difusión libres y efectivos (D_S línea de trazos, D_f línea continua y D_{coll} línea de trazos con puntos). Se puede ver de la figura 2.5 (a) que ninguno de los coeficientes que se derivan del ajuste cambia con la concentración $[P_T]$, lo que corresponde a los coeficientes libres, D_S y D_f. En la figura 2.5 (d), en cambio, se ve que $\tilde{D}_1$ se mantiene constante (y aproximadamente igual a D_S) mientras que $\tilde{D}_2$ crece con $[P_T]$. También se observa que $\tilde{D}_2 \approx D_{coll}$ para todo el rango de valores de $[P_T]$ explorados. Ambos coeficientes, $\tilde{D}_2$ y D_{coll} se aproximan a D_f cuando $[P_T]$ crece, lo cual es de esperarse según (1.21). Esto muestra que, inclusive en el límite de reacciones rápidas, el coeficiente de difusión libre de las moléculas fluorescentes, D_f, puede ser recuperado, dependiendo de las concentraciones relativas de las especies del sistema. En las figuras 2.5 (b)-(c), se observa que aún fuera del límite de reacciones rápidas (cuando τ_f es apenas más pequeño o del mismo orden que τ_r), el ajuste de la ACF numérica con dos componentes difusivas da estimaciones relativamente buenas para D_S and D_{coll}. Esto es así para $[P_T] \geq 0{,}15\mu M$ en la figura 2.5 (b) que corresponde a $\tau_r/\tau_f \leq 10$ y para $[P_T] \geq 0{,}04\mu M$ en la figura 2.5 (c) que corresponde a $\tau_r/\tau_f \leq 1{,}5$. Sin embargo, el ajuste no es bueno cuando $\tau_r/\tau_f > 10$ pero no lo suficientemente grande como en la figura 2.5 (b) para $[P_T] < 0{,}15\mu M$ o en la figura 2.5 (c) para $[P_T] < 0{,}04\mu M$. En esta región, el ajuste tiende a sobrestimar el coeficiente de difusón $\tilde{D}_2$, como se observa en la figura 2.5 (c) que los valores que toma caen fuera del marco de la figura.

2.3 Desde la difusión libre hacia la difusión efectiva en experimentos

Hasta aquí, se exploró la transición de un límite a otro cambiando la constante de reacción k_{off}. Cambios globales similares en la ACF se pueden obtener cuando se

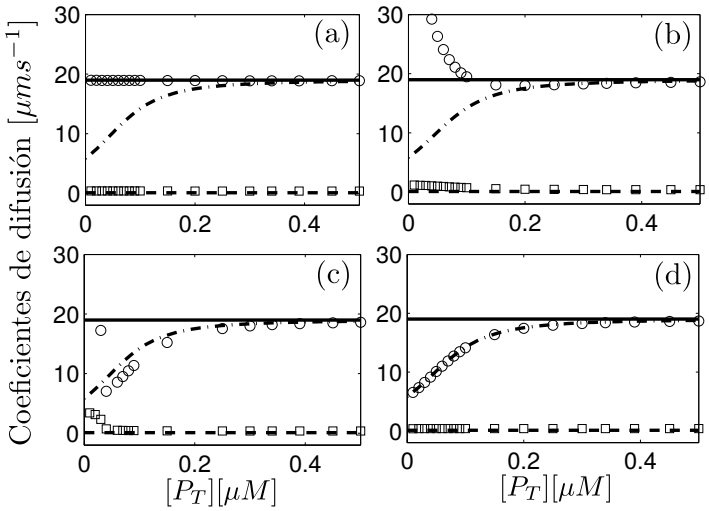

Figura 2.5: Coeficientes de difusón derivados del ajuste de la ACF obtenidos para diferentes valores de $[P_T]$ y k_{off} con una expresión de la forma (2.4) ($\tilde{D}_1$: cuadrados, $\tilde{D}_2$: círculos) y coeficientes de difusión característicos (D_S: línea de trazos, D_{coll}: línea de trazos con puntos, D_f: línea continua). (a). $k_{off} = 10^{-5}s^{-1}$, que corresponde al límite de difusión rápida. Tanto $\tilde{D}_1$ como $\tilde{D}_2$ no varían con $[P_T]$ y coinciden con los coeficientes libres del sistema. (b). $k_{off} = 10s^{-1}$ y $3{,}1 \leq \tau_r/\tau_f \leq 38$. (c). $k_{off} = 100s^{-1}$ y $0{,}31 \leq \tau_r/\tau_f \leq 3{,}8$ (d). $k_{off} = 10^6 s^{-1}$, que corresponde al límite de reacciones rápidas. $\tilde{D}_1$ no cambia con $[P_T]$ y satisface $\tilde{D}_1 \approx D_S$. $\tilde{D}_2$ no cambia con $[P_T]$ y satisface $\tilde{D}_2 \approx D_{coll}$.

varían otros parámetros que afectan la relación de escalas temporales [Elson, 2001, Thompson et al., 2011]. Por ejemplo, variar el volumen de iluminación, cambia el tiempo característico de difusión, $\tau_f = w_r^2/4D_f$. Si el cambio de volumen es suficientemente grande, puede producir una transición de un límite a otro. Entonces, surge la pregunta, si es posible hacer experimentos con diferentes volúmenes de iluminación, en los que sea posible pasar de un límite a otro, y así estimar los coeficientes difusión libres D_S y D_f, y el efectivo D_{coll}. Reducir el volumen de iluminación está limitado por el límite de difracción de la luz. Por otro lado, agrandar el volumen es más viable, y el límite de reacciones rápidas también puede dar información valiosa. Pero hasta donde es posible agrandar el volumen y a su vez obtener fluctuaciones lo suficientemente grandes para que la ACF pueda ser calculada, es algo que nos interesa determinar. De acuerdo con una exploración de parámetros donde se varió w_r, la transición para obtener D_{coll} se observa para $w_r^2 k_{off} \sim 0{,}25\mu m^2/s$. Este punto de transición se corresponde con $w_r \sim 0{,}5\mu m$

(valor del orden de un típico microscopio confocal) para $k_{off} \sim 100/s$ y dos veces ese valor $w_r \sim 1\mu m$, para $k_{off} \sim 25/s$. Dadas las concentraciones usadas en nuestro ejemplo, el número de moléculas fluorescentes en el volumen de observación, $5\pi^{3/2}w_r^3[P_T]$, será de 73 y 584, respectivamente, números que son adecuados para experimentos de FCS [Charier et al., 2005]. Para evaluar hasta donde es posible agrandar el volumen

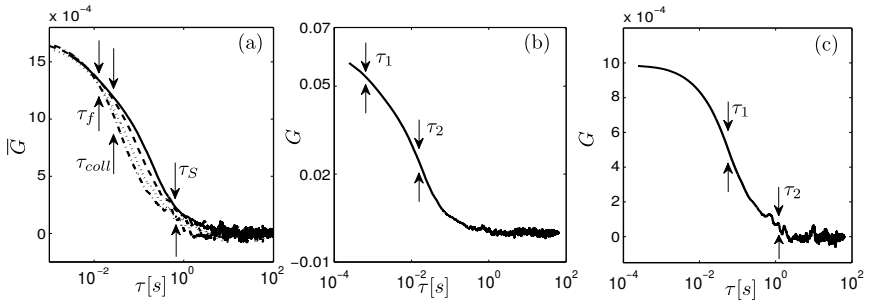

Figura 2.6: Función de autocorrelación obtenida de las simulaciones estocásticas realizadas usando los parámetros de la tabla 2.1, $k_{off} = 35s^{-1}$ y diferentes valores de w_r. (a). ACF re-escaleada, $\overline{G} \equiv w_r^3 G(\tau)$, como función de los "tiempos" re-escaleados, $\overline{\tau} \equiv \tau w_r^2$ para $w_r = 0{,}3\mu m$ (línea continua), $0{,}5\mu m$ (línea de trazos), $0{,}8\mu m$ (línea de puntos) y $1{,}2\mu m$ (línea de trazos y puntos). Con flechas se indican tres tiempos relevantes, $\overline{\tau}_f = \frac{1}{4D_f}$, $\overline{\tau}_{coll} = \frac{1}{4D_{coll}}$ y $\overline{\tau}_s = \frac{1}{4D_S}$. (b). $G(\tau)$ para $w_r = 0{,}3\mu m$. (c). $G(\tau)$ para $w_r = 1{,}2\mu m$. τ_1 y τ_2 son los tiempos que se obtienen del ajuste de la ACF sin ruido (ecuaciones (1.34)) con ecuación (2.4). La transición entre los límites se hace evidente en la medida que w_r aumenta.

de observación y extraer información de las fluctuaciones usando FCS, se realizaron simulaciones estocásticas como se explica en el apéndice B. Los resultados se muestran en la figura 2.6, donde se grafican las distintas ACFs obtenidas de las simulaciones usando $k_{off} = 35s^{-1}$ y diferentes valores de w_r ($w_r = 0{,}3\mu m$, $0{,}5\mu m$, $0{,}8\mu m$ y $1{,}2\mu m$). Se puede observar que las fluctuaciones fueron suficientes en todos los casos para calcular la ACF. Para que las distintas ACFs puedan ser comparadas fueron normalizadas de manera que todas tuvieran el mismo peso. De esta manera, se puede observar la transición entre límites (figura 2.6 (a)). Luego queda claro que es posible estimar la escala temporal más corta (τ_1), para ambos casos, como se puede observar en las figuras 2.6 (b)-(c) donde se graficó la ACF para $w_r = 0{,}3\mu m$ y $w_r = 1{,}2\mu m$. En cambio, en el caso de $w_r = 1{,}2\mu m$, obtener la escala temporal más larga (la que corresponde a la difusión de las trampas) es más complicado porque la ACF es muy ruidosa para esos valores de τ. Los valores,

τ_1 y τ_2, en la figura 2.6 (b)-(c), se obtuvieron ajustando con la ecuación (2.4) la ACF dada por la integración numérica de las ecuaciones (1.34), en las cuales no hay ruido que dificulte su estimación. En cualquier caso, las simulaciones estocásticas muestran que para ciertos valores de los parámetros ($k_{off} \sim 10 - 100s^{-1}$ en nuestro ejemplo) es posible inferir si los coeficientes de difusión estimados a partir del ajuste de la ACF corresponden a coeficientes libres o efectivos, al cambiar el volumen de observación desde el volumen típico de un microscopio confocal ($w_r = 0{,}3\mu m$) a valores mayores. Las simulaciones estocásticas, por otro lado, muestran que las expresiones (1.34) proveen una buena descripción de la función de autocorrelación del problema estudiado.

3

Cuantificación de concentraciones a partir de FCS

En el capítulo 2 se estudió qué parámetros biofísicos y bioquímicos pueden inferirse en un sistema donde una especie de moléculas fluorescentes difunde e interactúa con sitios de ligadura. Se analizó un amplio rango del espacio de parámetros, lo que permitió determinar un régimen en el cual se infieren coeficientes de difusión libres (límite de difusión rápida) y otro donde se infieren coeficientes de difusión efectivos que dependen de las concentraciones de las especies (límite de reacciones rápidas). El análisis estuvo focalizado en el rol de los tiempos característicos y la relación entre éstos y los parámetros del sistema. En este capítulo se considera un sistema similar al anterior, pero el análisis se centra en los pesos de las componentes de la ACF, en cómo se relacionan con las correlaciones y los parámetros del sistema. Además se analiza con qué precisión es

posible inferir concentraciones en experimentos de FCS y cómo esta precisión depende de los tiempos característicos del sistema.

3.1 ACF de un sistema con moléculas marcadas y sin marcar

Se considera nuevamente el sistema de partículas, P_f, que difunden con coeficiente de difusión D_f e interactúan con sitios de ligadura S. A diferencia del sistema considerado en el Capítulo 2, en este caso se tiene en cuenta que sólo una fracción de las moléculas P_f y de las P_b es fluorescente. Por lo tanto es necesario considerar las siguientes especies: P_f^t y P_b^t, que son fluorescentes y P_f^u, P_b^u y S que no lo son. P_f^t y P_f^u y P_b^t y P_b^t son iguales en todas sus características y propiedades, con la única excepción de que una de las especies es fluorescente y la otra no. Además, se considera que durante el tiempo del experimento no hay transformación entre las versiones fluorescente y no fluorescente de una misma especie. El esquema de reacción está dado entonces por:

$$P_f^t + S \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} P_b^t, \quad P_f^u + S \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} P_b^u. \tag{3.1}$$

Las concentraciones de equilibrio de las distintas especies, $[P_f^t]$, $[P_b^t]$, $[P_f^u]$, $[P_b^u]$ y $[S]$, satisfacen: $[P_f^{t,u}][S] = K_D[P_b^{t,u}]$, $[P_{f,b}^t] = f_t([P_{f,b}^t] + [P_{f,b}^u])$ siendo f_t la fracción de moléculas fluorescentes y las constantes $[P_f^u]+[P_f^t]+[P_b^u]+[P_b^t] = [P]_T$ y $[S]+[P_b^t]+[P_b^u] = [S]_T$.

Para el cálculo de la ACF se sigue, como antes, el procedimiento de Krichevsky [Krichevsky and Bonnet, 2002], que consiste en linealizar las ecuaciones de reacción-difusión del sistema, pasar al espacio de Fourier, encontrar autovalores y autovectores, para finalmente escribir la ecuación (1.30). A diferencia de los casos discutidos hasta ahora, en este capítulo se introduce la posibilidad de que las especies estén inicialmente correlacionadas. En [Krichevsky and Bonnet, 2002] se supone que las correlaciones de las concentraciones de las distintas especies cumplen $\langle \delta c_i(\vec{r}, 0)\delta c_j(\vec{r}', 0)\rangle = \langle c_i\rangle \delta_{ij}\delta(\vec{r} - \vec{r}')$. Es decir, que las moléculas de las diferentes especies inicialmente no están correlacionadas, y que por lo tanto, el número de moléculas de cada una, dentro de un

volumen de observación, V_{obs}, sigue una distribución de Poisson. Esta condición es relajada en lo que sigue y se considera que las especies pueden estar correlacionadas inicialmente, aunque se mantiene la supocisión de una correlación de corto alcance, $\langle \delta c_i(\vec{r},0)\delta c_j(\vec{r}',0)\rangle = \sigma^2_{ij}\delta(\vec{r}-\vec{r}')/V_{obs}$ con la matriz de correlaciones del número de partículas, $\sigma^2_{ij} \equiv \langle \delta N_i \delta N_j \rangle$, que no necesariamente será diagonal. Teniendo en cuenta esto, la ACF puede generalizarse como:

$$\begin{aligned} G(\tau) =& \frac{(2\pi)^{-3}}{q^2 V_{obs}([P^t_f]+[P^t_b])^2} \\ & \times \int d^3\xi \hat{I}(\vec{\xi}) \sum_{j,l} q_j q_l \sum_s X_{l,s} \exp(\lambda_s \tau) \sum_k (X^{-1})_{s,k} \sigma^2_{j,k} \end{aligned} \tag{3.2}$$

donde los subíndices j, l, identifican a las 5 especies, el índice s identifica a los autovalores, X^{-1} es la inversa de la matriz de autovectores y $\hat{I}(\vec{\xi})$ es la transformada de Fourier del $I(\vec{r})$. Dado que σ^2 es una matriz simétrica, se puede definir $Y = X^{-1}\sigma^2$.

En el apéndice A se muestran los cálculos realizados para obtener las expresiones que siguen. Teniendo en cuenta que sólo las especies P^t_f y P^t_b emiten fluorescencia y que ambas lo hacen con la misma eficiencia q, la expresión de la ACF (1.30) se reduce a:

$$G(\tau) = \frac{(2\pi)^{-3}}{q^2 V_{obs}([P^t_f]+[P^t_b])^2} \int d^3\xi I(\vec{\xi}) \sum_i \alpha_i e^{\lambda_i \tau}, \tag{3.3}$$

donde

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= q^2(X_{11}+X_{21})(Y_{11}+Y_{12}), \\ \alpha_2 &= q^2(X_{12}+X_{22})(Y_{21}+Y_{22}), \\ \alpha_3 &= q^2(X_{13}+X_{23})(Y_{31}+Y_{32}), \\ \alpha_4 &= q^2(X_{14}+X_{24})(Y_{41}+Y_{42}), \\ \alpha_5 &= q^2(X_{15}+X_{25})(Y_{51}+Y_{52}). \end{aligned} \tag{3.4}$$

De la ecuación (3.3), se puede ver que la ACF es la suma de varias componentes, una por cada autovalor del sistema. De todas formas, como ya se discutió en el capítulo 2, no siempre es posible obtener expresiones analíticas para la ecuación (3.3). Sin embargo, existen dos límites donde la ACF se puede expresar como la suma de componentes del tipo difusivas (1.23), el límite de difusión rápida y el límite de reacciones rápidas [Sigaut et al., 2010, Ipiña and Dawson, 2013]. En este capítulo se trabajó en el límite de

reacciones rápidas ya que así pueden estudiarse los efectos de la interacción entre las especies dado que los tiempos característicos están asociados a coeficientes de difusión efectivos. La ACF para el límite de reacciones rápidas se escribe como:

$$G(\tau) = \frac{G_{o_S}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_S}\right)\sqrt{1+w^2\frac{\tau}{\tau_S}}} + \frac{G_{o_{coll}}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{coll}}\right)\sqrt{1+w^2\frac{\tau}{\tau_{coll}}}} + \frac{G_{o_{sm}}}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{sm}}\right)\sqrt{1+w^2\frac{\tau}{\tau_{sm}}}}, \quad (3.5)$$

donde se consideró un perfil de iluminación gaussiano, $I(\vec{r}) = I_0 \exp(-\frac{2(x^2+y^2)}{w_r^2} - \frac{2z^2}{w_z^2})$, siendo $w = w_z/w_r$ la relación entre el ancho del haz en la dirección de propagación de la luz w_z y el plano perpendicular w_r. Los pesos y los tiempos característicos para cada componente son:

$$\begin{aligned}
G_{o_S} =& \frac{1}{\langle N^t\rangle^2}\frac{[P_f^t]}{K_D+[P_f]_T}\gamma_1, & \tau_S =& \frac{w_r^2}{4D_S},\\
G_{o_{coll}} =& \frac{1}{\langle N^t\rangle^2}\frac{[P_f^t]}{K_D+[P_f]_T}\frac{K_D\gamma_2-[P_f]_T\gamma_3}{[P_f]_T}, & \tau_{coll} =& \frac{w_r^2}{4D_{coll}},\\
G_{o_{sm}} =& \frac{1}{\langle N^t\rangle^2}\frac{[P_f^u]\gamma_4-[P_f^t]\gamma_5}{[P_f]_T}, & \tau_{sm} =& \frac{w_r^2}{4D_{sm}},
\end{aligned} \quad (3.6)$$

donde D_{coll} y D_{sm} son los ya mencionados previamente en el capítulo 1 coeficientes de difusión efectivos (1.21), $\langle N^t\rangle = ([P_f^t]+[P_b^t])V_{obs}$ es el valor medio de la fluorescencia en el volumen de iluminación, $[S_T]$ la concentración total de sitios de ligadura y γ_i son factores que tienen en cuenta las correlaciones entre las distintas especies,

$$\begin{aligned}
\gamma_1 =& \langle\delta N_b^{t^2}\rangle + \langle\delta N_f^t\delta N_b^t\rangle + \langle\delta N_f^t\delta N_S\rangle + \langle\delta N_f^t\delta N_b^u\rangle + \langle\delta N_b^t\delta N_b^u\rangle + \langle\delta N_b^t\delta N_S\rangle,\\
\gamma_2 =& \langle\delta N_f^{t^2}\rangle + \langle\delta N_b^{t^2}\rangle + 2\langle\delta N_f^t\delta N_b^t\rangle + \langle\delta N_f^t\delta N_f^u\rangle + \langle\delta N_f^u\delta N_b^t\rangle + \langle\delta N_f^t\delta N_b^u\rangle + \langle\delta N_b^t\delta N_b^u\rangle,\\
\gamma_3 =& \langle\delta N_f^t\delta N_S\rangle + \langle\delta N_b^t\delta N_S\rangle - \langle\delta N_f^{t^2}\rangle - \langle\delta N_f^t\delta N_b^t\rangle - \langle\delta N_f^t\delta N_f^u\rangle - \langle\delta N_f^u\delta N_b^t\rangle,\\
\gamma_4 =& \langle\delta N_f^{t^2}\rangle + \langle\delta N_b^{t^2}\rangle + 2\langle\delta N_f^t\delta N_b^t\rangle,\\
\gamma_5 =& \langle\delta N_f^t\delta N_f^u\rangle + \langle\delta N_f^u\delta N_b^t\rangle + \langle\delta N_f^t\delta N_b^u\rangle + \langle\delta N_b^t\delta N_b^u\rangle,
\end{aligned} \quad (3.7)$$

Simulaciones numéricas

Para explorar el comportamiento del sistema representado por el esquema (3.1) y verificar los resultados analíticos se realizaron simulaciones estocásticas basadas en el método Monte Carlo. El detalle de las simulaciones puede encontrarse en el apéndice B.

De las simulaciones se obtuvo la fluorescencia para distintos tiempos, $F(t)$, que luego se usó para calcular la ACF. Se realizaron dos tipos de simulaciones distintas, que variaban en la forma en que $F(t)$ era calculada. En la primera, $F(t)$ era recolectada usando un perfil de iluminación gaussiano, como en un microscopio confocal. Entonces, para calcular la fluorescencia en todo el volumen de observación, se consideró que cada molécula fluorescente contribuía con un peso dado por el perfil de iluminación gaussiano. En la segunda, $F(t)$ se calculó contando el número de moléculas dentro de un cubo, pesando a todas por igual. Los parámetros utilizados fueron extraídos del análisis [Sigaut et al., 2014] de experimentos de FCS realizados en embriones de *Drosophila melanogaster* en el que se estima el coeficiente de difusión de la proteína Bicoid [Abu-Arish et al., 2010].

Además de simulaciones del sistema donde las moléculas interactúan según (3.1), se realizaron simulaciones en que las moléculas de cada especie difunden sin interactuar. En la tabla 3.1 se muestran los parámetros utilizados para las distintas simulaciones que se muestran en las figuras del Capítulo.

	Figura 3.1 (a)	Figura 3.1 (b)	Figura 3.2 (a)	Figura 3.2 (b)	Figura 3.3
D_S	$[0-10]\mu m^2 s^{-1}$	$10\mu m^2 s^{-1}$	$0{,}005\mu m^2 s^{-1}$	0	$10\mu m^2 s^{-1}$
D_f	$19\mu m^2 s^{-1}$	$19\mu m^2 s^{-1}$	$500\mu m^2 s^{-1}$	$19\mu m^2 s^{-1}$	$19\mu m^2 s^{-1}$
k_{off}	$400s^{-1}$	$400s^{-1}$	-	$400s^{-1}$	$0{,}1s^{-1}$
K_D	$0{,}2496\mu M$	$0{,}2496\mu M$	-	$0{,}2496\mu M$	$0{,}192nM$
$[S]$	$2{,}87\mu M$	$2{,}87\mu M$	-	$2{,}87\mu M$	$2{,}21nM$
$[P_f^t]$	$5{,}90\mu M$	$5{,}90\mu M$	$0{,}01\mu M$	$5{,}90\mu M$	$4{,}54nM$
$[P_b^t]$	$68{,}29\mu M$	$68{,}29\mu M$	$0{,}01\mu M$	$68{,}29\mu M$	$52{,}53nM$
$[P_f^u]$	$1{,}78\mu M$	$1{,}78\mu M$	-	$1{,}78\mu M$	$1{,}37nM$
$[P_b^u]$	$20{,}02\mu M$	$20{,}02\mu M$	-	$20{,}02\mu M$	$15{,}40nM$
T_{obs}	$100s$	$100s$	$[0{,}03-11-1000]s$	$[0{,}04-0{,}64-10-82]s$	$100s$
$I(\vec{r})$	Gaussiano	Gaussiano	Gaussiano	Gaussiano	Cúbico
V_{obs}	$0{,}15\mu m^3$	$0{,}36\mu m^3$	$0{,}068\mu m^3$	$0{,}15\mu m^3$	$0{,}064\mu m^3$
V_T	$27\mu m^3$	$[8-64]\mu m^3$	$27\mu m^3$	$27\mu m^3$	$27\mu m^3$

Tabla 3.1: Parámetros de las simulaciones que se muestran en las figuras del capítulo.

3.2 Efecto de las correlaciones iniciales en los pesos de la ACF

Como se puede ver de la ecuación (3.6), los pesos de las distintas componentes de la ACF dependen de las correlaciones inciales entre el número de moléculas de cada especie. Es interesante notar que sólo los pesos de la ACF se ven afectados por las correlaciones, mientras que los tiempos característicos son independientes. El caso tratado en [Krichevsky and Bonnet, 2002] y que es ampliamente extendido a la hora de modelar experimentos de FCS, es considerar que las especies están descorrelaciondas, es decir, $\langle \delta N_i \delta N_j \rangle = \mathrm{var}(N_i)\delta_{ij}$. Por otro lado, se sabe que contar el número de partículas en un volumen fijo, al igual que contar el número de eventos que suceden en un determinado tiempo, sigue una distribución de Poisson, la cual satisface que su varianza es igual a su número medio, $\mathrm{var}(N_i) = \langle N_i \rangle$. Así se llega finalmente a la expresión utilizada por Krichevsky en su trabajo $\langle \delta c_i(\vec{r},0)\delta c_j(\vec{r}',0)\rangle = \langle N_i \rangle \delta(\vec{r}-\vec{r}')/V_{obs}$. En varias ocasiones se hace referencia a la suposición de Krichevsky como *caso de poisson* o *caso poissoniano*. Reemplazando en las expresiones (3.6-3.7) los pesos de la ACF para el caso poissoniano queda:

$$\begin{aligned} G_{o_S} =& \frac{[P_b^t]^2}{V([P_f^t]+[P_b^t])^2[S]_T}, \\ G_{o_{coll}} =& \frac{[P_f^t]}{V([P_f^t]+[P_b^t])^2} f_t \left(1+\frac{[S]^2}{K_D[S]_T}\right), \\ G_{o_{sm}} =& \frac{1-f_t}{V([P_f^t]+[P_b^t])}, \end{aligned} \tag{3.8}$$

donde $f_t \equiv [P_f^t]/([P_f^t]+[P_f^u]) = [P_b^t]/([P_b^t]+[P_b^u])$ es la fracción de moléculas flourescentes en equilibrio. De la ecuación (3.8) se verifica que la suma de los distintos pesos, G_{oi}, da el peso total de la ACF, G_o, el cual cumple que es igual la varianza del número de moléculas fluorescentes sobre su valor medio al cuadrado (1.8):

$$G_o = G_{o_S} + G_{o_{coll}} + G_{o_{sm}} = \frac{\mathrm{var}(N^t)}{\langle N^t \rangle^2} = \frac{1}{\langle N^t \rangle}. \tag{3.9}$$

La suposición de que el número de moléculas dentro del volumen de iluminación

sigue una distribución de poisson es en general correcta, y las expresiones derivadas a partir de ésta, permiten hacer una buena estimación de los parámetros biofísicos del sistema en estudio. Sin embargo, éste no es siempre el caso y se pueden dar situaciones donde existan correlaciones entre el número de moléculas de las diferentes especies y los pesos de la ACF cambien en forma significativa. En caso de que las correlaciones existan y no son tenidas en cuenta, las estimaciones de los pesos, y por consiguiente de los parámetros biofísicos, pueden no ser los correctos. A continuación se analiza cómo se modifica la ACF en dos casos en donde las correlaciones entre las especies surgen naturalmente del sistema que se estudia.

3.2.1 ACF para sistemas con sitios de ligadura inmóviles

En el primer caso considerado, los sitios de ligadura están fijos en el espacio y no difunden, es decir $D_S = 0$. A diferencia del caso donde hay difusión, el número de sitios de ligadura dentro del volumen de iluminación está fijo y se cumple que $N_{S_T} = N_S + N_b^t + N_b^u$ y $\delta N_b^t + \delta N_b^u + \delta N_S = 0$. De esta manera, se puede ver que N_b^t, N_b^u y N_S están correlacionadas, y siguen una distribución multinomial, que satisface $\langle \delta N_i^2 \rangle = \langle N_i \rangle (1 - \frac{\langle N_i \rangle}{N_{S_T}})$ y $\langle \delta N_i \delta N_j \rangle = -\langle N_i \rangle \frac{\langle N_j \rangle}{N_{S_T}}$, para $i \neq j$. Además se cumple

$$\langle \delta N_S \delta N_b^t \rangle + \langle \delta N_S \delta N_b^u \rangle = -\langle \delta N_S^2 \rangle. \tag{3.10}$$

Con respecto a N_f^t y N_f^u, no hay correlaciones, por lo que siguen una distribución de Poisson. De la ecuación (3.7) se puede ver que $\gamma_1 = 0$, con lo cual el peso de la componente asociada al autovalor que depende de D_S se hace exactamente cero, $G_{o_S} = 0$. Los demás factores, γ_i, se mantienen igual al caso Poissoniano, de manera que $G_{o_{coll}}$ y $G_{o_{sm}}$ toman los mismos valores que en la ecuación (3.8). El peso total de la ACF se expresa para el caso de $D_S = 0$ como:

$$G_o = G_{o_{coll}} + G_{o_{sm}} = \frac{\mathrm{var}(N_f^t) + \mathrm{var}(N_b^t)}{\langle N^t \rangle^2} = \frac{\langle N_f^t \rangle + \langle N_b^t \rangle (1 - \langle N_b^t \rangle / N_{ST})}{\langle N^t \rangle^2}, \tag{3.11}$$

De las ecuaciones (3.9) y (3.11) se puede ver que existe una diferencia finita entre los casos $D_S \neq 0$ y $D_S = 0$, y que dicha diferencia es independiente de D_S. De hecho, esta diferencia se da abruptamente cuando $D_S = 0$, y no hay una transición continua entre

un caso y el otro. También es interesante resaltar que en el caso de $D_S = 0$ no se cumple que el peso de la ACF sea igual a la inversa del número de moléculas fluorescentes, $G_o \neq 1/\langle N^t \rangle$, lo que suele ser asumido en este tipo de análisis.

En la figura 3.1 (a) se muestra, en símbolos las ACFs obtenidas a través de simulaciones numéricas para el caso $D_S \neq 0$ y $D_S = 0$ junto con sus correspondientes expresiones analíticas en líneas de trazos. Los parámetros son los mismos en ambas simulaciones, excepto por el valor del coeficiente de difusión de las trampas, D_S ($D_S = 0$ en cuadrados y línea sólida y $D_S = 10\mu m^2/s$ en cruces y línea de trazos). G_o es diferente en cada caso a pesar que $\langle N^t \rangle$ es el mismo. La correspondencia entre los datos de las simulaciones y la curvas analíticas, confirman lo predicho por las expresiones (3.9) y (3.11). Por lo tanto, un ajuste a ciegas de los datos, asumiendo una estadística de Poisson, puede levar a una estimación incorrecta de la concentración de moléculas fluorescentes. Es decir, para interpretar correctamente el peso de la ACF es necesario distinguir si las trampas son móviles o inmóviles.

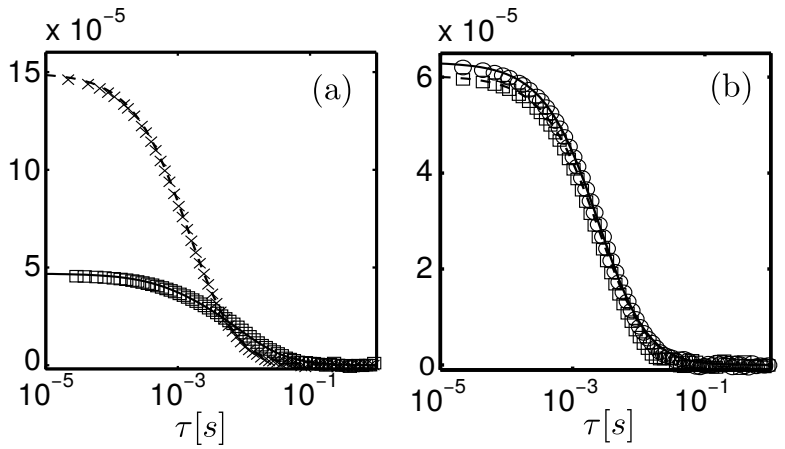

Figura 3.1: (a). ACF, $G(\tau)$, de un sistema de moléculas que difunde e interactúa con sitios de ligadura inmóviles (□) o móviles (×). Las curvas son las predicciones teóricas a partir de la ecuación (3.5) para los casos $D_S \neq 0$ (línea de trazos) y $D_S = 0$ (línea sólida). (b). Igual que en (a) pero con $D_S \neq 0$ y dos volúmenes de simulación distintos, $V_{obs} = 0{,}36\mu m^3$, $V_T = 8\mu m^3$ (○) y $V_{obs} = 0{,}36\mu m^3$, $V_T = 64\mu m^3$ (□). Para detalles de los parámetros usados ver la tabla 3.1.

3.2.2 ACF para sistemas que difunden en volúmenes confinados

El segundo caso considerado, en el cual existen correlaciones entres las especies, se trata de moléculas que difunden en un volumen confinado. Hasta aquí, estaba implícita la suposición de que el volumen de observación, V_{obs}, era mucho más pequeño que el volumen disponible que poseen las moléculas para difundir, V_T, es decir, $V_{obs} \ll V_T$. Cuando V_{obs} es lo suficientemente grande y se vuelve de tamaño comparable al volumen total, $V_{obs} \lesssim V_T$, aparecen correlaciones entre las moléculas de una misma especie que se encuentran dentro y fuera de V_{obs}. En este caso, la estádistica de Poisson deja de ser válida. Es decir, el número de moléculas fluorescentes en V_{obs}, $N^t = N_f^t + N_b^t$, está correlacionado con el número fuera de V_{obs}. Si se introduce la notación N_i^{ext} al número de moléculas de la especie i-esima fuera de V_{obs} y N_i^{total} el número total de moléculas en V_T, se cumple que $N_i + N_i^{ext} = N_i^{total} = \text{cte}$. El número de moléculas, N_i, sigue una distribución binomial $B(N_i^{total}, p)$ con parámetro $p = \frac{V_obs}{V_T}$, que satisface $\text{var}(N_i) = N_i^{total} p(1-p) = \langle N_i \rangle \left(1 - \frac{N_i^{ext}}{N_i^{total}}\right) = \langle N_i \rangle \left(1 - \frac{V_{obs}}{V_T}\right)$. Teniendo en cuenta este resultado, el peso de la ACF queda:

$$G_o = \frac{\text{var}(N^t)}{\langle N^t \rangle^2} = \frac{1}{\langle N^t \rangle} \left(1 - \frac{V_{obs}}{V_T}\right). \tag{3.12}$$

Notar que existe un factor $(1 - V_{obs}/V_T)$ que diferencia el caso $V_{obs} \lesssim V_T$ con el caso $V_{obs} \ll V_T$. De hecho, si $V_{obs} \ll V_T$, se cumple que $(1 - V_{obs}/V_T) \sim 1$, y se recuperá el caso típico poissoniano. Además, a diferencia del caso donde los sitios de ligadura están fijos, acá la transición de un caso a otro es continua.

En la figura 3.1 (b) se muestran dos simulaciones que ilustran cómo cambia la ACF cuando varía el volumen de iluminación. En círculos se muestra una simulación tal que $(1 - V_{obs}/V_T) = 0{,}99$, mientras que en cuadrados se muestra otra simulación que corresponde a $(1 - V_{obs}/V_T) = 0{,}96$. Ambas simulaciones se muestran con sus respectivas curvas analíticas (líneas sólida y de trazos respectivamente). La diferencia entre las curvas es, según la ecuación (3.12), $\sim 4\,\%$, lo cual es similar a la diferencia obtenida en las simulaciones.

Si se tiene en cuenta que los sitios de ligadura son inmóviles, es decir $D_S = 0$, nuevamente aparece un factor $(1 - V_{obs}/V_T)$ que tiene en cuenta las correlaciones

debidas al volumen confinado. Las correlaciones debidas a los sitios de ligadura fijas siguen presentes y afectan al peso de la ACF de la misma manera que se detalló previamente. El peso de la ACF queda:

$$G_o = \frac{\langle N_f^t \rangle + \langle N_b^t \rangle (1 - \langle N_b^t \rangle / N_{ST})}{\langle N^t \rangle^2} \left(1 - \frac{V_{obs}}{V_T}\right), \tag{3.13}$$

3.3 Precisión en los pesos de la ACF en experimentos de FCS

Como se mencionó anteriormente, por un lado las fluctuaciones permiten obtener información sobre los procesos que ocurren en el interior de las células, pero por otro ponen un límite a la precisión con que pueden ser obtenidos los parámetros biofísicos en un determinado tiempo de observación. En esta sección se busca determinar durante cuanto tiempo se debe registrar la fluorescencia en experimentos de FCS, para obtener concentraciones con una dada precisión.

Las fluctuaciones que se registran en experimentos de FCS provienen de dos fuentes diferentes: la primera, las fluctuaciones producto de la dinámica de los procesos biofísicos que tienen lugar en el interior de la célula, de las cuales se puede obtener información para cuantificar parámetros biofísicos y validar modelos. La segunda fuente de fluctuaciones tiene que ver con el ruido que se introduce por el camino óptico que sigue la luz y la eficiencia de los detectores. Este ruido, es conocido como "shot noise" y si bien es indeseado, tiene la ventaja de que es puramente aleatorio, no esta correlacionado a lo largo del tiempo y sólo tiene incidencia en la función de autocorrelación cuando $\tau = 0$ [Krichevsky and Bonnet, 2002]. En el análisis que se presenta en esta sección, esta fuente de error no es tenida en cuenta, y sólo se hace foco en el estudio de las fluctuaciones que se derivan de los procesos biofísicos de estudio.

Para cualquier sistema, los pesos individuales y el peso total de la ACF, G_{o_i} y $G_o = \sum_i G_{o_i}$ respectivamente, dependen del valor medio, la varianza y la covarianza de variables aleatorias del problema. En experimentos reales, el valor medio, la varianza y la convarianza son estimados a partir de las observaciones. Con lo cual, el cálculo de los

pesos se hace en términos de estos estimadores. Se define,

$$\tilde{G}_o \equiv \frac{s^2}{\left(\overline{N}^t\right)^2}, \tag{3.14}$$

al estimador del peso total de la ACF, siendo,

$$\overline{N}^t = \frac{\sum_l N_\ell^t}{n};\ s^2 = \frac{\sum_\ell \left(N_\ell^t - \overline{N}^t\right)^2}{n-1} \tag{3.15}$$

el estimador de $\langle N^t \rangle$ y $\mathrm{var}(N^t)$, respectivamente donde N_ℓ^t es el número de moléculas fluorescentes en V_{obs} al tiempo $t = \ell\Delta t$ y $n = \frac{T_{obs}}{\Delta t}$ es el tamaño de la muestra. $\overline{N}^t$ y s^2 son estimadores no sesgados, de manera que sus valores esperados son $\langle N^t \rangle$ y $\mathrm{var}(N^t)$ respectivamente. A su vez, los estimadores son funciones de variables estocásticas, por lo cual también son variables estocásticas. La varianza de estos estimadores, da información de cuan diferentes pueden ser los valores que toman respecto de sus valores esperados.

Se calcula $\mathrm{var}(\overline{N}^t)$ y $\mathrm{var}(s^2)$ para el caso de una única especie de moléculas fluorescentes que difunden con coeficiente de difusión D. En este caso sólo existe un tiempo de correlación, que para un volumen de iluminación gaussiano, se expresa $\tau_D = \frac{w_r^2}{4D}$. En cualquier experimento es necesario que $\Delta t \ll \tau_D$ para poder determinar los tiempos de correlación, pero entonces los valores que toma N^t a lo largo del tiempo, $\{N_\ell^t\}$, no son independientes. Entonces, al computar la varianza de los estimadores hay que tener en cuenta la no independencia de los datos, de manera que,

$$\mathrm{var}\left(\overline{N}^t\right) = \mathrm{var}\left(\frac{1}{n}\sum_{\ell=1}^{n} N_\ell^t\right) = \frac{1}{n^2}\sum_{\ell,k=1}^{n} \langle \left(N_\ell^t - \langle N^t \rangle\right)\left(N_k^t - \langle N^t \rangle\right)\rangle. \tag{3.16}$$

Hay que notar, que existe una similitud entre la expresión (3.16) y la definición de la ACF,

$$\langle N^t \rangle^2 G(\tau) = \langle \left(N^t(t) - \langle N^t \rangle\right)\left(N^t(t+\tau) - \langle N^t \rangle\right)\rangle = \frac{\mathrm{var}(N^t)}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{3/2}},$$

Dado que $G(\tau)$ decae muy rápidamente de su valor máximo a su valor mínimo es posible aproximar $\langle (N_\ell^t - \langle N^t \rangle)(N_k^t - \langle N^t \rangle)\rangle$ por $\langle (N_\ell^t - \langle N^t \rangle)^2 \rangle = \mathrm{var}(N^t)$ si $|\Delta t(\ell - k)| \leq \tau_D$

y 0 caso contrario. Es decir,

$$\langle \left(N_\ell^t - \langle N^t \rangle\right)\left(N_k^t - \langle N^t \rangle\right)\rangle \approx \begin{cases} \mathrm{var}(N^t) & |\Delta t(\ell - k)| \leq \tau_D \\ 0 & |\Delta t(\ell - k)| > \tau_D \end{cases} . \tag{3.17}$$

Usando la aproximación (3.17) y reemplazando en la ecuación (3.16) se obtiene la varianza del promedio,

$$\mathrm{var}(\overline{N}^t) \approx \frac{\mathrm{var}(N^t)}{n}(1 + (n-1)\rho) \tag{3.18}$$

con $\rho = 2\frac{(n+1)\tau_D}{(n-1)T_{obs}}$. De igual manera, se obtiene la siguiente expresión para la varianza de s^2,

$$\mathrm{var}(s^2) \approx \frac{2(\mathrm{var}(N^t))^2}{n-1}(1 + (n-1)\rho), \tag{3.19}$$

con ρ igual al caso anterior. Finalmente, de las ecuaciones (3.18-3.19) y usando la formula de propagación de errores en la ecuación (3.16), se puede escribir el error del peso de la ACF,

$$\left(\frac{\Delta \tilde{G}_o}{\langle \tilde{G}_o \rangle}\right)^2 = \frac{\mathrm{var}(s^2)}{\langle s^2 \rangle^2} + \frac{4\,\mathrm{var}(\overline{N}^t)}{\langle \overline{N}^t \rangle^2} \approx \frac{4\tau_D}{T_{obs}}\left(1 + 2\frac{\mathrm{var}(N^t)}{\langle N^t \rangle^2}\right). \tag{3.20}$$

La ecuación (3.20) depende del cociente entre el tiempo de correlación y el de observación. Por un lado, en la medida que el tiempo de observación es mayor, el error en el peso de la ACF disminuye. Por el otro lado, cuanto mayor sea el tiempo de correlación del sistema, mayor será el tiempo necesario para obtener una determinada precisión. El segundo término de la ecuación (3.20) depende del número medio de moléculas fluorescentes en el volumen de observación. En general, $\langle N^t \rangle \gg 1$, por lo tanto el segundo término se hace despreciable frente al primero, el cual es quien termina imponiendo el límite a la precisión que se puede obtener a un tiempo T_{obs}.

En el caso de un sistema que tiene varias especies fluorescentes con la misma eficiencia q_i, y que difunden libremente sin interactuar, las ecuaciones (3.18-3.19) son también válidas. Siendo N_i^t el número de moléculas dentro de V_{obs} de cada especie, el peso total de la ACF y su estimador están dados por:

$$G_o = \frac{\sum_i \mathrm{var}(N_i^t)}{\langle \sum_i N_i^t \rangle^2};\ \tilde{G}_o = \frac{\sum_i s_i^2}{\overline{N}^{t2}}, \tag{3.21}$$

donde $N^t = \sum_i N_i^t$ y $\overline{N}_i^t$ y s_i^2 son los estimadores de $\langle N_i^t \rangle$ y $\mathrm{var}(N_i^t)$, respectivamente. Identificando a $(\Delta\Xi)^2 = \mathrm{var}(\Xi)$, siendo $\Delta\Xi$ el error y $\mathrm{var}(\Xi)$ la varianza, para $\Xi = \overline{N}_i^t, s_i^2$, se obtiene:

$$\begin{aligned}\left(\frac{\Delta\tilde{G}_o}{\langle\tilde{G}_o\rangle}\right)^2 &= \frac{1}{\langle\tilde{G}_o\rangle^2}\sum_j\left(\left(\frac{\partial\tilde{G}_o}{\partial s_j^2}\right)^2\mathrm{var}(s_j^2)+\left(\frac{\partial\tilde{G}_o}{\partial\overline{N}_j^t}\right)^2\mathrm{var}(N_j^t)\right)\\ &= \frac{\sum_i\mathrm{var}(s_i^2)}{\langle\sum_i s_i^2\rangle^2}+\frac{4\sum_i\mathrm{var}(\overline{N}_i^t)}{\langle\sum_i\overline{N}_i^t\rangle^2}=\frac{\sum_i\mathrm{var}(s_i^2)}{\left(\sum_i\mathrm{var}(N_i^t)\right)^2}+\frac{4\sum_i\mathrm{var}(\overline{N}_i^t)}{\langle\sum_i N_i^t\rangle^2}.\end{aligned} \tag{3.22}$$

3.3.1 Especies difundiendo a tasas muy disímiles

Tal como se describió en la sección 3.2.1, y que además se puede ver de la figura 3.1 (a), la diferencia entre los pesos G_{o_S} cuando $D_S = 0$ y cuando $D_S \neq 0$, es un valor finito e independiente de D_S. Por lo tanto, existe un límite singular en el peso cuando $D_S = 0$. Surge la pregunta, entonces, cómo es posible distinguir un sistema en el que las moléculas difunden muy lentamente, de uno en el que son inmóviles. Si las moléculas difunden muy lentamente, durante el tiempo en que se observa el sistema, puede parecer que las moléculas están fijas. Es decir, a medida que más lenta es la difusión de las moléculas, es necesario un mayor tiempo de observación para distinguir su movimiento. En esta sección, se analiza como cambia la ACF en función del tiempo de observación, cuando D_S es muy pequeño. Particularmente, se analiza, si existe un rango de valores de T_{obs} en que la ACF puede ser aproximada por una expresión con $G_{o_S} = 0$. Para ello, primero se considera un sistema más sencillo de dos especies de moléculas igualmente fluorescentes (f y S) que difunden con D_f y $D_S \ll D_f$, sin interactuar. En este caso, la ACF es la suma de dos componentes difusivas de la forma (1.26) con tiempos de correlación $\tau_i = \frac{w_r^2}{4D_i}$, $i = f, S$. Luego, usando las ecuaciones (3.18-3.19), se calcula $\mathrm{var}(\Xi)/\langle\Xi\rangle^2$ para $\Xi = \overline{N}_i^t, s_i^2$, $i = f, S$ y, definiendo

$$\mathrm{var}(\Xi)/\langle\Xi\rangle^2 = \alpha^2,$$

se derivan los tiempos de convergencia, $T_\alpha(\Xi)$, para que Ξ esté dentro de su valor esperado con un error relativo α.

Asumiendo que N_f^t y N_S^t siguen una distribución de Poisson y que $\tau_i \gg \Delta t$, a partir

de las ecuaciones (3.18-3.19), se obtiene,

$$T_\alpha(\overline{N}_i^t) \approx 200\tau_i/\langle N_i^t\rangle \quad \text{y} \quad T_\alpha(s_i^2) \approx 400\tau_i$$

para $\alpha = 0{,}1$. Se observa que, $T_\alpha(\overline{N}_i^t) < T_\alpha(s_i^2)$, si $\langle N_i^t\rangle > 1$ y además que mientras $T_\alpha(\overline{N}_i^t)$ decrece con $\langle N_i^t\rangle$, $T_\alpha(s_i^2)$ es independiente del mismo. Esto último, implica que existe un límite de la precisión con el que se puede estimar la varianza, y por lo tanto, los pesos de la ACF, después de un dado tiempo de observación, T_{obs}. Este límite está determinado por los tiempos de correlación, τ_f and τ_S, y es independiente de las concentraciones. Más aún, este límite, independiente de la concentración, domina el error relativo de $\tilde{G}_o$, si $\langle N^t\rangle$ es lo suficientemente grande ($\gtrsim 5$). En ese caso, cambiar la concentración de moléculas fluorescentes en el volumen de observación no resulta en un incremento de la precisión en la estimación de los pesos.

Teniendo en cuenta la ecuación (3.22) y considerando el tiempo de correlación más lento de este ejemplo, τ_S, se puede concluir que $T_{obs} > \tau_S/\alpha^2 \gg \tau_S$, para estimar G_o con error relativo α. Por otro lado, el valor de τ_S también determina el tiempo en que N_S^t cambia significativamente. Es decir, es necesario que $T_{obs} \gg \tau_S$ para que N_S^t converja a su valor medio. Dado que $\tau_S \gg \tau_f$, en los tiempos de observación cortos, $\tau_f \ll T_{obs} < \tau_S$, el valor de $\overline{N}_S^t$, puede no ser cercano a $\langle N_S^t\rangle$, mientras que $\overline{N}_f^t \sim \langle N_f^t\rangle$. Con lo cual, va a existir un rango de valores de T_{obs}, en los cuales, el número de moléculas f convergió a su valor medio, mientras que el número de moléculas S no varió significativamente de su valor inicial, $\overline{N}_S^t \sim N_S^t(T_{obs} = 0)$.

A pesar de que $\tau_S \gg \tau_f$, el orden relativo entre $T_\alpha(s_f^2)$ y τ_S es arbitrario. Entonces, si $\tau_S \gg T_\alpha(s_f^2)$ se espera que exista un rango de valores de T_{obs} para los cuales la ACF se pueda aproximar con un única componente difusiva con tiempo de corrrelación, τ_f y peso

$$\tilde{G}_o \sim s_f^2/(\overline{N}_f^t + N_S^t(T_{obs} = 0)).$$

Caso contrario, si $\tau_S \ll T_\alpha(s_f^2)$, la ACF no converge cuando $T_{obs} < \tau_S$. Independientemente del orden entre $T_\alpha(s_f^2)$ y τ_S, si $T_{obs} \gg \tau_S$ la ACF converge a una expresión con dos componentes difusivas, y su peso se aproxima como,

$$\tilde{G}_o \sim \left(s_f^2 + s_S^2\right)/(\overline{N}_f^t + \overline{N}_S^t).$$

Este comportamiento se confirmó en las simulaciones estocásticas de la figura 3.2 (a), donde se grafican las ACFs obtenidas usando distintos T_{obs} que satisfacen: $T_\alpha(s_f^2) = 0{,}01s < T_{obs} = 0{,}027s \ll \tau_S = 2{,}65s$ (cuadrados), $T_{obs} = 0{,}87s \sim \tau_S/3$ (triángulos) y $T_{obs} = 350s \sim 130\tau_S$ (círculos) para $\alpha = 0{,}1$. Las ACFs obtenidas para T_{obs} hasta $\sim 0{,}1\tau_S$ son similares a la representada en cuadrados. Como se puede observar, el tiempo de correlación, τ_S, es inobservable para $T_{obs} \ll \tau_S$ y se vuelve aparente para $T_{obs} \lesssim \tau_S$. El peso total de la ACF depende de $N_S^t(T_{obs} = 0)$ para $T_{obs} \ll \tau_S$. En línea de trazos y puntos se muestra la ACF analítica asumiendo que inicialmente el número de moléculas S dentro de V_{obs} es igual a su valor medio, es decir, $N_S^t(T_{obs} = 0) = \langle N_S^t \rangle$. La simulación representada en cuadrados, muestra que inicialmente el número de moléculas S dentro de V_{obs} es significativamente menor a su valor medio. Por otro lado, en la región $T_{obs} \sim \tau_S$, la ACF no converge a ninguna función. Recién cuando $T_{obs} \gg \tau_S$ la ACF converge a su valor esperado. Sólo cuando se cumple esta condición es que se puede estimar un valor confiable para la concentración total de moléculas fluorescentes, a partir del peso de la ACF, $\tilde{G}_o$.

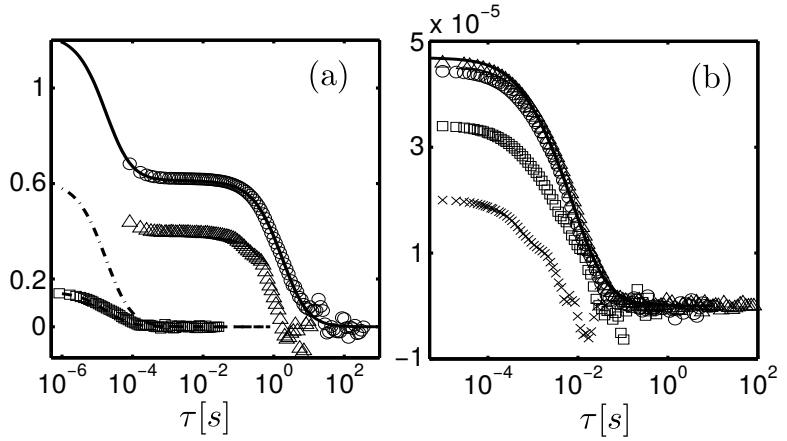

Figura 3.2: ACF, $G(\tau)$, calculada a partir de simulaciones numércicas estocásticas para diferentes T_{obs} (símbolos) y de expresiones analíticas teóricas (líneas continuas). (a) Las especies f y S difunden libremente sin interactuar con coeficientes de difusión $D_f = 500\mu m^2/s$ y $D_S = 0{,}005\mu m^2/s$ respectivamente, y $\langle N_f \rangle = \langle N_S \rangle = 0{,}4$; $T_{obs} = 0{,}027s$ (cuadrados), $0{,}87s$ (triángulos), $350s$ (círculos). ACF teórica para $N_S = 0$ (línea de trazos y puntos) y la ACF normalizada de manera que coincida con el peso de la simulación (línea de trazos). (b) Mismo sistema que el de la figura 3.1 (a) ($D_S = 0$) para $T_{obs} = 0{,}04s$ (cruces), 0.64s (cuadrados), 10.22s (círculos) y 81.76s (triángulos).

Las simulaciones de la figura 3.2 (a) también muestran que se satisface que $G_o \neq 1/\langle N^t \rangle$, cuando $D_S = 0$, en el límite de difusión rápida (cuando $\tau_D \ll \tau_r$), dado que la ACF en ese caso coincide con la de un sistema de moléculas que no interactúan. Además, debido a que se obtiene el mismo resultado en las dos situaciones límites del sistema de reacción-difusión, se espera que se sostenga en cualquier otra situación intermedia ($\tau_D \sim \tau_r$).

Sistema de reacción difusión con sitios de ligadura inmóviles

Cuando $D_S = 0$, la escala temporal, τ_S, está ausente de la ACF y la varianza de N^t se reduce para ambos sistemas, el de la figura 3.2 (a) y el sistema de reacción difusión con respecto al caso de $D_S \neq 0$. Estas dos características implican que $\Delta\tilde{G}_o/\tilde{G}_o$ se reduce y que el valor esperado de $\tilde{G}_o$ puede ser alcanzado en una escala temporal más corta si $D_S = 0$. Esto es equivalente a la situación transitoria de la figura 3.2 (a) para $T_{obs} \ll \tau_S$, pero con $\tilde{G}_o$ convergiendo a su valor real. Esto se ilustra en la figura 3.2 (b), donde se muestra la ACF derivada de los mismos datos que la figura 3.1 (a) ($D_S = 0$) para distintos valores de T_{obs}. Al comparar los valores de T_{obs} elegidos con el tiempo de correlación más lento, (en este caso, τ_{sm}), se satisface que, $T_{obs}/\tau_{sm} \sim 3$ (cruces), 43 (cuadrados), 681 (círculos) y 5450 (triángulos). Los errores relativos de $\tilde{G}_o$ en la figura 3.2 (b) se corresponden bastante bien con los estimados usando la ecuación (3.22) con $\mathrm{var}(N_i^t)$ y $\mathrm{var}(s_i^2)$ dados, respectivamente, por las ecuaciones (3.18-3.19) con $N^t = N_i^t$ $(i = f, S)$ y $\tau_{corr} = \tau_{sm}$. Es decir, para los parámetros de la simulación $\mathrm{var}(N_b^t) = \langle N_b^t \rangle (1 - [P_b^t]/[S]_T) = 10400$ y $\mathrm{var}(N_f^t) = \langle N_f^t \rangle = 3580$, y por lo tanto, $\Delta G_o/G_o \sim 8\tau_{sm}/T_{obs} \frac{(\mathrm{var}(N_f^t))^2 + (\mathrm{var}(N_b^t)^2)}{(\mathrm{var}(N_f^t) + \mathrm{var}(N_b^t))^2} \sim 5\tau_{sm}/T_{obs}$. Por lo cual, de acuerdo a las estimaciones, el error relativo de los ejemplos de la figura 3.2 (b) disminuye desde 1.7 a 0.001, al aumentar el tiempo de observación.

Sistema de reacción difusión con sitios de ligadura que difunden lentamente

Si ahora se considera el sistema en el cual las especies difunden e interactúan entre sí, cuando $D_S \neq 0$, el tiempo de correlación más corto, τ_S, también domina la variación de N_{ST}. Además determina durante cuanto tiempo se observa una correlación aparente que hace $\tilde{G}_{o_S} \approx 0$. A diferencia del caso con dos especies que fluorescen con la misma

intensidad y que difunden sin interactuar, en este caso no hay una correspondencia uno a uno entre las variables aleatorias independientes y los tiempos de correlación, como se puede ver de las ecuaciones (3.5- 3.11). De cualquier manera, para calcular el error del estimador del peso total, $\tilde{G}_o$, se usa la ecuación (3.22) con

$$N_1^t \equiv f_t(N_f^t + \frac{[S]}{[S]_T}N_b^t), \quad N_2^t \equiv (1-f_t)N^t \quad \text{y} \quad N_3^t \equiv \frac{[P_b^t]}{[S]_T}N_b^t,$$

es decir, se trabaja como si N_i^t, $i = 1, 2, 3$, fueran tres variables aleatorias independientes. Cada una de ellas está caracterizada por un único tiempo de correlación ($\tau_1 = \tau_{coll}$, $\tau_2 = \tau_{sm}$ y $\tau_3 = \tau_S$) y cumplen que $\text{var}(N_i^t) = \langle N_i^t \rangle$. Se satisface que $\sum_i N_i^t = N^t$ de modo que el peso total está dado por $G_o = \sum_i \text{var}(N_i^t)/\langle \sum_i N_i^t \rangle^2$, como se deduce de la ecuación (3.22).

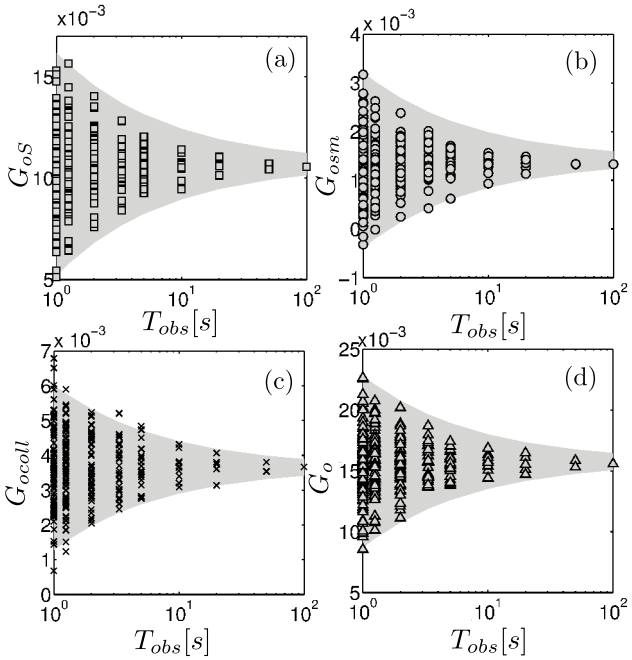

Figura 3.3: Pesos de las componentes y peso total de la ACF calculados a partir de simulaciones numéricas estocásticas para un sistema donde las moléculas f difunden e interactúan con los sitios de ligadura S (símbolos), junto con el error esperado para los dintitos tiempos de observación, T_{obs} (área sombreada). Los parámetros de las simulaciones se muestran en la tabla 3.1.

En la figura 3.3 se muestran los pesos de la ACF obtenidos a partir de las simulaciones estocásticas, en función del tiempo de observación, T_{obs} (símbolos). Se observa, como

los valores de los pesos disminuyen sus fluctuaciones a medida que T_{obs} es mayor, convergiendo a su valor esperado. Las áreas grises de la figura 3.3, representan el error estimado a partir de la ecuación (3.22), calculado para las variables aleatorias definidas previamente. Se puede ver que las fluctuaciones en los valores de las simulaciones concuerdan con el error estimado a partir de nuestra aproximación. Esto implica que, cuando las moléculas difunden y reaccionan, existe un límite fundamental para la precisión con la que pueden estimarse los pesos de la ACF, en un dado tiempo de observación. Este límite está determinado por los distintos tiempos de correlación del sistema, y es independiente del valor medio de moléculas en V_{obs}. Esto es consecuencia de que la ecuación (3.22) tiene dos tipos de términos,

$$\mathrm{var}(s_i^2)/\langle s_i^2\rangle^2 \approx 2\rho_i \sim 4\tau_i/T_{obs} \quad \text{y} \quad \mathrm{var}(\overline{N}_i^t)/\langle N_i^t\rangle^2 \approx \rho_i/\langle N_i^t\rangle \sim 2\tau_i/(T_{obs}\langle N_i^t\rangle),$$

donde los primeros no dependen del número medio de moléculas en el volumen de observación, mientras que los segundos sí.

4

Lectura endógena de concentraciones en el fluctuante ambiente intracelular

Aquellas fluctuaciones que son responsables de poner un límite a la estimación de parámetros cuando se observan procesos o señales en el interior celular, también afectan la precisión en que los mismos procesos biofísicos se llevan a cabo. Tal es el caso de la lectura de concentraciones de agentes por parte de las células o por componentes en su interior. Las células necesitan leer la concentración de agentes mensajeros que le indican cómo actuar en diversos momentos. Se ha observado que diversos procesos en el interior celular responden con gran precisión frente a cambios muy pequeños en concentraciones de agentes. La reproducibilidad de los patrones con que se expresan los genes en las primeras etapas del desarrollo embrionario es un buen ejemplo de cuan preciso puede llegar a ser un sistema biológico. El caso de la expresión del Hunchback a

partir del gradiente de Bicoid en *Drosophila melanogaster*, demuestra que para alcanzar tal precisión la célula debe determinar la concentración de Bcd con una precisión muy cercana al límite físico impuesto por las propias fluctuaciones en el número de sus moléculas [Gregor et al., 2007b]. Otro ejemplo de este tipo de sistema es la quimiotaxis en bacterias, fenómeno por el cual las bacterias se orientan y mueven en la dirección de mayor concentración de su fuente de alimento. En [Berg and Purcell, 1977] se estudió cual era el límite con el cual las concentraciones podían ser determinadas, como se describió en el capítulo 1. En este Capítulo se retoman los trabajos de Berg & Purcell [Berg and Purcell, 1977], Bialek [Bialek and Setayeshgar, 2005] y Kaizu [Kaizu et al., 2014], y se busca determinar el límite fundamental con que pueden ser estimadas concentraciones a partir de contar el número de moléculas dentro de un volumen de observación, en un sistema de ligandos que difunden e interactúan con receptores fijos. Para esto, se hace uso de los formalismos desarrollados en los capítulos anteriores, sobre la determinación de expresiones analíticas para la ACF. Se presentan expresiones para el error en la estimación de concentraciones que son válidas para todo tiempo de observación, y no sólo para tiempos largos. Además, se presenta una expresión que tiene en cuenta una fuente de ruido adicional, debido a la relación no lineal entre ligandos y receptores. Por último se analizan dos situaciones en las cuales los resultados presentados en este Capítulo pueden ayudar a entender las observaciones experimentales: la rápida convergencia de la precisión de la concentración de ARN en la transcripción de ADN, y las diferentes escalas temporales observadas en la distribución de tiempos de espera de creación de productos en un sistema de enzima única.

4.1 Estimación de concentraciones a partir de las fluctuaciones en el número de moléculas

Se considera un sistema compuesto de moléculas de un ligando, P_f, que difunden con coeficiente de difusión D_f y que interactúan con receptores S, de acuerdo con el esquema de reacción (1.12). Además, se considera que los receptores pueden ser inmóviles o móviles, y en el último caso mucho más masivos que los ligandos de manera

que las especies S y P_b difunden con coeficiente $D_S \ll D_f$. Las moléculas de las distintas especies están distribuidas uniformemente dentro de un volumen V_T del cual no pueden escapar y están en equilibrio.

Dado que se quiere determinar las concentraciones de las distintas especies, se cuenta el número de moléculas de cada una, $N^{(f)}$, $N^{(b)}$ y $N^{(S)}$, dentro de un volumen de observación, V_{obs}. Estas son variables aleatorias, ya que las moléculas pueden difundir, y cambiar de una especie a otra. Por lo tanto, es necesario medir durante un tiempo de observación T_{obs}, para estimar su valor

$$\overline{N}^{(s)}(T_{obs}) = \frac{1}{T_{obs}} \int_0^{T_{obs}} dt N^{(s)}(t). \tag{4.1}$$

donde el índice (s) identifica a cada una de las especies, $s = f, b, S$. En la medida que el tiempo de observación, T_{obs}, aumente, los valores de $\overline{N}^{(s)}(T_{obs})$ se van a aproximar a su valor medio correspondiente, $\langle N^{(s)} \rangle$. En el caso de P_f, el valor medio satisface $\langle N^{(f)} \rangle = [P_f]V_{obs}$. En el caso de los receptores, hay que diferenciar si se trata de receptores móviles o inmóviles. Cuando los receptores pueden difundir, es decir, $D_S \neq 0$, los valores medios de las especies P_b y S satisfacen $\langle N^{(b)} \rangle = [P_b]V_{obs}$ y $\langle N^{(S)} \rangle = [S]V_{obs}$ respectivamente. En cambio, si $D_S = 0$, el número de receptores ocupados y libres se mantiene constante dentro del volumen de observación V_{obs}, $N_{ST} \equiv N^{(S)} + N^{(b)} = \text{cte}$, por lo tanto, los valores medios satisfacen que $\langle N^{(b)} \rangle = N_{ST}[P_f]/([P_f] + K_D)$ y $\langle N^{(S)} \rangle = N_{ST} - \langle N^{(b)} \rangle$. Para determinar, cuán precisa es la estimación del valor medio a tiempo T_{obs} se calcula la varianza de $\overline{N}^{(s)}$.

$$\text{var}\left(\overline{N}^{(s)}(T_{obs})\right) = \left\langle \left(\overline{N}^{(s)}(T_{obs}) - \langle N^{(s)} \right)^2 \right\rangle. \tag{4.2}$$

La varianza se puede relacionar con la función de autocorrelación [Berg and Purcell, 1977],

$$G^{(s)}(\tau) = \left\langle \left(\overline{N}^{(s)}(t) - \langle N^{(s)} \right) \left(\overline{N}^{(s)}(t+\tau) - \langle N^{(s)} \right) \right\rangle, \tag{4.3}$$

como,

$$\text{var}\left(\overline{N}^{(s)}(T_{obs})\right) = \frac{1}{T_{obs}^2} \int_0^{T_{obs}} dt' \int_0^{T_{obs}} dt G^{(s)}(t'-t). \tag{4.4}$$

De la ecuación (4.4) se ve que es posible calcular la varianza a través de la función de autocorrelación. A continuación, se calcula la ACF para este sistema. Vale aclarar

que la definición de la ACF de la ecuación (4.3) difiere por un factor $\langle N^{(s)}\rangle^2$ de la definición utilizada en los capítulos anteriores para el caso de FCS.

4.1.1 ACF de las fluctuaciones en el número de moléculas

Para el cálculo de la ACF, se expresa el número de moléculas de cada especie en función de su concentración,

$$N^{(s)}(t) = \int_{V_{obs}} d^3r c^{(s)}(\vec{r}, t), \tag{4.5}$$

donde $c^{(s)}(\vec{r}, t)$ es la concentración de la especie (s) en el punto $\vec{r}$ y tiempo t. A diferencia del caso de la ACF en FCS, en donde las moléculas emiten fluorescencia que es recolectada por un detector, y es necesario integrar a lo largo de todo el volumen, V_T, en este caso, sólo hace falta contar las moléculas dentro de V_{obs}. De todas maneras, en las cuentas que siguen se considera un volumen gaussiano y se integra sobre todo el volumen V_T, dado que se simplifican los cálculos, y así se pueden obtener expresiones análiticas. Entonces, en vez de contar las moléculas dentro de V_{obs} se cuentan en todo el volumen V_T, asignando un peso gaussiano a cada molécula, $N^{(s)}(t) = \int_{V_T} d^3r I(\vec{r}) c^{(s)}(\vec{r}, t)$, donde $I(\vec{r}) = \exp\left(-2\frac{r^2}{w_r^2}\right)$, $r = |\vec{r}|$, w_r es el ancho de la cintura de la gaussiana y $c^{(s)} = \sum_{i_s} \delta(\vec{r} - \vec{r}_{i_s}(t))$ sumando sobre todas las moléculas de la especie (s) y $\vec{r}_{i_s}(t)$ su ubicación al tiempo t. De esta forma, la ACF queda:

$$\begin{aligned} G^{(s)}(\tau) &= \langle \delta N^{(s)}(t) \delta N^{(s)}(t+\tau) \rangle \\ &= \frac{1}{T_{obs}} \int d\vec{r} \int d\vec{r'} \int_0^{T_{obs}} dt\, I(\vec{r}) I(\vec{r'}) \delta c^{(s)}(\vec{r}, t) \delta c^{(s)}(\vec{r'}, t+\tau), \end{aligned} \tag{4.6}$$

siendo $\delta c^{(s)} \equiv c^{(s)}(\vec{r}, t) - \langle N^{(s)}\rangle / V_{obs}$ y $V_{obs} = \int d^3\vec{r} I(\vec{r}) = (\pi/2)^{3/2} w_r^3$.

Resolver la ecuación (4.6) nos va a permitir estimar la ecuación (4.2). De todas formas, primero se analizan dos casos partículares sencillos, que van a servir para luego generalizar a sistemas donde los ligandos interactúan con los receptores.

Difusión libre de ligandos

Primero se considera el caso de un conjunto de moléculas que difunden libremente, pero que no interactúan con receptores. La expresión de la ACF a partir de (4.6) se obtiene de manera similar a como se hizo en la ecuación (1.23),

$$G(\tau) = \frac{\mathrm{var}(N)}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{3/2}}, \tag{4.7}$$

donde D es el coeficiente de difusión del ligando, $\tau_D = \frac{w_r^2}{4D}$ el tiempo de correlación. A su vez vale recordar que el número de moléculas en el interior de V_{obs} sigue una distribución de Poisson, con lo cual $\mathrm{var}(N) = \langle N \rangle$. Usando la ecuación (4.4), es posible expresar la varianza del promedio como,

$$\mathrm{var}\left(\overline{N}(T_{obs})\right)) = \mathrm{var}(N)\frac{4\tau_D}{T_{obs}}\left(1 + 2\frac{\tau_D}{T_{obs}}\left(1 - (1 + \frac{T_{obs}}{\tau_D})^{1/2}\right)\right). \tag{4.8}$$

Si se considera $T_{obs} \gg \tau_D$, se puede escribir el error relativo del estimador promedio como,

$$\Delta(\overline{N}) = \frac{\left(\mathrm{var}(\overline{N})\right)^{1/2}}{\langle N \rangle} = \frac{w_r}{\sqrt{2D\langle N \rangle T_{obs}}}. \tag{4.9}$$

De esta última expresión, se puede ver que el error en la estimación del número de moléculas no sólo depende del número de moléculas dentro de V_{obs}, sino que también depende del tiempo de observación y la constante de difusión. A partir de la ecuación (4.9), es posible estimar el tiempo necesario para tener una precisión de valor α,

$$T_{obs}(\alpha) \sim \frac{\tau_D \mathrm{var}(N)}{\left(\alpha\langle N \rangle\right)^2}. \tag{4.10}$$

Finalmente, se puede reescribir la ecuación (4.9), en términos de la concentración c de las moléculas en V_{obs}, $c = \langle N \rangle / V_{obs}$, como,

$$\Delta(\overline{c}) = \frac{\left(\mathrm{var}(\overline{c})\right)^{1/2}}{c} = \frac{1}{\sqrt{2^{-1/2}\pi^{3/2} D w_r c T_{obs}}}. \tag{4.11}$$

La ecuación (4.11) es la misma que encuentran Berg & Purcell en [Berg and Purcell, 1977] y que se presentó en el capítulo 1 (1.42), con la única diferencia de un factor geométrico que depende del volumen de observación considerado. Es importante notar que la ecuación (4.9), a diferencia de la expresión de Ber & Purcell, permite estimar la varianza del promedio, para cualquier tiempo de observación, inclusive, si $T_{obs} \lesssim \tau_D$.

ACF con decaimiento exponencial

Si ahora se considera un conjunto de receptores inmóviles, que puede cambiar entre dos estados $A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} B$, (prendido o apagado, libre u ocupado), la función de correlación es una función exponencial simple [Krichevsky and Bonnet, 2002],

$$G(\tau) = \mathrm{var}(N)\exp(-\frac{\tau}{\tau_r}), \tag{4.12}$$

donde $\tau_r = k_1 + k_{-1}$ es el tiempo de relajación al equilibrio del sistema. Nuevamente, reemplazando G en la ecuación (4.4), la varianza del promedio se escribe,

$$\mathrm{var}\left(\overline{N}(T_{obs})\right)) = \mathrm{var}(N)\frac{2\tau_r}{T_{obs}}\left(1 + \frac{\tau_r}{T_{obs}}\left(e^{-\frac{T_{obs}}{\tau_r}} - 1\right)\right). \tag{4.13}$$

Ligandos interactuando con receptores

Estos dos primeros casos particulares son sencillos de analizar, dado que el sistema sólo tiene un único tiempo de correlación. Sin embargo, cuando se consideran reacciones entre ligandos y receptores, como se mostró en los capítulos anteriores, aparecen varios tiempos característicos, lo cual vuelve el análisis un poco más complicado.

Se considera el sistema descripto por el esquema de reacción (1.12), y se procede al cálculo de la ACF. Siguiendo el mismo procedimiento que en la sección 2.1 y también descripto en [Ipiña and Dawson, 2014, Krichevsky and Bonnet, 2002], se calcula $\delta c^{(s)}$, para las 3 especies del sistema, como la solución de las ecuaciones de reacción-difusión linearizadas alrededor del equilibrio. Luego, la solución puede ser escrita en el espacio de Fourier en términos de los autovectores y autovalores del sistema linearizado, resultando $G(\tau)$:

$$G^{(s)}(\tau) \quad = \quad \int d\vec{q}|\hat{I}(\vec{q})|^2 \sum_m X_j^{(m)} \exp(\lambda^{(m)}\tau)(X^{-1}\sigma^2)_j^{(m)} \tag{4.14}$$

donde el índice j hace referencia a las distintas especies ($j = 1$ para $s = S$, $j = 2$ para $s = f$ y $j = 3$ para $s = b$) y el índice (m) identifica a los autovalores, $\hat{I}(\vec{q})$ es la transformada de Fourier de $I(\vec{r})$ y $\vec{q}$ es la variable conjugada de $\vec{r}$, X es la matriz de autovectores, $\lambda^{(m)}$ es el m-ésimo autovalor y σ^2 es la matriz de correlaciones iniciales

entre las distintas especies, $\sigma_{ij}^2 = \langle \delta N^{(s)}(t) \delta N^{(s')}(t) \rangle 2^{3/2}/V_{obs}$ donde i, j son los índices correspondientes a la especie (s) y (s'), respectivamente.

Se asume, de igual manera que se hizo en el capítulo 3, que las correlaciones son de corto alcance, es decir $\langle \delta c^{(s)}(\vec{r}, t) \delta c^{(s')}(\vec{r'}, t) \rangle = \sigma_{ij}^2 \delta(\vec{r} - \vec{r'})$. Como se mostró anteriormente, el número de moléculas dentro de V_{obs} de una especie que difunde libremente sigue una distribución de Poisson, y $\sigma_{ij}^2 = \langle c^{(s)} \rangle \delta_{ij}$, siendo δ_{ij} la función delta de Kronecker. Esto es válido para los ligandos, pero no para los receptores, los cuales pueden ser móviles o inmóviles. En caso de que sean móviles, es decir, que $D_S \neq 0$, el número de moléculas va a seguir una distribución de Poisson, pero en el caso de que sean inmóviles, $D_S = 0$, ésto ya no es correcto. Dado que al no difundir, el número de receptores dentro de V_{obs} es constante ($N^{(S)} + N^{(b)} = N_{ST} = \text{cte}$), y el número de moléculas de los receptores en estado libre, $N^{(S)}$, o ligado a un ligando, $N^{(b)}$, sigue una distribución Binomial, de manera que $\langle \delta c^{(S)}(\vec{r}, t) \delta c^{(b)}(\vec{r'}, t) \rangle = -\langle \delta c^{(b)}(\vec{r}, t) \delta c^{(b)}(\vec{r'}, t) \rangle = -\langle N^{(b)} \rangle (1 - f_b) \delta(\vec{r} - \vec{r'}) 2^{3/2}/V_{obs}$, donde $f_b = \langle N^{(b)} \rangle / N_{ST}$ es la fracción de receptores ligados a un ligando en V_{obs} [Ipiña and Dawson, 2014].

La ecuación (4.14) en general no tiene una solución análitica, pero como se mostró en el capítulo 2 y en [Ipiña and Dawson, 2013] existen dos límites, el de reacciones rápidas y el de difusión rápida, en los cuales los tres autovalores del sistema pueden ser expresados como $\lambda_i = -\nu_i - D_i q^2$. En ese caso, la ACF se escribe como:

$$G^{(s)}(\tau) = \sum_{i=1}^{3} G_i^{(s)}(\tau) = \sum_{i=1}^{3} \frac{G_{oi}^{(s)}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}\right)^{3/2}} e^{-\nu_i \tau}, \tag{4.15}$$

donde $\tau_{Di} = w_r^2/4D_i$ y $\tau_{\nu i = 1/\nu_i}$ son los tiempos característicos asociados a la difusión y a las reacciones respectivamente, y los pesos, $G_{oi}^{(s)}$, resultan de combinaciones lineales de las covarianzas, σ_{ij}^2, entre las distintas variables estocásticas y satisfacen, $G_o^{(s)} \equiv \sum_i G_{oi}^{(s)} = \text{var}(N^{(s)})$.

En la tabla 4.1 se muestran los distintos coeficientes, τ_{Di}, ν_i y $G_{oi}^{(s)}$ derivados de la ecuación (4.14), para ambos límites y en los casos $D_S = 0$ y $D_S \neq 0$ para $s = f, b$.

	$G_o^{(f)}$		$G_o^{(b)}$		τ_D		ν	
	$D_S = 0$	$D_S \neq 0$	$D_S = 0$	$D_S \neq 0$	$D_S = 0$	$D_S \neq 0$	$D_S = 0$	$D_S \neq 0$
$G_1(\tau)$								
$r-r$		0	0	$f_b\langle N^{(b)}\rangle$		$\frac{w_r^2}{4D_S}$		0
$d-r$		0	0	$f_b\langle N^{(b)}\rangle$		$\frac{w_r^2}{4D_S}$		0
$G_2(\tau)$								
$r-r$		$\frac{1}{(1+\beta)}\langle N^{(f)}\rangle$		$\frac{(1-f_b)\beta}{(1+\beta)}\langle N^{(b)}\rangle$		$\frac{w_r^2}{4D_{coll}}$		0
$d-r$		0		$(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle$		$\frac{w_r^2}{4D_S}$	$\frac{k_{off}(1+\beta)}{1-f_b}$	$\frac{k_{off}}{1-f_b}$
$G_3(\tau)$								
$r-r$		$\frac{\beta}{(1+\beta)}\langle N^{(f)}\rangle$		$\frac{(1-f_b)}{(1+\beta)}\langle N^{(b)}\rangle$		$\frac{w_r^2}{4D_{ef2}}$		$\frac{k_{off}(1+\beta)}{1-f_b}$
$d-r$		$\langle N^{(f)}\rangle$		0		$\frac{w_r^2}{4D_f}$		0

Tabla 4.1: Expresiones de los pesos, $G_{oi}^{(f)}$ y $G_{oi}^{(b)}$, para los casos $D_S = 0$ y $D_S \neq 0$ y en los límites de difusión rápida (d-r) y reacciones rápidas (r-r), donde $f_b = \frac{\langle N^{(b)}\rangle}{N_{ST}}$, $D_{coll} = \frac{D_f+\beta D_S}{1+\beta}$, $D_{ef2} = \frac{\beta D_f + D_S}{1+\beta}$ and $\beta = \frac{\langle N^{(S)}\rangle^2}{K_D N_{ST} V_{obs}}$. Se definen las siguientes constantes de tiempo, $\tau_f = \frac{w_r^2}{4D_f}$, $\tau_S = \frac{w_r^2}{4D_S}$, $\tau_{coll} = \frac{w_r^2}{4D_{coll}}$, $\tau_{ef2} = \frac{w_r^2}{4D_{ef2}}$, $\tau_r = \frac{1-f_b}{k_{off}(1+\beta)}$ y $\tau_{off} = \frac{1-f_b}{k_{off}}$

Dado que los tiempos característicos τ_{Di} y $\tau_{\nu i} = 1/\nu_i$ están asociados a la difusión y las reacciones respectivamente, y debido a que las expresiones corresponden a límites en donde los tiempos de reacción y de difusión están separados en varios órdenes de magnitud, es posible asumir que cada componente tiene asociado un único tiempo de correlación. Este tiempo de correlación puede ser difusivo o exponencial. De manera que es posible escribir la ACF como la suma de varias componentes con expresiones como las de las ecuaciones (4.7) y (4.12), donde en vez de var(N) se usa el peso correspondiente al tiempo de correlación,

$$G^{(s)}(\tau) = \sum_{i=1}^{3} W_i^{(s)} \Phi_i^{(s)}(\tau), \tag{4.16}$$

donde $W_i^{(s)} = \frac{G_{oi}^{(s)}}{\mathrm{var}(N^{(s)})}$ y $\Phi_i^{(s)}(\tau) = \left(1 + \tau/\tau_i^{(s)}\right)^{-3/2}$ en caso de que $\tau_i^{(s)}$ corresponda a un tiempo difusivo y $\Phi_i^{(s)}(\tau) = \exp(-\tau/\tau_i^{(s)})$ si $\tau_i^{(s)}$ es exponencial.

4.1.2 Varianza y errores relativos

A partir de las ecuaciones (4.8) y (4.13), se puede escribir el error del promedio del número de moléculas para el caso de ligandos que interactúan con receptores como:

$$(\Delta_r \overline{N}^{(s)})^2(T_{obs}) = \frac{\mathrm{var}\left(\overline{N}^{(s)}\right)}{\langle N^{(s)}\rangle^2} \approx \frac{\mathrm{var}(N^{(s)})}{\langle N^{(s)}\rangle^2} \sum_{i=1}^{3} W_i^{(s)} \varphi_i^{(s)}(\tau_i^{(s)}/T_{obs}), \tag{4.17}$$

donde $\varphi_i^{(s)}(\tau_i^{(s)}/T_{obs}) = \frac{4\tau_i^{(s)}}{T_{obs}}\left(1 + 2\frac{\tau_i^{(s)}}{T_{obs}}\left(1 - (1 + \frac{T_{obs}}{\tau_i^{(s)}})^{1/2}\right)\right)$ en caso de que $\tau_i^{(s)}$ corresponda a un tiempo difusivo, y $\varphi_i^{(s)}(\tau_i^{(s)}/T_{obs}) = \frac{2\tau_i^{(s)}}{T_{obs}}\left(1 + \frac{\tau_i^{(s)}}{T_{obs}}\left(\exp\left(-\frac{T_{obs}}{\tau_i^{(s)}}\right) - 1\right)\right)$ si $\tau_i^{(s)}$ es exponencial.

La expresión (4.17) permite estimar el error en la determinación del número de moléculas de la especie (s) en un dado tiempo T_{obs}, en función de la varianza $\mathrm{var}(N^{(s)})$, el número medio $\langle N^{(s)}\rangle$ y los pesos W_i y tiempos de correlación τ_i que se derivan de la ACF. Es interesante notar que, dependiendo de la duración de la observación, el error va a estar dominado por distintos tiempos. Para tiempos de observación cortos, va a existir contribución de todos los tiempos en el error. A medida que el tiempo de observación es cada vez mayor, la contribución de los tiempos más cortos comienza a ser despreciable y el error es dominado por los tiempos de correlación asintóticos. Por otro lado, hay que tener en cuenta el peso W_i de cada tiempo de correlación. Como ejemplo, se puede pensar en una situación donde el tiempo de correlación más rápido, (τ_1 donde se recuerda que los tiempos de correlación fueron ordenados de menor a mayor), está acompañado del peso mayor en la ACF, supóngase $W_1 = 0{,}9$. En ese caso, cuando $T_{obs} \gg \tau_1$ el término del error asociado al tiempo τ_1 se hace despreciable, y el error en $\overline{N}^{(s)}$ se reduce un 90 %. Por el contrario, si los tiempos más largos tienen los pesos predominantes, el error no se va a ver reducido de forma apreciable a medida que el tiempo de observación supera los tiempos de correlación más cortos.

Caso de receptores inmóviles y reacciones rápidas

Dada la ecuación (4.17), considerando el caso $D_S = 0$ y recordando que en el límite de reacciones rápidas se cumple que $\tau_r \ll \tau_{D_{eff2}}$, se puede escribir la varianza del

promedio del número de moléculas, para los ligandos libres y los receptores ligados como,

$$\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)})_{r-r} = (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle \left(\tfrac{\beta}{1+\beta}\varphi_{D_{coll}}(T_{obs}) + \tfrac{1}{1+\beta}\varphi_r(T_{obs})\right), \tag{4.18}$$

$$\mathrm{var}(\overline{N}^{(f)})_{r-r} = \langle N^{(f)}\rangle \left(\tfrac{1}{1+\beta}\varphi_{D_{coll}}(T_{obs}) + \tfrac{\beta}{1+\beta}\varphi_r(T_{obs})\right), \tag{4.19}$$

donde,

$$\varphi_{D_{coll}}(T_{obs}) = \tfrac{4\tau_{coll}}{T_{obs}}\left(1 + 2\tfrac{\tau_{coll}}{T_{obs}}\left(1 - \sqrt{1+\tfrac{T_{obs}}{\tau_{coll}}}\right)\right), \tag{4.20}$$

$$\varphi_r(T_{obs}) = \tfrac{2\tau_r}{T_{obs}}\left(1 + \tfrac{\tau_r}{T_{obs}}\left(\exp\left(-\tfrac{T_{obs}}{\tau_r}\right) - 1\right)\right). \tag{4.21}$$

Es interesante notar que dado que los pesos de la ACF de ambas especies se encuentran cruzados, es decir, $W_2^{(f)} = W_3^{(b)} = (1+\beta)^{-1}$ y $W_3^{(f)} = W_2^{(b)} = 1 - W_2^{(f)}$, la misma situación se vuelve a dar para las varianzas.

Caso de receptores inmóviles y difusión rápida

Ahora se analiza como es la convergencia del promedio en el límite de difusión rápida y $D_S = 0$. De la tabla 4.1, se puede ver que en este caso las ACF para las diferentes especies sólo dependen de un único tiempo de correlación. Nuevamente, a partir de la ecuación (4.17) es posible escribir la varianza del error para cada especie,

$$\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)})_{d-r} = (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle \tfrac{2\tau_{off}}{T_{obs}}\left(1 + \tfrac{\tau_{off}}{T_{obs}}\left(\exp\left(-\tfrac{T_{obs}}{\tau_{off}}\right) - 1\right)\right), \tag{4.22}$$

$$\mathrm{var}(\overline{N}^{(f)})_{d-r} = \langle N^{(f)}\rangle \tfrac{4\tau_f}{T_{obs}}\left(1 + 2\tfrac{\tau_f}{T_{obs}}\left(1 - \sqrt{1+\tfrac{T_{obs}}{\tau_f}}\right)\right). \tag{4.23}$$

Contribución no-lineal de las fluctuaciones en el valor medio de la fracción de sitios ocupados

Cuando los sitios son inmóviles, $N^{(b)}$ es binomial y $\mathrm{var}(N^{(b)}) = (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle$ depende de $\langle N^{(f)}\rangle$ debido a que $f_b = \langle N^{(f)}\rangle/(\langle N^{(f)}\rangle + K_D V_{obs})$. Todas las estimaciones del error que se han usado fueron derivadas cuando el sistema se encuentra cercano al equilibrio y su dinámica puede ser modelada por un conjunto de ecuaciones lineales. La dependencia de $\mathrm{var}\left(N^{(b)}\right)$ con $\langle N^{(f)}\rangle$ es una consecuencia de la no linealidad del

problema. El número de moléculas libres en V_{obs}, $N^{(f)}$, es una variable estocástica y por lo tanto, está sujeta a los mismos tipos de incertezas que $N^{(b)}$. Es decir, toma cierto tiempo para que $\overline{N}^{(f)}$ difiera de $\langle N^{(f)} \rangle$ en un porcentaje pequeño. Entonces, es posible considerar que, luego de un tiempo T_{obs}, sólo se cuenta con una aproximación del valor de f_b y que las fluctuaciones en $N^{(f)}$, que decaen con su propio tiempo de correlación, tiene una influencia directa en $\mathrm{var}(N^{(b)})$ (y en $\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)})$). De manera de tener en cuenta este efecto, se estima $|\tilde{f}_b - f_b|$ como:

$$\Delta f_b = \left| \frac{\partial \tilde{f}_b}{\partial \overline{N}^{(f)}} \right| \sqrt{\mathrm{var}(\overline{N}^{(f)})} = f_b(1 - f_b)\Delta_r(\overline{N_f}), \tag{4.24}$$

luego se aproxima:

$$\begin{aligned} \mathrm{var}(N^{(b)}) &\approx (1 - f_b)\langle N^{(b)} \rangle + \left| \frac{\partial \, \mathrm{var}(N^{(b)})}{\partial f_b} \right| \Delta f_b \\ &= (1 - f_b)\langle N^{(b)} \rangle \left(1 + f_b \Delta_r(\overline{N}^{(f)}) \right), \end{aligned} \tag{4.25}$$

y se usa para calcular $\Delta_r(\overline{N}^{(b)})$ como antes. La corrección "no-lineal" de la ecuación (4.25) puede ser apreciable si $\langle N^{(f)} \rangle$ es lo suficientemente pequeño, una situación que ocurre cuando se da el límite de difusión rápida.

4.1.3 Comparación con expresiones de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu

En el capítulo 1 se hizo una breve introducción de los resultados obtenidos en los trabajos de [Berg and Purcell, 1977, Bialek and Setayeshgar, 2005, Kaizu et al., 2014]. En esta sección se realiza una comparación de sus expresiones con las nuestras. En los tres trabajos se busca determinar cual es el límite fundamental en la precisión con la que pueden estimarse concentraciones de especies en forma endógena, a través de la interacción de moléculas con un receptor en un esquema de reacción igual al que se considera en este trabajo (1.12). Luego la concentración del ligando, a la que se identifica como $c = [P_f]$ para mantener la misma notación que estos trabajos, se estima a partir del promedio del estado de ocupación del receptor en un tiempo de observación T_{obs}. De esta manera, teniendo en cuenta que $f_b = \frac{c}{c+K_D}$, el error en la concentración

del ligando se escribe a partir del error en la ocupación del receptor como,

$$\frac{\delta c}{c} = \frac{1}{c}\frac{dc}{df_b}\delta(\overline{f}_b) = \frac{1}{(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle}\sqrt{\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)})}. \tag{4.26}$$

Por otro lado, en los trabajos de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu estudian el problema para tiempos de observación mucho mayores que los tiempos de correlación asintóticos del sistema. Definiendo al tiempo de correlación asintótico de cada especie como,

$$\tau^{(s)} = \frac{1}{\mathrm{var}(N^{(s)})}\int_0^\infty G^{(s)}(\tau)d\tau. \tag{4.27}$$

Por lo que, formalmente, las expresiones de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu son válidas para $T_{obs} \gg \tau^{(b)}$. En ese caso, la varianza del promedio de los receptores ocupados se puede escribir como, $\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)}) = (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle 2\frac{\tau^{(b)}}{T_{obs}}$, por lo tanto la ecuación (4.26) se puede escribir,

$$\frac{\delta c}{c} = \sqrt{\frac{2\tau^{(b)}}{(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle T_{obs}}}. \tag{4.28}$$

De esta manera, es posible comparar las diferentes expresiones a través de los tiempos asintóticos de correlación. Es decir, las diferencias entre las expresiones de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu se deben a que obtienen diferentes expresiones para $\tau^{(b)}$. Usando la ecuación (4.27) se calcula el tiempo de correlación dado por nuestra ACF (4.15),

$$\tau^{(b)} = \frac{(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle}{2^{1/2}\pi^{3/2}acD_f} + \frac{1-f_b}{k_{off}} \tag{4.29}$$

donde para mantener la notación de Berg & Purcell, se usa el símbolo $a = w_r/2$, que en nuestro caso es la mitad del ancho de la cintura de la gaussiana, mientras que en sus trabajos representa el radio de la sección eficaz de interacción del receptor. Si se compara el tiempo de correlación obtenido con los que se desprenden de las expresiones de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu, las ecuaciones (1.45), (1.46) y (1.47) a partir de (4.28), se observa que es el mismo que obtiene Bialek en su trabajo [Bialek and Setayeshgar, 2005],

$$\tau^{(b)}_{bialek} = \frac{(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle}{2\pi acD_f} + \frac{1-f_b}{k_{off}},$$

con la diferencia de un factor geométrico. Por otro lado, los tiempos de Berg & Purcell y Kaizu son

$$\tau^{(b)}_{berg} = \frac{\langle N^{(b)}\rangle}{4acD_f} \quad y \quad \tau^{(b)}_{kaizu} = \frac{\langle N^{(b)}\rangle}{4\pi acD_f} + \frac{1-f_b}{k_{off}},$$

respectivamente. Por un lado, $\tau^{(b)}_{bialek}$ y $\tau^{(b)}_{kaizu}$ tienen un término asociado a la posibilidad de los ligandos de pegarse y despegarse del receptor, que es el mismo para ambos y también es igual al de nuestra expresión. Este término no aparece en la expresión de Berg & Purcell dado que en su descripción no incorporaron la dinámica del receptor. Por otro lado, el otro término, que tiene en cuenta la llegada de los ligandos al receptor, no es el mismo en todos los casos. Nuestro término es el mismo que obtiene Bialek, pero diferente al que obtienen Berg y Kaizu. La diferencia parece deberse a distintas maneras de linealizar las ecuaciones del problema no-lineal que describen la dinámica.

Retomando nuestra expresión para el tiempo de correlación asintótico, es posible reescribirlo como,

$$\tau^{(b)} = W^{(b)}_{r-r}\tau_{coll} + W^{(b)}_{d-r}\tau_{off}, \tag{4.30}$$

donde $W^{(b)}_{r-r}$ y $W^{(b)}_{d-r}$ son los pesos de la ACF, de la ecuación (4.16) para la especie ($s = b$), asociados a la componente con el tiempo de correlación más lento, τ_{coll} y τ_{off}, en los límites de reacciones rápidas y difusión rápida respectivamente. De cualquier manera, a pesar de que el tiempo de correlación asintótico tenga dos términos, en los límites donde nuestras expresiones son válidas, sólo uno de los términos tiene relevancia. Por ejemplo, en el límite de reacciones rápidas, $\tau_{coll} \gg \tau_{off}$, por lo que $\tau^{(b)} \approx W^{(b)}_{r-r}\tau_{coll} = \frac{(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle}{2^{-1/2}\pi^{3/2}acD_f}$. En cambio, en el límite de difusión rápida, $\tau_{coll} \gg \tau_{off}$, el tiempo de correlación queda $\tau^{(b)} \approx W^{(b)}_{d-r}\tau_{off} = \frac{1-f_b}{k_{off}}$. Con lo cual, se puede decir, que el tiempo de correlación que pone el límite fundamental a la precisión en la lectura endógena de concentraciones depende del límite en el que el sistema se encuentra.

4.1.4 Más allá del límite asintótico

Como se mencionó previamente, los resultados de Berg & Purcell, Bialek y Kaizu, son válidos para tiempos mucho mayores a los de correlación, $T_{obs} \gg \tau^{(b)}$, mientras que las expresiones (4.17-4.25) son válidas para todo tiempo. A continuación se comparan las diferencias entre estimar los errores de las concentraciones usando nuestras expresiones (4.17-4.25) y la expresión asintótica de Bialek (1.46).

En la figura 4.1 se muestra la varianza del promedio normalizada por su valor esperado, $\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)})/\mathrm{var}(N^{(b)})$, en función de T_{obs}, usando nuestra expresiones (4.18)

y (4.22) que son válidas para todo T_{obs} (línea continua) y la expresión para tiempos asintóticos (1.46) (línea de trazos y puntos). En la figura 4.1 (a), (b) y (d) vale la aproximación de reacciones rápidas, mientras que en la figura 4.1 (c) se cumple la difusión rápida. Se observa que, para tiempos T_{obs} suficientemente largos, nuestra expresión y la asintótica predicen el mismo decaimiento. Esto se puede ver claramente en la figura 4.1 (b), donde se muestran las mismas curvas que en la figura 4.1 (a) pero con el eje vertical en escala logarítmica. Sin embargo, para tiempos no tan largos, se ve una marcada diferencia entre el error predicho por la expresión (4.17) y la asintótica (1.46), donde esta última tiende a sobrestimarlo. El rol de los tiempos individuales se puede examinar en el límite de reacciones rápidas, donde hay dos tiempos carácteristicos, τ_r y τ_{coll}, ($\tau_r \ll \tau_{coll}$). En las figuras 4.1 (a) y (d), el decaimiento inicial del error está asociado al tiempo corto τ_r, y está claramente separado del subsiguiente decaimiento asociado al tiempo largo τ_{coll} (asintótico). Si $\tau_r \ll \tau_{coll}$, el término asociado a τ_r en la ecuación (4.18) puede ser despreciable, aún cuando $T_{obs} \ll \tau_{coll}$. Además, dependiendo de los pesos de cada término, los cuales difieren en un factor β, puede acentuarse el decaimiento de la varianza para tiempos $T_{obs} \ll \tau_{coll}$. En tal caso, usar la expresión asintótica, puede llevar a una sobre estimación del tiempo necesario para alcanzar una determinada precisión α, inclusive si α es muy pequeño. En la figura 4.1 (d), se muestra una situación donde $\beta = 0{,}0034$, $\tau_r = 5 \times 10^{-5}s$ y $\tau_{coll} = 0{,}25s$, por lo que el valor de la varianza decae al 10 % en $T_{obs} = 9{,}4 \times 10^{-4}s \ll \tau_{coll}$. Por otro lado, la expresión asintótica estima un tiempo de $T_{obs} = 0{,}033s$ para que la varianza decaiga al 10 %. Finalmente, en la figura 4.1 (c), se muestra una situación en el límite de difusión rápida, la línea continua representa la expresión (4.22), y la expresión asintótica en línea de trazos y puntos, mientras que la línea de trazos corresponde a la expresión (4.25), que tiene en cuenta el error en f_b. Se observa una diferencia mayor al 20 % inicialmente, si se tiene en cuenta el error de f_b. La diferencia entre ambas expresiones converge para tiempos largos casi al mismo momento que lo hace la expresión asintótica.

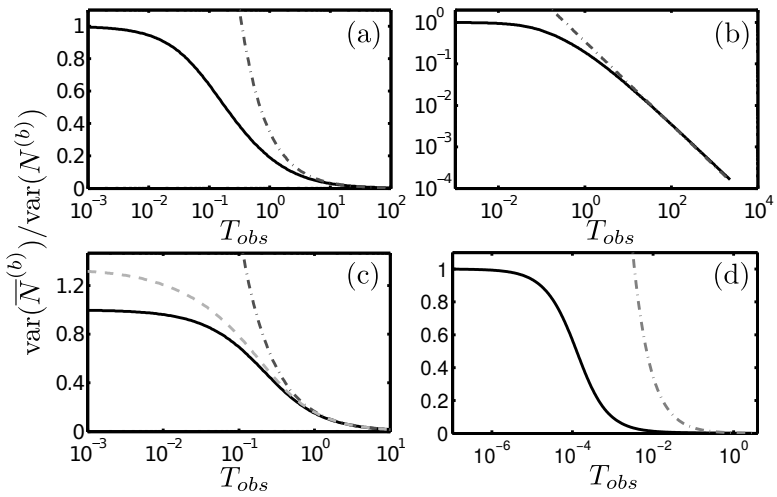

Figura 4.1: Varianza del promedio en el número de moléculas ligadas, normalizada por su valor esperado, $\mathrm{var}(\overline{N}^{(b)})/\mathrm{var}(N^{(b)})$, en función de T_{obs}, obtenida a partir de las expresiones (4.18) (a), (b) y (d) y (4.22) (c) (línea continua) y la expresión para tiempos asintóticos (1.46) (línea de trazos y puntos). La línea a trazos en (c) corresponde a la expresión (4.25). Los parámetros utilizados para cada figura se muestran en la tabla 4.2.

4.2 Validación de las expresiones a través de simulaciones numéricas estocásticas

Para probar la validez de las expresiones para la ACF (4.15), y de la ecuación (4.17), junto con las que posteriormente se derivan de ésta, se realizaron simulaciones numéricas estócasticas similares a las presentadas en los capítulos 2-3. Los detalles de la implementación se encuentran descriptos en el apéndice B. Se integró el sistema representado por (1.12) durante $T_{obs} = 100s$. Inicialmente, las moléculas de cada especie fueron distribuidas con probabilidad uniforme dentro de un volumen de simulación cúbico de $V_T = 27\mu m^3$. El número de moléculas de cada especie se determinó de manera tal que se satisfaga la condición de equilibrio en V_T. Cada $dt = 2{,}193 \times 10^{-5}s$ se registraba el número de moléculas de cada especie dentro de un volumen de observación V_{obs}. Al igual que en el capítulo 3, se consideraron dos tipos de volúmenes de observación: un volumen gaussiano y un volumen cúbico. En el volumen gaussiano las moléculas eran contadas asignándoles un peso dado por una función gaussiana ubicada en el centro de V_T, (la

	Figura 4.1 (a-b)	Figura 4.1 (c)	Figura 4.1 (d)
D_f	$1\mu m^2 s^{-1}$	$10\mu m^2 s^{-1}$	$1\mu m^2 s^{-1}$
k_{off}	$10s^{-1}$	$0{,}1s^{-1}$	$100s^{-1}$
K_D	$1{,}66\mu M$	$16{,}6nM$	$0{,}083\mu M$
$[P_f]$	$0{,}33\mu M$	$83{,}1nM$	$16{,}6\mu M$
$[S_T]$	$3{,}32\mu M$	$16{,}6nM$	$11{,}63\mu M$
f_b	0,17	0,84	0,995
β	1,39	0,03	0,0034
V_{obs}	$0{,}125\mu m^3$	$0{,}125\mu m^3$	$1\mu m^3$

Tabla 4.2: Parámetros utilizados en las curvas de la figura 4.1.

misma $I(\vec{r})$ usada en la expresión (4.6)), este volumen permite obtener expresiones análiticas para la ACF. El volumen cúbico estaba centrado en V_T, en este caso las moléculas eran contadas de manera normal, todas por igual, sin pesos preferenciales.

Con los datos obtenidos de las simulaciones, se calcularon los promedios y sus errores. A su vez se calcularon las fluctuaciones, para finalmente obtener la función de autocorrelación, ACF. Los parámetros utilizados fueron extraídos del análisis [Sigaut et al., 2010] de experimentos de FCS realizados en embriones de *D. melanogaster* para estimar el coeficiente de difusión de la proteína Bicoid [Abu-Arish et al., 2010], y se pueden ver en la tabla 4.3.

4.2.1 Función de autocorrelación del número de partículas

Previo a la verificación de la expresión (4.17), se analizó y comprobó la validez de las expresiones para la ACF del sistema de ligandos interactuando con receptores (4.15). En la tabla 4.1 se muestran los diferentes pesos W_i y tiempos de correlación τ_i para las especies $s = f, b$, en los límites de reacciones rápida y difusión rápida. Además se muestran los casos de $D_S = 0$ y $D_S \neq 0$.

Primero se analizó el caso de los ligandos, $s = f$. Los pesos de las componentes de la ACF para los ligandos, $W_i^{(f)}$, no dependen de D_S, por lo tanto son iguales para el caso de receptores móviles y receptores inmóviles, $D_S \neq 0$ y $D_S = 0$ respectivamente,

	Figura 4.2 (a)	Figura 4.2 (b-c)	Figura 4.3 (a-b)	Figura 4.4
D_S	$[0-5]\mu m^2 s^{-1}$	$[0-5]\mu m^2 s^{-1}$	$0\mu m^2 s^{-1}$	$0\mu m^2 s^{-1}$
D_f	$19\mu m^2 s^{-1}$	$19\mu m^2 s^{-1}$	$19\mu m^2 s^{-1}$	$19\mu m^2 s^{-1}$
k_{off}	$[0{,}5-1-5]s^{-1}$	$400s^{-1}$	$400s^{-1}$	$0{,}5s^{-1}$
K_D	$1{,}92nM$	$0{,}2496\mu M$	$0{,}2496\mu M$	$1{,}92nM$
$[S]$	$22{,}1nM$	$2{,}87\mu M$	$2{,}87\mu M$	$22{,}1nM$
$[P_f]$	$59{,}1nM$	$7{,}68\mu M$	$7{,}68\mu M$	$59{,}1nM$
$[P_b]$	$679{,}3nM$	$88{,}31\mu M$	$88{,}31\mu M$	$679{,}3nM$
T_{obs}	$100s$	$100s$	$100s$	$100s$
$I(\vec{r})$	Gaussiano	Gaussiano	Cúbico	Cúbico
V_{obs}	$0{,}053\mu m^3$	$0{,}053\mu m^3$	$0{,}016\mu m^3$	$0{,}016\mu m^3$

Tabla 4.3: Parámetros de las simulaciones utilizados en las distintas figuras.

ver tabla 4.1. Sí dependen del límite en que el sistema se encuentra. Para el límite de reacciones rápidas, $G^{(f)}(\tau)$ tiene dos componentes, la primera puramente difusiva, y la segunda difusiva pero con un término que decae exponencialmente con el tiempo. Ambas componentes difusivas están asociadas a coeficientes de difusión efectivos, D_{coll} y D_{ef2}. D_{coll} es el mismos derivado en [Pando et al., 2006], que se muestra en la ecuación (1.21). El término que decae exponencialmente, tiene un tiempo característico igual al tiempo característico de reacción $\nu^{-1} = \tau_{off}$, tal cual se describió en la sección 2.1.1. Dado que se cumple la condición de reacciones rápidas, $\tau_r \ll \tau_{ef2}$, de la segunda componente de $G^{(f)}(\tau)$ se puede despreciar el término difusivo. Por otro lado, en el límite de difusión rápida, $G^{(f)}(\tau)$ ahora tiene una única componente difusiva, que corresponde a los ligandos difundiendo sin interactuar con los receptores.

En cuanto a los receptores, la situación es distinta. Al igual que en el capítulo 3, los pesos de la ACF para los receptores ocupados, $G^{(b)}(\tau)$, cambian si las trampas son móviles o inmóviles, dado que la varianza del número de moléculas se modifica, siguiendo en el primer caso una distribución de Poisson y el segundo una Binomial. En realidad, la componente asociada al tiempo de difusión puro de la trampa D_S desaparece en el caso de que los receptores son inmóviles. En la figura 4.2 se muestran simulaciones de la ACF para los receptores ocupados, re-normalizada de manera que su peso sea 1 en el

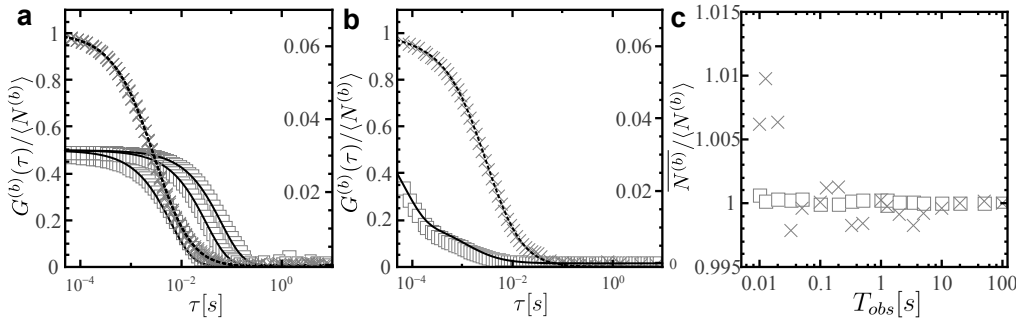

Figura 4.2: (a) $G^{(b)}(\tau)/\langle N^{(b)}\rangle$ para un sistema de partículas que difunden y reaccionan con sitios de ligadura inmóviles (□) o móviles (×) en el límite de difusión rápida para $k_{off} = 0{,}5s^{-1}$, $1s^{-1}$, $5s^{-1}$. Se observa que $G^{(b)}(\tau)/\langle N^{(b)}\rangle$ varía con k_{off} cuando $D_S = 0$. (b) $G^{(b)}(\tau)/\langle N^{(b)}\rangle$ como en (a) pero para otras concentraciones, $k_{off} = 400s^{-1}$ de manera que el límite de reacciones rápidas sea válido y $D_S = 0$ (□) o $5\mu m^2 s^{-1}$ (×). En (a) y(b), las curvas representan las predicciones teóricas para $D_S \neq 0$ (línea a trazos, escala izquierda) y $D_S = 0$ (línea continua, escala derecha). (c) $\overline{N^{(b)}}(T_{obs})/\langle N^{(b)}\rangle$ *vs.* T_{obs} para los mismos parámetros que en (b) y $D_S = 0$ (□) o $0{,}2\mu m^2 s^{-1}$ (×).

caso de $D_S \neq 0$ ($G^{(b)}(\tau)/\langle N^{(b)}\rangle$), para los límites de difusión rápida (a) y reacciones rápidas (b). En el caso de difusión rápida y $D_S \neq 0$ la ACF tiene dos componentes, una puramente difusiva y una difusiva pero con un término exponencial. Ambas componentes difusivas están asociadas al coeficiente de difusión D_S. El tiempo característico con el que decae exponencialmente la segunda componente es igual al tiempo característico de las reacciones, $\nu^{-1} = \tau_r$. Dado que el sistema se encuentra dentro del límite de difusión rápida, $D_S \gg \nu$, la parte exponencial de la segunda componente decae muy lentamente comparado con como decae el término difusivo, y $G^{(b)}(\tau)$ se comporta como si se tratase de la ACF de los receptores difundiendo libremente. En el caso que los receptores son inmóviles, es decir $D_S = 0$, la ACF tiene una única componente que decae exponencialmente, que depende de un tiempo característico distinto a $\nu_2^{-1} = \frac{1-f_b}{k_{off}} \neq \tau_r$. En la figura 4.2 (a) se muestran la ACF obtenida a partir de la expresión (4.15) en línea sólida, junto con datos obtenidos de simulaciones en cruces para $D_S \neq 0$ y cuadrados para $D_s = 0$. Notar que en la figura la escala de la izquierda corresponde para el caso $D_S \neq 0$, mientras que la escala de la derecha corresponde a $D_S = 0$. Por un lado se observa como el peso de la ACF cambia significativamente en un caso y en el otro. Por otro lado, también se observa como cambian las escalas temporales. En la figura 4.2 (a)

se muestra la función de autocorrelación calculada, junto con los datos de simulaciones, para distintos valores de k_{off}, ($k_{off} = 0{,}5s^{-1}$, $= 1{,}0s^{-1}$ y $= 5{,}0s^{-1}$). En el caso $D_S \neq 0$ no se aprecia ninguna diferencia entre las distintas curvas, siendo consistente con la separación de escalas temporales entre los tiempos de difusión y reacción. En cuanto al caso de los receptores inmóviles, $D_S = 0$, la ACF depende claramente del valor de k_{off}. Dado que los receptores no pueden difundir, los tiempos de pegado y despegado de los ligando a los receptores ahora se vuelven perceptible, a pesar de estar dentro del límite de difusión rápida.

En el límite de reacciones rápidas, si $D_S \neq 0$ la ACF tiene tres componentes, dos puramente difusivas, y una tercera difusiva, pero con un término exponencial. Los coeficientes de difusión asociados a cada componente son D_S, D_{coll} y D_{ef2}, es decir, el coeficiente de difusión de los receptores, y los dos coeficientes efectivos. Al igual que el caso de los ligandos el tiempo característico del decaimiento exponencial es el tiempo característico de las reacciones, $\nu^{-1} = \tau_{reac}$. En cuanto al caso $D_S = 0$, la componente asociada al coeficiente D_S desaparece, quedando las otras dos componentes restantes. Si bien los pesos de estas componentes son iguales que en el caso $D_S \neq 0$, sus tiempos característicos asociados, cambian debido a que $D_S = 0$. La figura 4.2 (b) muestra la misma información que la figura 4.2 (a), con la diferencia que ahora los parámetros son tales que el sistema se encuentra dentro del límite de las reacciones rápidas. En la figura se ve claramente como los pesos y los tiempos asociados a cada componente cambian cuando $D_S \neq 0$ y $D_S = 0$.

4.2.2 Precisión en el número de moléculas en función del tiempo de observación

El tiempo que toma obtener una determinada precisión en la estimación de los valores medios del número de receptores ocupados depende de los tiempos de correlación del sistema, pero también de los pesos de la ACF. De la figura 4.2 (b) se ve como cuando los receptores son inmóviles la ACF converge a cero más rápido que el caso en que los receptores son móviles. Esto ocurre porque la escala temporal asociada a

la difusión de los receptores desaparece cuando $D_S = 0$. Además, dado que el sistema se encuentra en el límite de reacciones rápidas, el tiempo τ_S, asociado a D_S, es el más lento de todos los tiempos de correlación, lo que implica que si $D_S = 0$, las correlaciones más lentas desaparecen y la ACF converge a cero en una escala temporal más corta. De acuerdo con la ecuación (4.17), el promedio del número de receptores ocupados va a converger a su valor medio más rápidamente en el caso $D_S = 0$. Esto se puede ver en la figura 4.2 (c), donde se representa el cociente entre el promedio obtenido a tiempo t y su valor asintótico, $(\overline{N}^{(b)}(t)/\overline{N}^{(b)}(T_{obs}))$, para simulaciones usando los mismos parámetros que en la figura 4.2 (b), para $D_S \neq 0$ (cruces) y $D_S = 0$ (cuadrados). Se puede observar que mientras los receptores inmóviles mantienen fluctuaciones por debajo del 1 ‰ prácticamente desde tiempo $t = 0s$, los receptores móviles tienen fluctuaciones del orden del 10 % en los primeros tiempos y les toma del orden de $10s$ alcanzar la precisión de los receptores inmóviles.

Ahora, se compara el tiempo necesario, $T_{obs}(\alpha)$, para estimar $\overline{N}^{(f)}$ y $\overline{N}^{(b)}$ con un error relativo α, cuando $D_S = 0$. La ecuación (4.17) implica que $T_{obs}(\alpha)$ escalea linealmente con $\mathrm{var}\left(N^{(s)}\right)/\langle N^{(s)}\rangle^2$. Recordando que si $D_S = 0$, $\mathrm{var}\left(N^{(b)}\right) = \langle N^{(b)}\rangle(1-f_b)$, mientras que las fluctuaciones en $N^{(f)}$ siguen una distribución de Poisson. Mas allá de los tiempos de correlación, si $f_b = \frac{\langle N^{(b)}\rangle}{N_{S_T}} \approx 1$, las fluctuaciones en $\overline{N}^{(b)}$ van a ser pequeñas, y su valor muy cercano al valor medio.

Caso de receptores inmóviles y reacciones rápidas

Primero se analiza el caso de los receptores inmóviles en el límite de reacciones rápidas. Las ecuaciones (4.18) y (4.19) describen la evolución de las varianzas de los promedios en función del tiempo de observación. Como se hizo notar previamente, las expresiones (4.18) y (4.19) dependen de los mismos pesos de la ACF, pero con la particularidad de que se encuentran cruzados, es decir, $W_2^{(f)} = W_3^{(b)} = (1+\beta)^{-1}$ y $W_3^{(f)} = W_2^{(b)} = 1 - W_2^{(f)}$. Independientemente de cuanto sea el valor de f_b, cuál de los promedios de cada especie va a tener menor error relativo depende del valor de β. Si $\beta \gg 1$, los pesos dominantes van a ser $W_3^{(f)} = W_2^{(b)}$, con lo cual, $\overline{N}^{(f)}$ converge con τ_r, mientras $\overline{N}^{(b)}$ lo hace con τ_{coll}. Es decir, $\overline{N}^{(f)}$ se acerca a su valor medio en una escala

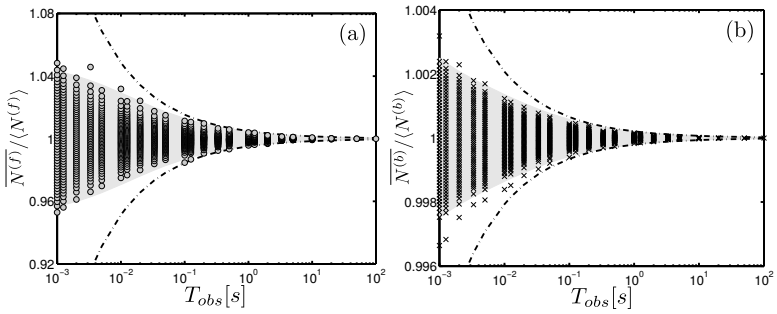

Figura 4.3: Promedios normalizados del número de ligandos, $N^{(f)}$ (a), y receptores ocupados, $N^{(b)}$ (b), obtenidos a partir de simulaciones estocásticas ($\circ$ y $\times$) del sistema de reacción difusión con $D_S = 0$ y errores relativos, $\pm 2\Delta_r(\overline{N}^{(f,b)})$, dados por las ecuaciones (4.19) y (4.18) (áreas grises) como función de T_{obs}. En línea de trazos y puntos se representa el error relativo para tiempos asintóticos. En (a,b) los parámetros son los mismos que en la figura 4.2 (b,c).

temporal mucho más rápida que $\overline{N}^{(b)}$. Si $\beta \ll 1$, los roles ahora se intercambian y $\overline{N}^{(b)}$ es la que converge en un escala temporal más corta. Además, en esta última condición, aún si $f_b \sim 1$, el tiempo de correlación τ_{coll} tiende a τ_f. Esto implica que puede darse una situación donde $f_b \sim 1$, es decir, la mayor parte del tiempo los receptores están ocupados, y el tiempo de convergencia más lento es el asociado a la difusión de los ligandos libres. En la figura 4.3 se muestran los promedios normalizados por el valor medio de los ligandos, $\overline{N}^{(f)}/\langle N^{(f)}\rangle$ (a)(círculos) y receptores ocupados, $\overline{N}^{(b)}/\langle N^{(b)}\rangle$ (b)(cruces), para simulaciones realizadas usando parámetros que se desprenden del análisis realizado en [Sigaut et al., 2010, Sigaut et al., 2014]. Se puede ver que $\Delta_r(\overline{N}^{(b)}) < \Delta_r(\overline{N}^{(f)})$ para todo T_{obs}. La diferencia no responde sólo al hecho de que $\langle N^{(b)}\rangle > \langle N^{(f)}\rangle$, sino tambi én a que $f_b \sim 0{,}97$. Por otro lado, las áreas grises representan el error de los promedios estimados a partir de la ecuación (4.19) en (a) y (4.18) en (b). Se puede ver c ómo la dispersión de los datos obtenidos de las simulaciones cae mayormente dentro del área predicha, mostrando que las expresiones (4.18) y (4.19) son una buena aproximacón para $\Delta_r(\overline{N}^{(s)})$. Por otro lado, la figura 4.3 muestra en línea de trazos y puntos, las expresiones asintóticas, que se obtienen cuando $T_{obs} \gg \tau^{(s)}$, para $s = f$ en (a) y $s = b$ en (b). Al igual que en la figura 4.1, se ve como las expresiones asintóticas sólo describen bien los tiempos de observación largos, mientras que sobrestiman el error para los tiempos T_{obs} cortos.

Caso de receptores inmóviles y difusión rápida

Ahora se analiza el caso de receptores inmóviles en el límite de difusión rápida. Nos interesa analizar la varianza de $\overline{N}^{(b)}$, ya que en esta situación pueden hacerse visibles los efectos de la relación no-lineal entre las variables del problema. En la figura 4.4 se muestra el promedio del número de moléculas $N^{(b)}$ normalizado por su valor medio, en función del tiempo de observación. Los símbolos □ representan los valores obtenidos a partir de simulaciones numéricas estocásticas. El área gris es la región $1 \pm \Delta_r(\overline{N}^{(b)})$ obtenida a partir de la ecuación (4.22), mientras que la línea de trazos delimita la misma región pero en caso de tener en cuenta los efectos no-lineales de las fluctuaciones de $N^{(f)}$, según la ecuación (4.25). Se observa que para $T_{obs} < 0{,}5s$, la ecuación (4.25) es la que mejor describe la evolución de la varianza, mostrando que los efectos no-lineales son apreciables en este caso. Para $T_{obs} > 0{,}5s$, las ecuaciones (4.22) y (4.25) no muestran diferencias apreciables y ambas describen adecuadamente la dispersión de los datos de la simulación. Además, para $T_{obs} > 0{,}5s$ las ecuaciones (4.22) y (4.25) convergen a la expresión para tiempos asintóticos.

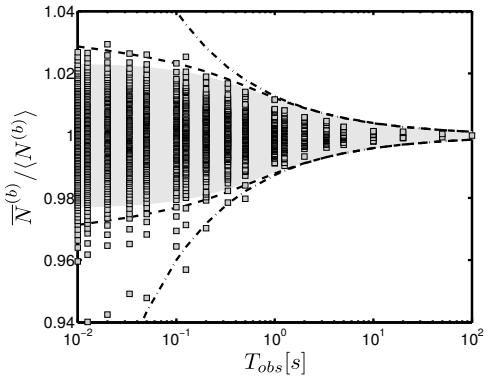

Figura 4.4: Promedio del número de receptores, $\overline{N}^{(b)}(T_{obs})$, normalizado por su valor medio $\langle N^{(b)}\rangle$, en función del tiempo de observación T_{obs}, para difusión rápida y $D_S = 0$. Los símbolos (□) corresponden a datos obtenidos a través de simulaciones estocásticas. El área gris es el error estimado por la ecuación (4.22) y la línea de trazos el error considerando la ecuación (4.25). En línea de trazos y puntos se representa la expresión de la varianza del promedio para tiempos asintóticos.

Vale aclarar que, de la figura 4.4 ,se puede ver que los puntos de la simulación están distribuidos asimétricamente alrededor del valor medio, mostrando una mayor dispersión

en los valores por debajo de este. Este efecto se debe a c ómo fueron computados los datos. Todos los datos se desprenden de una única simulación de $100s$ de duración, la cual fue partida en ventanas de distintas duraciones donde el promedio era calculado. Los puntos que muestran la asimetría son los que corresponden a los datos iniciales de la simulación, y su apartamiento se debe a que inicialmente el sistema no se encontraba en equilibrio.

4.3 Aplicaciones

En esta sección se presentan dos posibles sistemas en los cuales la ecuación (4.17) puede ser de utilidad para interpretar las observaciones experimentales.

4.3.1 Ecuación de Michaelis-Menten a nivel de molécula única

La actividad catalítica de las enzimas se puede entender en términos de los trabajos de Michaelis-Menten [Menten and Michaelis, 1913, Murray, 2002]. El mecanismo que describe la actividad enzimática considera un sustrato S que se liga reversiblemente a una enzima E, para formar en una primera etapa un complejo sustrato-enzima ES, y luego se transforma en un producto P, mientras la enzima original E es regenerada vía E^0, como se describe en el siguiente esquema:

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} E^0 + P, \quad E^0 \overset{k_3}{\rightarrow} E. \tag{4.31}$$

donde, k_1, k_{-1}, k_2 y k_3 son las distintas constantes de reacción, de las distintas etapas del ciclo catalítico. Michaelis-Menten encontraron que para este sistema, mientras la concentración del complejo no varía durante el tiempo que toma el producto en formarse, la tasa con la que se forma el producto, ν, se puede expresar de la siguiente manera,

$$\nu = \frac{k_2[E]_T[S]}{[S] + K_M} \tag{4.32}$$

donde [] indican concentraciones, $K_M = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$ y $[E]_T$ es la concentración total de enzima. El modelo de Michaelis-Menten provee una adecuada descripción de la actividad catalítica en el caso de un ensamble de muchas enzimas.

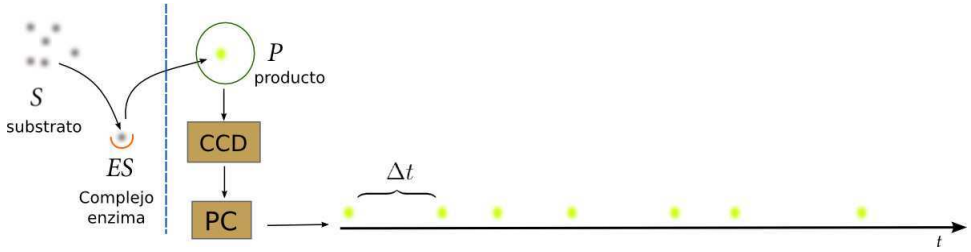

Figura 4.5: Esquema del experimento de enzima única. El experimento consistía en guardar los tiempos en que los productos eran creados por la única enzima observada. De los datos recolectados se obtiene la función de distribución de tiempos de espera.

Recientemente, en [English et al., 2006, Kou et al., 2005] se estudió como es el comportamiento del sistema sustrato-enzima (4.31), a nivel de enzima única, y si, en ese caso, la descripción de Michaelis-Menten sigue siendo válida. Para ello efectuaron un experimento en el cual la actividad de una única enzima era observada, el cual se esquematiza en la figura 4.5 [English et al., 2006]. La enzima transformaba un sustrato no fluorescente en un producto fluorescente. Mediante microscopía confocal, cada vez que un producto era creado, se registraba un pico en la intensidad de la fluorescencia. De esta manera, la distribución en los tiempos de espera entre la creación de productos, $f(t)$, era calculada. De los resultados que obtuvieron se encontró que la distribución $f(t)$ dependía de la concentración de sustrato, $[S]$. Cuando la concentración de sustrato era pequeña, $f(t)$ seguía una distribución monoexponencial, mientras que a medida que la concentración de S aumentaba $f(t)$ cambiaba a una distribución multiexponencial. Por otro lado, en [Kou et al., 2005] se dedujo a partir del modelo de Michaelis-Menten, que la distribución $f(t)$ es siempre monoexponencial independientemente de la concentración de S. Para explicar la discrepancía entre las observaciones y lo predicho por el modelo de Michaelis-Menten, en [Kou et al., 2005, English et al., 2006] propusieron que el comportamiento multiexponencial era debido a un desorden dinámico, producido por fluctuaciones en las constantes de reacción, asociadas a cambios conformacionales de la enzima. En esta aplicación de nuestros resultados, se muestra como el cambio en las escalas temporales debido al aumento en la concentración del sustrato pueden ser entendidas a partir del cambio de los tiempos de correlación del sistema.

El esquema de reacción de la enzima (4.31) es muy similar al esquema estudiado en este capítulo (1.12). La diferencia está dada en que en el esquema de Michaelis-Menten, la enzima que forma el complejo puede volver a su estado inicial por dos caminos distintos: desarmar el complejo en sustrato y enzima; o puede producir un producto y luego regenerarse mediante el estado intermedio E^0. Si se supone que el producto es creado inmediatamente una vez formado el complejo, y que además la enzima vuelve inmediatamente a estar disponible para generar un nuevo complejo, es decir, $k_2, k_3 \gg (k_{-1} + k_1[S])$ ambos esquemas son equivalentes ($S \equiv P_f$, $E \equiv S$ y $ES \equiv P_b$), y las fluctuaciones en P son las mismas que las del complejo ES. Por lo tanto, estudiando los tiempos de espera del complejo ES, se obtiene la distribución $f(t)$.

Recordando que al tener una única enzima, el sistema sólo puede estar en 2 estados, con la enzima libre, ϕ_E, y con la enzima ocupada, formando el complejo, ϕ_{ES}. El tiempo que transcurre entre que se forman dos productos sucesivos se relaciona con la probabilidad de encontrar al sistema en el tiempo $t + \tau$ con la enzima libre, ϕ_E, dado que en el tiempo t se encontraba formando el complejo, ϕ_{ES}, $P(\phi_{ES}, t + \tau|\phi_E, t)$. En realidad, $P(\phi_{ES}, t + \tau|\phi_E, t)$ no diferencia si, entre t y $t + \tau$, el sistema vuelve al estado ϕ_E por primera vez, o si lo hizo varias veces, pero de cualquier manera aporta información de los tiempos de espera. Es posible relacionar esta probabilidad con la función de autocorrelación de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} G^{(E)}(\tau) =& G^{(ES)}(\tau) \\ =& (1 - f_b)\left(P(\phi_E, t + \tau|\phi_E, t) - (1 - f_b)\right) \\ =& (1 - f_b)\left(1 - P(\phi_{ES}, t + \tau|\phi_E, t) - (1 - f_b)\right) \end{aligned} \tag{4.33}$$

donde f_b, es la probabilidad de encontrar la enzima formando el complejo. La distribución de tiempos de espera, $f(t)$, se puede escribir como:

$$\begin{aligned} f(\tau) =& \zeta \frac{dP(\phi_{ES}, t + \tau|\phi_E, t)}{d\tau} \\ =& -\zeta \frac{dG^{(ES)}}{d\tau} \end{aligned} \tag{4.34}$$

donde ζ es una constante de normalización de manera que $\int f(t) = 1$. De esta manera se tiene una expresión aproximada para $f(t)$ que se calcula a través de la ecuación (4.15).

Recordando que las expresiones para $G^{(ES)}$ en los límites de difusión rápida y reacciones rápidas, es posible escribir la distribución de tiempos de espera $f(t)$. En el límite de difusión rápida,

$$f_{d-r}(\tau) = \frac{1}{\tau_{off}} e^{-\tau/\tau_{off}}, \tag{4.35}$$

para el caso de difusión rápida, siendo $\tau_{off} = \frac{1-f_b}{k_{off}}$. Para el límite de reacciones rápidas,

$$f_{r-r}(\tau) \propto \frac{3/2}{\tau_{coll}} \frac{W_1}{(1+\frac{\tau}{\tau_{coll}})^{5/2}} + \frac{W_2}{(1+\frac{\tau}{\tau_{ef2}})^{3/2}} \left(\frac{3/2}{\tau_{ef2}+\tau} + \frac{1}{\tau_r} \right) e^{-\tau/\tau_r} \tag{4.36}$$

donde $W_1 = \frac{\beta}{1+\beta}$, $W_2 = \frac{1}{1+\beta}$, $\tau_{coll} = \frac{w_r^2(1+\beta)}{4D_f}$, $\tau_{ef2} = \frac{w_r^2(1+\beta)}{4\beta D_f}$ y $\tau_r = \frac{1-f_b}{k_{off}(1+\beta)}$, siendo w_r el ancho de la cintura de la gaussiana del volumen de observación y $\beta = \frac{(1-f_b)^2 k_1}{k_{-1}}$.

De la expresión (4.35) se observa que f_{d-r} tiene un comportamiento monoexponencial, tal como es predicho por el modelo de Michaelis-Menten, sin embargo en la expresión (4.36) se observa una distribución más compleja, que depende de tres tiempos característicos, con un término tipo ley de potencias y otro exponencial. Por lo tanto, la dependencia temporal de $f(t)$ va a depender de en que límite se encuentre el sistema. Del capítulo 2 se recuerda que una manera de pasar de un límite a otro es cambiando la concentración de alguna de las especies. De esta manera, partiendo de una concentración de ligandos lo suficientemente pequeña para estar en el límite de difusión rápida, al aumentarla se puede alcanzar el límite de reacciones rápidas. Es decir, aumentando $[S]$, se puede pasar de una distribución de tiempos de espera monoexponencial a una de varios tiempos característicos.

Para estudiar c ómo cambia la distribución de los tiempos de espera cuando aumenta la concentración de sustrato, $[S]$, se integró numéricamente la ecuación (4.34) para los parámetros que se muestran en la tabla 4.4. Los resultados se muestran en la figura 4.6. Notoriamente, hay una gran similitud de nuestros resultados con los del experimento realizado por English *et. al.*, publicados en [English et al., 2006]. Cuando la concentración de sustrato es baja, la distribución de tiempos muestra un decaimiento exponencial (línea recta en el gráfico con el eje de las ordenadas en escala logarítmica), lo cual coincide con lo esperado según Michaelis-Menten. A medida que la concentración aumenta, $f(\tau)$ comienza a tener un comportamiento no-lineal. La forma de la distribución coincide con la observada en [English et al., 2006]. A modo ilustrativo, se calcularon $f_{d-r}(\tau)$ y $f_{r-r}(\tau)$

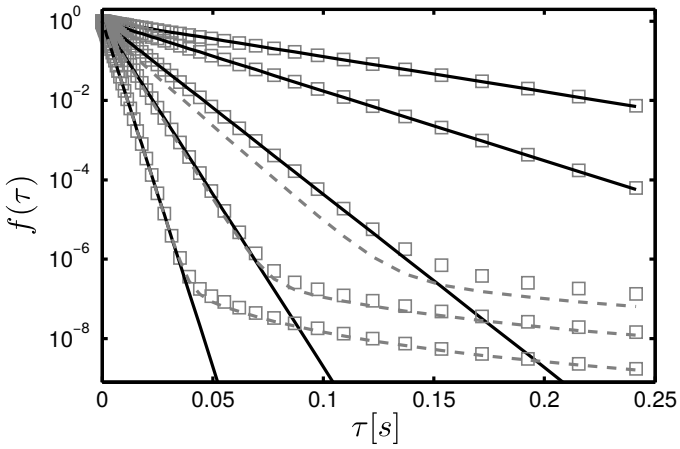

Figura 4.6: Distribución de tiempos de espera, $f(\tau)$, calculada a partir de la expresión (4.34) integrando numéricamente para distintas concentraciones de sustrato (cuadrados). También para los mismos parámetros, se muestran $f_{d-r}(\tau)$ (línea sólida) y $f_{r-r}(\tau)$ (línea a trazos), calculadas según (4.35) y (4.36) respectivamente.

a partir de las ecuaciones (4.35) y (4.36), línea sólida y línea a trazos respectivamente. Cuando la concentración es baja, el sistema se encuentra en el límite de difusión rápida, por lo tanto, $f_{d-r}(\tau)$ describe la distribución de tiempos de espera. Como ya se mencionó, f_{d-r} es una distribución monoexponencial, coincidiendo con Michaelis-Menten. Sin embargo, cuando la concentración de S aumenta, el sistema eventualmente pasa al límite de reacciones rápidas, en el cual f_{r-r} describe la distribución de tiempos de espera, que sigue para tiempos largos una ley de potencias, $\sim \tau^{5/2}$.

A partir de nuestro análisis de las fluctuaciones en el estado del complejo ES es posible predecir distribuciones de tiempos de espera con las mismas características observadas en [English et al., 2006]. A medida que la concentración de sustrato aumenta el sistema pasa de un régimen dominado por un decaimiento exponencial a otro dominado por distintos tiempos de correlación y un decaimiento tipo ley de potencias para tiempos largos.

4.3.2 Precisión en la transcripción de ADN

La segunda aplicación de los resultados presentados en este capítulo es entender c ómo se reducen las fluctuaciones en la transcripción de ADN en observaciones experimentales

$[S]$	$[10-20-50-100-200]\mu M$
D_S	$5\mu m^2 s^{-1}$
k_{-1}	$0{,}5 s^{-1}$
K_1	$2\mu M^{-1} s^{-1}$
N_E	1
V	$5{,}57 \times 10^{-3} \mu m^3$

Tabla 4.4: Parámetros utilizados para la integración numérica de la ecuación (4.34).

de la producción del ARNm del gen Krupel en embriones de *Drosophila melanogaster*. En [Little et al., 2013] se realizan observaciones de la transcripción instantánea del gen Krupel, (kr) mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH por sus siglas en inglés), que permite marcar y detectar moléculas de ARNm individuales. Mediante el uso de esta técnica es posible contar el número absoluto de moléculas de los distintos genes que se expresan en el embrión, y por lo tanto estudiar la precisión en la transcripción en diferentes núcleos y embriones durante las primeras etapas de la diferenciación celular. En particular, en [Little et al., 2013], estudian las fluctuaciones de la transcripción de moléculas de ARNm nacientes en el núcleo y las comparan con las fluctuaciones en el número de moléculas de ARNm que se acumulan en el citoplasma. Encuentran que en el caso del gen kr, la variación en el número de moléculas de ARNm nacientes en el núcleo es $\hat{\sigma}_{nuc} = 0{,}22 \pm 0{,}03$, mientras que la misma variación en el citoplasma, cuando hay acumuladas alrededor de 800 moléculas de ARNm, es $\hat{\sigma}_{cyto} = 0{,}06 \pm 0{,}02$, valor consistentemente menor a sus estimaciones. En su trabajo consideran una fuente con fluctuaciones que siguen una distribución tipo Super-Poisson, con un desvío estándar, σ_{nuc}, por N_0 moléculas de ARNm producidas, la máxima eficiencia en la reducción de ruido debido al promediado temporal se alcanza cuando las diferentes realizaciones son independientes, de modo tal que, si se producen m realizaciones del mismo proceso, el valor medio de moléculas de ARNm acumuladas es $\mu = mN_o$, con un desvío estándar $\sigma_{nuc}\sqrt{m}$. Por lo tanto, las fluctuaciones en el ARNm acumulado sigue la siguiente relación,

$$\hat{\sigma}_{cyto} = \left(\hat{\sigma}_{nuc}^2 N_0/\mu + \eta^2\right)^{1/2}, \tag{4.37}$$

donde η tiene en cuenta las fuentes de ruido externas a la producción de ARNm. A partir de mediciones directas, $N_0 = 100 \pm 20$, $\hat{\sigma}_{nuc} = \sigma_{nuc}/N_0 = 0{,}22 \pm 0{,}03$ y una estimación conservadora de $\eta = 3\,\%$, la ecuación (4.37) $\hat{\sigma}_{cyto} = 8\,\%$, cuando hay aproximadamente ~ 800 moléculas de ARNm acumuladas. Dado que sus estimaciones, a partir del promediado temporal, no pueden explicar la reducción del ruido en los niveles de expresión, suponen que debe existir un promediado espacial, a través del intercambio de moléculas producidas en núcleos vecinos que da cuenta de esa diferencia. La ecuación (4.25) puede dar una interpretación diferente de estos resultados.

Identificando al factor de transcripción que se pega al ADN para transcribir el gen, como $\overline{N}^{(f)}$ y $\overline{N}^{(b)}$ en su estado libre y ligado respectivamente, podemos usar nuestros resultados para calcular la precisión de la transcripción del gen en función del tiempo acumulado. A pesar de que nuestro modelo es sencillo, da cierta idea de qu é procesos pueden ser responsables de la reducción del ruido observada. Para este fin, se asume que las fluctuaciones del ARNm naciente son proporcionales a las fluctuaciones en $N^{(b)}$ y que aquellas en la proteína acumulada al tiempo T_{obs} son proporcionales a las fluctuaciones en $\int_0^{T_{obs}} dt N^{(b)} = T_{obs}\overline{N}^{(b)}$. Por lo tanto, las fluctuaciones del ARNm naciente y de la proteína acumulada, están dados, respectivamente, por $\Delta_r(\overline{N}^{(b)})(T_{obs} = 0)$ y $\Delta_r(\overline{N}^{(b)})(T_{obs})$. A partir de las ecuaciones (4.22) y (4.25), en $T_{obs} \approx 0$, se puede escribir,

$$\hat{\sigma}^2_{nuc} \approx \frac{\mathrm{var}(N^{(b)})}{\langle N^{(b)}\rangle} \approx (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle \left(1 + f_b \frac{\sqrt{\mathrm{var}(N^{(f)})}}{\langle N^{(f)}\rangle}\right), \tag{4.38}$$

donde se uso la notación, $\hat{\sigma}_{nuc}$, para el error del número de moléculas de ARNm naciente, como en [Little et al., 2013]. Se espera que las fluctuaciones en $\overline{N}^{(f)}$ decaigan mucho más rápido que aquellas en $\overline{N}^{(b)}$ (esto es así en el límite de difusión rápida y también en reacciones rápidas si β es suficientemente grande). Por lo tanto, independientemente si se usa la ecuación (4.38) o $\mathrm{var}(N^{(b)}) = (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle$, para la varianza (inicial) de $N^{(b)}$, $\Delta_r(\overline{N}^{(b)})$ es eventualmente dado por la ecuación (4.22), con $\mathrm{var}(N^{(b)}) = (1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle$. De esta manera, luego que las fluctuaciones en $\overline{N}^{(f)}$ hayan decaído y su valor asintótico se haya alcanzado, la subsecuente reducción del ruido en $\overline{N}^{(b)}$ es equivalente a la provista por el promediado temporal. Si se incluyen otras fuentes de error debido a las mediciones, como en [Little et al., 2013], ésto implica que, para T_{obs} mayor que los tiempos de

Parámetros extraídos de [Little et al., 2013]		Parámetros estimados a partir de *bicoid*	
N_0	100	D_S	$19\mu m^2 s^{-1}$
$\hat{\sigma}_{nuc}$	0,22	$[P_f]$	$7nM$
η	0,03	k_{off}	$1s^{-1}$
		K_d	$0{,}192nM$
		N_{ST}	6
		f_b	0,9973
		V	$0{,}125\mu m^3$

Tabla 4.5: Parámetros utilizados para el cálculo de la ecuación (4.40), representada en la figura 4.7.

correlación en las que las fluctuaciones en $\overline{N}^{(f)}$ decaen, el error en la proteína acumulada es,

$$\hat{\sigma}_{cyto} \approx \left(\Delta_r(\overline{N}^{(b)})\right) \approx \left(\frac{(1-f_b)\langle N^{(b)}\rangle}{m\langle N^{(b)}\rangle^2} + \eta^2\right)^{1/2}, \tag{4.39}$$

donde nuevamente se usó la notación de [Little et al., 2013] e identificó $\hat{\sigma}_{cyto}$ como el error de la proteína acumulada. m es el número de veces que se repite el proceso, el cual esta relacionado con $T_{obs}/(2\tau^{(b)})$. Insertando la ecuación (4.38) en la ecuación (4.39) se obtiene,

$$\hat{\sigma}_{cyto} \approx \left(\frac{\hat{\sigma}^2_{nuc} N_0}{\mu(1 + f_b/\langle N^{(f)}\rangle^{1/2})} + \eta^2\right)^{1/2}, \tag{4.40}$$

donde se reemplazó $m = \mu/N_0$ y $\mathrm{var}(N^{(f)}) = \langle N^{(f)}\rangle$ dado por $N^{(f)}$ que sigue una distribución de Poisson. Comparando las ecuaciones (4.40) y (4.37), se puede ver que la corrección no-lineal explica una mayor reducción del ruido que la predicha por sólo el promediado temporal. Entonces, se quiere evaluar si esta reducción puede ser cuantitativamente similar a la observada experimentalmente. De las mediciones en [Little et al., 2013] se sabe que $\hat{\sigma}_{nuc} \sim 22\,\%$. Por lo tanto, se fija $\mathrm{var}(N^{(b)})/\langle N^{(b)}\rangle^2 = (0{,}22)^2 = 0{,}05$ con $\mathrm{var}(N^{(b)})$ dado por la ecuación (4.38). En su trabajo también estiman $N_0 = 100$, y $\eta = 0{,}03$. De manera que quedan por determinar varios parámetros que no fueron estimados. No se cuenta con información de esos parámetros en el caso del gen *krupel*, pero si para el gen *bicoid*. Por lo que usamos parámetros estimados para *bicoid*, los cuales dan un orden de magnitud de qué valores serían realistas en una situación como

la que se pretende analizar. En la tabla 4.5 se muestra la elección utilizada para nuestra estimación de los diferentes parámetros del problema.

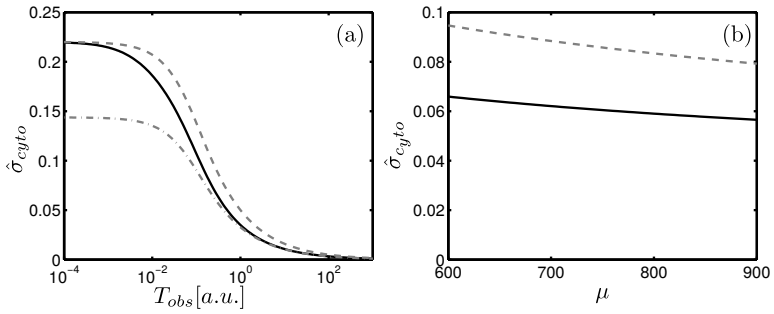

Figura 4.7: Desvío estándar del número observado de moléculas de proteína que es acumulada en el citoplasma en función del (a) tiempo de observación T_{obs}, y (b) número de moléculas acumuladas μ. (a) En línea de trazos grises se muestra la predicción de cómo decae el ruido debido al promediado temporal a partir de la ecuación (4.22). En línea sólida negra, la estimación de $\hat{\sigma}_{cyt}$ a partir de la ecuación no lineal, dada por la ecuación (4.25). Ambas líneas parten del valor medido de las fluctuaciones instantáneas iniciales, $\hat{\sigma}_{cyt}(T_{obs} = 0) = \hat{\sigma}_{nuc} = 0{,}22$. La línea de trazos y puntos grises, es la estimación dada por la ecuación (4.22) normalizada de manera que coincide con la ecuación (4.25) para T_{obs} grandes. (b) En línea sólida negra, se representa nuestra estimación que tiene en cuenta la reducción en el ruido debido a las fluctuaciones en el arribo de moléculas $N^{(f)}$, dada por la ecuación (4.40), mientras que la línea de trazos grises representa la estimación en [Little et al., 2013], a partir de la ecuación (4.37).

En la figura 4.7 (a), se muestra como se reduce el ruido en el número observado de moléculas de proteína acumulada en el citoplasma, en función del tiempo observado si se tiene o no en cuenta la contribución no-lineal de las fluctuaciones en $N^{(f)}$, que se obtiene a partir de las ecuaciones (4.25) y (4.22) respectivamente. Si bien el gen que se observa es *krupel*, del cual no se cuenta con suficiente información, si se cuenta para el gen *bicoid*. Por lo que usamos parámetros estimados para *bicoid*, para obtener un orden de lo que serían valores realistas en una situación como la que se pretende analizar. Se observa que cuando ambas ecuaciones parten de la misma varianza inicial, en este caso dada por $\hat{\sigma}^2_{nuc}$, a medida que avanza el tiempo, la estimación que tiene en cuenta la contribución no-lineal de $N^{(f)}$ decae más rápidamente que la que sólo tiene en cuenta el promediado temporal. Por otro lado, se muestra que para que las

estimaciones dadas por las ecuaciones (4.25) y (4.22) coincidan para tiempos T_{obs} largos, el valor de $\hat{\sigma}_{cyt}(T_{obs} = 0)$ en la ecuación (4.22) debe ser, para los valores de los parámetros escogidos, un 35 % menor que en el caso de la estimación no-lineal. Estas dos observaciones muestran que la contribución en las fluctuaciones debido a la llegada de moléculas del factor de transcripción que se liga a los promotores del gen, produce un efecto, que puede ser considerable, en la estimación de la evolución temporal de la reducción del ruido del ARNm producido. Por lo que sólo tener en cuenta una reducción debido al promediado temporal puede no ser suficiente para interpretar las observaciones de estos procesos. En la figura 4.7 (b), se muestra cómo se reduce el ruido en función de la cantidad de proteína acumulada, μ, según la estimación teórica realizada en [Little et al., 2013], dada por la ecuación (4.37), y nuestra estimación que tiene en cuenta la contribución de las fluctuaciones del factor de transcripción, a partir de la ecuación (4.40). Nuevamente se observa que cuando ya se acumuló cierta cantidad de proteína, es decir, transcurrió un tiempo suficiente tal que $T_{obs} \gg \tau^{(f)}$, el ruido para el caso con la contribución no-lineal es menor. Cuando $\mu \sim 800$, como la situación que se analiza en [Little et al., 2013], el ruido estimado a partir del promediado temporal es $\hat{\sigma}_{cyt} \sim 0{,}08$, mientras que según nuestro modelo que tiene en cuenta las fluctuaciones en $N^{(f)}$, $\hat{\sigma}_{cyt} \sim 0{,}06$, valor similar al observado en [Little et al., 2013]. Por lo que, nuestra suposición de que existen fluctuaciones en la concentración, y por lo tanto, en la tasa con la que arriban los factores de transcripción a los sitios promotores, provee una explicación válida para la subestimación en la reducción del ruido de la proteína Kr acumulada que se observa en [Little et al., 2013]. Vale aclarar, que estos resultados dependen de la elección de varios parámetros de los cuales no se cuenta con valores medidos. De todas formas, se recuerda que se hizo una estimación de los valores de los parámetros, buscando que sean lo más realista posibles.

5

El rol de las reacciones en la formación del gradiente de Bicoid

Las técnicas de manipulación genética, que permiten que diversas proteínas nativas de interés sean expresadas con una cola fluorescente en organismos vivos, han abierto la posibilidad de observar el funcionamiento de procesos de relevancia fisiológica de un modo directo. Un caso paradigmático en este sentido lo constituye la observación de "morfógenos", típicamente, proteínas, cuya distribución no uniforme dentro del embrión da lugar a la subsiguiente diferenciación celular. Como se mencionó en la Introducción, un ejemplo de morfogénesis muy estudiado es el del desarrollo embrionario de la mosca *Drosophila melanogaster*. En particular, dentro de este contexto, un tema que ha concitado gran interés es el del establecimiento y las propiedades del gradiente de la proteína Bicoid (Bcd), un morfógeno que actúa como factor de transcripción regulando

la producción de muchas otras proteínas. La posibilidad de contar con embriones de mosca que expresan bcd-egfp permitió observar la dinámica espacio-temporal de Bcd *in vivo* [Gregor et al., 2007a]. A pesar de ello, los mecanismos por los cuales se establece este gradiente son aún motivo de controversia y continuo estudio [Grimm et al., 2010]. Como se describió en la sección 1.1.1, el modelo SDD, el cual supone que la proteína es sintetizada en un extremo del embrión y luego difunde mientras es degradada, fue en un principio propuesto para explicar la formación del gradiente de Bcd [Driever and Nussleinvolhard, 1988, Driever and Nusslein-Volhard, 1989, Struhl et al., 1989]. Si bien el modelo SDD ha mostrado ser exitoso en describir la conformación de gradientes de morfógenos en otros casos [Wolpert, 1969, Crick, 1970], en el del Bcd no parece ser suficiente para explicar las observaciones experimentales [Gregor et al., 2007a]. Uno de los principales problemas es el del tiempo que le lleva al gradiente establecerse. Las observaciones de [Gregor et al., 2007a] mostraron que este tiempo es de alrededor de una hora después de la fertilización. Estimándolo como $\sim L^2/D$ con $L \sim 500\mu m$ la longitud del embrión y $D \sim 0{,}3-1\mu m^2 s^{-1}$ el coeficiente de difusión determinado en experimentos de FRAP [Gregor et al., 2007a, Abu-Arish et al., 2010] se obtiene un valor ($\geq 69h$) mucho mayor. Diversos modelos se han propuesto para explicar esta discrepancia. Entre otros, están los que consideran que el gradiente observado no corresponde al del estado estacionario [Bergmann et al., 2007], los que incorporan transporte activo [Gregor et al., 2007b] y advectivo [Hecht et al., 2009] o los que suponen que la distribución de Bcd es un reflejo directo de la del ARNm a partir del cual es producido [Spirov et al., 2009]. Esta última suposición fue refutada en experimentos recientes [Little et al., 2011] que mostraron que más del 90 % del ARNm a partir del cual se sintetiza Bcd está localizado en el 20 % del polo anterior mientras que para Bcd se observa un gradiente que decae exponencialmente hasta un 75 % de la longitud del embrión, es decir el ARNm de Bcd está más localizado que la proteína que produce. Dadas todas estas observaciones, no hay consenso aún sobre cuál es el modelo que mejor describe la dinámica del gradiente de Bcd ni de cuáles son valores confiables para los parámetros biofísicos relevantes [Gregor et al., 2007a, Little et al., 2011, Abu-Arish et al., 2010, Grimm et al., 2010]. En el caso del coeficiente de difusión, mediciones realizadas con la técnica de FCS estimaron un

valor para D un orden de magnitud mayor que el obtenido usando FRAP [Abu-Arish et al., 2010, Porcher et al., 2010] (ver sección 1.2). Estas discrepancias fueron estudiadas en [Sigaut et al., 2010, Sigaut et al., 2014] sugiriendo que pueden ser explicadas si se considera que Bcd interactúa con sitios de ligadura o trampas, S, según el esquema (1.12). Si el coeficiente de difusión libre de Bcd es D_f y las trampas difunden con D_S, en [Pando et al., 2006] se encontró que el transporte neto de Bcd puede describirse en términos de los coeficientes de difusión efectivos, D_{coll} y D_{sm}, dados por las ecuación (1.21). Como se dijo en la sección 1.3.1, D_{sm} describe el transporte de una molécula única (de Bcd) y D_{coll} la dispersión de un conjunto de ellas. En [Sprague and McNally, 2005] se determinó que FRAP provee una estimación de D_{sm} mientras que en [Sigaut et al., 2010] se mostró que FCS da estimaciones para D_{sm} y D_{coll}. El análisis de [Sigaut et al., 2014] interpretó los resultados de FCS de [Gregor et al., 2007a, Abu-Arish et al., 2010, Porcher et al., 2010] dentro de este marco. De este modo se determinó que ambos resultados experimentales eran compatibles si se suponía que el coeficiente de difusión libre del Bcd era $D_f \approx 19\mu m^2 s^{-1}$, los sitios de ligadura eran inmóviles o difundían con $D_S \sim 0{,}09\mu m^2 s^{-1}$ y que las concentraciones y la constante de disociación eran tales que $D_{sm} \sim 1\mu m^2 s^{-1}$ y $D_{coll} = 14\mu m^2 s^{-1}$. Dados estos valores, los tiempos determinados por L^2/D con $D = D_f$ o $D = D_{coll}$ son menores al que, de acuerdo a las observaciones experimentales, le lleva al gradiente establecerse. Por lo tanto, si son D_f o D_{coll} los coeficientes que establecen la escala temporal de formación del gradiente podría, en principio, resolverse el problema del tiempo de formación incluyendo la interacción de Bcd con sitios de ligadura. En este Capítulo se investiga un modelo que incorpora esta interacción.

Ahora bien, si la dinámica del Bcd está fuertemente afectada por la interacción con distintos sitios de ligadura a lo largo del embrión, no sólo la interpretación de los experimentos de FCS y FRAP debe revisarse (como se hizo en [Sigaut et al., 2014]), sino que la observación de la distribución de Bcd en sí [Gregor et al., 2007a, Little et al., 2011, Abu-Arish et al., 2010] debe reinterpretarse ya que la fluorescencia no distingue entre Bcd libre y Bcd ligado. En este Capítulo se estudian estos aspectos. Más específicamente se estudia qué información proveen las observaciones de fluorescencia

si se las analiza suponiendo que el gradiente es el resultado del transporte difusivo en presencia de trampas y que la fluorescencia observada corresponde al Bcd total, no sólo al libre. También se analiza el tiempo de formación y la longitud característica del gradiente dentro de este marco y se intenta determinar de qué manera esta re-interpretación de la distribución observada afecta las conclusiones obtenidas sobre el comportamiento de Bcd como factor de transcripción para la expresión de la proteína Hunchback [Gregor et al., 2007b]. Para tal fin se consideran diversas versiones de un modelo que tiene en cuenta la interacción de Bcd con sitios de ligadura según el esquema (1.12). El propósito no es describir exactamente la dinámica del gradiente de Bcd (que es cooperativa, mucho más complicada y que ocurre a lo largo de una larga secuencia de ciclos de división celular). Se busca hacer un análisis semi-cuantitativo que permita abordar las cuestiones aquí planteadas en términos de la relación entre las escalas características de los fenómenos básicos (difusión, producción, interacción y degradación) que subyacen a la formación del gradiente.

5.1 Modelo *SDID*

Se considera un modelo para la conformación del gradiente de la proteína Bicoid que se basa en que ésta es **S**intetizada a lo largo de una región extendida del polo anterior, **D**ifunde e **I**nteractúa con sitios de ligadura según (1.12), mientras es **D**egradada, de ahí la sigla *SDID*. Por simplicidad, se modela al embrión como un dominio cilíndrico donde las concentraciones de las especies varían a lo largo de la dirección axial, z, que representa al eje AP, siendo $z = 0$ y $z = L = 500\mu m$ las coordenadas del polo anterior y del polo posterior, respectivamente. Siguiendo los resultados sobre la distribución del ARNm del Bcd determinadas en [Little et al., 2011], se supone que Bcd es sintetizado con una tasa:

$$\theta(z) = \begin{cases} \theta_o & \text{si } z \leq 0{,}2L \\ 0 & \text{si } z > 0{,}2L \end{cases}, \tag{5.1}$$

donde θ_o es constante. Esta es una aproximación a las observaciones de [Little et al., 2011] de acuerdo a las cuales, si bien más del 90 % del ARNm de Bcd está en el 20 % anterior del embrión, la distribución de ARNm en esa región no es espacialmente

uniforme. Se supone también que los sitios de ligadura se encuentran uniformemente distribuidos a lo largo de todo el embrión y difunden con coeficiente D_S. Se considera que los sitios de ligadura corresponden a moléculas mucho más masivas que las de *Bcd* y, por lo tanto, su coeficiente de difusión no cambia cuando tienen Bcd ligado.

5.1.1 Un modelo con varias alternativas

A continuación se muestran las ecuaciones que describen al modelo para los distintos casos considerados en la presente Tesis.

Modelo *SDID* con degradación parcial de Bcd

En primer lugar se considera una versión del modelo en que la degradación del Bcd sólo ocurre cuando éste está libre. En tal caso las ecuaciones dinámicas son:

$$\begin{aligned}\frac{\partial[Bcd]}{\partial t} =& D_f\nabla^2[Bcd] - k_{on}[Bcd]([S_T]-[Bcd_b]) + k_{off}[Bcd_b] \\ & - \tilde{\alpha}[Bcd] + \theta(z), \\ \frac{\partial[Bcd_b]}{\partial t} =& D_S\nabla^2[Bcd_b] + k_{on}[Bcd]([S_T]-[Bcd_b]) - k_{off}[Bcd_b],\end{aligned} \tag{5.2}$$

donde $[Bcd_T] = [Bcd] + [Bcd_b]$ y $[S_T] = [S] + [Bcd_b]$ son las concentraciones totales de *Bcd* y de sitios de ligadura, respectivamente, $\tilde{\alpha}$ es la tasa de degradación y $\theta(z)$ es la fuente de *Bcd*. Para simplificar notaciones, se utiliza $[Bcd]$ para identificar la concentración de Bicoid libre, lo que no debe confundirse con *Bcd* que se usa para referirse genéricamente a la proteína.

Modelo *SDID* con degradación total de Bcd

Se considera en segundo lugar una versión del modelo en que el Bcd es degradado con la misma tasa, $\overline{\alpha}$, tanto cuando está libre como cuando se encuentra ligado a S. En

este caso las ecuaciones dinámicas son:

$$\begin{aligned}\frac{\partial[Bcd]}{\partial t} =& D_f\nabla^2[Bcd] - k_{on}[Bcd]([S_T]-[Bcd_b]) + k_{off}[Bcd_b] \\ & - \overline{\alpha}[Bcd] + \theta(z), \\ \frac{\partial[Bcd_b]}{\partial t} =& D_S\nabla^2[Bcd_b] + k_{on}[Bcd]([S_T]-[Bcd_b]) - k_{off}[Bcd_b] \\ & - \overline{\alpha}[Bcd_b],\end{aligned} \tag{5.3}$$

Modelo *SDID* con maduración de la GFP

La GFP no es fluorescente inmediatamente después de ser sintetizada dentro de la célula sino que necesita madurar, lo que le lleva un tiempo del orden de $\sim 10-60$min [Sniegowski et al., 2005, Iizuka et al., 2011]. Lo mismo ocurre con la Bcd-eGFP dentro del embrión. Este tiempo de maduración afecta el perfil de la distribución de Bcd que puede observarse en embriones de *D. melanogaster*. Se considera entonces una variante del modelo con degradación parcial en la que se incorpora el retraso en la maduración de la GFP y se analiza qué efecto produce sobre la dinámica del gradiente. Para ello es necesario distinguir entre el Bcd fluorescente y el no-fluorescente (Bcd^t y Bcd^u, respectivamente) e incluir la transformación de uno en otro. De esta manera, las ecuaciones quedan:

$$\begin{aligned}\frac{\partial[Bcd^u]}{\partial t} =& D_f\nabla^2[Bcd^u] - k_{on}[Bcd^u]\left([S_T]-[Bcd^u_b]-[Bcd^t_b]\right) \\ & + k_{off}[Bcd^u_b] - \tilde{\alpha}[Bcd^u] - \gamma[Bcd^u] + \theta(z), \\ \frac{\partial[Bcd^t]}{\partial t} =& D_f\nabla^2[Bcd^t] - k_{on}[Bcd^t]\left([S_T]-[Bcd^u_b]-[Bcd^t_b]\right) \\ & + k_{off}[Bcd^t_b] - \tilde{\alpha}[Bcd^t] + \gamma[Bcd^u], \\ \frac{\partial[Bcd^u_b]}{\partial t} =& D_S\nabla^2[Bcd^u_b] + k_{on}[Bcd^u]\left([S_T]-[Bcd^u_b]-[Bcd^t_b]\right) \\ & - k_{off}[Bcd^u_b] - \gamma[Bcd^u_b], \\ \frac{\partial[Bcd^t_b]}{\partial t} =& D_S\nabla^2[Bcd^t_b] + k_{on}[Bcd^t]\left([S_T]-[Bcd^u_b]-[Bcd^t_b]\right) \\ & - k_{off}[Bcd^t_b] + \gamma[Bcd^u_b],\end{aligned} \tag{5.4}$$

donde γ es la tasa de maduración de la proteína Bcd-eGFP.

En [Liu et al., 2013] se analiza el efecto de la maduración en el gradiente de Bcd considerando un modelo SDD modificado que tiene en cuenta la conversión entre moléculas de Bcd no fluorescentes a fluorescentes con tasa γ (igual al modelo descripto por la ecuación (5.4) considerando que no hay trampas y que la fuente es puntual). Aplicando el modelo para analizar la distribución de Bcd-eGFP en embriones vivos medida dentro de los 16 ± 5 minutos luego del c.n. 14, en este trabajo se encuentra que la tasa de maduración es igual a la tasa de degradación, es decir, $\gamma = \alpha$. Teniendo en cuenta las estimaciones realizadas en [Drocco et al., 2011] se determina $\gamma = 0{,}0003 s^{-1}$. Por otro lado, comparando el perfil de Bcd total, es decir, el marcado y sin marcar (Bcd^t, Bcd^u), con el observado (Bcd^t) se ve que el efecto de la maduración es más importante en la zona cercana al polo anterior y que disminuye al alejarse del mismo. Para corregir el gradiente por este efecto en este trabajo se define el factor de corrección, $R(z)$, que depende de la posición a lo largo del eje antero-posterior como

$$R(z) = \frac{[Bcd^t](z) + [Bcd^u](z)}{[Bcd^t](z)}. \tag{5.5}$$

En [Liu et al., 2013] hallan que $R(z)$ tiene un valor máximo de ≈ 3 alrededor del polo anterior, mientras que cerca del polo posterior es ≈ 1.

5.1.2 Estimaciones analíticas: Modelo *SDID* bajo la aproximación de reacciones rápidas

Las distintas versiones del modelo *SDID* que se han introducido en este Capítulo corresponden a sistemas de reacción-difusión. El análisis de este tipo de sistemas puede resultar complicado. Es por eso que para interpretar algunos resultados y para elegir *a priori* algunos de los parámetros del modelo se trabaja con una versión aproximada en donde el transporte del Bcd está descripto en términos de un coeficiente de difusión efectivo. Para tal fin se procede como en situaciones en las que existe una separación de escalas temporales en las que las reacciones ocurren más rápidamente que todos los otros procesos, incluyendo la difusión, la síntesis y la degradación. En esta aproximación de *reacciones rápidas* [Strier and Dawson, 2000] o *buffers rápidos* [Wagner and Keizer,

1994] los sistemas de ecuaciones (5.2) o (5.3) se reducen a:

$$\frac{\partial[Bcd]}{\partial t} = D_{coll}\nabla^2[Bcd] - \beta D_S|\nabla[Bcd]|^2 - \hat{\alpha}[Bcd] + \hat{\theta}(z,t), \tag{5.6}$$

$$[Bcd_b] = \frac{[Bcd][S_T]}{[Bcd] + K_D}, \tag{5.7}$$

donde D_{coll} es el coeficiente de difusión efectivo definido en la ecuación (1.21),

$$\hat{\theta} = \frac{\theta}{1 + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]}}, \quad \beta = \frac{2[S]^3}{K_D^2[S_T]^2(1 + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]})}, \tag{5.8}$$

y

$$\hat{\alpha} = \frac{\tilde{\alpha}}{1 + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]}}, \tag{5.9}$$

para el modelo con degradación parcial (ecuaciones (5.2)) y

$$\hat{\alpha} = \frac{\overline{\alpha}(1 + \frac{[S]}{K_D})}{1 + \frac{[S]^2}{K_D[S_T]}}, \tag{5.10}$$

para el modelo con degradación total (ecuaciones (5.3)). Dado que $D_S \ll D_f$, por simplicidad se considera $D_S = 0$. En ese caso el término $\propto |\nabla[Bcd]|^2$ desaparece de la ecuación (5.6) y ésta se reduce a:

$$\frac{\partial[Bcd]}{\partial t} = D_{coll}\nabla^2[Bcd] - \hat{\alpha}[Bcd] + \hat{\theta}(z). \tag{5.11}$$

Es importante notar que la solución estacionaria de la ecuación (5.11) junto con (5.7) coincide con la del sistema (5.2) para $D_S = 0$ y es aproximadamente igual a la del sistema (5.3) si $\overline{\alpha} \ll k_{off}$. A pesar de que la ecuación (5.11) parece lineal, no lo es: D_{coll}, $\hat{\alpha}$ y $\hat{\theta}$ dependen de [Bcd], *i.e.*, son dependientes de la posición y del tiempo.

5.1.3 Resolución Numérica del Modelo *SDID*

Las soluciones de los sistemas de ecuaciones (5.2), (5.3) y (5.4) son obtenidas numéricamente (ver apéndice B para mayor detalle). En todos los casos se considera un cilindro de largo $L = 500\mu m$ con condiciones de borde de flujo cero en ambos extremos como dominio de integración. En la tabla 5.1 se muestran los parámetros que son usados en las simulaciones. Para las concentraciones, constantes de disociación y coeficientes libres de difusión fueron usadas las estimaciones presentadas en [Sigaut et al., 2014]

derivadas del análisis de los datos experimentales de [Abu-Arish et al., 2010]. Para la tasa de maduración, γ, se usaron las mediciones experimentales realizadas en [Drocco et al., 2011, Liu et al., 2013]. Las tasas de síntesis, θ_o, degradación, $\tilde{\alpha}$ o $\overline{\alpha}$, y reacción, k_{off}, fueron elegidas de manera de obtener un gradiente simulado con características similares a las observadas experimentalmente.

D_S	$0{,}095\mu m^2 s^{-1}$
D_f	$19\mu m^2 s^{-1}$
k_{off}	$0{,}1 s^{-1}$
K_D	$0{,}192 nM$
$[S_T]$	$130 nM$
L	$500\mu m$

Tabla 5.1: Parámetros utilizados en las simulaciones.

5.2 Reproducción del gradiente

En esta sección se muestran los resultados de las simulaciones numéricas del modelo 5.1. En primer lugar se analiza cómo las propiedades de las soluciones cambian en función de los parámetros eligiendo los más adecuados, de acuerdo a cada versión del modelo, para reproducir las observaciones. Luego, se analiza qué parámetros determinan las escalas espaciales y temporales del gradiente comparando los resultados obtenidos con los que corresponden a un modelo que no considera las reacciones. Finalmente, se re-analiza la relación entre las distribuciones de Bcd y de la proteína, Hunchback, de la cual es factor de transcripción, considerando que las observaciones de fluorescencia no distinguen entre Bcd libre y Bcd ligado a sitios.

5.2.1 Elección de parámetros

Como se mencionó anteriormente, se cuenta con estimaciones de D_f, D_S, K_D, $[S_T]$ y $[Bcd_T]$ en el polo anterior derivadas en [Sigaut et al., 2014] a partir de un análisis de los experimentos realizados en [Abu-Arish et al., 2010, Gregor et al., 2007b]. Se conocen

también L [Gregor et al., 2007b] y γ [Drocco et al., 2011, Liu et al., 2013]. Para elegir los parámetros restantes se explora el espacio de parámetros manteniendo aquéllos que permiten reproducir el gradiente de Bcd con una escala espacial y tiempos de conformación similares a las observados experimentalmente [Gregor et al., 2007a, Little et al., 2011]. En primer lugar se trabaja con el modelo con degradación parcial de Bcd dado por las ecuaciones (5.2). Para organizar la búsqueda, primero se analiza la solución estacionaria de (5.2). Dado que en experimentos usando Bcd-eGFP no es posible distinguir entre la proteína en su estado libre o ligado nos interesa la distribución estacionaria de la concentración de Bcd total, *i.e.*, de $[Bcd_T] = [Bcd_b] + [Bcd]$. Es más sencillo encontrar esta solución estacionaria cuando $D_S = 0$ lo que no es una mala opción ya que $D_S \ll D_f$. Si $D_S = 0$, dentro de la región donde Bcd es sintetizado (*i.e.*, para $z \leq 0{,}2L$ con L la longitud del embrión), la producción continua de Bcd eventualmente satura los sitios de ligadura. Por lo tanto, debe existir una pequeña región, $z \leq z_u \leq 0{,}2L$, en la cual es posible suponer que $[Bcd]$ y $[Bcd_T]$ están distribuidos uniformemente con Bcd y S en equilibrio entre ellos de manera que:

$$[Bcd_b] = [Bcd][S_T]/([Bcd] + K_D), \tag{5.12}$$

$$[S] = K_D[S_T]/([Bcd] + K_D). \tag{5.13}$$

En el equilibrio, en esta pequeña región debe haber un balance entre la tasa a la que el Bcd es producido y a la que es degradado. Por lo tanto, la solución estacionaria debe satisfacer:

$$[Bcd] \approx \frac{\theta_o}{\tilde{\alpha}}, \tag{5.14}$$

$$[Bcd_b] \approx \frac{\theta_o}{\tilde{\alpha}} \frac{[S_T]}{\theta_o/\tilde{\alpha} + K_D}. \tag{5.15}$$

La concentración (total) de $[Bcd]$ observada en el polo anterior ha sido estimada en $\sim 140nM$. Por lo tanto, se eligen $\theta_o/\tilde{\alpha}$ tal que $[Bcd_T] = [Bcd_b] + [Bcd] \approx 140nM$ en $z = 0$. Para $D_S = 0$, la solución estacionaria de la ecuación (5.2) satisface la condición de equilibrio dada por las ecuaciones (5.12)–(5.13) en todos los puntos del espacio pero a su vez debe cumplir la relación:

$$0 = D_f \nabla^2 [Bcd]_s - \tilde{\alpha}[Bcd]_s + \theta(z) = D_f \nabla^2 [Bcd]_s - \tilde{\alpha}[Bcd]_s, \quad \text{si}\, 0{,}2L \leq z \leq L. \tag{5.16}$$

Esta última igualdad implica que, para $0{,}2L \leq z \leq L$ y $D_S = 0$, la solución estacionaria $[Bcd]_s$ está dada por la ecuación (1.1) con z_o igual a:

$$z_{o_f} \equiv \sqrt{D_f/\tilde{\alpha}}. \tag{5.17}$$

Esta escala espacial corresponde al gradiente del Bcd libre en nuestro modelo. La concentración total, $[Bcd_T] = [Bcd_b] + [Bcd]$, que es la que debe ser comparada con las observaciones, está caracterizada por una escala distinta. Se define como:

$$z_{o_T} \equiv [Bcd_T]/|\nabla[Bcd_T]|, \quad z > 0{,}2L. \tag{5.18}$$

Usando las ecuaciones (1.1) y (5.12) se obtiene,

$$\frac{z_{o_f}}{z_{o_T}} = \frac{D_{sm}}{D_{coll}}, \tag{5.19}$$

donde D_{sm} y D_{coll} están dados por la ecuación (1.21) con $D_S = 0$. Claramente, la ecuación (5.19) no describe una única longitud de escala, z_{o_T}, dado que D_{sm} y D_{coll} dependen de $[Bcd]$, el cual no es uniforme para $z > 0{,}2L$. De cualquier modo, este análisis muestra que, contando con estimaciones previas de los coeficientes de difusión, la constante de disociación de la reacción y las concentraciones de las distintas especies, a partir de la longitud característica de la distribución de Bcd observada es posible estimar el valor de $\tilde{\alpha}$. Luego, teniendo en cuenta el valor de la concentración total de Bcd en $z = 0$ y que ésta se relaciona con $\theta_o/\tilde{\alpha}$ a través de las ecuaciones (5.15) se puede estimar el valor de θ.

Si ahora se considera el modelo con degradación total descripto por las ecuaciones (5.3) y se procede como en el caso anterior, se deduce que la condición de equilibrio (5.12)–(5.13) no se mantiene para todo $z \geq 0{,}2L$. Ahora bien, si se usa la aproximación de "reacciones rápidas" (5.6)–(5.7) las ecuaciones (5.12)–(5.13) se satisfacen en cada punto de la región $z \geq 0{,}2L$. La separación de escalas temporales requerida para que la aproximación sea válida se satisface para los parámetros de la simulación, listados en la tabla 5.1, siempre que $\overline{\alpha}$ sea suficientemente pequeño. En ese caso la evolución de $[Bcd]$ está determinada por las ecuaciones (5.6)–(5.8) con $\hat{\alpha}$ dado por la ecuación (5.9), igualdad que se reduce a $\hat{\alpha} = \overline{\alpha} D_{coll}/D_{sm}$ para $D_S = 0$. La solución estacionaria para

estas ecuaciones satisface una condición similar a la dada por la ecuación (5.16) pero con D_{coll}, $\hat{\alpha}$ y $\hat{\theta}$ en lugar de D_f, $\tilde{\alpha}$ y θ, respectivamente. Así, en este caso se estima la longitud característica de la solución estacionaria de $[Bcd]$ como

$$z'_{o_f} \approx \sqrt{D_{coll}/\hat{\alpha}} = \sqrt{D_{sm}/\overline{\alpha}}, \tag{5.20}$$

y, para $[Bcd_T]$, la longitud

$$z'_{o_T} = z'_{o_f} D_{coll}/D_{sm}. \tag{5.21}$$

Si bien el cociente entre las longitudes características de $[Bcd]$ y de $[Bcd_T]$ es el mismo si se usa el modelo con degradación parcial o total, la longitud del gradiente como función de los parámetros biofísicos es diferente en ambos casos (comparar (5.17) con (5.20)). Por lo tanto, si se procede como antes y se estima $\overline{\alpha}$ a partir de igualar z'_{o_T} a la longitud característica medida del gradiente, se obtendrá un valor distinto al obtenido en el caso con degradación parcial. Más específicamente, ambas constantes de degradación estarán relacionadas por $\overline{\alpha} = \tilde{\alpha} D_{sm}/D_f$. Dado que $D_{sm} < D_f$, al usar el modelo de degradación total, se derivará un valor para la degradación y para la intensidad de la fuente, θ, (a través de la ecuación (5.15)) que es aproximadamente un factor D_{sm}/D_f más chico que el derivado usando el modelo con degradación parcial. Cabe aclarar que las estimaciones de las tasas de producción y degradación obtenidas de este modo son valores *a priori* que dan una idea del rango de valores que es razonable elegir. Los valores finalmente utilizados son los que, a partir de las simulaciones numéricas, permiten reproducir las propiedades observadas del gradiente.

5.2.2 Resultados de las simulaciones numéricas

En la figura 5.1 se muestran las concentraciones de las distintas especies a lo largo del eje antero-posterior obtenidas para el tiempo, $t = 100$ min usando el modelo con degradación parcial (a) o total (b) con los párametros de la tabla 5.1. Para las estimaciones *a priori* de los otros parámetros se procedió como se explicó anteriormente. En particular, sabiendo que $z_{o_T} \approx 150\mu m$, que $D_f \sim 20\mu m^2/s$ y que $D_{sm}/D_{coll} \approx 0{,}1$ en la región donde se realizan los experimentos de FCS [Sigaut et al., 2014], usando las ecuaciones (5.17)-(5.19) se obtiene un valor *a priori* para $\tilde{\alpha}$ de $\sim 0{,}1s^{-1}$. Partiendo de

este valor la búsqueda subsiguiente determinó que una tasa de degradación $\tilde{\alpha} = 0{,}05s^{-1}$ permitía reproducir varias características del gradiente. Usando este valor de $\tilde{\alpha}$, la ecuación (5.15) y $[Bcd_T](z = 0) = 140nM$, se estima $\theta_0 = 0{,}5nMs^{-1}$. Las simulaciones mostradas en la figura 5.1(a) corresponden a estos valores. Se observa que la distribución espacial de $[Bcd_T]$ es consistente con las observaciones experimentales. En particular, su concentración decae $\sim 50\,\%$ para $z \sim 150\mu m$. Consistente con lo estimado en [Sigaut et al., 2014] se observa que la mayoría de las moléculas de Bcd en el polo anterior están ligadas (los sitios de ligadura están saturados cerca de la fuente de Bcd) mientras que a medida que aumenta z la concentración de Bcd total comienza a disminuir y el número de sitios de ligadura libres comienza a crecer. Si se comparan las distribuciones de las concentraciones de Bcd libre y de Bcd ligado se observa que esta última se hace despreciable a distancias mayores del polo anterior que la primera.

En la figura 5.1(b) se muestra lo mismo que en (a) pero para el modelo con degradación total. Siguiendo los razonamientos que se describieron previamente y teniendo en cuenta que en la zona donde se realizan los experimentos de FCS es $D_{sm}/D_f \sim 0{,}05$, se obtiene, a partir de las ecuaciones (5.20)-(5.21), una estimación *a priori* para $\overline{\alpha} \sim 0{,}005s^{-1}$. Las simulaciones numéricas para este orden de magnitud de la tasa de degradación, sin embargo, no dieron distribuciones razonables. Se utilizó entonces $\overline{\alpha} = 0{,}0005s^{-1}$ y $\overline{\theta}_0 = 0{,}1nMs^{-1}$. Debido a que ahora se degradan el Bcd libre y el ligado, la forma del gradiente de Bcd total cambia ligeramente. Se puede ver, por ejemplo, que en los alrededores del polo anterior, donde actúa la fuente de Bcd, la pendiente de $[Bcd_T]$ es un poco más pronunciada que en el caso de degradación parcial. Esto hace que la longitud característica del gradiente sea levemente distinta en ambos casos. En el caso de degradación parcial la concentración de Bcd total decae al $10\,\%$ de su valor máximo para $z \sim 195\mu m$, mientras que en el caso de degradación total el mismo porcentaje se alcanza para $z \sim 165\mu m$. Por otro lado, de la figura 5.1 también se ve que, tanto en el caso de degradación parcial como en el de degradación total, la distribución del Bcd no sigue a la del ARNm, dado por la fuente $\theta(z)$. Esto muestra que la distribución de Bcd no es un reflejo pasivo de la del ARNm que la produce, contrariamente a lo supuesto en [Spirov et al., 2009].

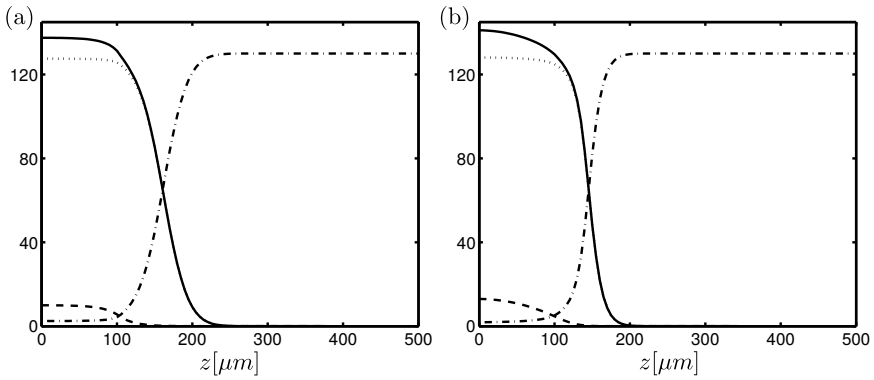

Figura 5.1: Distribuciones obtenidas mediante simulaciones numéricas para las diferentes especies ($[Bcd_T]$ en línea continua, $[Bcd]$ en línea a trazos, $[Bcd_b]$ en línea de puntos y $[S]$ en línea de trazos y puntos) a lo largo del eje antero-posterior. Todas las concentraciones están expresadas en nM. Los perfiles mostrados corresponden al tiempo $t = 100$ min. (a) Modelo con degradación parcial, para $\tilde{\alpha} = 0{,}05s^{-1}$, $\theta_0 = 0{,}5nMs^{-1}$. (b) Modelo con degradación total, para $\overline{\alpha} = 0{,}0005s^{-1}$, $\overline{\theta_0} = 0{,}1nMs^{-1}$.

Comparando los valores para la tasa de degradación usados en la figura 5.1 con los reportados en la literatura, $0{,}0003s^{-1} - 0{,}0015s^{-1}$ [Grimm et al., 2010, Gregor et al., 2007a, Drocco et al., 2011], vemos que el del modelo con degradación total está dentro de este rango, mientras que el del modelo de degradación parcial supera ampliamente el valor máximo de este rango. Esto último es razonable si se tiene en cuenta que las estimaciones de [Gregor et al., 2007a, Drocco et al., 2011] fueron obtenidas a partir de mediciones de fluorescencia que no distinguen entre Bcd ligado y libre. En caso de que sólo el Bcd libre fuera degradado con una tasa $\tilde{\alpha}$ la estimación obtenida a partir de observar la fluorescencia total estaría re-escaleada por la fracción de Bcd libre a Bcd total. Esta fracción es $\sim 0{,}08$ en el ejemplo de la figura 5.1 (a) lo que permite explicar, en parte, la discrepancia entre el valor, $\tilde{\alpha} = 0{,}05s^{-1}$, utilizado en el modelo con degradación parcial y los valores estimados en [Gregor et al., 2007a, Drocco et al., 2011].

En lo que se refiere a la tasa de síntesis, θ, en [Little et al., 2011] se determina el número de moléculas de ARNm dentro del embrión a lo largo de los distintos ciclos nucleares. En particular, entre los ciclos 10 y 13 la cantidad de moléculas de ARNm en el embrión es $\sim 10^5$. Si en base a las observaciones de [Gregor et al., 2007a] suponemos

que la región donde se encuentran los núcleos y puede moverse el Bcd es la cáscara de un elipsoide de radios $\sim 250\mu m$, $75\mu m$ y $75\mu m$, que el cascarón es de unos $20\mu m$ de espesor, que las moléculas de ARNm ocupan el 20 % anterior de ese volumen y que cada una de ellas sintetiza una molécula de proteína por segundo [Milo and Phillips, 2015], se obtiene una tasa de síntesis del orden de $0{,}3nM/s$. Este valor es similar a los obtenidos para que el modelo con degradación parcial o con degradación total reproduzcan el gradiente de Bcd observado.

Hasta acá se han determinado las tasas de producción y de degradación de Bcd basándose en las propiedades espaciales del gradiente. Como ya fue mencionado, el tiempo que le toma al gradiente formarse es otro aspecto importante que ha sido muy debatido, principalmente debido a que el coeficiente de difusión estimado en [Gregor et al., 2007a] era muy pequeño para explicar la formación del gradiente en los tiempos observados. Un parámetro de nuestro modelo que no se analizó hasta el momento es, k_{off}, el cual se relaciona con la escala temporal. El parámetro k_{off} permite controlar los tiempos de reacción entre las moléculas de Bcd y los sitios de ligadura, ya que cambiando su valor pero manteniendo constante K_D, podemos cambiar la escala temporal con las que las reacciones ocurren. Es de esperar que al cambiar la escala temporal de las interacciones se modifique la convergencia del gradiente. Por ejemplo, si k_{off} es muy pequeño, la interacción entre moléculas de Bcd y sitios de ligadura es muy lenta, y los moléculas de Bcd libres logran difundir durante mayor tiempo antes de ser atrapadas por los sitios. Por lo tanto, hay una primera fase en la que el gradiente de Bcd cambia rápidamente debido a que la especie avanza sin interactuar, pero hay después otro proceso más lento debido a la interacción con los sitios. En el otro extremo, si k_{off} es muy grande, las interacciones son rápidas comparadas con los tiempos de difusión y se puede analizar el problema en el marco de la aproximación de reacciones rápidas. Se hicieron simulaciones para distintos valores k_{off} abarcando varios órdenes de magnitud, $10^{-5} - 10^{3}s^{-1}$. Se encontró que, manteniendo los otros parámetros como antes, el sistema es poco sensible a cambios en k_{off} (no se muestran). Las distribuciones de las concentraciones de las distintas especies sólo cambian considerablemente para valores extremos de k_{off}, los cuales son poco realistas. Por esta razón se utilizó $k_{off} = 0{,}1s^{-1}$

un valor razonable para este tipo de interacciones.

En la figura 5.2(a) se muestra cómo es la convergencia del gradiente de Bcd total en función del tiempo de observación para el modelo con degradación parcial. El tiempo a partir del cual las diferencias entre el gradiente observado y la solución asintótica son menores al 5 % es $T = 800$ minutos (≈ 13 horas). Este tiempo es mucho más largo que los 100 minutos que, de acuerdo a las observaciones de [Gregor et al., 2007a], le toma al gradiente alcanzar el estado estacionario en embriones. De todas maneras, entre los 70 y 167 minutos el gradiente no cambia significativamente como se ve en la figura 5.2(b). En este intervalo de tiempo la concentración, $[Bcd_T]$, difiere en menos de un 10 % de la obtenida para $t = 100$ minutos y las mayores diferencias están restringidas a una región espacial muy pequeña. Por otro lado, la diferencia respecto del valor estacionario para $t \geq 70$min no supera el $\sim 15\,\%$ en todos los puntos. Debido al ambiente ruidoso de los experimentos, la diferencia del 10 % puede no ser apreciable y el gradiente parecer estable. Esto concuerda con lo presentado en [Bergmann et al., 2007] donde se discute que, durante la etapa de sincitio, el gradiente no alcanza a llegar al estado estacionario. En el caso del modelo con degradación total se observa una evolución del gradiente de $[Bcd_T]$ similar. Entre los 80 y 120 minutos el gradiente varía menos de un $\sim 20\,\%$ en la misma región que en el caso con degradación parcial. Se concluye entonces que, si bien los parámetros de producción y degradación son diferentes, la dinámica espacio-temporal del Bcd libre y del Bcd total predicha por los modelos con degradación parcial o con degradación total es similar. Por lo tanto, de ahora en más se trabajará con el modelo con degradación parcial.

Si bien el tema de la convergencia al estado estacionario puede acomodarse según lo descripto, hay otra propiedad de nuestras simulaciones que resulta incompatible con las observaciones: el máximo de concentración, $([Bcd_T](z = 0))$, es alcanzado en forma prácticamente instantánea. Esto no coincide con lo observado en [Little et al., 2011] en donde se ve que el máximo se alcanza aproximadamente unos 80 minutos luego de la fecundación del embrión. El hecho de que los experimentos usan Bcd-eGFP para observar y que a ésta le lleva un tiempo madurar y volverse fluorescente podría ser la razón que explique esta diferencia. Otra posible explicación podría ser la migración, a

partir del ciclo nuclear 10 ($\sim 80min$ después de la fecundación), de los núcleos desde el centro a la membrana del sincitio, donde la fluorescencia emitida no es obstruida por el interior del embrión. Se analiza a continuación si teniendo en cuenta el tiempo de maduración de la eGFP es posible corregir este problema.

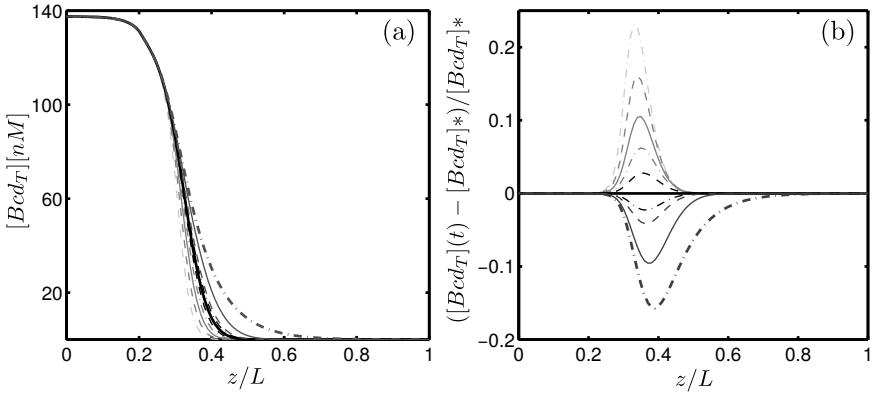

Figura 5.2: (a) Distribución de Bcd total a lo largo del eje AP obtenida para distintos tiempos con el modelo con degradación parcial ($T = [50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100 - 110 - 120 - 167 - 833]$ min aumentando de izquierda a derecha). La línea continua negra del centro, ($T = 100$ min), corresponde al tiempo reportado en que se establece el gradiente. (b) Diferencias entre los valores de $[Bcd_T]$ a distintos tiempos con respecto al que corresponde a $T = 100$min, $[Bcd_T]* \equiv [Bcd_T](T = 100min)$. A lo largo de $T = 70 - 167$ minutos, la concentración, $[Bcd_T]$, permanece prácticamente constante a lo largo del eje AP, excepto en una pequeña región donde las diferencias son menores al 10 %.

Para evaluar el efecto de la maduración se realizaron simulaciones numéricas del sistema de ecuaciones (5.4). En la figura 5.3 (a) se observa la concentración (normalizada respecto de su valor asintótico) del Bcd marcado total, $[Bcd_T^t]$, en el punto donde la fuente se extingue ($z = 20\mu m$) como función del tiempo para distintas tasas de maduración, γ. Se muestra también, con línea a trazos negra, la concentración del Bcd total para el modelo SDID con degradación parcial sin maduración. Los parámetros de la simulación son iguales a los de la figura 5.1 (a). Como era de esperar, se observa que la convergencia al valor asintótico demora más a medida que la maduración es más lenta, es decir, γ más pequeño. Para $\gamma = 0{,}01s^{-1}$ se observa poca diferencia entre el modelo que tiene en cuenta la maduración y el original en que las moléculas de Bcd son instantáneamente fluorescentes. Para $t = 10min$ la concentración de Bcd total en $z = 20\mu m$ alcanza el 98,1 % del valor asintótico para el modelo con maduración retardada, contra 99,4 %

para el modelo con maduración instantánea. Para $\gamma = 0{,}0005s^{-1}$, el menor de todos los valores considerados, la concentración alcanza el $\sim 73\,\%$ del valor asintótico para el mismo tiempo. En regiones alejadas del polo anterior y de la fuente, la concentración de moléculas de Bcd maduras es mayor por lo que el retardo en la convergencia, producto del efecto de la maduración, se ve reducido. Se obtienen resultados similares si se incorpora la descripción de la maduración al modelo con degradación total.

Ahora bien, al incluir la maduración de la eGFP en el modelo no sólo el tiempo de convergencia a la solución estacionaria se ve afectado, sino que la distribución asintótica del Bcd fluorescente también se modifica con el consecuente cambio en la longitud característica del gradiente observable [Liu et al., 2013]. Por lo tanto, los parámetros estimados en base a las simulaciones donde la maduración no es tenida en cuenta deberían revisarse. Para analizar este efecto en las simulaciones de nuestro modelo se muestra en la figura 5.3 (b) el cociente entre la distribucion asintótica de Bcd total y la de Bcd fluorescente, $R(z)$, definido en (5.5). R depende de la relación entre $\tilde{\alpha}$ y γ. Se muestra en la figura 5.3 (b) el valor de R en función de z para distintos valores de γ ($[0{,}01 - 0{,}005 - 0{,}001 - 0{,}0005]s^{-1}$). En todos los casos se observa que R es mayor cerca de la fuente, mientras que decae a valores próximos a $R \approx 1$ a medida que se acerca a la región del polo posterior. En [Liu et al., 2013] observan que el valor de R cerca de la fuente es ~ 3. De todos los valores de la tasa de maduración analizados, el que da un perfil de R que se parece más al observado es $\gamma = 0{,}001s^{-1}$. Este valor de γ, está perfectamente contenido dentro de los reportados para la degradación de Bcd en la literatura [Grimm et al., 2010, Gregor et al., 2007a, Drocco et al., 2011].

5.3 Interpretación de las observaciones: las consecuencias de tener en cuenta las reacciones.

Los resultados de las simulaciones presentados hasta ahora muestran que es posible reproducir aproximadamente las características espacio-temporales del gradiente de la proteína Bicoid en el marco de modelos que tienen en cuenta la interacción con sitios usando parámetros biofísicos “razonables”. Ahora nos interesa determinar cómo

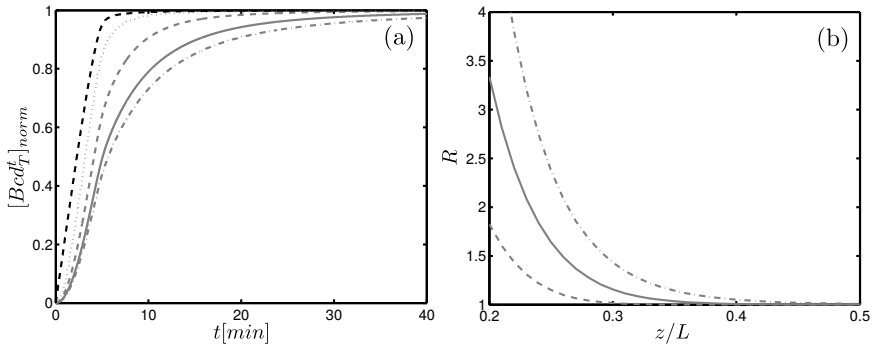

Figura 5.3: (a) Concentración de Bcd marcado total normalizada respecto del valor asintótico, $[Bcd_T^t]_{norm}$, a lo largo del tiempo en la región donde la fuente se hace cero ($z = 20\mu m$) obtenida mediante simulaciones de las ecuaciones (5.4) para distintas tasas de maduración, (línea punteada gris $\gamma = 0{,}01s^{-1}$, línea de trazos gris $\gamma = 0{,}005s^{-1}$ y línea continua gris $\gamma = 0{,}001s^{-1}$ y línea de trazos y puntos gris $\gamma = 0{,}0005s^{-1}$). En línea a trazos negra se muestra la concentración en función del tiempo para el modelo SDID con degradación parcial. Todos los parámetros coinciden con los de la figura 5.1 (a). (b) Cociente entre la concentraciones para $T = 100min$ de Bicoid total y de Bicoid total fluorescente, R, definido en (5.5) a lo largo del eje antero-posterior. Los tipos de líneas y colores son los mismos que en (a).

describir las escalas espacial y temporal del gradiente obtenido en términos de los parámetros del modelo SDID de un modo sencillo. La evolución espacio-temporal de las concentraciones de Bcd libre y total determinada por las distintas variantes del modelo *SDID* acá analizadas es complicada. El problema es no lineal y no hay una única escala espacial o temporal que lo defina. Esto es evidente si se analizan las ecuaciones en la aproximación de reacciones rápidas (5.6)–(5.7) en las que el transporte está determinado por un coeficiente de difusión efectivo que depende de la concentración y, por lo tanto, no toma un valor único a lo largo del embrión. La existencia de "muchos" coeficientes o escalas múltiples está de acuerdo con el trabajo de [Little et al., 2011] en el que, para reproducir las observaciones experimentales, recurren a un modelo con coeficientes de difusión que varían a lo largo del tiempo de un modo *ad hoc*. Una de las propiedades interesantes de nuestro modelo es que posee esa propiedad naturalmente ya que el cambio en el transporte a lo largo del tiempo puede interpretarse como una consecuencia de la variación en la fracción de moléculas de Bcd que se encuentran ligadas a sitios en cada instante. El abordaje de [Little et al., 2011] refuerza nuestra idea de que

son los coeficientes de difusión efectivos los que determinan las escalas características del problema. En esta sección se busca relacionar del modo más sencillo posible los parámetros efectivos del modelo con la escala espacial y el tiempo de convergencia del gradiente observado. De este modo es posible comparar los parámetros que pueden estimarse a partir de esta interpretación de las observaciones con los que se derivan si no se tienen en cuenta las interacciones.

5.3.1 Escala espacial: Gradiente de Bcd libre *vs* gradiente de Bcd total

La solución estacionaria del modelo SDD con una fuente puntual de Bcd en un extremo:

$$\frac{\partial[Bcd]}{\partial t} = D\nabla^2[Bcd] - \alpha[Bcd] + \theta_o\delta(z), \tag{5.22}$$

tiene una solución estacionaria de la forma dada por la ecuación (1.1), que decae en el espacio con la escala característica:

$$z_o = \sqrt{D/\alpha}. \tag{5.23}$$

Dado que en este modelo todo el Bcd está libre y que no se tiene en cuenta el tiempo que le lleva madurar a la GFP, se puede igualar z_o a la longitud característica, ℓ_o, de la distribución de fluorescencia observada, $z_o = \ell_o \sim 100\mu m$. Si se usa el valor $D \approx 1\mu^2 m/s$ estimado en [Gregor et al., 2007a, Abu-Arish et al., 2010] usando FRAP se obtiene $\alpha \sim 0{,}0001s^{-1}$ mientras que resulta $\alpha \sim 0{,}002s^{-1}$ si se usa $D \approx 20\mu^2 m/s$ el valor de difusión libre de Bcd estimado en [Sigaut et al., 2014]. Ambos valores de α están aproximadamente contenidos dentro del rango reportado en la literatura $0{,}0003s^{-1} - 0{,}0015s^{-1}$ [Grimm et al., 2010, Gregor et al., 2007a, Drocco et al., 2011]. En el caso del modelo *SDID* es más complicado definir una única escala espacial. Sin embargo, es posible trabajar con las ecuaciones reducidas en la aproximación de reacciones rápidas (5.7) y (5.11) como se hizo para obtener la estimación de parámetros *a priori*. Notando que la ecuación (5.11) es formalmente similar a la ecuación (5.22) es que se puede calcular la longitud característica de la concentración de Bcd libre, z_{o_f}, como en (5.23)

pero reemplazando D por D_{coll} y α por $\hat{\alpha}$. De ese modo se obtiene (5.17) en el caso del modelo con degradación parcial y (5.20) en el de degradación total. En caso de que el gradiente observado haya alcanzado el estado estacionario, su longitud característica debería vincularse con la del Bcd total ya que la fluorescencia no distingue si está libre o no. En la aproximación de reacciones rápidas esta longitud, z_{o_T}, está determinada por las ecuaciones (5.19) y (5.17) en el caso de degradación parcial y por (5.21) y (5.20) en el de degradación total. Las longitudes, z_{o_f} y z_{o_T}, definidas usando la aproximación de reacciones rápidas pueden ser muy diferentes entre sí. Por otro lado, sus valores dependen del punto a lo largo del embrión. Acá se analiza en qué regiones las ecuaciones (5.17) y (5.19) proveen una buena estimación de la escala espacial de las distribuciones de Bcd libre y total y dónde el cociente entre ambas se corresponde con lo obtenido en las simulaciones. También se analiza si es posible extraer una única escala característica para cada distribución en la región inmediatamente contigua a la región de la fuente y, de existir, se estudia a qué coeficientes de difusión efectivos corresponde. Todos estos estudios se hacen en el marco del modelo SDID con degradación parcial. Se obtienen resultados equivalentes en el de degradación total (donde hay que modificar la tasa re-escaleada de degradación de Bcd respecto del caso de degradación parcial). En la figura 5.4 (a) se muesta la concentración normalizada de Bcd libre y Bcd total a lo largo del eje AP para $t = 100min$ usando el modelo SDID con degradación parcial. Se puede ver que la distribución de Bcd libre decae a un 50 % en $z \approx 100\mu m$, mientras que el Bcd total lo hace en $z \approx 160\mu m$. Por otro lado, se puede obtener la longitud característica de los gradientes ajustando la concentración en función de z por una exponencial dada por la ecuación (1.1). Los perfiles de $[Bcd_T]$ y $[Bcd]$ en función de z no son exactamente exponenciales. Sin embargo, pueden aproximarse por este tipo de función en alguna región de valores de z como se observa en la figura 5.4 (b). En esta figura se muestran $[Bcd_T]$ y $[Bcd]$ normalizadas por su valor máximo usando una escala logarítmica en el eje vertical. Se realizaron ajustes en las regiones de $z = (125 - 300)\mu m$ para $[Bcd]$ y $z = (150 - 300)\mu m$ para $[Bcd_T]$ obteniéndose $z_{of} \approx 19\mu m$ y $z_{oT} \approx 45\mu m$. Se pueden comparar estos valores con los predichos por las expresiones (5.17) y (5.19). Para el caso del Bcd libre, la escala característica dada por (5.17), usando los parámetros de la

simulación es $z_{of} = 19{,}5\mu m$, valor que coincide con la estimación obtenida del ajuste. En el caso de la distribución de $[Bcd_T]$ la comparación es un poco más complejo, dado que, según (5.19), la longitud característica depende de D_{coll} y D_{sm}, cuyos valores dependen del tiempo y la posición en el eje AP. Si se toman los valores de D_{coll} y D_{sm} para el tiempo $t = 100$ min y para la región donde comienza el ajuste, $z = 150\mu m$, se obtiene $D_{coll}/D_{sm} \approx 2$. Usando este valor en la ecuación (5.19) se obtiene un valor $z_{oT} \approx 40\mu m$, el cual es muy similar al estimado mediante el ajuste. Si, en cambio, se considera $z = 180\mu m$, el cociente entre los coeficientes efectivos queda $D_{coll}/D_{sm} \approx 1{,}2$, lo que lleva a una estimación de $z_{oT} \approx 23\mu m$ que difiere sólo en un factor 2 respecto del valor obtenido con el ajuste. Las ecuaciones (5.17) y (5.19), por lo tanto, permiten hacer una estimación de las longitudes características del gradiente de Bcd observado en términos de los parámetros del modelo SDID considerando los coeficientes efectivos en la región donde las concentraciones comienzan a decrecer. Se recuerda que estas estimaciones fueron realizadas para el modelo con degradación parcial. Si se considera el modelo con degradación total se llega a resultados similares en los cuales es posible relacionar la escala espacial del gradiente con las ecuaciones (5.20) y (5.21).

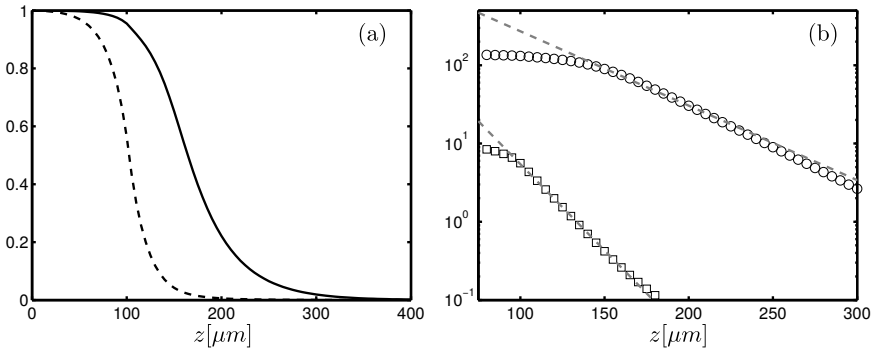

Figura 5.4: (a) Gradientes de $[Bcd_T]$ y $[Bcd]$ normalizados en función de z (línea continua y a trazos respectivamente) para el tiempo de observación $T = 100min$, obtenidos de simulaciones numéricas usando el modelo de degradación parcial. (b) Lo mismo que en (a), pero el eje vertical se muestra en escala logarítmica ($[Bcd_T]$ en ◯ y $[Bcd]$ en □). Junto los datos de las simulaciones se muestran dos ajustes lineales, en las regiones $z = (125 - 300)\mu m$ para el Bcd libre y $z = (150 - 300)\mu m$ en el caso de Bcd total, de los cuales se desprenden las escalas características $z_{of} \approx 19\mu m$ y $z_{oT} \approx 45\mu m$.

5.3.2 Escala temporal: coeficientes de difusión efectivos *vs.* coeficiente de difusión libre

El modelo SDD con una fuente puntual en un extremo, dado por la ecuación (5.22), tiene soluciones de la forma [Bergmann et al., 2007]:

$$\begin{aligned}[Bcd](z,t) =& \frac{\lambda\theta_o}{2D}\left(\exp(-z/\lambda) - \frac{\exp(-z/\lambda)}{2} erfc\left(\frac{2Dt/\lambda - z}{\sqrt{4Dt}}\right)\right. \\ & \left. - \frac{\exp(z/\lambda)}{2} erfc\left(\frac{2Dt/\lambda + z}{\sqrt{4Dt}}\right)\right),\end{aligned} \tag{5.24}$$

donde $erfc()$ es la función error y $\lambda = (D/\alpha)^{1/2}$. Esta ecuación muestra que la aproximación a la solución estacionaria (ecuación (1.1)) ocurre como si hubiera un frente que viaja con la velocidad

$$v \equiv \sqrt{\alpha D}, \tag{5.25}$$

que se forma con el coeficiente de difusión, D, y la tasa de degradación, α, con la cual puede definirse un tiempo de convergencia a la distancia, z, de la fuente como:

$$t_{conv}(z) \equiv \frac{z}{\sqrt{\alpha D}}. \tag{5.26}$$

Se ve entonces que si se elige α para un D dado de modo de ajustar la longitud característica del gradiente dada por (5.23) se obtiene un tiempo de convergencia:

$$t_{conv}(z) \equiv \frac{z z_o}{D}, \tag{5.27}$$

que es mayor a 10 horas (demasiado largo) para $z = 0{,}75L$ si se toma $z_o = 100\mu m$ y el valor $D \approx 1\mu^2 m/s$ estimado en [Gregor et al., 2007a, Abu-Arish et al., 2010] usando FRAP y del orden de media hora (demasiado corto) si se usa $D \approx 20\mu^2 m/s$ el valor de difusión libre de Bcd estimado en [Sigaut et al., 2014]. La solución (5.24) también muestra que la tasa de producción, θ_o, determina la amplitud máxima de [Bcd] pero no está involucrada en el tiempo de convergencia. En el caso del modelo *SDID* es más complicado definir una velocidad ya que además del tiempo dado por α están los tiempos asociados a la reacción. Para poder "construir" una velocidad como en el caso del modelo *SDD* es posible trabajar con las ecuaciones reducidas en la aproximación de reacciones rápidas (5.6)–(5.7). Apelando nuevamente a la forma equivalente entre las

ecuaciones (5.11) y (5.22) se define la velocidad y el tiempo de convergencia como en (5.25) y (5.27) pero reemplazando D por D_{coll} y α por $\hat{\alpha}$. Se obtiene

$$v = \sqrt{\tilde{\alpha}\frac{D_{coll}^2}{D_f}}, \quad t_{conv}(z) = z\left(\frac{D_f}{\tilde{\alpha}D_{coll}^2}\right)^{1/2}, \tag{5.28}$$

en el modelo con degradación parcial y

$$v = \sqrt{\overline{\alpha}\frac{D_{coll}^2}{D_{sm}}}, \quad t_{conv}(z) = z\left(\frac{D_{sm}}{\overline{\alpha}D_{coll}^2}\right)^{1/2}, \tag{5.29}$$

en el modelo con degradación total. Como en el caso de la longitud espacial, acá se analiza si la solución obtenida numéricamente avanza con una velocidad como proveen las ecuaciones (5.28) o (5.29), si es posible definir un único valor en la región inmediatamente contigua a la región de la fuente y, de existir, qué coeficientes de difusión efectivos lo determinan. Cabe aclarar que si, para el modelo con degradación parcial, se determina el valor de $\tilde{\alpha}$ a partir de las ecuaciones (5.19) y (5.17) usando valores dados de D_f, D_{sm}/D_{coll} y de la longitud espacial observada, ℓ_o, que en este caso se iguala a z_{o_T}, el tiempo de convergencia resulta

$$t_{conv} = \frac{D_{sm}\ell_o z}{D_{coll}^2}. \tag{5.30}$$

Esta misma expresión se obtiene para el modelo con degradación total si se determina $\overline{\alpha}$ a partir de las ecuaciones (5.21) y (5.20) usando los mismos valores dados pero en este caso identificando $z'_{o_T} = \ell_o$. De acá se concluye que si se estima $\tilde{\alpha}$ para el modelo con degradación parcial o $\overline{\alpha}$ para el de degradación total de modo de ajustar la longitud espacial del gradiente observado identificándola con la de Bcd total para el modelo el tiempo de convergencia a la solución estacionaria será el mismo a pesar de que $\tilde{\alpha} \neq \overline{\alpha}$. Teniendo en cuenta esto, se analiza la convergencia en el marco del modelo SDID con degradación parcial.

Para representar cómo avanza el frente de la distribución de Bcd y así caracterizar la escala temporal del gradiente se calcula el tiempo, t, que le lleva a la concentración libre, $[Bcd(z,t)]$, alcanzar el 50 % del valor máximo asintótico, $\text{máx}_t[Bcd(z,t)]$, para cada z. En la figura 5.5 se muestra la posición sobre el eje AP, z, como función del tiempo, t, recién definido para el modelo con degradación parcial. La pendiente de esta

curva corresponde a la velocidad de propagación. Como era de esperarse, a diferencia del modelo SDD, en nuestro caso el frente avanza con una velocidad que depende de la posición y del tiempo. Se observa que esta velocidad es menor cuanto menor es z. Al igual que se hizo antes para determinar la escala espacial, acá se define una región donde la velocidad es aproximadamente constante. En base a los resultados de la figura 5.5 se ajusta el perfil del frente con una función lineal en dos regiones: entre $z = (100 - 150)\mu m$ (línea de trazos clara) y $z = (150 - 225)\mu m$ (línea de trazos oscura). De los ajustes se obtienen las velocidades $v \approx 1{,}3\mu m/\text{min}$ para la región más próxima a la fuente y $v \approx 0{,}53\mu m/\text{min}$ para la región más alejada. Para evaluar si es posible hacer estimaciones usando la expresión (5.28) se comparan los valores del ajuste con los que se obtienen a partir de esta expresión. La velocidades que se obtienen son $v(z = 140\mu m, 50min) \approx 1{,}5\mu m/\text{min}$ y $v(z = 180\mu m, 100min) \approx 0{,}4\mu m/\text{min}$. Estas estimaciones son similares a las derivadas del ajuste. Se concluye que es posible relacionar los parámetros del modelo con la escala temporal de formación del gradiente. Además, de la expresión (5.28) se observa la importancia de distinguir entre el coeficiente de difusión colectivo y el de molécula única. Si se hubiera considerado en la ecuación (5.28) el coeficiente D_{sm}, en lugar de D_{coll}, las estimaciones de la velocidad del frente serían aproximadamente la mitad de las obtenidas lo que duplicaría la escala temporal.

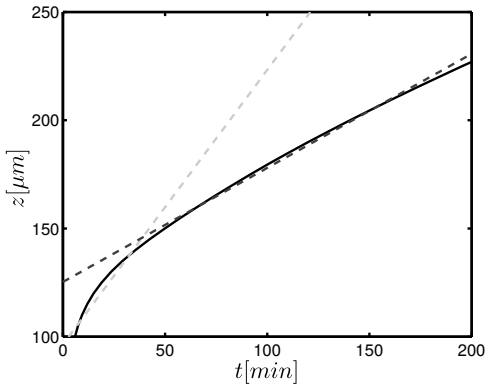

Figura 5.5: Posición sobre el eje AP y tiempo, (t, z), tal que la concentración de Bcd libre alcanzá 50 % de su valor asintótico, para el modelo de degradación parcial (línea sólida). Para estimar la velocidad con la que la que el gradiente converge a su estado estacionario, se hicieron dos ajustes lineales es diferentes regiones a lo largo del eje AP, (líneas de trazos).

5.3.3 La distinción entre Bcd libre y Bcd total y el rol de Bcd como factor de transcripción.

Como se mencionó en el capítulo 1, la proteína Bicoid actúa como factor de transcripción del gen que codifica para la proteína Hunchback (Hb). Aquí se explora el efecto de los sitios de ligadura sobre la dinámica de Bcd y cómo influyen en la transcripción de Hb. Se consideran dos situaciones diferentes respecto de cómo el Bicoid interactúa con al ADN. En la primera se supone que el Bcd sólo interactúa con los sitios promotores asociados a la transcripción de hb por lo que estos sitios están representados por la especie, S, del modelo SDID. En la otra situación, se supone que la especie S representa otros sitios con los que el Bcd interactúa y que la ligadura de Bcd a los sitios promotores de la transcripción de hb no modifica significativamente las concentraciones de Bcd libre o ligado determinadas por el modelo SDID. Independientemente de la situación, la producción de Hb está regulada por la tasas de interacción del Bcd libre con los sitios promotores. Como ya se discutió, el uso de Bcd-eGFP en los experimentos no permite distinguir entre el Bcd en su estado libre o ligado a otra especie. En [Gregor et al., 2007b] se estudió la relación entre las concentraciones de Hb y Bcd, encontrando una relación muy no lineal consistente con un alto grado de cooperatividad dado por una ecuación de Hill con coeficiente $n = 5$. En este sección se analiza cómo se deben re-interpretar estas observaciones experimentales si se tienen en cuenta las reacciones de las que participa Bcd.

Primero se analiza el caso en que los sitios con los que interactúa el Bcd son los promotores para la síntesis el ARNm que eventualmente producirá Hb. Por simplicidad, en esta situación se supone que la concentración de Hb es proporcional a la cantidad de Bcd ligado, $[Bcd_b]$. Esto involucra de por sí una simplificación ya que el modelo SDID acá considerado no supone que esta interacción sea cooperativa. De todos modos, el objetivo de este análisis es determinar en cuánto difiere el coeficiente de Hill que se infiere de las observaciones si supone que la concentración de Bcd observada corresponde sólo al Bcd libre o corresponde al Bcd total. Bajo esta suposición las concentraciones se

relacionan por:

$$\frac{[Hb]}{[Hb]_{max}} = \frac{[Bcd_b]}{[Bcd_b]_{max}} = \frac{[Bcd]}{[Bcd] + K_D}. \tag{5.31}$$

En la figura 5.6 (a) se muestra la concentración del Bcd ligado en función de la concentración de Bcd libre y de Bcd total, todos normalizados por sus valores máximos. Dado que la gran mayoría del Bcd se encuentra ligado, la relación entre $[Bcd_b]$ y $[Bcd_T]$ es casi la identidad, como se observa en la figura. Se obtendría esta misma relación independientemente de la cooperatividad de la interacción si la mayor parte de Bcd está ligado. Esto no se corresponde con las observaciones de [Gregor et al., 2007b] que muestran una relación muy no lineal entre Hb y Bcd. La relación con el Bcd libre es considerablemente más no lineal en el modelo SDID donde Bcd sólo interactúa con los sitios promotores en el ADN. Sin embargo, la región donde [Hb] es más sensible a cambios en [Bcd] no coincide con la observada. Estos resultados sugieren que el Bcd no sólo interactúa con los sitios del ADN que promueven la producción de Hb.

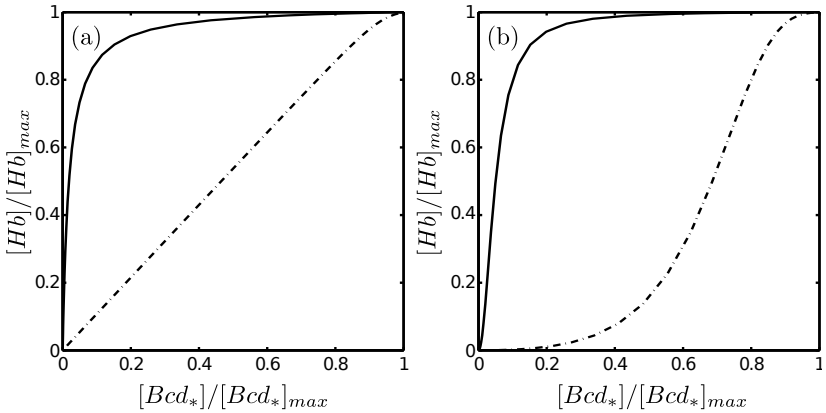

Figura 5.6: Concentración de [Hb] en función de $[Bcd_*]$ normalizado, que representa la concentración de Bcd libre (línea sólida) y Bcd total (línea de trazos y puntos). (a) Los sitios de ligadura del Bcd son los mismos promotores de Hb. En este caso, $[Hb] \propto [Bcd_b]$. (b) Los sitios de ligadura compiten con los sitios de promotores por el Bcd. Se muestra la concentración de Hb, dada por la ecuación (5.32). para $n = 2$ y $\overline{K}_D = 0{,}5\mu M$.

En segundo lugar se analiza el caso en que la ecuación (1.12) representa la interacción con sitios que no promueven la producción de Hb. Para que los resultados del modelo SDID analizado en las secciones anteriores sean válidos se supone que la fracción de Bcd que se pega a los sitios promotores en el ADN es mucho menor que la concentración,

$[Bcd_b]$, determinada con el modelo. Se supone entonces que la concentración de Hb y la de Bcd están vinculadas por una relación de Hill:

$$\frac{[Hb]}{[Hb]_{max}} = \frac{[Bcd]^n}{[Bcd]^n + \overline{K}_D^n}, \tag{5.32}$$

donde $\overline{K}_D^n$ es una constante de disociación efectiva entre los sitios promotores de la producción de Hb y el Bcd. El análisis realista de esta situación es más complicado que el que proponemos acá. La forma correcta de tratar el problema sería tener en cuenta que existe, además del Bcd libre y el Bcd ligado a los sitios de interacción, una fracción de Bcd que se encuentra ligado a los sitios promotores. Por lo tanto, habría que redefinir las fracciones de Bcd libre y el Bcd total. Sin embargo, si se considera que el número de sitios promotores es pequeño, de manera que $[S_T^{promotores}] \ll [S_T]$, donde $[S_T^{promotores}]$ es la concentración total de sitios promotores, la fracción de Bcd ligada al ADN es despreciable frente a las fracciones restantes, y es posible trabajar con las concentraciones derivadas de nuestras simulaciones. Siguiendo esta suposición en la figura 4.6 (b) se muestra la concentración de Hb en función de las concentraciones de Bcd libre y Bcd total, que se obtiene a partir de la ecuación (5.32) usando $\overline{K}_D = 0{,}5\mu M$ y $n = 2$. Se observa que, en este caso, la relación entre $[Hb]$ y $[Bcd_T]$ se parece más a la observada en [Gregor et al., 2007b]. En la medida en que n aumenta esta relación muestra una derivada mayor. Por otro lado, la relación con el Bcd libre muestra una dependencia diferente. Esto sugiere que, dado que en los experimentos se observa la relación entre las concentraciones de Hb y Bcd totales, el coeficiente de Hill n, estimado a partir de estas observaciones puede no corresponder a la verdadera cooperatividad entre Hb y Bcd. Para evaluar en cuánto puede diferir dicho coeficiente si se lo estima a partir de comparar $[Hb]$ con las concentraciones de Bcd libre o Bcd total se reescribe la ecuación (5.32) de la siguiente manera:

$$\log\left(\frac{[Hb]_{max}}{[Hb]} - 1\right) = \log\left(\frac{\overline{K}_D^n}{[Bcd_*]_{max}^n}\right) - n\log\left(\frac{[Bcd_*]}{[Bcd_*]_{max}}\right), \tag{5.33}$$

donde Bcd_* puede ser Bcd o Bcd_T. De acuerdo a la la ecuación (5.33) $\log([Hb]_{max}/[Hb] - 1)$ y $\log([Bcd_*][Bcd_*]_{max})$ se relacionan linealmente con una pendiente que es el coeficiente de Hill. En la figura 4.7 (a) se muestra $\log([Hb]_{max}/[Hb] - 1)$ como función de

$\log([Bcd_*][Bcd_*]_{max})$ para $[Bcd_*]$ igual a $[Bcd]$ (línea sólida) o a $[Bcd_T]$ (línea de trazos y puntos)). Se ve que en el primer caso la relación es lineal con una pendiente igual al coeficiente de cooperatividad, $n = 2$, usado en la simulación. En el caso de Bcd total la relación es lineal cuando $[Bcd_T]$ es pequeño, pero a medida que la concentración crece, la linealidad se pierde. Dicha relación lineal se pierde en la región donde $[Hb]$ muestra mayor sensibilidad a cambios en $[Bcd_T]$, $[Bcd_T]/[Bcd_T]_{max} \sim (0{,}5 - 0{,}8)$ (ver figura 5.6 (b)). Si se realiza un ajuste de los datos usando la ecuación (5.32), el ajuste será bueno si logra reproducir el comportamiento en la región donde hay mayor sesibilidad. En la figura 5.7 (a) se muestra un ajuste hecho sobre los datos de Bcd total en la región de mayor sensibilidad. El ajuste arroja un coeficiente de Hill, $n_{ajuste} \approx 7$, mucho mayor que el que corresponde a la cooperatividad entre Hb y Bcd utilizada en la simulación, $n = 2$. Esto muestra que el hecho de no poder distinguir entre Bcd libre y Bcd total puede llevar a una sobreestimación del coeficiente de Hill y de la cooperatividad entre las especies. En la figura 5.7 (b) se muestra la relación entre $[Hb]$ y $[Bcd_T]$ obtenida con las simulaciones junto con la ecuación (5.32) con $Bcd = Bcd_*$ y $n = n_{ajuste}$. Si bien el ajuste no es perfecto, resulta adecuado si se tiene en cuenta que los datos provenientes de las observaciones experimentales tienen gran variabilidad.

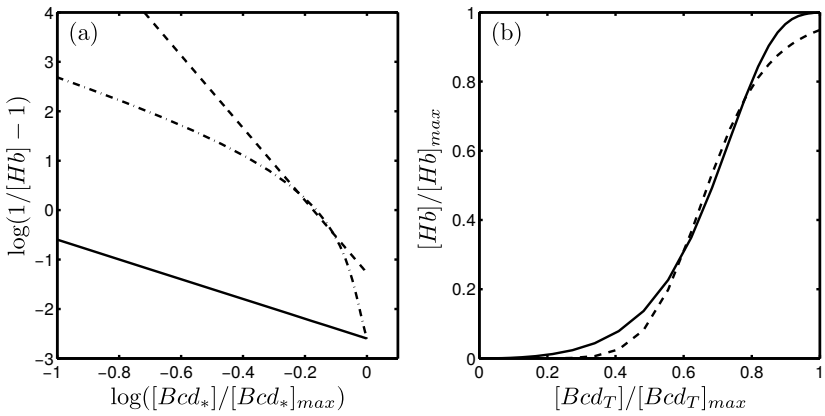

Figura 5.7: (a) Concentración de Hb reescrita según la ecuación (5.33) en función de $[Bcd]$ (línea sólida) y $[Bcd_T]$ (línea de trazos y puntos), usando $\overline{K}_D = 0{,}5\mu M$ y $n = 2$. En línea de trazos se muestra un ajuste lineal en el caso de Bcd total, en la región de mayor sensibilidad entre Hb y Bcd total. El coeficiente de Hill estimado del ajuste es $n_{ajuste} \approx 7$. (b) $[Hb]$ normalizado en función de $[Bcd_T]$ junto con la representación de la ecuación (5.32) usando el n_{ajuste} obtenido del ajuste previo.

6

Fluctuaciones en imágenes de señales de Ca^{2+}

Las técnicas ópticas junto con los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} proveen una manera poco invasiva de ver las señales intracelulares de este ión en células intactas. Existe un tipo de indicadores llamados radiométricos que permiten estimar $[Ca^{2+}]$ a partir de las imágenes dado que cambian la longitud de onda de la fluorescencia que emiten dependiendo de si tienen o no Ca^{2+} ligado. Estos indicadores se excitan en el rango UV del espectro por lo que no pueden utilizarse en experimentos en donde las señales son evocadas fotoliberando compuestos enjaulados con luz UV. Esto es lo que ocurre en los experimentos donde se observan señales mediadas por receptores de IP_3. En ese tipo de experimentos se utilizan indicadores de longitud de onda única que sólo cambian la intensidad de la fluorescencia que emiten al ligar Ca^{2+}. Por lo

tanto, la fluorescencia observada está relacionada con el Ca^{2+} ligado al indicador cuya distribución espacio-temporal depende de las propiedades del fluoróforo. En cualquiera de los dos casos, el hecho de que el Ca^{2+} debe ligarse al indicador para que se lo pueda observar introduce un problema adicional cuando las señales, como las mediadas por IP_3Rs, dependen del fenómeno conocido como "Calcium Induced Calcium Release". ¿Hasta qué punto la fluorescencia observada es un buen "reportero" de la dinámica del Ca^{2+} durante las señales evocadas? ¿De qué modo afecta la presencia del fluoróforo las propiedades de las mismas? ¿Cuán comparables son las imágenes obtenidas con fluoróforos de propiedades cinéticas distintas? Para contestar estas preguntas y establecer un "estándar" de comparación entre experimentos realizados en condiciones diversas se introdujo en [Piegari et al., 2014] un método que permite realizar esta comparación de un modo cuantitativo. El mismo está inspirado en la técnica de N&B [Digman et al., 2008] e involucra la realización de tres tipos de experimentos para analizar las fluctuaciones de la fluorescencia en un dado "set-up" en condiciones basales (es decir, en ausencia de señales). Interpretando los resultados de los experimentos mediante un modelo de fluctuaciones que es una extensión del de N&B se cuantifican los parámetros del mismo. En base al modelo puede estimarse la relación señal-ruido esperada en imágenes de señales obtenidas con el "set-up" analizado. El modelo permite, por otro lado, generar numéricamente imágenes de señales de Ca^{2+} con ruido realista que pueden utilizarse para interpretar y cuantificar las obtenidas en experimentos de microscopía.

En este capítulo se analiza el modelo de fluctuaciones propuesto en [Piegari et al., 2014]. En [Piegari et al., 2014] se considera a la fluorescencia por píxel como una variable aleatoria identificando a los valores que toma en la imagen obtenida en cada experimento "basal" con distintas mediciones de dicha variable. Se agrupan luego los datos con distintos criterios dependiendo del experimento basal a partir del cual fueron obtenidos. Se supone entonces que los datos agrupados brindan información sobre la distribución de la variable aleatoria bajo un conjunto de condiciones que depende de cada tipo de experimento analizado. El modelo consiste en suponer que las distribuciones son de un dado tipo y extraer parámetros de la distribución teórica a partir de los gráficos de varianza como función del valor medio de la fluorescencia. En este Capítulo

se analiza si las distribuciones propuestas en el modelo se corresponden o no con las obtenidas en los experimentos. Se estudia también hasta qué punto los parámetros del modelo quedan unívocamente determinados a partir de ajustar los datos obtenidos con los experimentos basales del método introducido en [Piegari et al., 2014].

6.1 Modelo de fluctuaciones de fluorescencia en señales de Ca^{2+}

En [Piegari et al., 2014] se considera que la fluorescencia recolectada en cada píxel de la imagen es una variable aleatoria que depende del tiempo de exposición por píxel y de tres fuentes de fluctuaciones: (1) la variación del número de moléculas fluorescentes cuya fluorescencia es recolectada en cada píxel; (2) cambios en la fracción de tales moléculas que están ligadas a iones de calcio; (3) fluctuaciones en el número de fotones detectados. Se define como N a la variable aleatoria que representa el número total de moléculas del indicador fluorescente que contribuyen a la fluorescencia dentro de un píxel. Se considera que N sigue una distribución de Poisson con valor medio igual al número medio de moléculas del indicador fluorescente en cada píxel, $\langle N \rangle$:

$$N = Poisson(\langle N \rangle). \tag{6.1}$$

Si la concentración del indicador es aproximadamente uniforme y constante en el sistema en estudio resulta $\langle N \rangle = [D_T]V_{pixel}$, donde $[D_T]$ es la concentración total del indicador y V_{pixel} es un volumen asociado al píxel. Se define a N_{CaD} como el número de moléculas del indicador que están ligadas a Ca^{2+}, el cual también es una variable aleatoria. La probabilidad de que una molécula de indicador esté ligado es p. En general, p depende del espacio y tiempo, aunque en experimentos realizados en condiciones estacionarias (basales) puede considerarse constante y uniforme en el espacio. Por esta razón se supone que, dado N, N_{CaD} sigue una distribución binomial de modo que la probabilidad de que haya N_{CaD} moléculas ligadas dado que hay N en el volumen asociado al píxel está dada por:

$$P(N_{CaD}|N) = \binom{N}{N_{CaD}} p^{N_{CaD}}(1-p)^{N-N_{CaD}}. \tag{6.2}$$

Como en N&B se supone que cada molécula de fluoróforo emite un número suficientemente alto de fotones como para despreciar las fluctuaciones en la emisión. Se supone entonces que llega al detector una fluorescencia de intensidad q_1 por cada molécula de indicador ligada a Ca^{2+} y de intensidad q_2 por cada molécula libre durante el tiempo de adquisición por píxel. Por lo tanto, el número de fotones que llega al detector desde un dado píxel está dado por $N_o = q_1 N_{CaD} + q_2(N - N_{CaD})$. q_1 y q_2 son funciones crecientes de la intensidad del láser. De esta manera, el número de fotones que llega al detector de la región de muestreo asociada a cada píxel puede escribirse como:

$$N_o = (q_1 - q_2)N_{CaD} + q_2 N. \tag{6.3}$$

Se supone que q_2/q_1 toma un valor fijo para cada tipo de fluoróforo y que $q_1 \gg q_2$ dado que el indicador ligado emite mucho más intensamente. De la ecuación (6.3) se desprende que $\langle N_o \rangle = ((q_1 - q_2)p + q_2)\langle N \rangle$ y que $\sigma^2_{N_o} = \left(((q_1 - q_2)p + q_2)^2 + p(1-p)(q_1 - q_2)^2\right)\langle N \rangle$, donde se consideró que $\sigma^2_N = \langle N \rangle$. El detector amplifica la señal y al mismo tiempo introduce ruido adicional. En el modelo de [Piegari et al., 2014] se supone que si llegan N_o fotones al detector la intensidad de la fluorescencia detectada es una variable aleatoria, F, proporcional a otra cuya distribución es Poissoniana con valor medio N_o. Se supone que la constante de proporcioanalidad, γ, representa el factor de amplificación del detector. Es decir, dado N_o, $F = \gamma Poisson(N_o)$. La probabilidad de obtener una intensidad de fluorescencia F dado que llegaron N_o fotones, está dada por,

$$P(F|N_o) = \frac{N_0^{F/\gamma} e^{-N_0}}{(F/\gamma)!}, \tag{6.4}$$

donde la distribución de N_o está dada por la ecuación (6.3). Bajo estas suposiciones, el valor medio y la varianza de la fluorescencia reportada por píxel están dados por:

$$\begin{aligned} \langle F \rangle =& \gamma\left((q_1 - q_2)p + q_2\right)\langle N \rangle, \\ \sigma^2_F =& \gamma^2\left((q_1 - q_2)p + q_2 + (q_1^2 - q_2^2)p + q_2^2\right)\langle N \rangle. \end{aligned} \tag{6.5}$$

6.2 Experimentos en condiciones basales para cuantificar los parámetros del modelo de fluctuaciones

El método de [Piegari et al., 2014] consiste en suponer que las Ecs. (6.3) y (6.5) proveen una buena descripción de las fluctuaciones de la fluorescencia obtenida en tres tipos de experimentos de microscopía confocal realizados en células en "condiciones basales" y en el modo de "linescan". En el primero sólo se introduce el fluoróforo y se recoge la fluorescencia a lo largo de una línea de unos $10\mu m$ durante un tiempo del orden de algunos segundos utilizando una intensidad ("estándar") del láser fija. Se repite el experimento en distintas regiones de la misma célula y de otras células manteniendo la misma iluminación. La distribución de fluorescencia por píxel de las distintas imágenes corresponden a distintos valores de la variable N pero a los mismos valores de q_1, q_2 y γ. Se supone, por otro lado, que si hay variaciones en el valor de p en los distintos píxeles agrupados, las mismas no afectan notoriamente las fluctuaciones de F. En el segundo tipo de experimento se microinyecta la misma cantidad de fluoróforo y se toman imágenes de una región fija de la célula en el modo de "linescan" para distintas potencias del láser (es decir, intensidad de la iluminación). Se agrupan todos estos datos suponiendo que los valores de fluorescencia por píxel corresponden a distintos valores de las variables q_1 y q_2 (pero manteniendo q_2/q_1 fijo) y a los mismos valores de p, N y γ. Finalmente, en el tercer tipo de experimento se agrega Ca^{2+} en el citosol y se obtienen imágenes como en el primer tipo de experimentos. Se supone acá que las fluctuaciones pueden ser debidas a cambios en p y en N. Interpretando los gráficos de σ_F^2 vs $\langle F \rangle$ obtenidos para cada tipo de experimento en términos del modelo descripto en la Sección anterior y usando valores de q_2/q_1 de la literatura, en [Piegari et al., 2014] se determinan los valores de γ y q_1 (para las condiciones de iluminación estándar) y se estiman rangos de valores para p y $\langle N \rangle$ en condiciones basales.

Para evaluar la validez del modelo se analizan acá imágenes del citosol de ovocitos de *X. leavis* microinyectados con Fluo4 dextran de alta afinidad ($K_D \cong 800nM$) o con Rhod2 dextran ($K_D \cong 2000nM$) y con el buffer exógeno de Ca^{2+}, EGTA. Fluo4 y

Rhod2 son dos fluoróforos de Ca^{2+} de longitud de onda única con propiedades distintas. Los imágenes provienen de experimentos hechos para tres combinaciones distintas de indicador y EGTA como se indica en la tabla 6.1 y corresponden a líneas fijas en la zona cortical de los gránulos en el hemisferio animal de los ovocitos obtenidas con un objetivo de inmersión en aceite de 60× ($NA \sim 1{,}35$). Las líneas tienen un tamaño de 10,15mm y 250$pixeles$ y son escaneadas 3000 veces consecutivas, en un tiempo de 3,625ms por línea. Siguiendo la estrategia descrita en el párrafo anterior, en [Piegari et al., 2014] se analizan tres tipos de experimentos obteniendo las estimaciones de los parámetros del modelo que se muestran en la tabla 6.2 para las distintas combinaciones de fluoróforo y EGTA analizadas.

serie	indicador	$[\mu M]$	EGTA $[\mu M]$
i	Fluo4	36	90
ii	Rhod2	36	90
iii	Rhod2	90	45

Tabla 6.1: Diferentes combinaciones de concentración del indicador fluorescente y EGTA utilizadas en las imágenes analizadas.

Si bien el método supone que las condiciones que no se varían entre los distintos tipos de experimentos deben permanecer iguales en valor medio, lo cierto es que existe una gran variabilidad debido a varios factores que no es posible controlar. Por ejemplo, no todos los ovocitos poseen la misma concentración de calcio citosólico, inclusive ésta cambia entre regiones dentro del mismo ovocito. Por otro lado, los ovocitos se mueven haciendo que en ocasiones se pierda el foco del sistema de iluminación. En este Capítulo buscamos evaluar el impacto de estas variaciones sobre las estimaciones de parámetros que pueden obtenerse con el método de [Piegari et al., 2014]. Como ya mencionamos, estos parámetros fueron determinados en [Piegari et al., 2014] estudiando cómo variaban los valores medios de la fluorescencia y su varianza entre los distintos tipos de experimentos y no haciendo un análisis de las fluctuaciones de la fluorescencia en un mismo píxel a lo largo del tiempo. La distribución de la fluorescencia píxel a píxel contiene más información que el valor medio y la varianza. A continuación, se estudia

qué información es posible extraer de estas fluctuaciones usando el modelo descripto.

	i	ii	iii
q_1	0,45	0,36	0,36
$\frac{q_1}{q_2}$	0,025	0,07	0,07
γ	5	6	6
p	0,125	0,05	0,05
$\langle N \rangle^*$	$41-65$	$39-98$	$98-177$

Tabla 6.2: Parámetros estimados a partir del análisis de las imágenes de los diferentes experimentos realizados en [Piegari et al., 2014]. * $\langle N \rangle$ estimado a partir de considerar una concentración de calcio basal, $[Ca^{+2}] = 0{,}1\mu M$.

6.2.1 Experimentos en condiciones estándar cambiando de región en el ovocito

Se comienza analizando los experimentos realizados en condiciones estándar. Para ello se tomaron distintas imágenes y se hicieron histogramas de fluorescencia por píxel a partir de los datos de cada la imagen espacio-temporal adquirida (excluyendo previamente las zonas oscuras correspondientes a los gránulos). De acuerdo al modelo descrito, la distribución de fluorescencia está dada por la ecuación (6.4), la cual depende de 5 parámetros, q_1, q_2, p, γ y $\langle N \rangle$. Para obtener información de estos parámetros se ajustan los histogramas con la ecuación (6.4) usando el método de cuadrados mínimos no lineal, *lsqcurvefit* de MATLAB [MATLAB, 2010]. Si no se cuenta con información *a priori* de los valores de los parámetros, al realizar el ajuste se pueden obtener distintas combinaciones de éstos que llevan a resultados similares. Por ejemplo, se puede lograr un efecto similar sobre la distribución combinando un valor de q_1 grande con uno de p pequeño y viceversa. Lo mismo sucede al elegir N y q_1 o N y p. Es entonces necesario contar con cierta información previa de los valores de algunos par ámetros para orientar la búsqueda. Una posibilidad es usar información sobre las concentraciones y las constantes de reacción para tener estimaciones del número de moléculas $\langle N \rangle$ o la probabilidad de que el indicador esté ligado a Ca^{2+}, p. Esto en la práctica no es

posible, dado que la concentración de Ca^{2+} en ovocitos de *X. leavis* es muy variable. Lo que sí está fijo en este tipo de experimentos es la potencia de la iluminación y, por lo tanto, q_1 y q_2. Por otro lado, es de esperar que la amplificación del detector, γ, también esté fija. Usando las estimaciones de q_1, q_1/q_2 y γ que se muestran en la tabla 6.2 se realizaron ajustes de la distribución de fluorescencia por píxel obteniendo valores de p y de $\langle N \rangle$ para cada imagen. Se analizaron imágenes de experimentos realizados en las tres condiciones de la tabla 6.1, pero sólo se muestran los resultados correspondientes a la condición i dado que todos los casos fueron muy similares. En la figura 6.1 (a) se muestra el histograma de la distribución de fluorescencia junto con el ajuste del modelo para una región arbitraria de un ovocito cualquiera. En el cuadro (b) se muestra la distribución acumulada de los datos y del ajuste para este mismo ejemplo. Se puede observar que el modelo (6.4) ajusta muy bien la distribución de fluorescencia obtenida en este ejemplo. Los datos que se muestran y su respectivo ajuste son representativos de todo el conjunto de imágenes analizadas, independientemente de la condición i, ii o iii del experimento. Del ajuste de los datos se obtienen valores para p y $\langle N \rangle$. En el caso de los experimentos i se analizaron 25 imágenes. Los valores de p y $\langle N \rangle$ obtenidos se muestran en la figura (6.1) (c). Se puede observar una gran dispersión. Por ejemplo, los valores $\langle N \rangle$ varían entre $\sim 60 - 160$, aproximadamente el doble o triple de los valores estimados en [Piegari et al., 2014], correspondientes a considerar $[Ca^{2+}] = 0{,}1\mu M$ (ver Tabla 6.2). Los valores acá obtenidos están más cercanos a un calcio basal $[Ca^{2+}] = 0{,}2\mu M$. Por otro lado, los valores de p también muestran mucha dispersión, siendo en la mayoría de los casos muy cercanos a cero. Podemos suponer entonces que, como se describió en [Piegari et al., 2014], las variaciones en p no impactan demasiado en las fluctuaciones de fluorescencia observadas en los experimentos realizados en las condiciones i por lo que es difícil determinar p a partir de ellos.

Se probó luego ajustar p manteniendo $\langle N \rangle$ fijo y viceversa. En la figura 6.1 (d) se muestra un histograma de los valores de p obtenidos a partir del ajuste de las 25 imágenes anteriores tomando $\langle N \rangle = 50$ fijo. Se puede ver nuevamente que existe una gran dispersión entre los valores de p, aunque con valores razonables. De hecho, la distribución, si bien parece casi uniforme, muestra un máximo alrededor de $p \sim 0{,}125$.

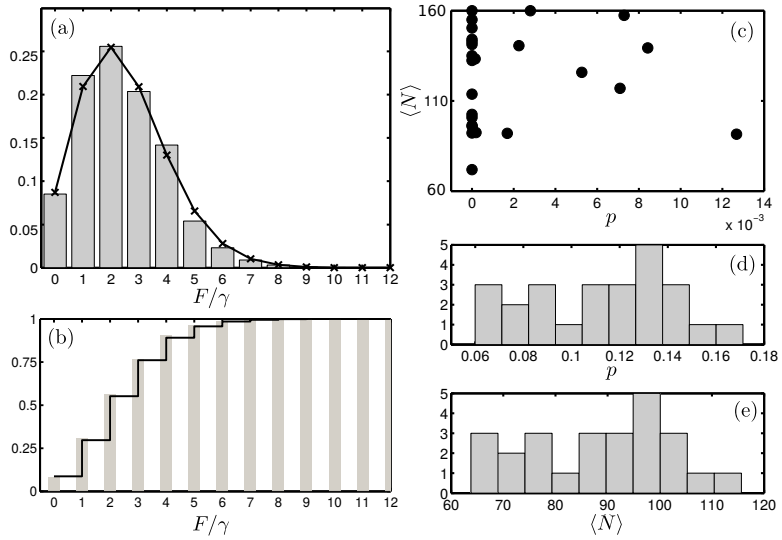

Figura 6.1: (a) Histograma normalizado de los valores de fluorescencia por píxel de una imagen de un experimento realizado en las condiciones i. La línea sólida muestra el ajuste de los datos usando la expresión (6.4), con parámetros de ajuste p y $\langle N \rangle$. (b) Distribuciones acumuladas de los datos (barras) y su ajuste (línea) mostrados en (a). (c) Valores obtenidos a partir del ajuste de 25 imágenes de experimentos realizados en las condiciones i, usando la expresión (6.4). (d) Histograma de valores de p del ajuste de las imágenes anteriores para $\langle N \rangle = 50$ dejando los parámetros restantes fijos. (e) Idem (d), pero se muestran los valores ajustados para el caso de $\langle N \rangle$, tomando $p = 0{,}125$.

De cualquier manera, la gran variabilidad de los valores de p se debe como se mencionó anteriormente a que existe poca sensibilidad de la fluorescencia a cambios en su valor. En la figura 6.1 (e) se muestra el histograma de valores de $\langle N \rangle$ obtenidos al ajustar los datos variando sólo $\langle N \rangle$, tomando $p = 0{,}125$ y los demás parámetros iguales a los de los ajustes previos. Se puede ver nuevamente que los valores de $\langle N \rangle$ presentan una gran dispersión y que son mayores a los estimados previamente. De cualquier manera, esta vez las variaciones son más acotadas, $\sim 65 - 115$, con una moda alrededor de $\sim 95 - 100$ moléculas.

6.2.2 Experimentos variando la potencia de iluminación

En estos experimentos se toman varias imágenes de la misma región de un mismo ovocito con distintas potencias de iluminación. Lo único que se supone que cambia entre imágenes son q_1 y q_2 manteniendo q_1/q_2 fijo. En la figura 6.2 (a) se puede ver cómo

cambian los valores, q_1, que se obtienen de ajustar las distribuciones obtenidas a partir de las imágenes usando la ecuación (6.4) suponiendo que todos los parámetros, salvo q_1 y q_2, son iguales en las distintas imágenes. Los valores de los parámetros fijos son los que se muestran en la tabla 6.2, con excepción de $\langle N \rangle$ que se estimó a partir del análisis de los experimentos que se muestra en la sección 6.2.1, (i) $\langle N \rangle = 90$, (ii) $\langle N \rangle = 100$ y (iii) $\langle N \rangle = 200$. Los símbolos $\square$ y $\circ$ representan datos de imágenes con el indicador Rhod2 en distintas concentraciones (ii) y (iii) respectivamente, mientras que $\triangleleft$ representa imágenes usando Fluo4, (i). Como es de esperar, los valores de q_1 aumentan a medida que la intensidad de iluminación también lo hace. Para los experimentos (i) y (iii) se aprecian dos regímenes que aparentan ser lineales, uno a bajas potencias y otro a altas. Al aumentar la potencia del láser en el rango de potencias menores la variación de q_1 es pequeña. Esto puede interpretarse suponiendo que en ese rango de iluminación el ruido proveniente del fondo tiene una incidencia significativa en la fluorescencia en cada píxel. Cuando la potencia de iluminación es lo suficientemente intensa, el efecto del ruido de fondo es despreciable y la intensidad de emisión de los indicadores cambia con una pendiente mayor con la potencia del láser. El análisis de la figura 6.2 (a) permite detectar, para las distintas condiciones experimentales, cuál es la potencia mínima necesaria para obtener el mayor rendimiento del indicador. Para ambos indicadores se observa que el mayor rendimiento se obtiene para potencias mayores a 12 %. Por otro lado, de la figura 6.2 se observa que los valores obtenidos de q_1 son similares para los experimentos realizados con diferentes concentraciones de Rhod2-EGTA (ii) y (iii). q_1 es independiente de la concentración del indicador fluorescente, y el hecho que el ajuste de su valor en ambos experimentos de valores similares es una validación del modelo.

6.2.3 Experimentos variando la concetración de Ca^{2+} citosólico

En el tercer tipo de experimentos del método introducido en [Piegari et al., 2014] se modifica la concentración de Ca^{2+} citosólico basal cuyo efecto es cambiar la fracción de indicador ligado a Ca^{2+}. En el modelo de fluctuaciones acá analizado esto implica un cambio en el parámetro p, mientras que los restantes parámetros no deberían verse afectados en relación a los experimentos hechos en condiciones “estándar”. Sí puede

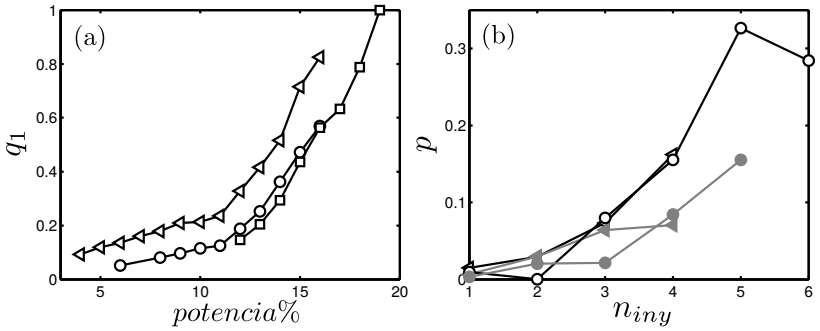

Figura 6.2: (a) Intensidad de emisión, q_1, en función de la potencia de iluminación (en porcentaje del máximo que da el láser) obtenida a partir de ajustar los datos experimentales usando las ecuaciones (6.1)–(6.4). Se muestran los resultados obtenidos a partir de analizar imágenes de experimentos realizados con distintas potencias de iluminación y: (i) $[F_4] = 36\mu M$, $[EGTA] = 90\mu M$ ($\triangleleft$); (ii) $[R_2] = 36\mu M$, $[EGTA] = 90\mu M$ ($\square$) y (iii) $[R_2] = 90\mu M$, $[EGTA] = 45\mu M$ ($\circ$). (b) Similar a (a) pero para la fracción de indicador ligada a Ca^{2+}, p, en función del número de micro-inyecciones de CaCl, n_{iny}l. Los datos corresponden a ajustes en imágenes de experimentos con distintas concentraciones de Ca^{2+} basal y: (i) $[F_4] = 36\mu M$ $[EGTA] = 90\mu M$ ($\triangleleft$ abiertos y rellenos color gris) y $(iiii)$ $[R_2] = 90\mu M$ $[EGTA] = 45\mu M$ ($\circ$ abiertos y rellenos color gris).

variar $\langle N \rangle$ ya que toma valores bastante distintos incluso entre distintas regiones de un mismo ovocito. Usando la ecuación (6.4) para ajustar la distribución de fluorescencia en este tipo de experimento esperamos poder determinar también configuraciones experimentales óptimas y comparar la eficiencia de diferentes indicadores.

Se analizan imágenes de ovocitos a los que se les modificó la concentración de calcio citosólico mediante micro-inyecciones de CaCl. Estos experimentos presentan algunas dificultades para ser analizados. Por un lado, no hay manera de saber con exactitud la concentración resultante de Ca^{2+} citosólico luego de las micro-inyecciones. Además, debido a la estructura interna del ovocito, es poco probable que el Ca^{2+} agregado se distribuya uniformemente dentro del mismo. Por otro lado, elevadas concentraciones de Ca^{2+} citosólico son tóxicas para el ovocito, por lo que la célula cuenta con diferentes mecanismos para eliminar rápidamente el Ca^{2+} de su interior. Finalmente, los ovocitos no soportan muchas micro-inyecciones antes de romperse, limitando la cantidad de cambios en la concentración que se pueden inducir. En la figura 6.2 (b) se muestra el resultado de ajustes realizados a partir de los experimentos mencionados. Se ajustó p

mientras que los parámetros restantes se dejaron fijos. Los valores de los parámetros fijos corresponden a los de la tabla 6.2 con excepción de $\langle N \rangle$, los cuales fueron los mismos que en los ajustes de la figura 6.2 (a). Se muestra la fracción de indicador ligada a calcio, p, en función del número de micro-inyecciones de CaCl, n_{iny} obtenida a partir de los ajustes para 4 experimentos, dos usando como indicador Fluo4 en la configuración (i), y dos usando el indicador Rhod2 en la configuracón (iii). Se puede ver, como es de esperar, que p aumenta con el número de micro-inyecciones, aunque no en todos los casos analizados lo hace por igual. Se observa que para experimentos realizados, teóricamente en las mismas condiciones, los resultados del ajuste pueden ser muy distintos. El caso de Rhod2 es el más destacado, donde se observa que en los dos experimentos, realizados en las mismas condiciones se llegan a obtener valores de p que difieren en más del doble. El caso de Fluo4 es similar, donde para $n_{iny} = 4$ también la diferencia entre los valores llega a casi el doble. En cuanto a cómo difiere la fracción de fluoróforo ligado a calcio dependiendo del experimento no se observa una tendencia definida. Si bien en un caso el Rhod2 muestra los mayores valores de p, en el segundo experimento realizado en las mismas condiciones, los valores de p son menores que para el Fluo4. La variabilidad de los ajustes obtenidos no permite sacar conclusiones sobre las condiciones experimentales óptimas ni comparar indicadores. Como se mencionó antes, estas diferencias se deben a las dificultades de controlar las condiciones en este tipo de experimentos. Por otro lado, el número de experimentos analizados es pequeño. Es necesario incorporar un mayor número de experimentos al análisis para que se vea una tendencia definida en los datos y obtener información valiosa.

7

Conclusiones

La interpretación de las observaciones de procesos *in vivo* mediante técnicas ópticas, en general, no es una tarea trivial. Por un lado, los procesos que tienen lugar en el interior celular son complejos, y por el otro, las técnicas ópticas sólo permiten observar en parte lo que ocurre. En el caso de la microscopía de fluorescencia, sólo se observa aquello que fue marcado fluorescentemente. Por lo tanto, para interpretar esas observaciones es necesario conocer qué ocurre con lo que no se puede ver. El marcado fluorescente, por otro lado, puede introducir escalas temporales adicionales no presentes en los procesos que se desean estudiar lo que modifica, a su vez, la distribución espacial de la fluorescencia en relación a la de las sustancias de interés. Por ejemplo, las proteínas expresadas con una cola fluorescente tienen que madurar para que puedan ser observadas mientras que los indicadores que ligan a las moléculas bajo estudio proveen observaciones indirectas que dependen de la dinámica del sistema indicador-

moléculas. Por otro lado, al modificar proteínas para que se vuelvan fluorescentes o al hacer que se peguen a otras sustancias para que se hagan visibles pueden perderse o alterarse algunas de sus propiedades funcionales. A lo largo de esta tesis se estudió, en forma teórica, cómo analizar algunos datos experimentales de observaciones *in vivo* para extraer información cuantitativa sobre parámetros biofísicos relevantes para los fenómenos observados. Fueron considerados sistemas en los cuales las moléculas de interés difunden e interactúan con otras especies. La difusión y las interaccciones entre especies (reacciones) son dos procesos fundamentales en la mayoría de los fenómenos que ocurren en el interior celular. En la tesis se consideraron esquemas de reacción sencillos que, a pesar de ello, brindan los elementos necesarios para interpretar situaciones más complejas. Por otro lado, en gran parte de la tesis, se hizo foco en la información que puede extraerse de las fluctuaciones de fluorescencia y en su modelado. Hay varios motivos por los cuales es de interés estudiarlas. Por un lado, a partir de su análisis es posible cuantificar parámetros biofísicos tales como tasas de transporte, de reacción o concentraciones, de relevancia para caracterizar los procesos que subyacen a las observaciones. Por otro lado, el modelado de las fluctuaciones permite estudiar los límites que impone la física a la precisión con que algunos procesos pueden ocurrir en el interior celular. Esto es de gran interés dado que, a pesar de que el interior celular es un ambiente ruidoso, muchos procesos ocurren con asombrosa precisión y reproducibilidad. El estudio de los tiempos característicos en los que se alcanza una dada precisión en la determinación de concentraciones por mecanismos celulares endógenos fue también motivo de estudio en esta tesis.

La primera parte de la tesis se centró en el estudio de la información cuantitativa que es posible extraer del análisis de las fluctuaciones de fluorescencia en sistemas de reacción-difusión. Se centró la atención en los distintos tiempos que caracterizan a este tipo de sistemas y en cómo determinan el comportamiento de las fluctuaciones e inciden sobre la información que puede ser obtenida a partir de su análisis. En los capítulos 2 y 3 se estudió la técnica de espectroscopía por correlación de fluorescencia (FCS). En FCS se miden las fluctuaciones en un pequeño volumen a partir de las cuales se calcula la función de auto-correlación (ACF) a partir de cuyo ajuste en

términos de un modelo es posible inferir coeficientes de difusión, tasas de reacción y concentraciones. En el caso estudiado de una reacción simple se mostró que existen dos regímenes, el de reacciones rápidas y el de difusión rápida, donde la ACF tiene una expresión analítica que es la suma de componentes de tipo difusivo y se estudió la transición entre ambos regímenes. En el límite de reacciones rápidas los coeficientes de difusión que aparecen en la expresión de la ACF son efectivos, es decir, dependen de las concentraciones de las especies y de las tasas de reacción. En el de difusión rápida, son los coeficientes de difusión de las especies libres. De esta manera, según el régimen en que se encuentre el sistema (el que depende de los los tiempos característicos de los procesos involucrados), se puede obtener distinta información. Desde el punto de vista experimental, no siempre es posible conocer *a priori* si el sistema en estudio se encuentra en algunos de estos regímenes, por lo que la interpretación de los parámetros que se obtienen de un ajuste de los datos experimentales no es clara. Es de utilidad entonces contar con herramientas que permitan determinar qué tipo de coeficientes son los que se están infiriendo en un dado experimento. El estudio de la transición de un límite al otro sugirió estrategias experimentales para abordar este problema. En particular, se mostró de qué modo cambia la ACF al variar algunos parámetros que pueden ser controlados experimentalmente, como la concentración de las moléculas marcadas o el volumen de iluminación. Al cambiar la concentración de las moléculas marcadas los coeficientes de difusión deberían variar si se tratara de coeficientes efectivos mientras que deberían permanecer constantes si fueran coeficientes libres. Algo similar debería suceder al cambiar el volumen de observación lo que podría ser más sencillo de implementar dentro de ciertos límites: achicar el volumen de observación puede implicar la necesidad de cambiar el sistema óptico y agrandar el volumen disminuye el tamaño de las fluctuaciones lo que hace más difícil su análisis. Los resultados de este estudio fueron publicados en [Ipiña and Dawson, 2013].

En el capítulo 3 se continuó estudiando la técnica FCS para un sistema similar al anterior, con la diferencia de que se hizo foco en la información que es posible extraer a partir de los pesos de la ACF y de sus componentes. En particular, se comparó el caso en que las moléculas marcadas interactúan con sitios móviles con el caso en

que lo hacen con sitios inmóviles. En este último caso, la distribución que siguen el número de sitios libres y ocupados es una binomial, mientras que ambos números siguen una distribución de Poisson si los sitios difunden, independientemente del coeficiente con que lo hagan. Esto implica que el peso de la ACF, que depende de la varianza de las moléculas fluorescentes, es distinto si los sitios difunden o no. Por lo tanto, la información que se determina a partir de éste también es distinta. Del peso de la ACF se puede determinar la concentración de moléculas fluorescentes dentro del volumen de observación, pero su correcta estimación a partir del peso implica conocer si las trampas son móviles o inmóviles, algo que no siempre se conoce. Algo similar sucede cuando el volumen en el cual las diferentes moléculas pueden difundir no es mucho más grande al volumen de observación donde se recolecta la fluorescencia. En ese caso, el número de moléculas que se encuentran dentro y fuera del volumen de observación para cada especie sigue una distribución binomial. Nuevamente, esto modifica el peso de la ACF, lo que debe tenerse en cuenta para hacer una correcta estimación de la concentración. Por otro lado, cuando los sitios son inmóviles, el tiempo característico debido a la difusión de los sitios desaparece y el peso de la componente de la ACF asociada a éste se hace cero. Hay una diferencia finita entre la ACF que se obtiene en uno u otro caso, es decir, el límite de difusión nula es singular. Se estudió entonces cómo cambiaba el peso de la ACF a medida que el coeficiente de difusión se hacía más lento. Se encontró que, dependiendo del tiempo de observación durante el cual es recolectada la fluorescencia, el peso de la ACF converge a diferentes valores. Cuando los sitios se mueven muy lentamente, dependiendo de la relación entre el tiempo de observación y los tiempos característicos de difusión, es posible converger en una primera instancia a un peso de la ACF como si los sitios fueran inmóviles. Cuando se deja transcurrir el tiempo suficiente, el peso terminará convirgiendo a su valor correspondiente. De estos resultados se desprende que, dependiendo del tiempo de observación, podrían obtenerse distintas ACF. Se estudió entonces la precisión de las estimaciones de parámetros a partir de la ACF en función del tiempo de observación. Se derivaron expresiones para la precisión de los pesos de la ACF que dependen de los distintos tiempos de corelación del sistema y del tiempo de observación. A partir de estas expresiones se concluyó

que para estimar la concentración con un error relativo α el tiempo de observación es proporcional al tiempo de correlación más lento e inversamente proporcional a α^2. Por lo tanto, es necesario un tiempo de observación muchas veces mayor a los de correlación para poder inferir concentraciones con bajo error. Los resultados de este estudio fueron publicados en [Ipiña and Dawson, 2014].

Motivados en los resultados previos, junto con las observaciones de la respuesta precisa a cambios de concentración de Bicoid en embriones de *D. melanogaster*, surgió la pregunta de cuánto tiempo le toma a una célula "medir" concentraciones con cierta precisión. En particular, se estudió este problema para mecanismos de "lectura" que involucran la ligadura a receptores o sitios de las moléculas cuya concentración es "leída". En este caso la concentración determina el estado promedio de ocupación de los receptores a lo largo del tiempo. En el trabajo clásico de Berg & Purcell estudian este problema para el caso de un receptor único y encuentran una expresión para el límite fundamental a la precisión con la cual dicho receptor mide la concentración de su ligando. El resultado original de Berg & Purcell fue revisitado en trabajos más recientes teniendo en cuenta otros aspectos no considerados. En todos estos trabajos se derivan expresiones para el error relativo en la concentración que son válidas para tiempos de observación mucho mayores a los tiempos de correlación del sistema. En esta tesis se derivaron expresiones válidas para todo tiempo de observación. Estas expresiones evidencian el rol de los diferentes tiempos de correlación y muestran que las expresiones asintóticas de Berg & Purcell y sus revisiones pueden llevar a sobrestimaciones del error en algunas ocasiones. Por otro lado se incorporó un nuevo aspecto que no había sido tenido en cuenta en los trabajos previos: las fluctuaciones en el número medio de receptores ocupados debidas a las fluctuaciones en la llegada de moléculas de ligandos. La incorporación de este aspecto permitió entender la reducción observada en embriones de *Drosophila melanogaster* entre las fluctuaciones en la producción instantánea de mRNA y las de la proteína correspondiente acumulada a lo largo del tiempo. Por otro lado, el análisis de las fluctuaciones en el número de moléculas de las especies involucradas en nuestro sistema, del cual se derivaron nuestras expresiones, permitió también hacer una estimación de la distribución de tiempos de espera entre eventos de ligadura consecutivos.

Se encontró que esta distribución permite interpretar observaciones experimentales de la actividad de enzimas a nivel de molécula única. La expresión derivada, explica los cambios en el la forma funcional de la distribución observados a partir de cambios en los tiempos de correlación del sistema sustrato-enzima, a diferencia de otras explicaciones propuestas como la existencia de numerosos estados conformacionales distintos de la enzima. Los resultados de estos estudios están contenidos en [Ipiña and Dawson, 2015b].

El caso de la proteína Bicoid es un claro ejemplo de la dificultad de cuantificar parámetros biofísicos y bioquímicos a través observaciones *in vivo*. El sistema Bcd en embriones de *D. melanogaster* fue estudiado mediante microscopía de fluorescencia usando la proteína fluorescente Bcd-eGFP. Estas observaciones no permiten diferenciar si la proteína difunde libremente o interactúa con otras especies, dos situaciones que requieren de un análisis diferente si se desea hacer una correcta estimación de parámetros o determinar la mecánica por la que el gradiente de la proteína se conforma. En muchos trabajos las observaciones fueron interpretadas bajo el marco del modelo de síntesis, difusión y degradación (*SDD*), el cual no logró explicar cuantitativamente las características observadas del gradiente. Por otro lado, estimaciones del coeficiente de difusión del Bcd, mediante las ténicas FCS y FRAP, resultaron ser muy dispares entre sí. Las diferencias entre las estimaciones de ambas técnicas fueron reconciliadas suponiendo que el Bcd interactúa con sitios inmóviles o que difunden lentamente. En el capítulo 5 se propuso y estudió una extensión del modelo *SDD* al que se llamó *SDID*, dado que incorpora la *interacción* de Bcd con sitios de ligadura. Con este modelo se pudieron recrear las propiedades observadas del gradiente usando estimaciones de los parámetros del sistema extraidas del trabajo que re-interpreta las observaciones de experimentos de FCS y FRAP considerando la interacción con sitios. Se encontró que las escalas temporales y espaciales del gradiente están determinadas por coeficientes efectivos de difusión que dependen de las concentraciones de las distintas especies involucradas. De esta manera, bajo el modelo propuesto, se reconcilian las diferentes estimaciones de parámetros y predicciones realizadas a partir de las observaciones experimentales. Por otro lado, el modelo permite reinterpretar la relación entre el Bcd y la proteína Hunchback (Hb). Se encontró que, de existir trampas, el hecho de usar

proteínas fluorescentes y no ser capaces de diferenciar entre la proteína libre y la ligada a sitios de ligadura, puede llevar a una sobrestimación de la relación de cooperación entre el Bcd y Hb. Los resultados de estos estudios están contenidos en [Ipiña and Dawson, 2015a].

Finalmente en el capítulo 6 se volvieron a estudiar fluctuaciones de fluorescencia, pero en este caso, cuando se usan indicadores fluorescentes de longitud de onda única para observar señales de Ca^{2+}. Estos fluoróforos son tales que aumentan la intensidad de la fluorescencia al tener Ca^{2+} ligado por lo que las señales observadas dependen de la cinética de su interacción con el Ca^{2+}. Para poder comparar imágenes de señales obtenidas con distintos indicadores y en concentraciones diversas se introdujo en [Piegari et al., 2014] un método que permite estimar la relación-señal ruido esperada. Este método incluye la realización de varios experimentos de calibración en condiciones basales, su interpretación en términos de un modelo para las fluctuaciones observadas y el subsiguiente ajuste de los parámetros del modelo. Una vez estimados dichos parámetros el modelo puede usarse para generar imágenes numéricas de señales con ruido realista. En el capítulo 6 se analizó el modelo en detalle. Se encontró que el mismo describe adecuadamente la distribución de fluorescencia por píxel obtenida en los distintos experimentos basales, aunque no siempre para un conjunto unívoco de parámetros. Por otro lado, se mostró de qué modo el análisis de la serie de experimentos donde alguno de estos parámetros varía mientras los demás permanecen constantes permite determinar configuraciones experimentales óptimas. El modelo de fluctuaciones acá analizado podría también utilizarse para detectar pequeñas liberaciones de Ca^{2+} distinguiéndolas de otras fuentes de fluctuación de fluorescencia. Para tal fin deberían analizarse las fluctuaciones en cada píxel identificando aquéllas que se apartan de las fluctuaciones típicas. Explorar esta aplicación queda pendiente para el futuro.

A

Cálculos auxiliares de la ACF para un sistema con moléculas marcadas y sin marcar que interactúan con trampas

Para calcular la función de autocorrelación del sistema estudiado en el capítulo 3, representado por el esquema de reacción (3.1), se sigue el procedimiento de Krichevsky [Krichevsky and Bonnet, 2002]. De acuerdo a las leyes de Fick (1.9) y de

acción de masas (1.11), las ecuaciones de reacción-difusión para el sistema se expresan:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial c_f^t}{\partial t} &= D_f \nabla^2 c_f^t - k_{on} c_f^t c_S + k_{off} c_b^t, \\
\frac{\partial c_b^t}{\partial t} &= D_S \nabla^2 c_b^t + k_{on} c_f^t c_S - k_{off} c_b^t, \\
\frac{\partial c_f^u}{\partial t} &= D_f \nabla^2 c_f^u - k_{on} c_f^u c_S + k_{off} c_b^u, \\
\frac{\partial c_b^u}{\partial t} &= D_S \nabla^2 c_b^u + k_{on} c_f^u c_S - k_{off} c_b^u, \\
\frac{\partial c_S}{\partial t} &= D_S \nabla^2 c_S - k_{on} c_f c_S + k_{off} c_b,
\end{aligned} \tag{A.1}$$

donde c_S es la densidad de moléculas (o concentración) de los sitios de ligadura libres, y $c_f = c_f^t + c_f^u$ y $c_b = c_b^t + c_b^u$ son las concentraciones totales de las moléculas libres y ligadas respectivamente. Luego las ecuaciones (A.1) se linealizan alrededor del equilibrio, $c_{f,eq}^{u,t} \equiv [P_f^{u,t}]$, $c_{b,eq}^{u,t} \equiv [P_b^{u,t}]$, $c_{S,eq} \equiv [S]$, que satisface $[P_f^t][S] = K_D[P_b^t]$, $[P_f^u][S] = K_D[P_b^u]$ y finalmente la ACF se puede escribir como:

$$G(\tau) = \frac{\int d^3\vec{r} d^3\vec{r'} I(\vec{r}) I(\vec{r'}) \sum_{i,j} q_i q_j \langle \delta c_i(\vec{r}, 0) \delta c_j(\vec{r'}, \tau) \rangle}{\left(q V_{obs}([P_f^t] + [P_b^t])\right)^2}. \tag{A.2}$$

Se usa la notación, δc_i, para identificar la variación de la concetración con respecto al valor de equilibrio de la especie i-esima, mientras que q_i es la eficiencia de la fluorescencia de cada especie y $V_{obs} = \frac{\int d^3\vec{r} I(\vec{r})}{I(0)}$. Para hallar la evolución de las concentraciones se pasa al espacio de Fourier. El sistema transformado se expresa como $\dot{C}_\xi = M_\xi C_\xi$, con C_ξ el vector columna con las variaciones de concentración respecto del equilibrio en el espacio de Fourier, $\vec{\xi}$ la variable conjugada de la posición $\vec{r}$ y M_ξ dada por:

$$M_\xi = \begin{bmatrix}
-D_f\xi^2 - k_{on}[S] & k_{off} & -k_{on}[P_f^t] & 0 & 0 \\
k_{on}[S] & -D_s\xi^2 - k_{off} & k_{on}[P_f^t] & 0 & 0 \\
-k_{on}[S] & k_{off} & -D_s\xi^2 - k_{on}[P_f^t] - k_{on}[P_f^u] & -k_{on}[S] & k_{off} \\
0 & 0 & -k_{on}[P_f^u] & -D_f\xi^2 - k_{on}[S] & k_{off} \\
0 & 0 & k_{on}[P_f^u] & k_{on}[S] & -D_s\xi^2 - k_{off}.
\end{bmatrix} \tag{A.3}$$

Finalmente se obtienen los autovectores y autovalores del sistema:

$$\begin{aligned}
\lambda_1 &= -\,D_s\xi^2,\\
\lambda_2 &= -\,\frac{1}{2}\left(k_{off} + k_{on}([S] + [P_f]_T) + (D_f + D_s)\xi^2 + \sqrt{\eta_1}\right),\\
\lambda_3 &= -\,\frac{1}{2}\left(k_{off} + k_{on}([S] + [P_f]_T) + (D_f + D_s)\xi^2 - \sqrt{\eta_1}\right),\\
\lambda_4 &= -\,\frac{1}{2}\left(k_{off} + k_{on}[S] + (D_f + D_s)\xi^2 + \sqrt{\eta_2}\right),\\
\lambda_5 &= -\,\frac{1}{2}\left(k_{off} + k_{on}[S] + (D_f + D_s)\xi^2 - \sqrt{\eta_2}\right),
\end{aligned} \tag{A.4}$$

donde $\eta_1 = (k_{off} + k_{on}([S] + [P_f]_T))^2 + 2(D_f - D_s)\xi^2(k_{on}[S] - k_{on}[P_f]_T - k_{off}) + (D_f - D_s)^2\xi^4$, $\eta_2 = (k_{off} + k_{on}[S])^2 + 2(D_f - D_s)\xi^2(k_{on}[S] - k_{off}) + (D_f - D_s)^2\xi^4$ and $[P_f]_T = [P_f^t] + [P_f^u]$. La matriz de autovectores es:

$$X = \begin{bmatrix}
0 & \frac{[P_f^t]}{[P_f^u]}\frac{\phi_2}{k_{on}[S]} & \frac{[P_f^t]}{[P_f^u]}\frac{\phi_3}{k_{on}[S]} & -\frac{\phi_4}{k_{on}[S]} & -\frac{\phi_5}{k_{on}[S]}\\
\frac{[P_f^t]}{[P_f^u]} & \frac{[P_f^t]}{[P_f^u]} & \frac{[P_f^t]}{[P_f^u]} & -1 & -1\\
\frac{K_D}{[P_f^u]} & -\frac{[P_f]_T}{[P_f^u]} & -\frac{[P_f]_T}{[P_f^u]} & 0 & 0\\
0 & \frac{\phi_2}{k_{on}[S]} & \frac{\phi_3}{k_{on}[S]} & \frac{\phi_4}{k_{on}[S]} & \frac{\phi_5}{k_{on}[S]}\\
1 & 1 & 1 & 1 & 1
\end{bmatrix} \tag{A.5}$$

siendo $\phi_2 = \lambda_2 + k_{off} + k_{on}[P_f]_T$, $\phi_3 = \lambda_3 + k_{off} + k_{on}[P_f]_T$, $\phi_3 - \phi_2 = \sqrt{\eta_1}$, $\phi_4 = \lambda_4 + k_{off}$, $\phi_5 = \lambda_5 + k_{off}$ and $\phi_5 - \phi_4 = \sqrt{\eta_2}$. Cada componente, i, del vector, $C_\xi(t)$, puede escribirse como $(C_\xi(t))_i = \sum_{j,\ell} X_{ij}(X^{-1})_{j\ell}(C_\xi(0))_\ell \exp(\lambda_j t)$.

B

Simulaciones numéricas

Para validar los resultados obtenidos a lo largo de los capítulos 2 3 y 4, se realizaron simulaciones numéricas estocásticas. En el capítulo 5 se resolvió un sistema de ecuaciones de reacción-difusión usando un método numérico determinista. A continuación se describen los métodos utilizados.

B.1 Simulaciones estocásticas

El modelo estocástico fue usado para simular un sistema de moléculas o partículas de diferentes especies que difunden e interactúan entre sí. El algoritmo implementado se basó en el método de Monte Carlo. Básicamente se modelan dos procesos, la difusión y las reacciones entre especies. La difusión se simula como una caminata al azar sobre una grilla 3D con condiciones de borde reflectoras, mientras que las reacciones se

realizan entre moléculas que se encuentran dentro de un mismo sitio de grilla siguiendo distribuciones de probabilidad dadas por el esquema de reacción. Este método para simular la difusión y las reacciones sobre la grilla sólo es válido si el tamaño de grilla es lo suficientemente grande. Para evaluar que el método funcionaba correctamente se simularon casos típicos de referencia como prueba. A continuación se detalla el algoritmo:

- Se define una grilla de N^3 elementos, sobre un volumen cúbico de L^3. El volumen de grilla se define como dr^3, siendo $dr = \frac{L}{N}$.

- Se distribuyen las partículas sobre los puntos de la grilla con probabilidad uniforme. El numero de partículas dentro de todo el volumen es tal que se cumple la condición de equilibrio.

- Comienza la simulación dando pasos de tiempo constantes. El paso de tiempo de la simulación se define por el proceso más rápido $dt = \frac{dr^2}{6D_{max}}$.

- El algoritmo realiza por separado los procesos de difusión y los de reacción. Primero se avanza un paso del paseo al azar de todas las partícula para lo que se sortea con probabilidad $p = 1/6$ a cuál de los primeros sitios vecinos va a difundir cada una de ellas.

- Luego se realizan las reacciones entre las especies dentro de cada sitio de grilla.

    - Para determinar qué partículas van a reaccionar se computa el número de posibles pares de reacción para cada par de especies que reaccionan entre sí. Como cada par tiene la misma probabilidad de unión, dada por $p_{on} = \frac{k_{on}dt}{dr^3}$, el número de pares que van a reaccionar está dado por una distribución binomial. En caso de que las especies interactúen con más de otra especie la distribución es multinomial. A partir de esa distribución se determina el número de pares que reaccionan.

    - El otro sentido de la reacción es más sencillo. Se determina si las partículas ligadas se van a separar con probabilidad dada por $p_{off} = k_{off}dt$.

- Luego, según el caso, se guarda la fluorescencia o el número de partículas de cada especie, dentro del volumen de observación.
- Se avanza un tiempo dt.

Se consideran dos volúmenes de observación que representan dos situaciones diferentes.

Volumen gaussiano

En el caso de las simulaciones de experimentos de FCS, dado que se desea recrear las observaciones realizadas mediante un microscopio confocal, se considera un volumen de observación gaussiano que es una aproximación válida en este caso. La función utilizada está dada por $I(\vec{r}) = \exp\left(-\frac{x^2}{4w_r^2} - \frac{y^2}{4w_r^2} - \frac{z^2}{4w_z^2}\right)$. De esta manera, si todas las moléculas fluorescentes lo son con igual intensidad, la fluorescencia $F(t)$ se calcula como

$$F(t) = I_o \sum_{i}^{N^t} I(\vec{r}_i), \tag{B.1}$$

donde N^t es el número de partículas fluorescentes, $\vec{r}_i$ es el vector posición de cada partícula respecto del centro de la gaussiana e I_o es un factor de normalización que se puede incorporar a la definición de I.

Volumen cúbico

Este caso representa una situación ideal donde se pueden contar las moléculas individualmente dentro de un volumen arbitrario. Por simplicidad se eligió un volumen cúbico centrado en el volumen de la simulación. En estas simulaciones se guarda el número de partículas de cada especie dentro del volumen cúbico.

B.2 Simulaciones deterministas usando diferencias finitas

En el capítulo 5 se modela la difusión de la proteína Bicoid (Bcd) dentro de embriones de *Drosophila melanogaster*, mientras es degradada e interactúa con sitios de ligadura.

La dinámica del Bcd está descripta por un sistema de ecuaciones de reacción-difusión. Se integró el sistema de ecuaciones usando diferencias finitas. Se modeló el embrión como un cilindro de largo $L = 500\mu m$, por lo que las ecuaciones fueron integradas en una sola dimensión, a lo largo de la dirección axial que representa el eje antero-posterior, con condiciones de borde de flujo cero.

La integración numérica del sistema tiene el inconveniente de que las ecuaciones de reacción-difusión son no lineales y están acopladas. Una manera de resolver este tipo de sistemas es usar métodos implícitos que actualicen secuencialmente las diferentes variables a pasos de la mitad de tiempo. El método implícito de reacción alterna de Douglas-Ratchford [Douglas and Rachford, 1956] posee esta característica. A modo de ejemplo, se consideran acá dos especies, A y B, que difunden e interactúan entre sí. Las ecuaciones que describen la concentración de cada especies son:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [A](z,t)}{\partial t} &= D_A \nabla^2 [A](z,t) + H_A\left([A](z,t), [B](z,t)\right), \\ \frac{\partial [B](z,t)}{\partial t} &= D_B \nabla^2 [B](z,t) + H_B\left([B](z,t), [A](z,t)\right), \end{aligned} \tag{B.2}$$

donde D_A y D_B son los coeficientes de difusión de cada especie respectivamente, y H_A y H_B las funciones que tienen en cuenta las interacciones entre las especies, fuentes y otros términos. Claramente las ecuaciones representan un caso genérico de las ecuaciones de reacción-difusión estudiadas en el Capítulo 5. El método de Douglas-Ratchford consiste en integrar las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \left(1 - \frac{\delta_z}{2}\right)[A]^{n+1} &= \left(1 + \frac{\delta_z}{2}\right)[A]^n + \frac{\Delta t}{2}\left(H_A\left([A]^{n+1}, [B]^{n+1/2}\right) + H_A\left([A]^n, [B]^{n+1/2}\right)\right) \\ \left(1 - \frac{\delta_z}{2}\right)[B]^{n+1/2} &= \left(1 + \frac{\delta_z}{2}\right)[B]^{n-1/2} + \frac{\Delta t}{2}\left(H_B\left([B]^{n+1/2}, [A]^n\right) + H_B\left([B]^{n-1/2}, [A]^n\right)\right) \end{aligned} \tag{B.3}$$

donde δ_z es un operador tal que $\delta_z[x]^n = D_x \frac{\Delta t}{\Delta z^2}\left([x]^n_{j+1} - 2[x]^n_j + [x]^n_{j-1}\right)$, siendo Δ_t y Δ_z la discretización del tiempo y el espacio respectivamente, $[x]^n_j$ el valor de concentración de la especie x a tiempo $t = n\Delta t$ y posición $z = j\Delta z$, y D_x el coeficiente de difusión de esa especie.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer especialmente a Silvina. Por darme la oportunidad de hacer el doctorado bajo su dirección, por guiarme y enseñarme con su ejemplo. Por incentivarme y permitirme participar de numerosas reuniones y conferencias científicas. Por su paciencia y constante buena predisposición cada vez que hizo falta.

También agradezco a mis compañeras de oficina, Lucia, Estefi y Cecilia Viviana Villarroel. Especialmente a Ceci con quien compartí la mayor parte del tiempo en la oficina, y quien se tomó el trabajo de leer y releer esta tesis. A Lorena, compañera de oficina durante mi primer año de doctorado y de quien aprendí mucho.

Al departamento de Física de la Universidad de Buenos Aires donde fue realizado este trabajo. En particular a quienes apoyan y fomentan la ciencia interdisciplinaria. A los organizadores de la escuela J. J. Giambiagi de 2013 y del programa de profesores visitantes, gracias a ellos tuve la posibilidad de presenciar cursos de profesores e investigadores de primer nivel. También al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento y el apoyo a las diversas áreas de la ciencia.

Al departamento de Física de la Universidad Católica Argentina, por darme la oportunidad de ejercer y crecer como docente. También por el apoyo que me brindaron durantes estos últimos. En especial a Jorge Clot, Eduardo Heredia, Agustina Portu y Cecilia Cattorini.

Por último, a mis amigos y a mi familia por su constante e incondicional apoyo. Gracias.

Bibliografía

[Abu-Arish et al., 2010] Abu-Arish, A., Porcher, A., Czerwonka, A., Dostatni, N., and Fradin, C. (2010). High mobility of bicoid captured by fluorescence correlation spectroscopy: Implication for the rapid establishment of its gradient. *Biophysical Journal*, 99(4):L33–L35.

[Agmon and Szabo, 1990] Agmon, N. and Szabo, A. (1990). Theory of reversible diffusion-influenced reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 92(9):5270–5284.

[Alberts et al., 2014] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 6th edition.

[Allbritton et al., 1992] Allbritton, N., Meyer, T., and Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, 258:1812–1815.

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

[Berg and Purcell, 1977] Berg, H. and Purcell, E. (1977). Physics of chemoreception. *Biophysical Journal*, 20(2):193 – 219.

[Berg, 1993] Berg, H. C. (1993). *Random Walks in Biology*. Princeton University Press.

[Bergmann et al., 2007] Bergmann, S., Sandler, O., Sberro, H., Shnider, S., Schejter, E., Shilo, B.-Z., and Barkai, N. (2007). Pre-steady-state decoding of the bicoid morphogen gradient. *PLoS Biol*, 5(2):e46.

[Berridge et al., 1998] Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium - a life and death signal. *Nature*, 395:645–648.

[Bialek and Setayeshgar, 2005] Bialek, W. and Setayeshgar, S. (2005). Physical limits to biochemical signaling. *Proc Natl Acad Sci (USA) of the United States of America*, 102(29):10040–10045.

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

[Busa et al., 1985] Busa, W. B., Ferguson, J. E., Joseph, S. K., Williamson, J. R., and Nuccitelli, R. (1985). Activation of frog (xenopus laevis) eggs by inositol trisphosphate. i. characterization of ca2+ release from intracellular stores. *The Journal of Cell Biology*, 101(2):677–682.

[Callamaras et al., 1998] Callamaras, N., Marchant, J. S., Sun, X.-P., and Parker, I. (1998). Activation and co-ordination of insp_3-mediated elementary ca^{2+} events during global ca^{2+} signals in *xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 509(1):81–91.

[Charier et al., 2005] Charier, S., Meglio, A., Alcor, D., Cogné-Laage, E., Allemand, J., Jullien, L., and Lemarchand, A. (2005). Reactant concentrations from fluorescence correlation spectroscopy with tailored fluorescent probes. an example of local calibration-free ph measurement. *J. Chem Soc. A*, 127:15491–15505.

[Choe and Ehrlich, 2006] Choe, C.-u. and Ehrlich, B. E. (2006). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (ip3r) and its regulators: Sometimes good and sometimes bad teamwork. *Science Signaling*, 2006(363):re15–re15.

[Crank et al., 1975] Crank, J. et al. (1975). *The mathematics of diffusion*, volume 2. Clarendon press Oxford.

[Crick, 1970] Crick, F. (1970). Diffusion in Etibryogenesis. *Nature*, 225:421.

[Digman et al., 2008] Digman, M. A., Dalal, R., Horwitz, A. F., and Gratton, E. (2008). Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophysical journal*, 94(6):2320–2332.

[Douglas and Rachford, 1956] Douglas, J. and Rachford, H. H. (1956). On the numerical solution of heat conduction problems in two and three space variables. *Transactions of the American mathematical Society*, pages 421–439.

[Driever and Nusslein-Volhard, 1989] Driever, W. and Nusslein-Volhard, C. (1989). The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early drosophila embryo. *Nature*, 337:138–143.

[Driever and Nussleinvolhard, 1988] Driever, W. and Nussleinvolhard, C. (1988). Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient. *Cell*, 54(1):83–93.

[Drocco et al., 2011] Drocco, J. A., Grimm, O., Tank, D. W., and Wieschaus, E. (2011). Measurement and perturbation of morphogen lifetime: effects on gradient shape. *Biophysical journal*, 101(8):1807–1815.

[Duffy et al., 2001] Duffy, A., Sneyd, J., and Dale, P. (2001). Traveling waves in buffered systems: Applications to calcium waves. *SIAM J on Appl Math*, 58(4):1178–1192.

[Duffy et al., 1998] Duffy, A., Sneyd, J., and Dale, P. D. (1998). Traveling waves in buffered systems: applications to calcium waves. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 58(4):1178–1192.

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

[English et al., 2006] English, B. P., Min, W., van Oijen, A. M., Lee, K. T., Luo, G., Sun, H., Cherayil, B. J., Kou, S. C., and Xie, X. S. (2006). Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-menten equation revisited. *Nat Chem Biol*, 2(3):87 – 94.

[Foskett et al., 2007] Foskett, J. K., White, C., Cheung, K.-H., and Mak, D.-O. D. (2007). Inositol trisphosphate receptor ca2+ release channels. 87(2):593–658.

[Gregor et al., 2007a] Gregor, T., Wieschaus, E. F., McGregor, A. P., Bialek, W., and Tank, D. W. (2007a). Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient. *Cell*, 130(1):141–152.

[Gregor et al., 2007b] Gregor, T., T., D.W., W., and E.F., Bialek, W. (2007b). Probing the limits to positional information. *Cell*, 130(1):153–164.

[Grimm et al., 2010] Grimm, O., Coppey, M., and Wieschaus, E. (2010). Modelling the bicoid gradient. *Development*, 137(14):2253–2264.

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

[Hecht et al., 2009] Hecht, I., Rappel, W.-J., and Levine, H. (2009). Determining the scale of the bicoid morphogen gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6):1710–1715.

[Houchmandzadeh et al., 2002] Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E., and Leibler, S. (2002). Establishment of developmental precision and proportions in the early Drosophila embryo. *Nature*, 415(6873):798–802.

[I. Bezprozvanny and Erlich, 1991] I. Bezprozvanny, J. W. and Erlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of lns(l,4,5)p3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351:751–754.

[Iizuka et al., 2011] Iizuka, R., Yamagishi-Shirasaki, M., and Funatsu, T. (2011). Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Analytical biochemistry*, 414(2):173–178.

[Ipiña and Dawson, 2013] Ipiña, E. P. and Dawson, S. P. (2013). From free to effective diffusion coefficients in fluorescence correlation spectroscopy experiments. *Phys. Rev. E*, 87:022706.

[Ipiña and Dawson, 2014] Ipiña, E. P. and Dawson, S. P. (2014). How Long Should a System Be Observed to Obtain Reliable Concentration Estimates from the Measurement of Fluctuations? *Biophysical Journal*, 107(11):2674–2683.

[Ipiña and Dawson, 2015a] Ipiña, E. P. and Dawson, S. P. (2015a). The effect of reactions on the formation and readout of the of the morphogen bicoid gradient. *En preparación.*

[Ipiña and Dawson, 2015b] Ipiña, E. P. and Dawson, S. P. (2015b). Fluctuations, correlations and the estimation of concentrations inside cells. *En preparación.*

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

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

[Kaizu et al., 2014] Kaizu, K., de Ronde, W., Paijmans, J., Takahashi, K., Tostevin, F., and ten Wolde, P. R. (2014). The berg-purcell limit revisited. *Biophysical journal*, 106(4):976–985.

[Keener and Sneyd, 1998] Keener, J. and Sneyd, J. (1998). *Mathematical Physiology.* Interdisciplinary applied mathematics. Springer.

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

[Kou et al., 2005] Kou, S., Cherayil, B. J., Min, W., English, B. P., and Xie, X. S. (2005). Single-molecule michaelis-menten equations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(41):19068–19081.

[Krichevsky and Bonnet, 2002] Krichevsky, O. and Bonnet, G. (2002). Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics*, 65(2):251.

[Lacalli, 1991] Lacalli, T.C., H. L. (1991). From gradients to segments: models for pattern formation in early drosophila embryogenesis. *Semin. Dev. Biol.*, 2:107–117.

[Lakowicz, 2006] Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy.* Springer Science & Business Media, 3rd edition.

[Lechleiter and Clapham, 1992] Lechleiter, J. D. and Clapham, D. E. (1992). Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in x. laevis oocytes. *Cell*, 69:283–294.

[Little et al., 2013] Little, S. C., Tikhonov, M., and Gregor, T. (2013). Precise developmental gene expression arises from globally stochastic transcriptional activity. *Cell*, 154(4):789–800.

[Little et al., 2011] Little, S. C., Tkačik, G., Kneeland, T. B., Wieschaus, E. F., and Gregor, T. (2011). The formation of the bicoid morphogen gradient requires protein movement from anteriorly localized mrna. *PLoS biology*, 9(3):e1000596.

[Liu et al., 2013] Liu, F., Morrison, A. H., and Gregor, T. (2013). Dynamic interpretation of maternal inputs by the drosophila segmentation gene network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17):6724–6729.

[Magde et al., 1972] Magde, D., Elson, E., and Webb, W. W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29:705–708.

[MATLAB, 2010] MATLAB (2010). *version 7.10.0 (R2010a).* The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts.

[Menten and Michaelis, 1913] Menten, L. and Michaelis, M. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49:333–369.

[Milo and Phillips, 2015] Milo, R. and Phillips, R. (2015). *Cell Biology by the numbers - DRAFT*. Garland Science.

[Murray, 2002] Murray, J. D. (2002). Mathematical biology i: An introduction, vol. 17 of interdisciplinary applied mathematics.

[Nuccitelli, 1994] Nuccitelli, R. (1994). *A practical guide to the study of calcium in living cells*, volume 40. Academic Press.

[Pando et al., 2006] Pando, B., Dawson, S. P., Mak, D.-O. D., and Pearson, J. E. (2006). Messages diffuse faster than messengers. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 103(14):5338–5342.

[Parker and Yao, 1996] Parker, I. and Yao, Y. (1996). ca^{2+} transients associated with openings of inositol trisphosphate-gated channels in xenopus oocytes. *J Physiol*, 491 (Pt 3):663–8.

[Pawley, 2010] Pawley, J. (2010). *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science & Business Media.

[Periasamy et al., 1999] Periasamy, A., Skoglund, P., Noakes, C., and Keller, R. (1999). An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in xenopus morphogenesis. *Microscopy research and technique*, 47(3):172–181.

[Piegari et al., 2014] Piegari, E., Lopez, L., Ipiña, E. P., and Dawson, S. P. (2014). Fluorescence fluctuations and equivalence classes of ca2+ imaging experiments. *PloS one*, 9(4):e95860.

[Porcher et al., 2010] Porcher, A., Abu-Arish, A., Huart, S., Roelens, B., Fradin, C., and Dostatni, N. (2010). The time to measure positional information: maternal hunchback is required for the synchrony of the bicoid transcriptional response at the onset of zygotic transcription. *Development*, 137(16):2795–2804.

[Remington, 2006] Remington, S. J. (2006). Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current opinion in structural biology*, 16(6):714–721.

[Sigaut et al., 2014] Sigaut, L., Pearson, J. E., Colman-Lerner, A., and Ponce Dawson, S. (2014). Messages do diffuse faster than messengers: Reconciling disparate estimates of the morphogen bicoid diffusion coefficient. *PLoS Comput Biol*, 10(6):e1003629.

[Sigaut et al., 2010] Sigaut, L., Ponce, M. L., Colman-Lerner, A., and Dawson, S. P. (2010). Optical techniques provide information on various effective diffusion coefficients in the presence of traps. *Phys. Rev. E*, 82:051912.

[Smith, 1996] Smith, G. (1996). Analytical steady-state solution to the rapid buffering approximation near an open ca2+ channel. *Biophys. J.*, 71(6):3064–3072.

[Sniegowski et al., 2005] Sniegowski, J. A., Phail, M. E., and Wachter, R. M. (2005). Maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of arg96, glu222, and gly67 variants of green fluorescent protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(3):657–663.

[Spirov et al., 2009] Spirov, A., Fahmy, K., Schneider, M., Frei, E., Noll, M., and Baumgartner, S. (2009). Formation of the bicoid morphogen gradient: an mRNA gradient dictates the protein gradient. *Development*, 136(4):605–614.

[Sprague and McNally, 2005] Sprague, B. and McNally, J. (2005). Frap analysis of binding: Proper and fitting. *Trends in Cell Biology*, 15(2):84–91.

[Sprague et al., 2004] Sprague, B., Pego, R., Stavreva, D., and McNally, J. (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical Journal*, 86(6):3473–3495.

[St Johnston et al., 1989] St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S., and NÃ$\frac{1}{4}$sslein-Volhard, C. (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte. *Development (Cambridge, England)*, 107 Suppl:13–19.

[Strier and Dawson, 2000] Strier, D. E. and Dawson, S. P. (2000). Rescaling of diffusion coefficients in two-time scale chemical systems. *The Journal of Chemical Physics*, 112(2):825–834.

[Strier et al., 2003] Strier, D. E., Ventura, A. C., and Dawson, S. P. (2003). Saltatory and continuous calcium waves and the rapid buffering approximation. *Biophysical journal*, 85(6):3575–3586.

[Struhl et al., 1989] Struhl, G., Struhl, K., and Macdonald, P. M. (1989). The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell*, 57:1259–1273.

[Sun et al., 1998] Sun, X.-P., Callamaras, N., Marchant, J. S., and Parker, I. (1998). A continuum of $insp_3$-mediated elementary ca^{2+} signalling events in xenopus oocytes. *J Physiol (Lond)*, 509(1):67–80.

[Swillens et al., 1999] Swillens, S., Dupont, G., Combettes, L., and Champell, P. (1999). From calcium blips to calcium puffs: Theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 96(24):13750–13755.

[Thompson et al., 2011] Thompson, N. L., Navaratnarajah, P., and Wang, X. (2011). Measuring surface binding thermodynamics and kinetics by using total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy: Practical considerations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(1):120–131.

[Tsien, 1998] Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1):509–544.

[Turing, 1952] Turing, A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 237(641):37–72.

[Wagner and Keizer, 1994] Wagner, J. and Keizer, J. (1994). Effects of rapid buffers on ca2+ diffusion and ca2+ oscillations. *Biophys. J.*, 67(1):447–456.

[Wolpert, 1969] Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of Theoretical Biology*, 25(1):1–47.