
SIMULACION DE TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE COEFICIENTES DE DIFUSION: FRAP Y FCS

Carlos Federico, Rita Berguño, Juan Salgado Salter

INTRODUCCION

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) es una técnica de microscopia muy empleada en biología celular para el estudio de la dinámica de proteínas. Desde la década de 1970 esta técnica se empleo para el estudio de la dinámica de proteínas de membrana y la determinación de sus coeficientes de difusión. A partir de la década de 1990, cuando fue posible la expresión de proteínas de fusión a GFP (green fluorescent protein) FRAP cobro nuevo impulso. En FRAP, las moléculas fluorescentes localizadas en una pequeña región de interés son irreversiblemente fotoblanqueadas empleando un laser de alta intensidad. A continuación la recuperación de la fluorescencia en la región de interés como resultado del movimiento de las moléculas fluorescentes hacia la misma, es medida en el tiempo empleando un microscopio confocal.

La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) es otra técnica que permite determinar coeficientes de difusión de proteínas fluorescentes y otros fluoroforos. Para ello empleando un microscopio confocal se miden las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia dentro de un pequeño volumen de observacion ($\sim 0,2$ fL) conteniendo unas pocas moléculas. Luego el análisis de la correlación temporal de dichas fluctuaciones permite obtener información como el coeficiente de difusión y la concentración.

DESARROLLO

Se simularon experimentos de FRAP en proteínas de membrana, asumiendo que estas realizan un random walk en dos dimensiones sobre una superficie esférica. La célula fue representada como una esfera de radio igual a $10 \mu\text{m}$. Se simulo el movimiento de 50000 partículas con posiciones iniciales aleatorias sobre la esfera. Cada una unidad de tiempo, las proteínas dieron un paso de dirección y longitud aleatoria restringido a un círculo. A todas las partículas se les asigno inicialmente una fluorescencia arbitraria igual a 1. Transcurrido un cierto tiempo T_0 la fluorescencia de aquellas partículas que se encontraban en la región de interés (un círculo de radio $2 \mu\text{m}$) paso a ser igual a cero. Posteriormente, se registro la fluorescencia (que es igual al numero de moléculas fluorescentes) en la región de interés en función del tiempo, mientras las proteínas difundían libremente.

Para el estudio de FCS se simulo un random walk en 3 dimensiones con 500 partículas (≈ 10 nM) dentro de una esfera de $10 \mu\text{m}$ (representando el citosol de

una célula). Se registro el numero de partículas en el volumen focal (considerado como un esferoide de semieje menor $\omega_0=0,25 \mu\text{m}$ y semieje mayor $\omega_z=1,25 \mu\text{m}$) en función del tiempo. Luego se obtuvo la función de autocorrelación:

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

Donde:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$$

y $F(t)$ es la fluorescencia a tiempo t .

RESULTADOS Y DISCUSION

Mediante la simulación de FRAP se obtuvieron los resultados esperados para una proteína que difunde libremente en la membrana plasmática, observándose una recuperación casi total (es inalcanzable una recuperación del 100% debido a la perdida de fluorescencia que implica el Photobleaching). En la figura 1 se muestra como ejemplo una de las curvas obtenidas. En ella se observa como luego del Photobleaching la fluorescencia se recupera debido al ingreso de proteínas fluorescentes al área medida.

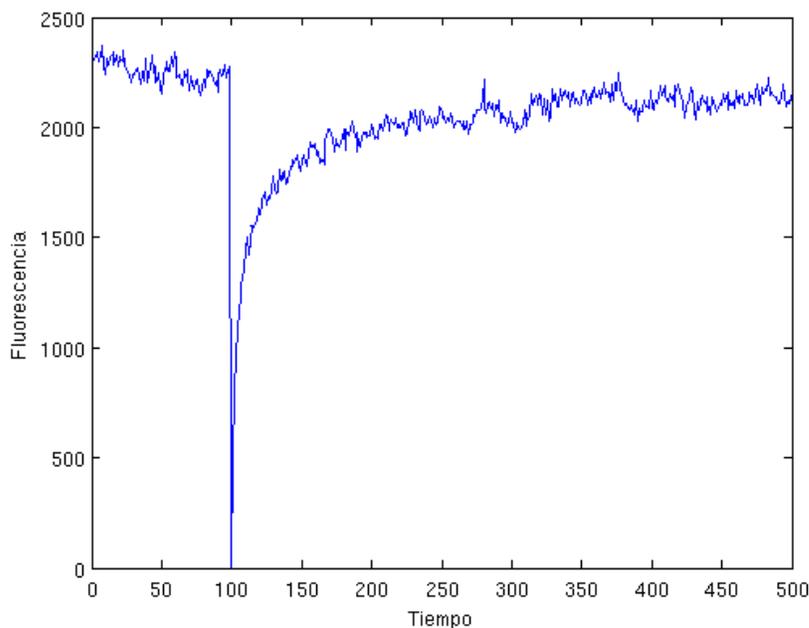


Figura 1. Simulación de FRAP de proteínas de membrana

A continuación se realizaron nuevas simulaciones de 50000 partículas variando el tamaño del paso dado por las partículas. En las simulaciones, el desplazamiento a

cada tiempo esta dado por un $\Delta\phi=2\pi*P*rand$ y un $\Delta\theta=\pi*P*rand$ siendo P un numero menor a 1. En la figura 2 se muestran las curvas de fluorescencia (relativizada a la fluorescencia final) en función del tiempo para distintos valores de P.

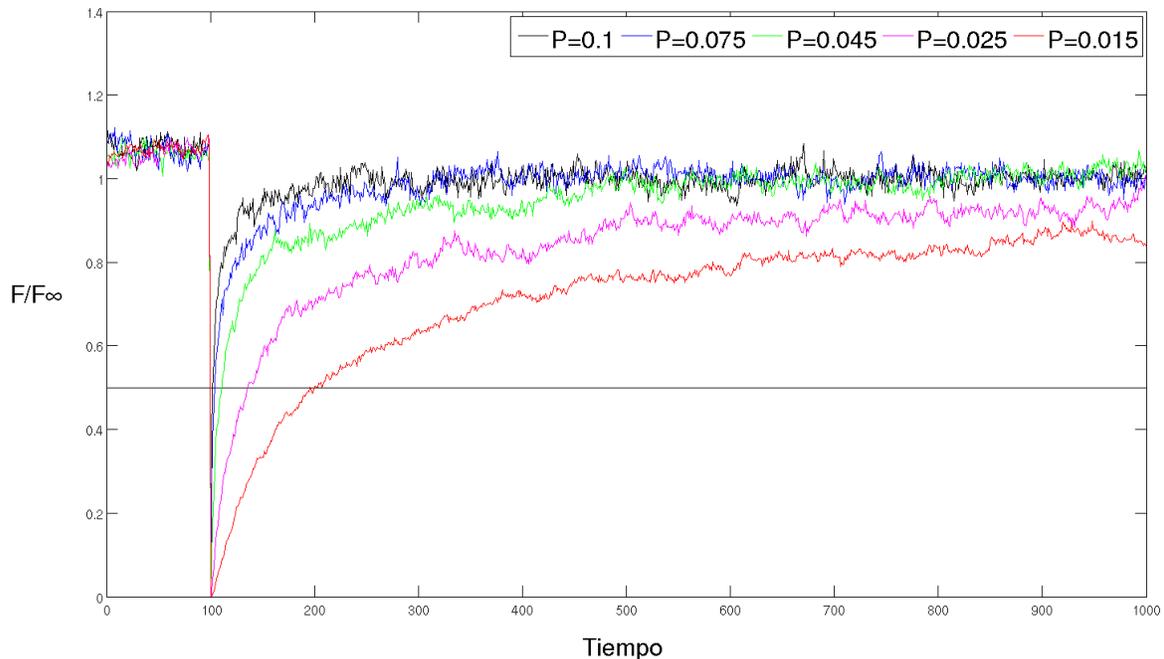


Figura 2. Efecto del tamaño del paso sobre la recuperación de la fluorescencia.

Tal como se esperaba cuanto mas rápido se mueven las partículas (mayor valor de P) la recuperación es mas veloz. Se denomina tiempo de difusión o tiempo característico (τ_d) al tiempo en el cual la fluorescencia es la mitad de la fluorescencia final. Este se relaciona con el coeficiente de difusión por:

$$\tau_d = \omega^2 / 4D$$

Donde ω es el radio de la región sobre la cual se hizo el photobleaching. Se gráfico el tiempo característico en función de la inversa de P^2 (figura 3). Se obtuvo una relación lineal, lo cual era esperable ya que P es proporcional al tamaño del paso y el coeficiente de difusión es proporcional al cuadrado del paso.

Mediante la simulación del movimiento de partículas en 3 dimensiones se obtuvieron datos de fluorescencia en función del tiempo, con los cuales se construyeron las curvas de $G(\tau)$ que se muestran en la figura 4. El resultado obtenido es el esperado, observándose como la autocorrelación (normalizada) decae con el tiempo hasta llegar a cero. Además se comprueba que el tiempo característico es inversamente proporcional al tamaño del paso (y en ultima instancia al coeficiente de difusión), ya que $\tau_d = \omega_0^2 / 4D$ (donde τ_d es el tiempo al cual la correlación decae a la mitad y ω_0 es el radio en el plano x-y del volumen focal).

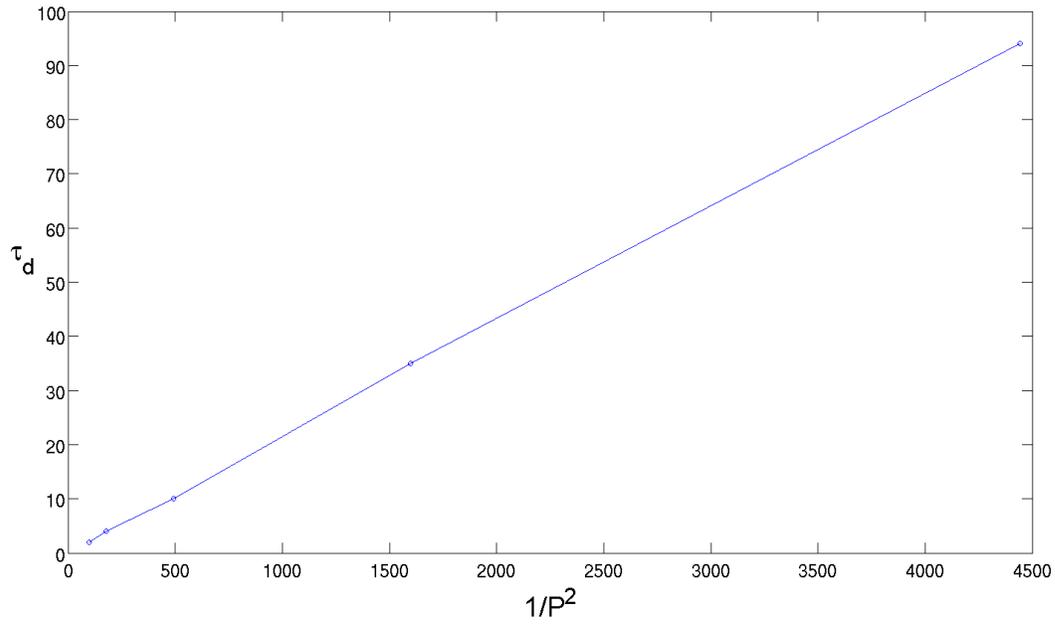


Figura 3. Relación entre el tiempo característico y el tamaño del paso.

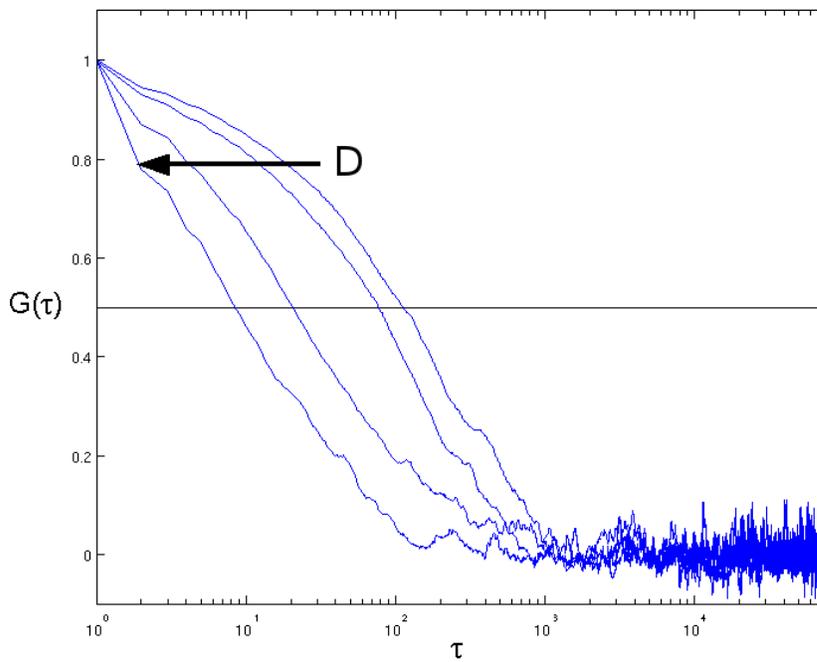


Figura 4. Autocorrelación temporal para distintos coeficientes de difusión obtenida mediante simulación de FCS

BIBLIOGRAFIA

Axelrod, D., Ravdin, P., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Webb, W.W., Elson, E.L. and Podleski, T.R. (1976) Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(12): 4594–4598.

Axelrod, D., D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W.W. Webb. (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J.* 16:1055-69.

Bacia, K., and Schwille, P. (2003) A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods.* 29(1):74-85.

Bates, I.R., Wiseman, P.W., and Hanrahan, J.W. (2006) Investigating membrane protein dynamics in living cells. *Biochem Cell Biol.* 84: 825-31.

Bulsecq D.A., Wolf D.E. (2007) Fluorescence correlation spectroscopy: molecular complexing in solution and in living cells. *Methods Cell Biol.* 81:525-59

Chen, Y., Lagerholm, B.C., Yang, B., and Jacobson, K. (2006) Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods.* 39(2):147-53.

Krichevsky, O. and Bonnet, G. (2002) Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.* 65 251-297

Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N., and Patterson, G.H. (2003) Photobleaching and photoactivation: Following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biolo* Supplement: S7-S14.

Reits, E.A., and Neefjes, J.J. (2001) From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol.* 3:E145-7.

Snapp1, E.L., Altan1, N., and Lippincott-Schwartz1, J. (2003) Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 21:Unit 21.1.

Soumpasis, D.M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J.* 41:95-7.

White, J. and Stelzer, E. (1999) Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends in Cell Biology* 9: 61-65.