

Física Biológica / Biofísica

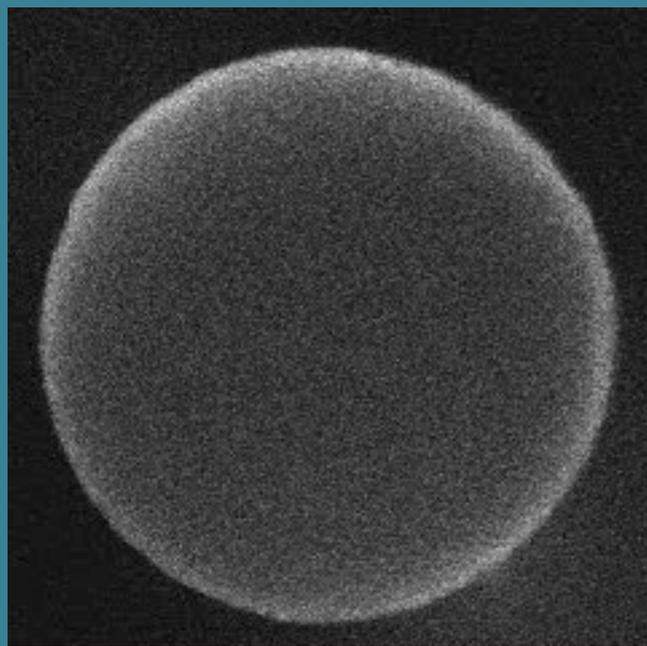
Sexta Teórica.

Difusión en algunos procesos biológicos

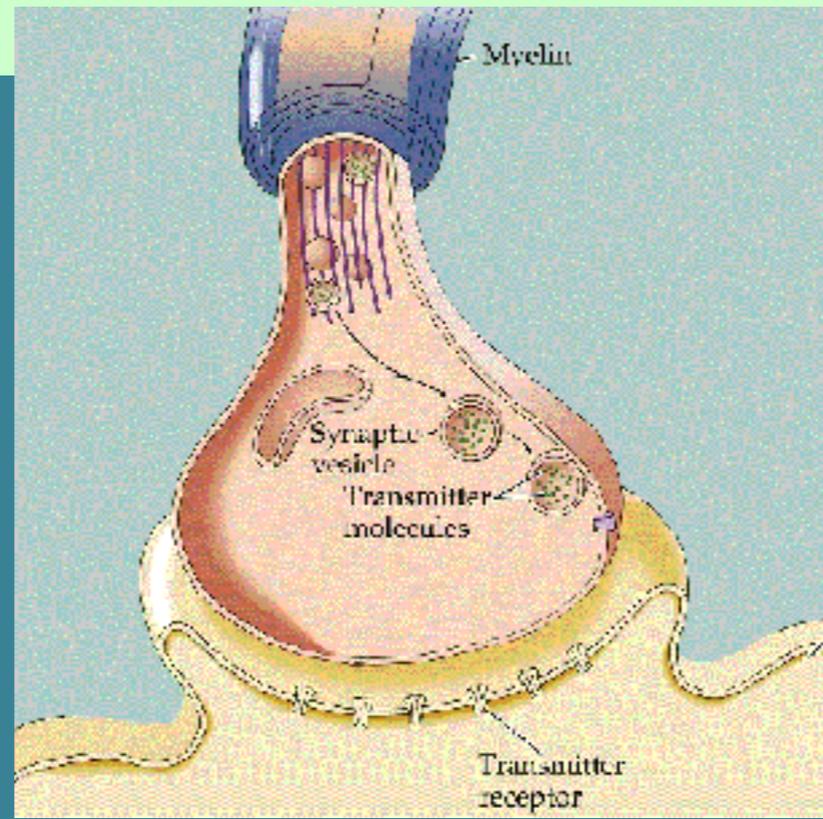
El transporte difusivo de sustancias cumple un rol relevante en muchos procesos biológicos.

Por ejemplo, en las señales intra e inter celulares de calcio.

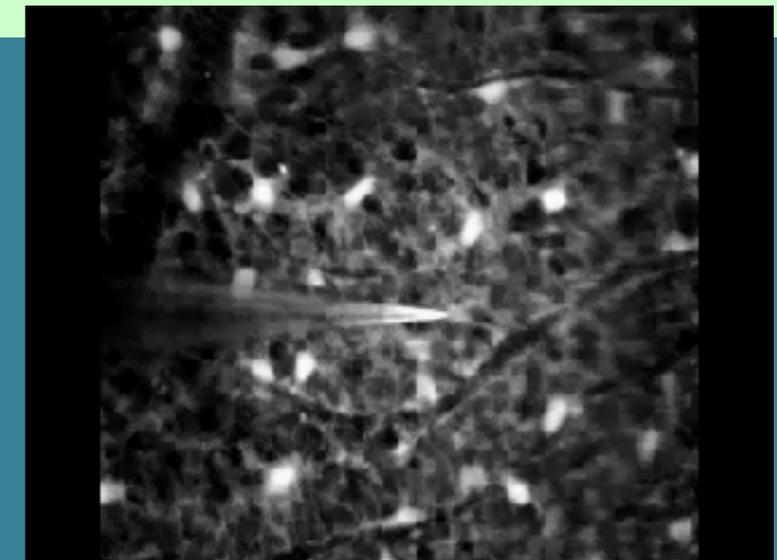
El calcio es un mensajero universal que participa de muchísimos procesos distintos. Está en muy baja concentración libre en el citosol. Cuando ingresa a través de distintos canales induce respuestas muy variadas. Ejemplos:



Onda de fertilización  
Fontanilla and Nuccitelli



En sinapsis químicas



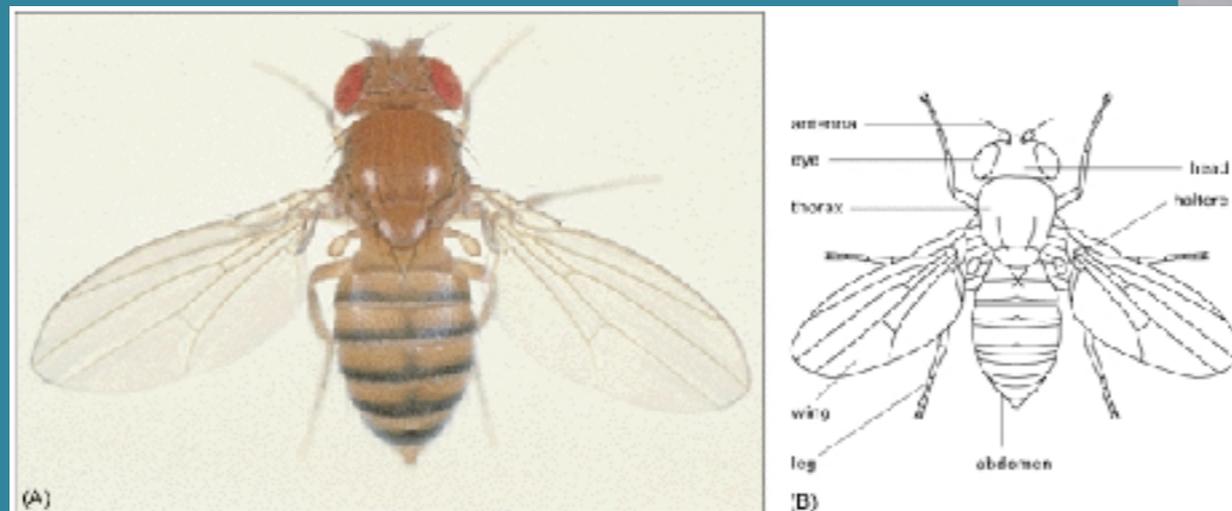
Onda de  $Ca^{2+}$  en retina de rata iniciada con un estímulo mecánico. Newman and Zahs, Science, 1997

La tasa de transporte del mensajero, calcio, determina el rango espacio-temporal de su distribución y la consiguiente respuesta que induce.

La difusión de distintas sustancias cumple un rol fundamental para el establecimiento de estructuras espaciales (patrones o patterns).

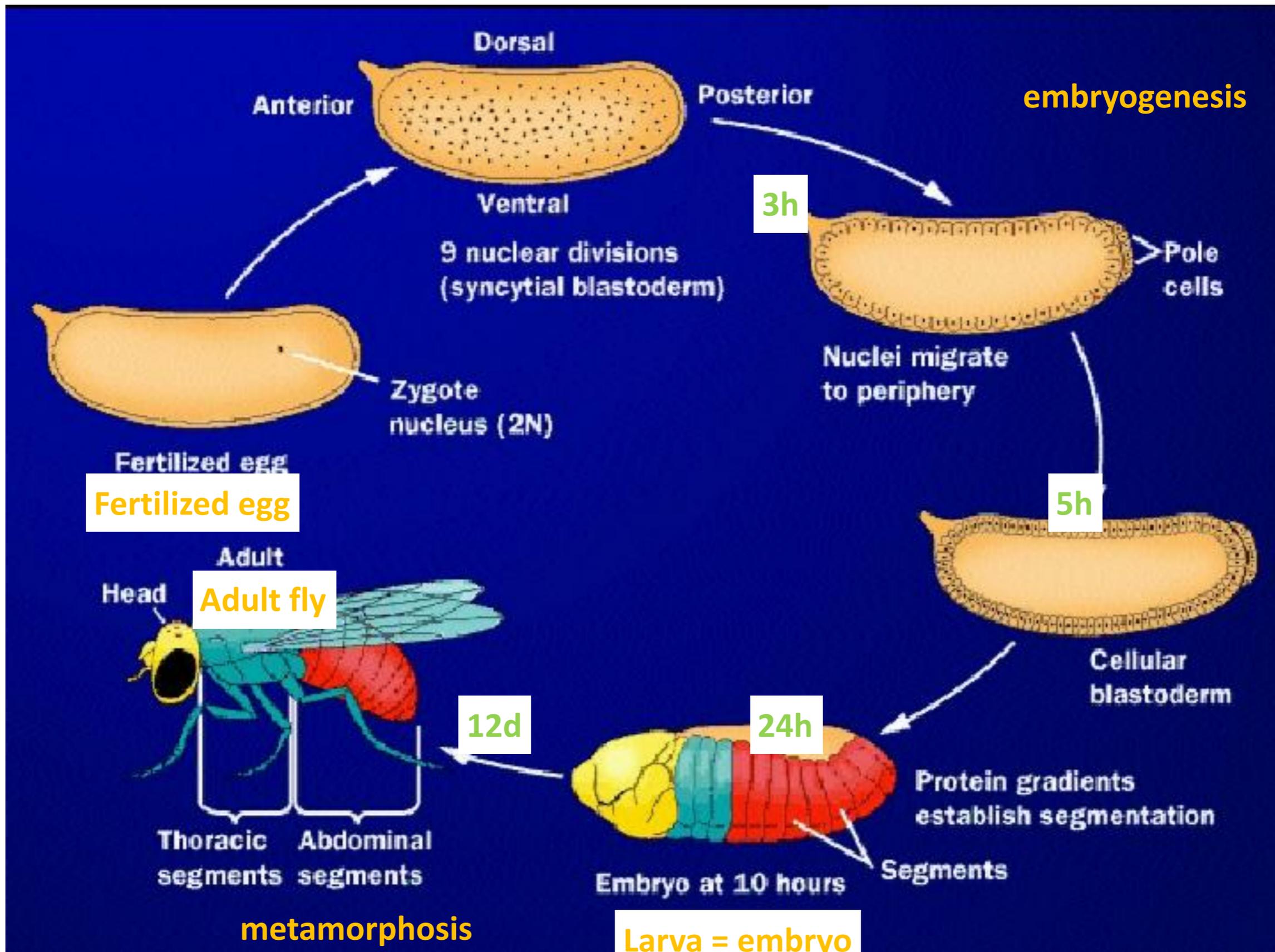
En embriogénesis hay sustancias (morfógenos) que dictan diferentes destinos a células indiferenciadas dependiendo de su posición en el embrión. El gradiente de morfógenos es determinante para la diferenciación celular.

Un caso muy estudiado es el del establecimiento del eje dorso-ventral en embriones de la mosca drosófila



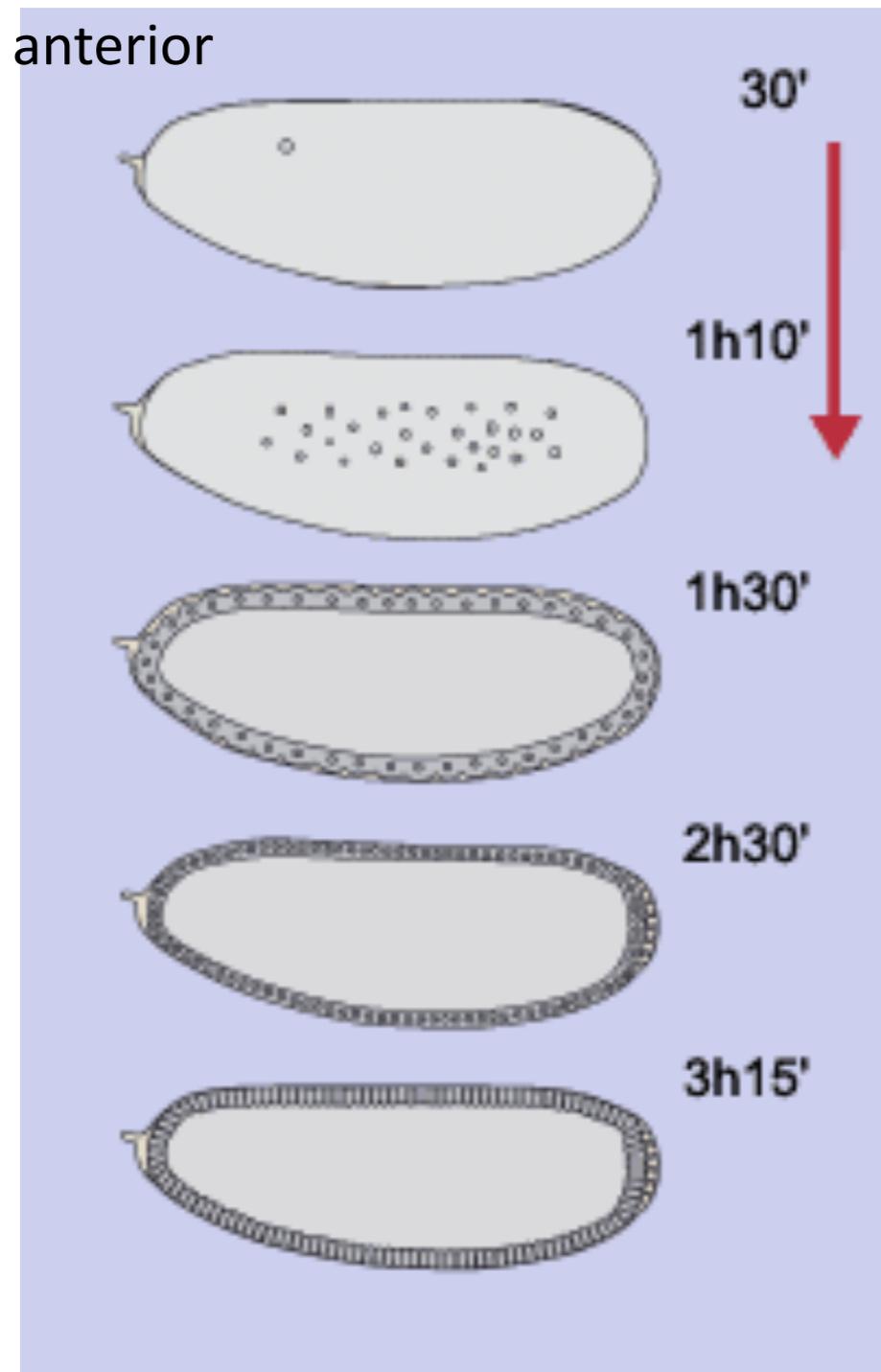
# Drosophila development

Slide by Katja Nowick, TFome and Transcriptome Evolution. Leipzig



# Early steps of embryogenesis

Slide by Katja Nowick,



→ Huevo fertilizado

Los núcleos se dividen pero no la célula  
→ Syncytium

Los núcleos migran a la superficie y se  
siguen dividiendo  
→ Syncytial blastoderm

Se forman membranas entre los núcleos  
→ Cellular blastoderm

# La expresión secuencial de distintos conjuntos de genes establece el “plan corporal” a lo largo del eje antero-posterior

mRNA localizado espacialmente y traducido en proteínas después de la fertilización—

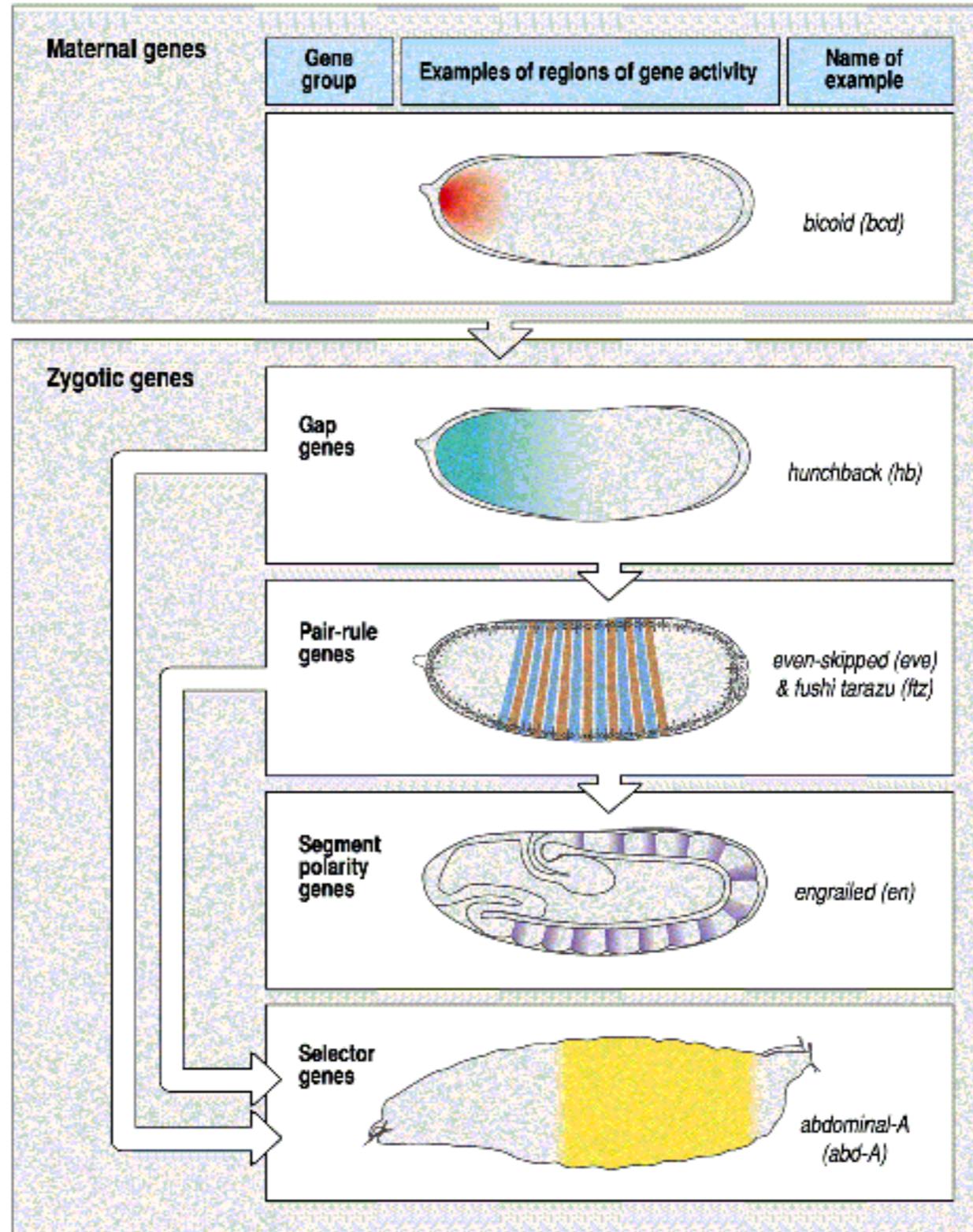
La información posicional activa distintos genes

Secuencia temporal

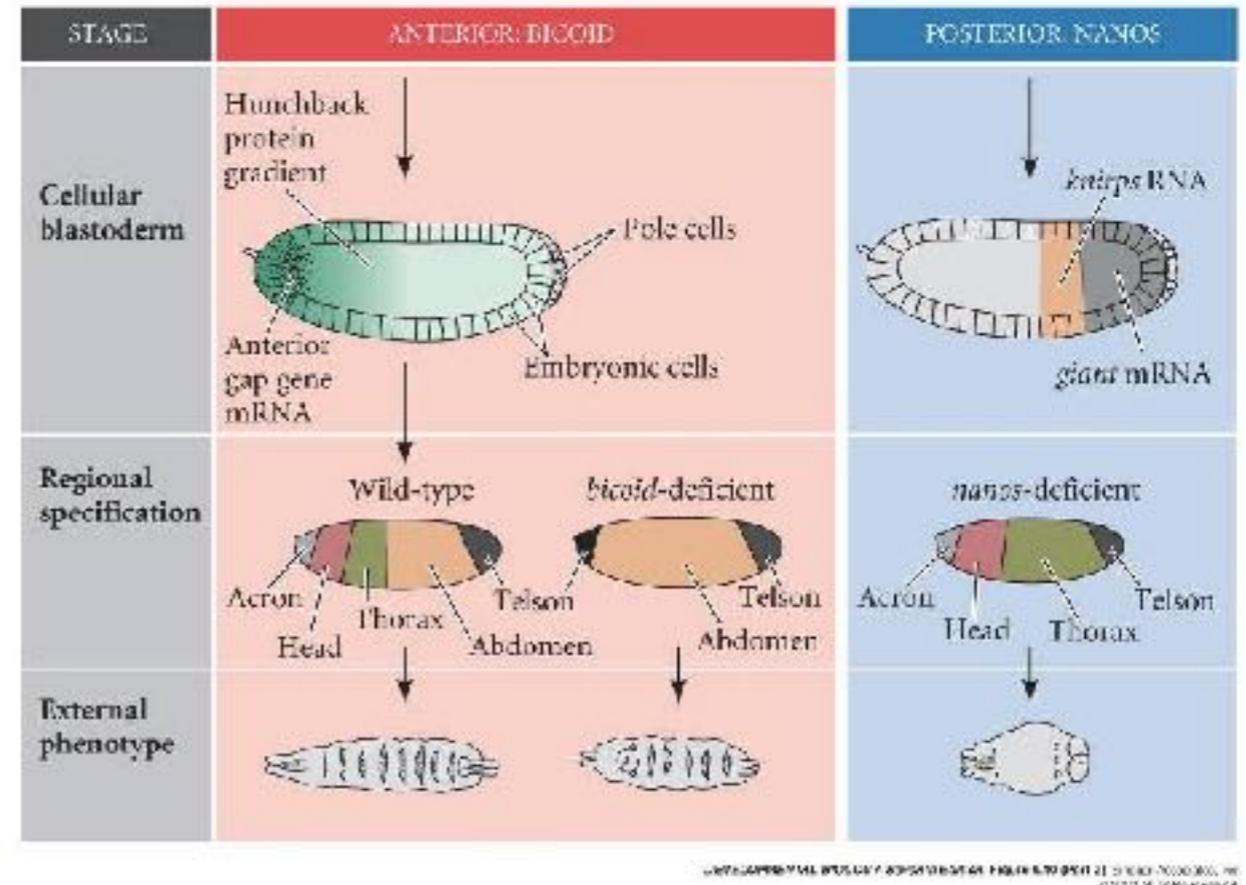
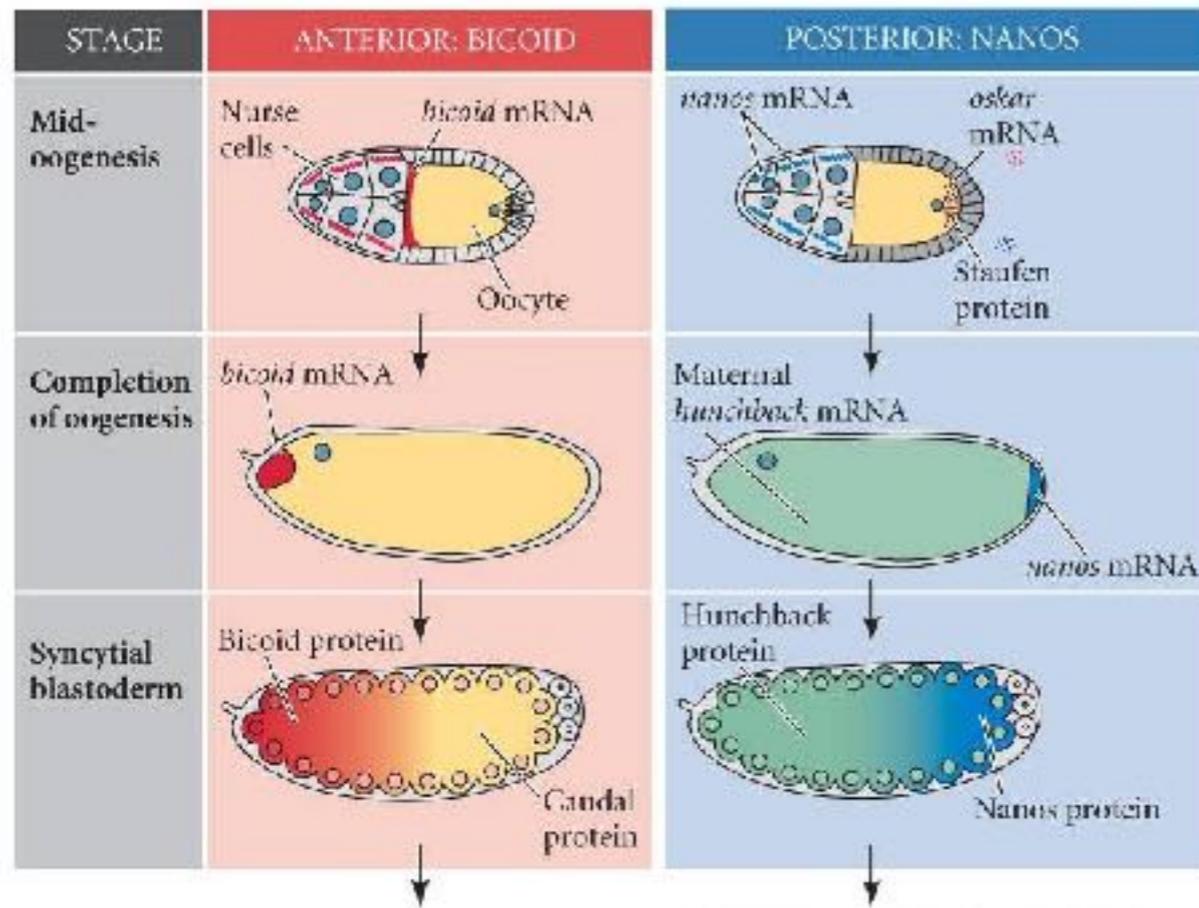
parasegment

Pattern in the segment

Segment identities



# Dos caminos genéticos independientes interactúan para formar el eje antero-posterior en embriones de *Drosophila*

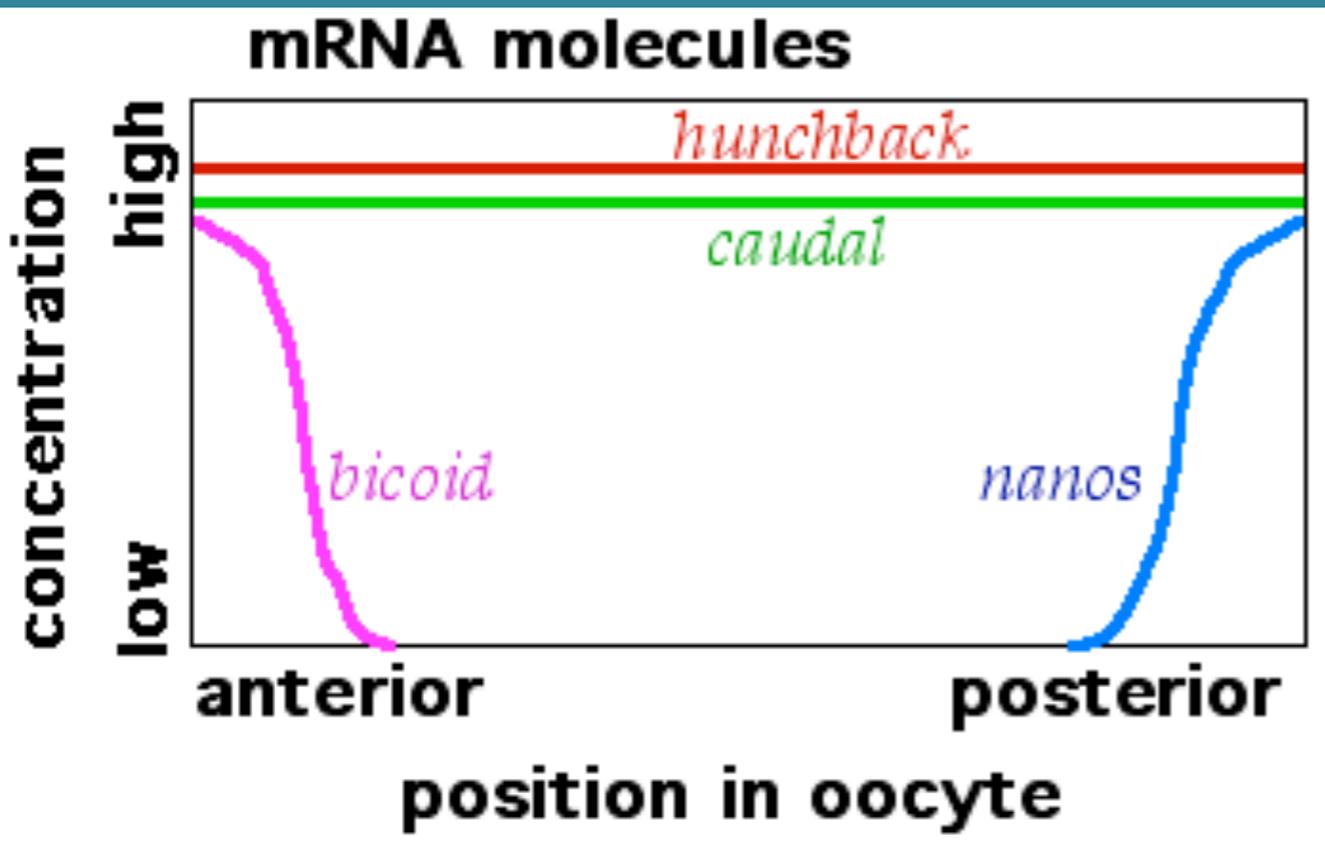


Durante el desarrollo del huevo, antes de ser fertilizado, hay una distribución no uniforme de ciertas moléculas de mRNA.

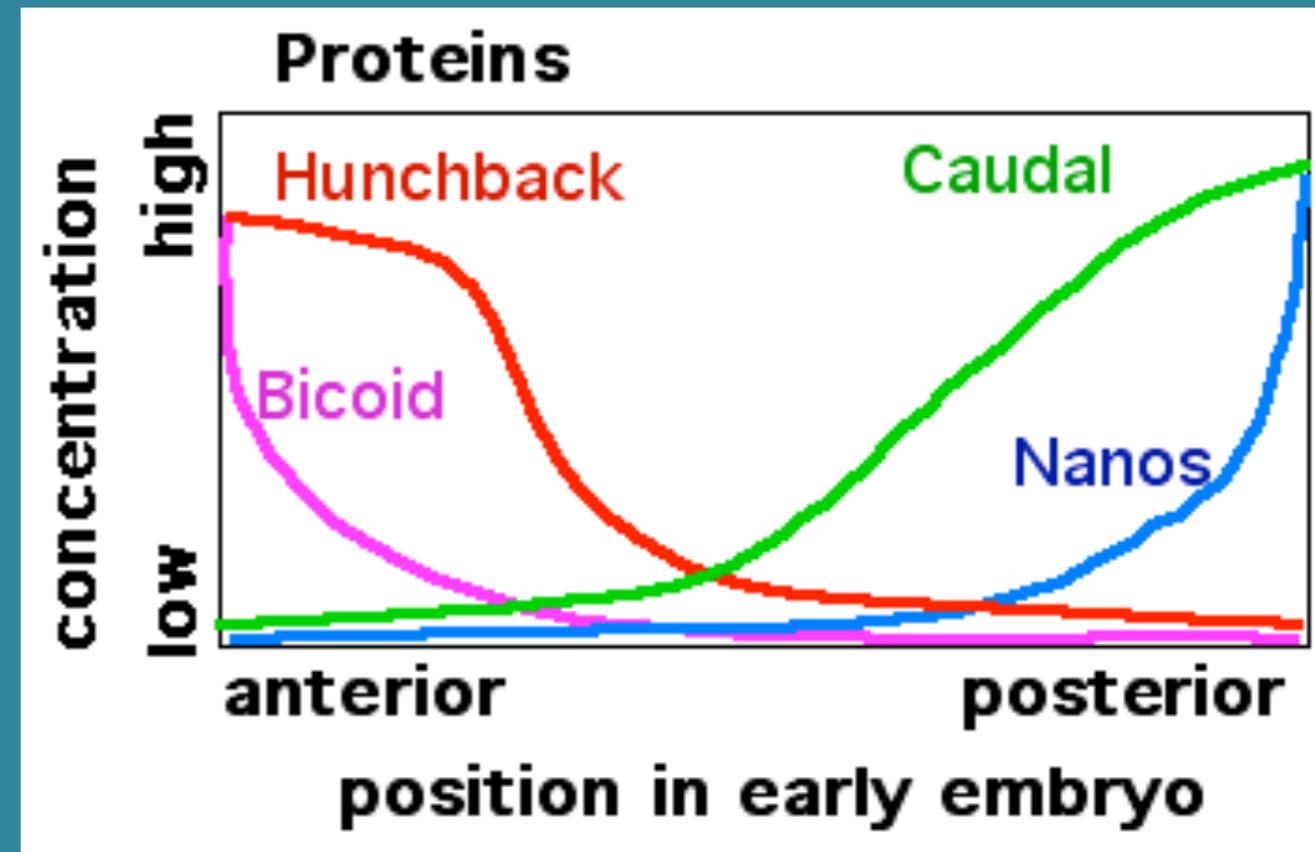
El gen materno, bicoid, está concentrado en el extremo "anterior". La proteína cuya producción codifica también muestra una distribución no uniforme (un gradiente) en el embrión.

El gradiente de Bicoid se establece dentro de los 90 minutos transcurridos desde la fertilización y permanece estable a lo largo de muchas divisiones.

Bicoid, por otro lado, es un factor de transcripción (una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN), en particular, promueve la transcripción de otro gen materno, hunchback.



Posición en el huevo

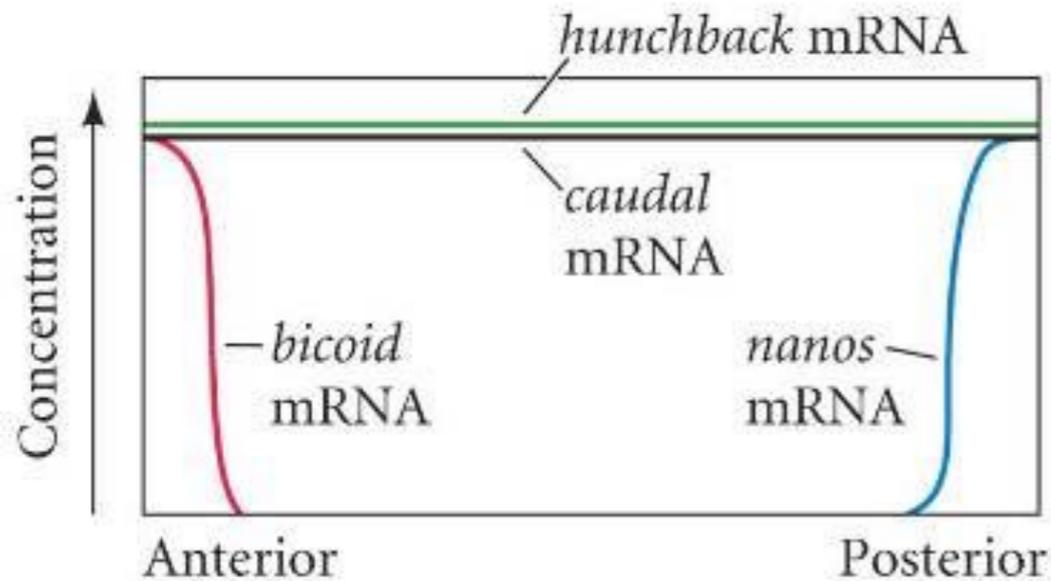


Posición en el embrión

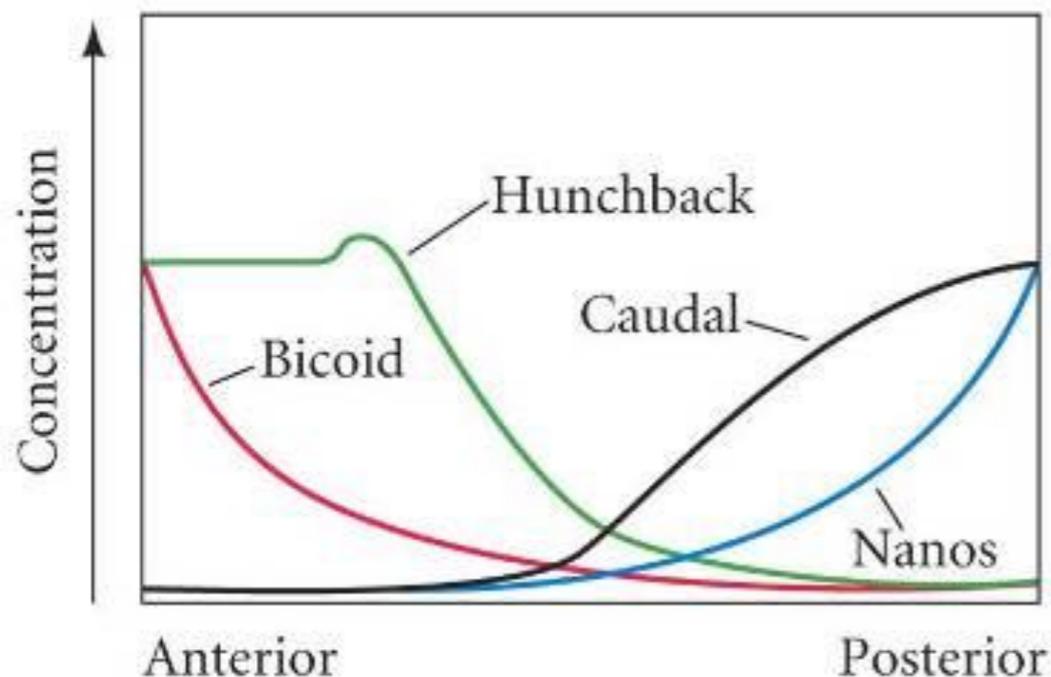
# Generación del patrón entero-posterior en *Drosophila*

## Efecto de genes maternos

(A) Oocyte mRNAs



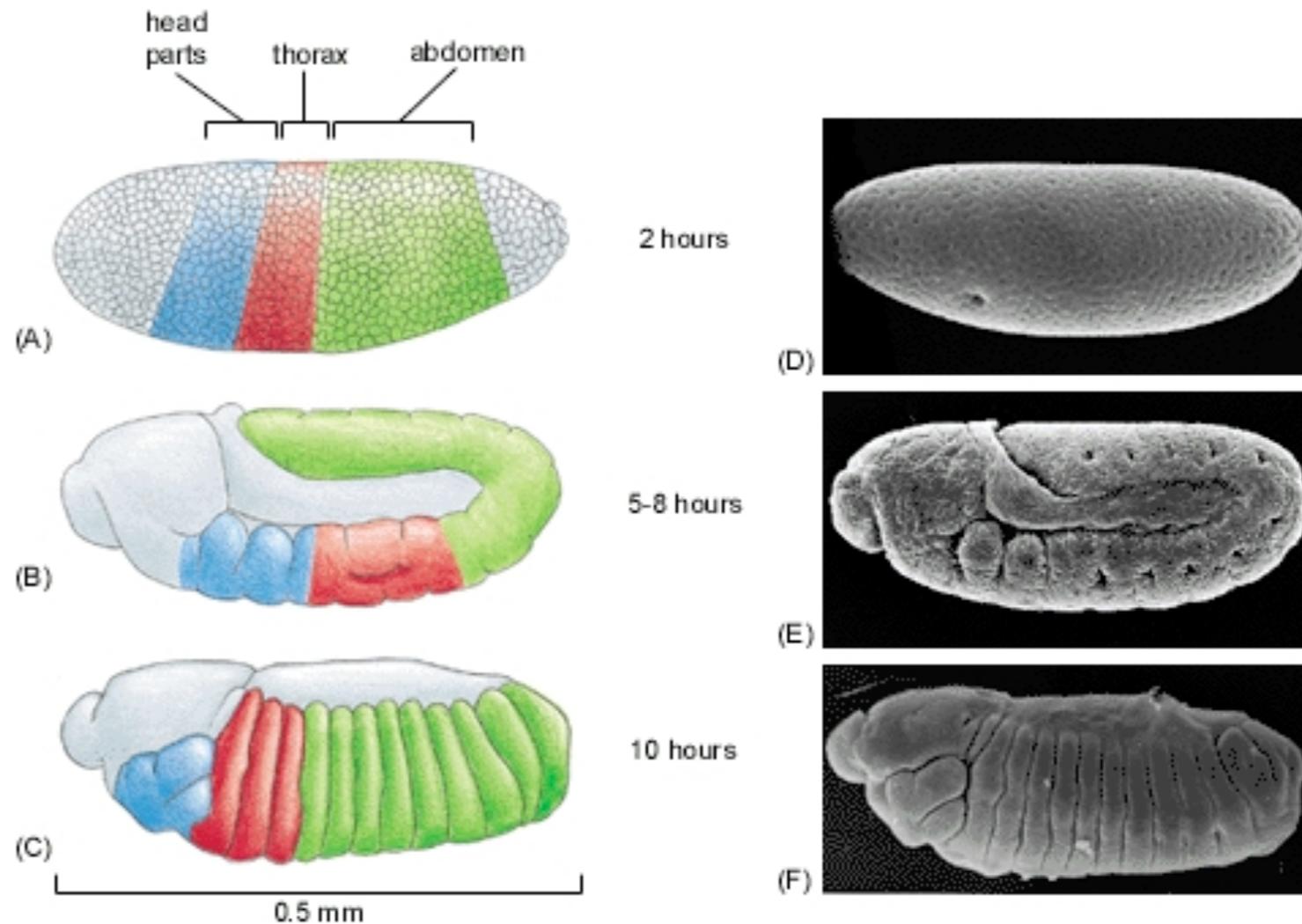
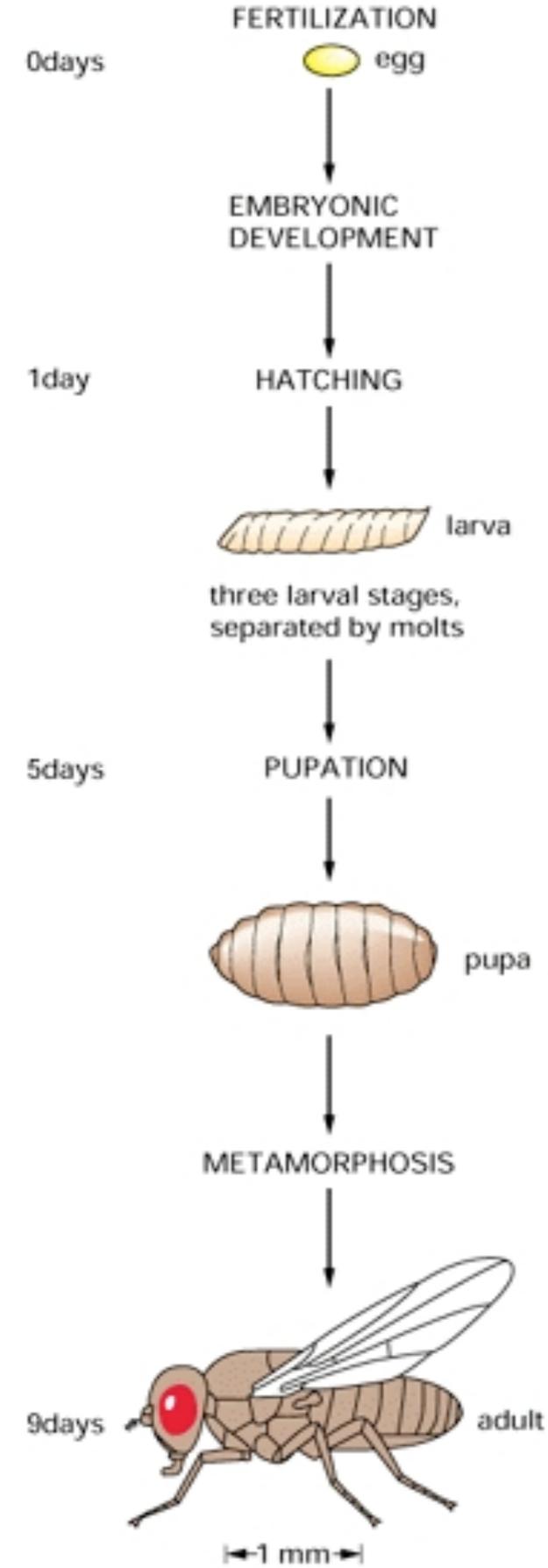
(B) Early cleavage embryo proteins



Bicoid estimula la transcripción de *hunchback*

Esta transcripción depende de [Bcd], i.e., no ocurre a igual ritmo en todos los puntos del embrión

Estas diferencias en la transcripción de Hb como función de la posición se traducen en cambios en la expresión de otros genes “río abajo”. Esta cascada de eventos genera diferencias espaciales tan precisas que núcleos vecinos (separados por ~10nm) pasan a tener niveles de expresión distinguibles para varios genes y estos patrones son reproducibles entre embriones.



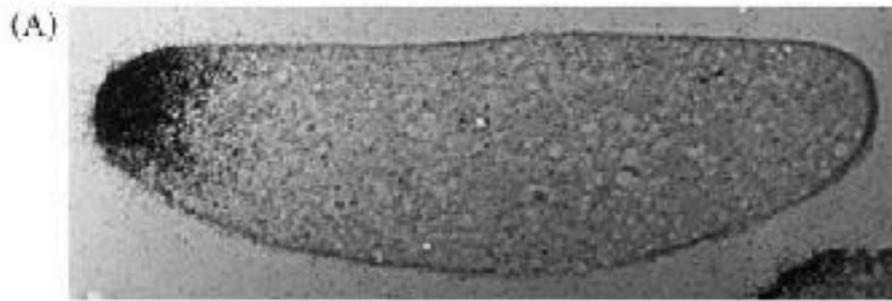
Dibujos de embriones (A-C) e imágenes SEM (D-F). A las 2 horas el embrión está en un estado donde la segmentación no es visible, sin embargo ya existe un “mapa” que determina lo que sucederá después

Estas diferencias de expresión dependiendo de la posición constituyen la “información posicional” que luego se traduce en que distintas partes del embrión den lugar a distintas partes del animal adulto.

Sinopsis del desarrollo desde el huevo hasta la mosca adulta.

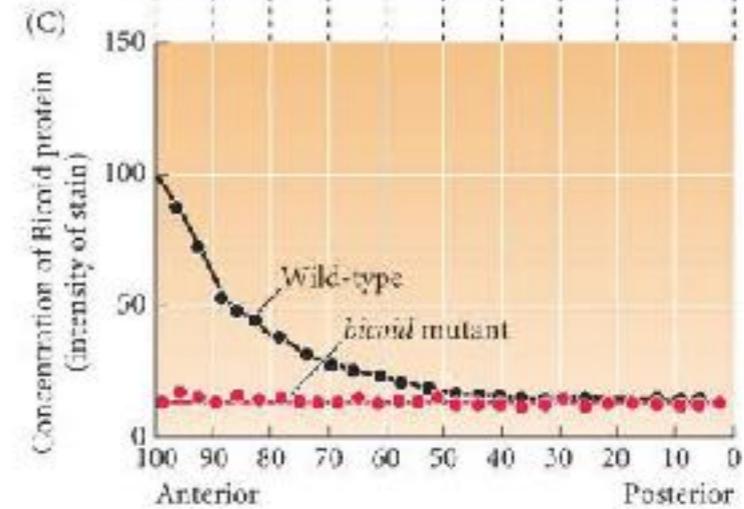
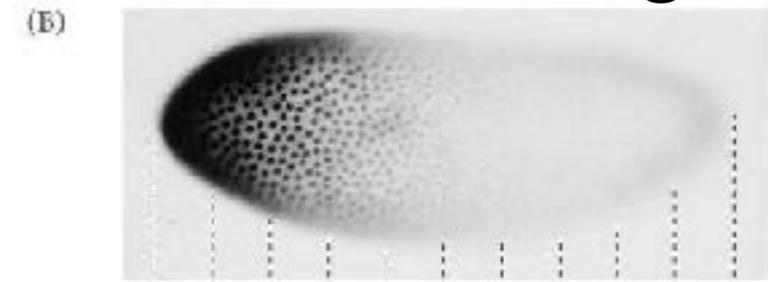
Molecular Biology of the Cell. 3rd edition. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al.

El gradiente de la Proteína Bicoid en el embrión temprano de *Drosophila* es un componente fundamental de la diferenciación subsiguiente



WIKIPEDIA: BICOID; Averita/Flickr, Figure 8.14 (part 1) from Development, 4e © 2005 Allyn and Bacon

*bicoid* mRNA in the anterior tip of the embryo  
3' untranslated region



WIKIPEDIA: BICOID; Averita/Flickr, Figure 8.14 (part 2) from Development, 4e © 2005 Allyn and Bacon

Bcd protein concentrated in the nuclei

Un modelo que puede explicar la formación del gradiente es suponer que Bcd es producido en el extremo anterior y luego difunde y es degradado fuera de esa región.

En este modelo el coeficiente de difusión determina la longitud característica del gradiente y el tiempo que le lleva formarse.

## Recordemos ecuación de difusión y flujo difusivo

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c \qquad \vec{j} = -D \vec{\nabla} c$$

donde  $c$  es la concentración de “los paseadores al azar” (de las partículas que difunden)

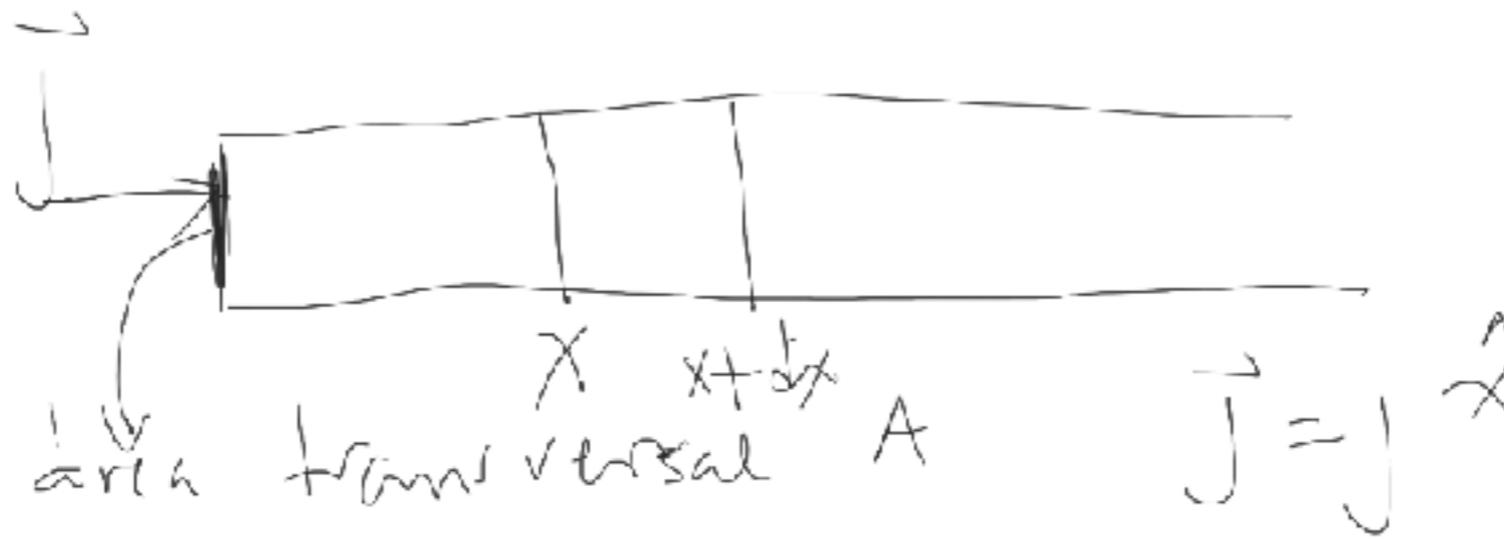
En 3 dimensiones,  $c(\mathbf{r},t) d^3r$  es el número de partículas (que difunden) que están en un volumen diferencial,  $d^3r$ , alrededor del punto,  $\mathbf{r}$ , al tiempo  $t$ . La cantidad  $c$  es la concentración de dichas partículas (número de partículas por unidad de volumen).

En 1 dimensión (el ejemplo del caño) donde  $c$  solo depende de la coordenada  $x$  y del tiempo,  $t$ , podemos considerar que  $c(x,t)$  es también número de partículas por unidad de volumen o que representa una densidad lineal (número de partículas por unidad de longitud).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \qquad j = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

Mantengamos  $c$  en una concentración por unidad de volumen. Las unidades del flujo son entonces:

$$[j] = [D] \frac{1}{[\ell]} [c] = \frac{[\ell]^2}{[t]} \frac{1}{[\ell]} \frac{1}{[\ell]^3}$$



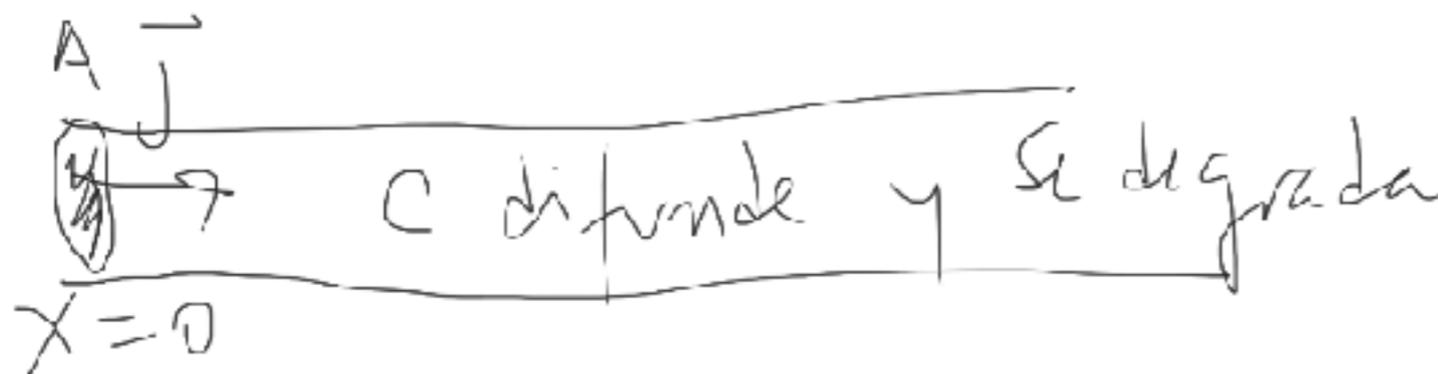
$$[j] = \frac{[l]^2}{[t]} \frac{1}{[l]} \frac{1}{[l]^3} = \frac{1}{[t][l]^2}$$

$$[j A] = ?$$

$j(x,t) A =$  número de partículas que atraviesan el área,  $A$ , por unidad de tiempo, en la posición  $x$  al tiempo  $t$ .

### Modelo SDD para distribución de Bicoid en el embrión de mosca.

Pensemos el embrión como un cilindro y a la producción de Bicoid como algo que lo mete con un flujo,  $j$ , desde el extremo izquierdo



$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{x=0}$$

## Cómo modelar la degradación

Supongamos que solo hay degradación y que comparamos el número de partículas que hay en el pequeño volumen que va entre  $x$  y  $x+dx$  al tiempo  $t$  y al tiempo  $t + dt$

$A dx c(x, t + dt)$  = número de partículas en el pequeño volumen al tiempo  $t + dt$

$A dx c(x, t)$  = número de partículas en el pequeño volumen al tiempo  $t$

$A dx c(x, t + dt) - A dx c(x, t)$  = - número de partículas en el pequeño volumen que se degradaron entre  $t$  y  $t + dt$

Durante el intervalo,  $dt$ , el número de partículas que se degradan en ese volumen es proporcional a  $dt$  y al número de partículas que había allí.

$$A dx c(x, t + dt) - A dx c(x, t) = - \alpha A dx c(x, t) dt$$

$$(c(x, t + dt) - c(x, t)) / dt = - \alpha c(x, t) = dc/dt$$

Si las partículas también difunden, sumamos esta variación a la difusión, de modo que la ecuación queda:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \alpha c$$

Pasemos al pizarrón para resolver esta ecuación sujeta a la condición de borde:

$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{x=0}$$

En el pizarrón vimos que la solución estacionaria de la ecuación:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \alpha c$$

con condiciones de borde:

$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{x=0}$$

$$\frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{x \rightarrow \infty} = 0$$

es:

$$c_s = \frac{j}{(\alpha D)^{1/2}} \exp\left(-\frac{x}{(D/\alpha)^{1/2}}\right)$$

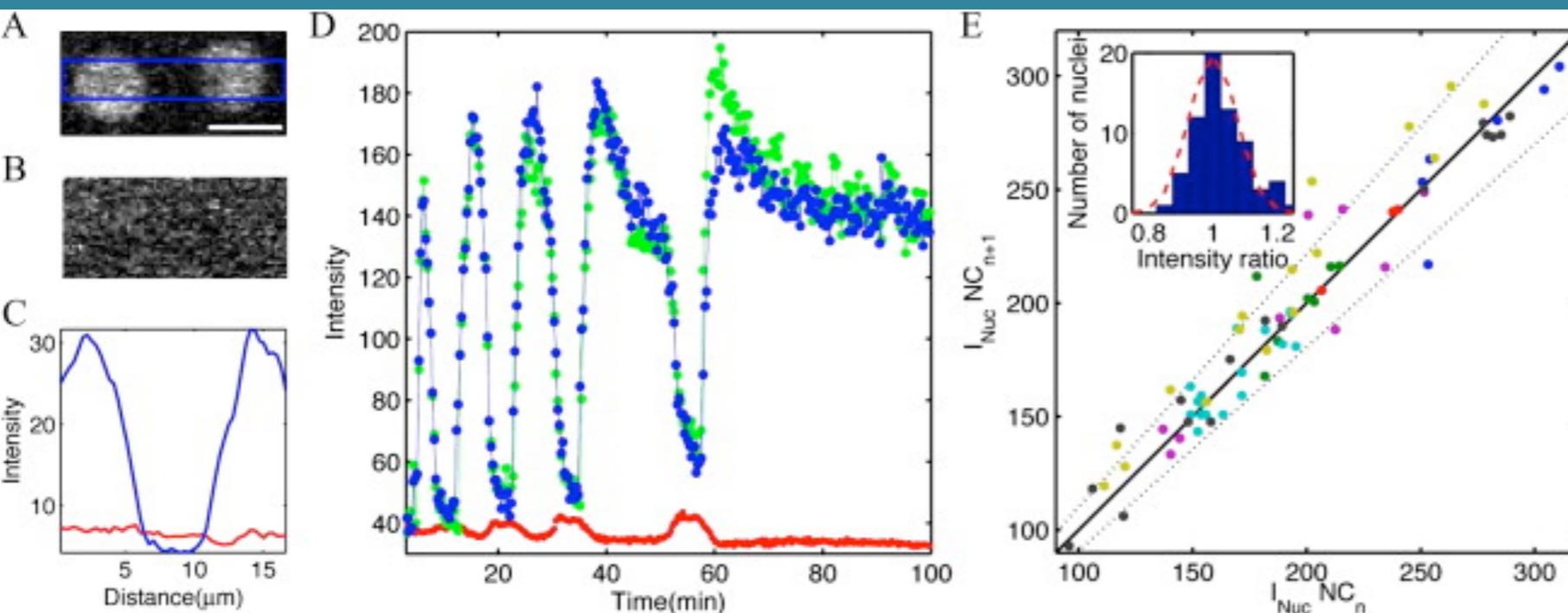
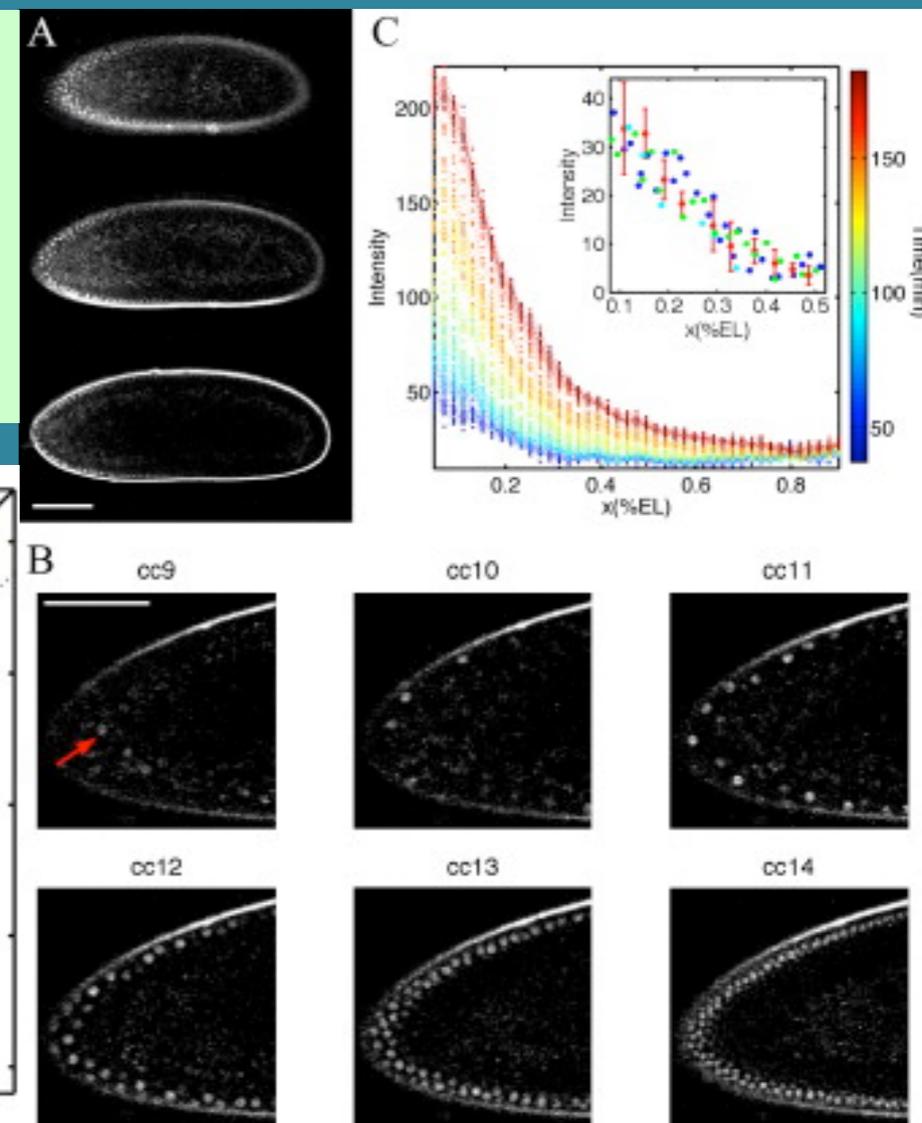
O sea, la longitud característica del gradiente (estacionario) de Bicoid está determinada por su coeficiente de difusión (y su tasa de degradación)

$$\ell = \left(\frac{D}{\alpha}\right)^{1/2}$$

Les comento ahora una serie de estudios que se hicieron para determinar este coeficiente y entender cómo se establece el gradiente de Bicoid (parte de).

Utilizando embriones que expresan Bcd-GFP Gregor et al determinaron que el gradiente de bicoid se establece durante los 90 minutos posteriores a la fertilización y se mantiene estable a lo largo de las sucesivas divisiones nucleares.

Embrión que expresa Bcd-GFP. (A) Ciclo nuclear 12 a 30  $\mu\text{m}$  (top), 60  $\mu\text{m}$  (medio), y 90  $\mu\text{m}$  (bottom) de la superficie. (Barra 100  $\mu\text{m}$ ) (B) Cada foto corresponde a un instante durante las interfases 9 a 14. (C) Las imágenes empiezan 20  $\pm$  15 min after después de poner el huevo. (Gregor et al, Cell 2007)

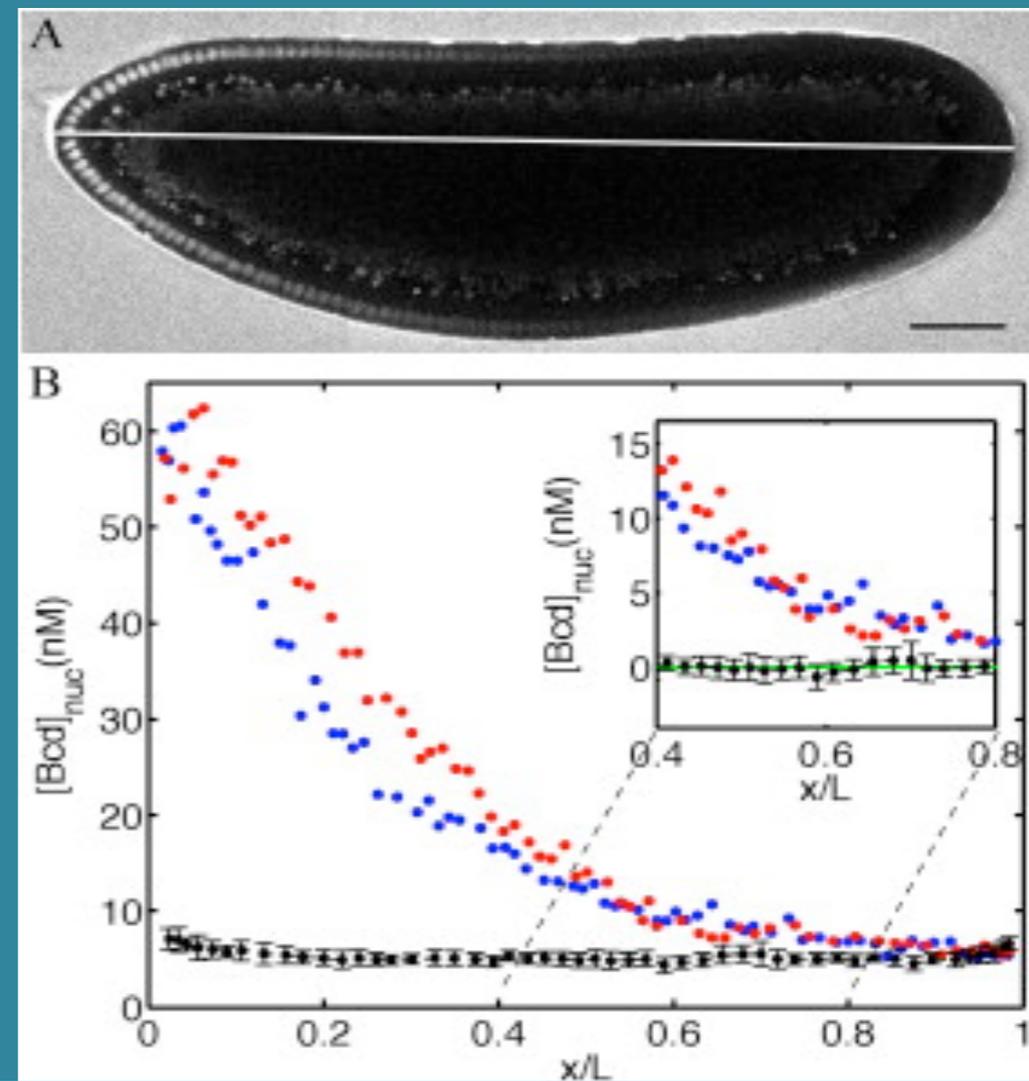


(A) Dos núcleos durante interfase (B) Igual región que en (A) durante mitosis. (C) Intensidad .(D) Bcd-GFP en el núcleo y en el citoplasma.(E) Pico de intensidad en el núcleo durante el ciclo n como función del pico durante el ciclo n+1. (Gregor et al, Cell 2007)

El coeficiente de difusión determina también cuán rápidamente se establece el gradiente (no solo la longitud característica de decaimiento de la concentración).

Existen métodos ópticos que permiten determinar coeficientes de difusión en células intactas de un modo poco invasivo.

Dos métodos muy utilizados: FRAP (Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueado) y FCS (Espectroscopía por correlación de fluorescencia). Ambos fueron usados para estimar la difusión del producto de bicoid.



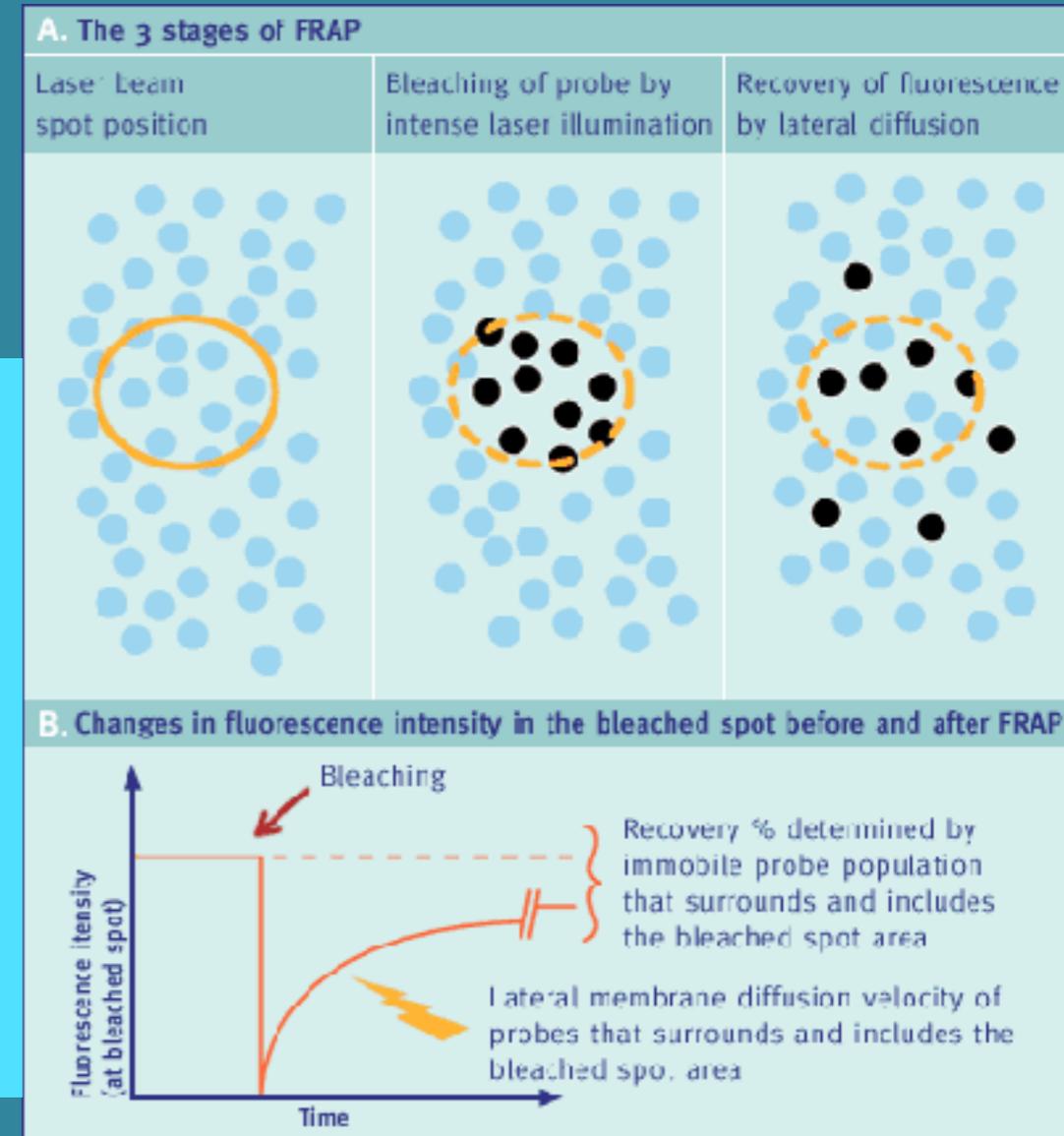
Embrión de drosófila que expresa la proteína fusionada Bcd-GFP (Gregor et al., 2007); escala  $50\mu\text{m}$ . (B)

Concentraciones aparentes en los núcleos visibles ( $L$ =largo del huevo).

# El otro día hablamos de Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

Muy usada para estimar difusión de proteínas, en particular, en membranas.

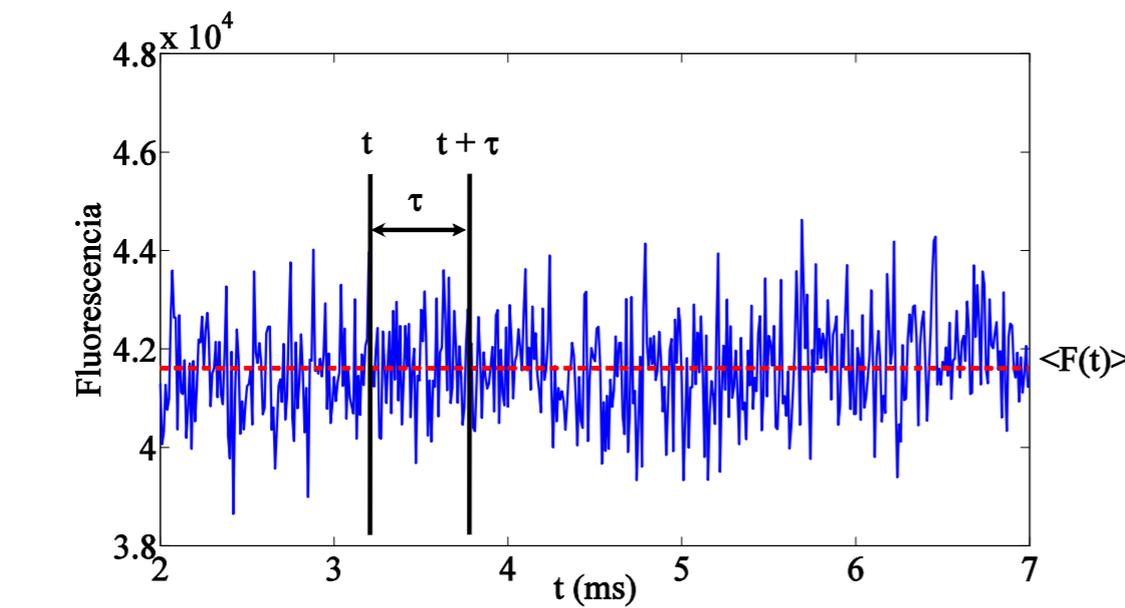
Se expresa una versión fluorescente de la proteína de interés, se fotoblanquea una región (se apaga la fluorescencia allí). La fluorescencia en la región se recupera al entrar nuevas proteínas fluorescentes. A partir del tiempo de recuperación se determina  $D$ .



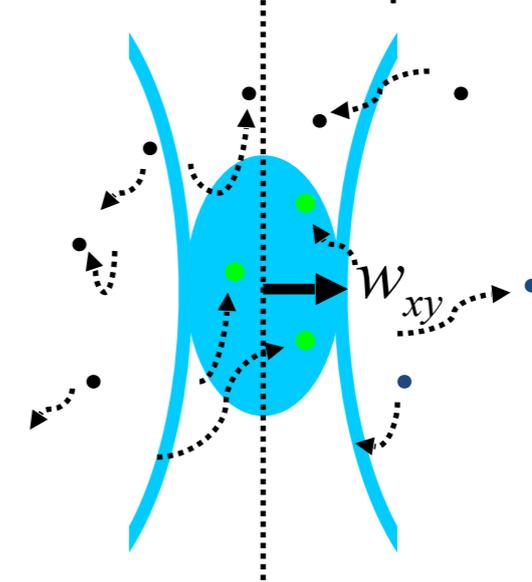
# Otro método

## FCS – Espectroscopía por correlación de fluorescencia

FCS mide la correlación de las fluctuaciones de fluorescencia dentro de un volumen de detección del orden de 1 fl.



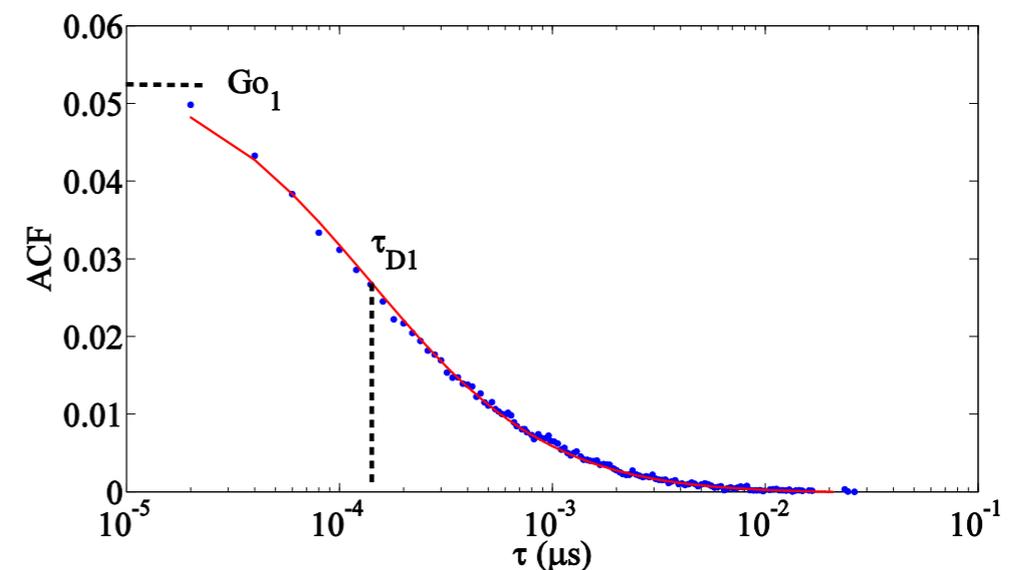
Difusión libre de una especie



Se calcula la auto-correlación de la variación de la fluorescencia:

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

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



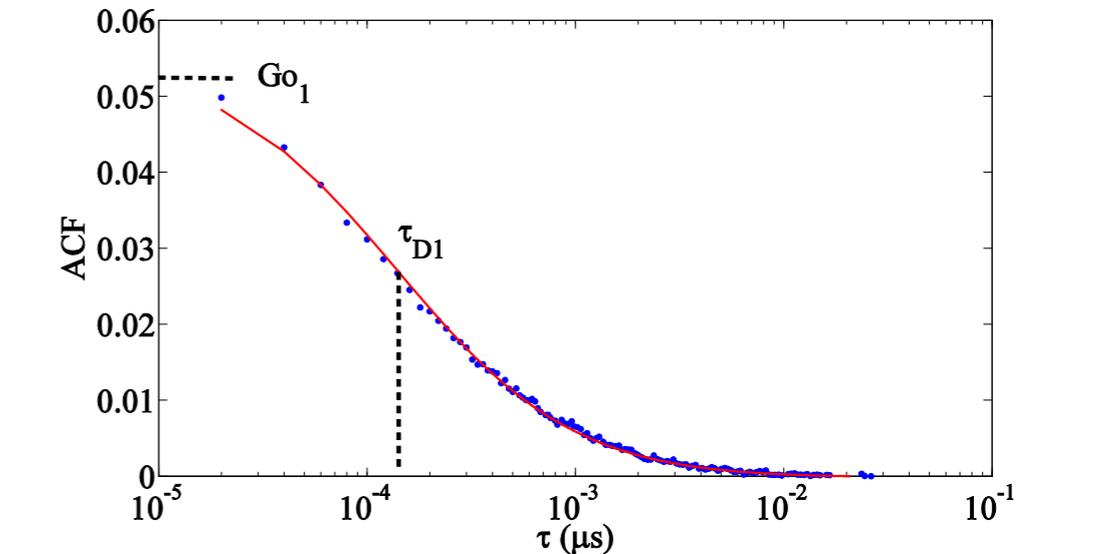
# FCS – difusión libre de partículas sin interactuar

## Difusión libre de una especie

$$G(\tau) = \frac{G_0}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{w^2 \tau_D}}}$$

$$\tau_D = \frac{w_r^2}{4D} \longrightarrow D$$

$$G_0 = \frac{1}{V_{ef} C_{tot}} \propto \frac{1}{N} \longrightarrow C_{tot}$$

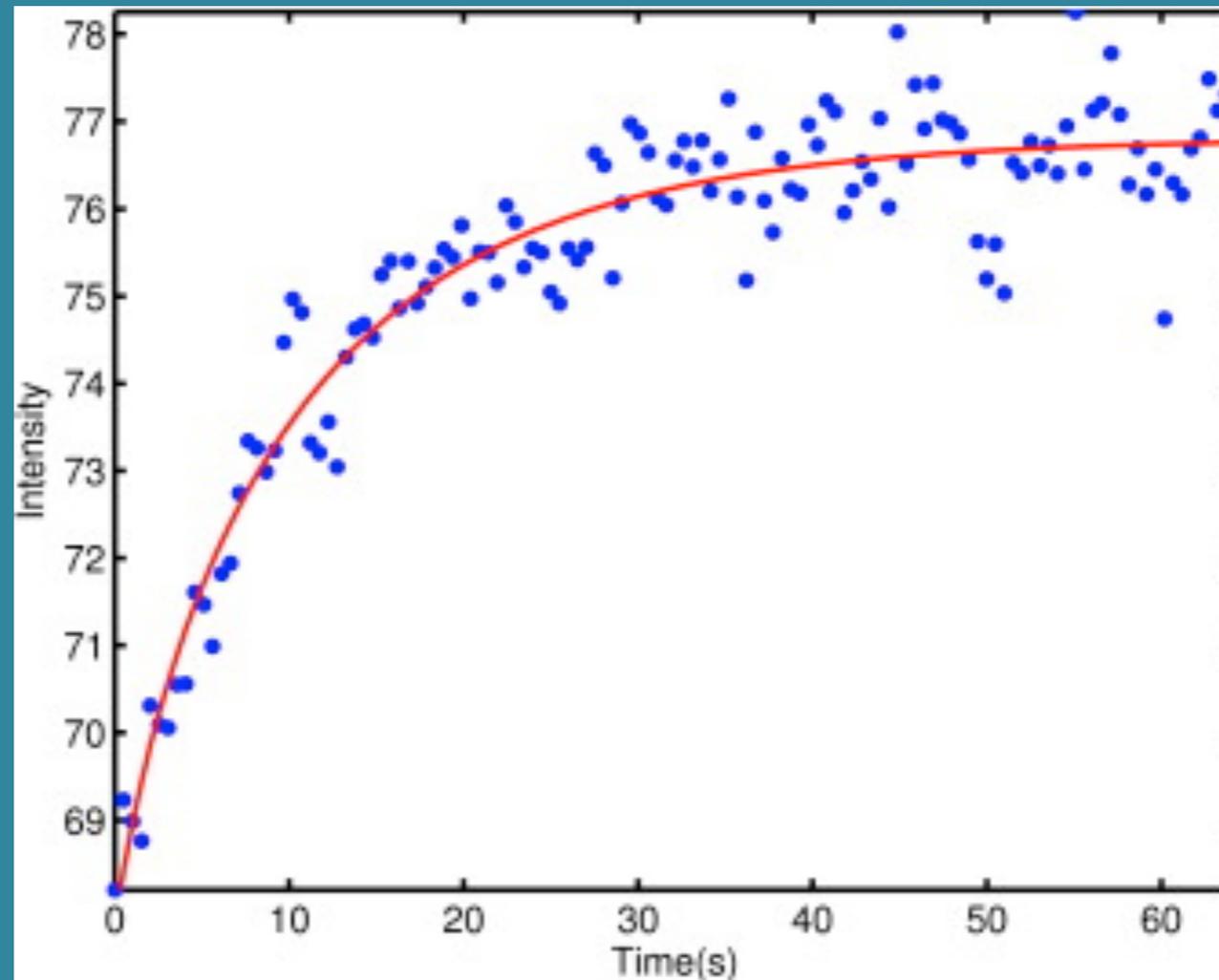


Solución 50 nM TMR-Dex en agua. Azul: experimento, rojo: ajuste

$V_{ef}$  y  $w_r$  son parámetros geométricos del volumen de detección, se determinan mediante una calibración.

**En el caso de varias especies fluorescentes difundiendo la función de correlación es la suma de componentes de esta forma, tantas como especies.**

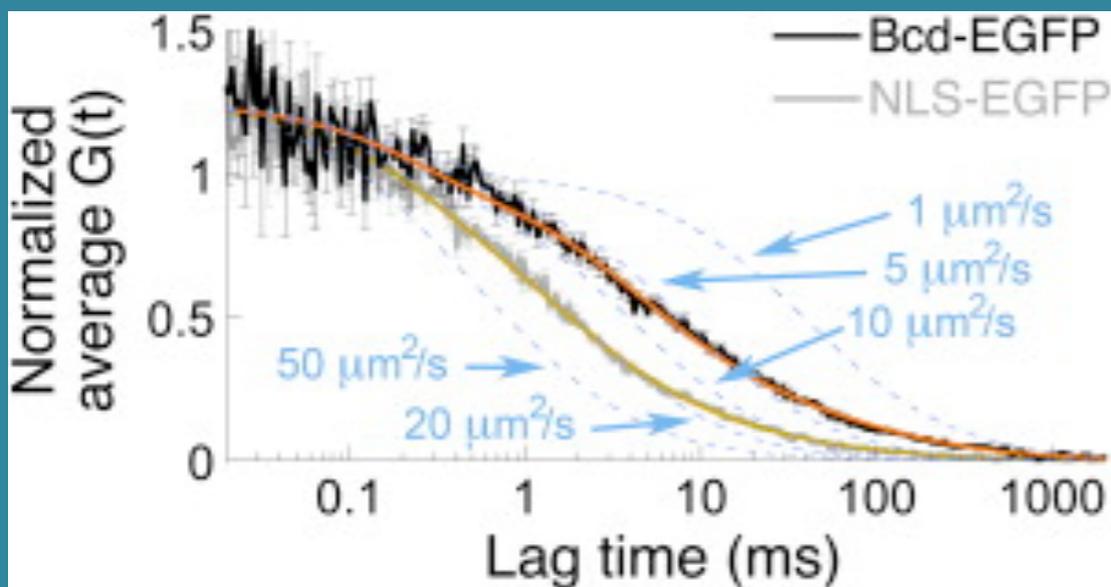
Gregor et al, 2007, hicieron experimentos de FRAP para determinar el coeficiente de difusión,  $D$ , del producto de bicoid.



Curva de recuperación. Da  $D = 0.27 \pm 0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Este valor resulta demasiado pequeño para explicar la formación del gradiente dentro de los 90 minutos posteriores a la fertilización

Abu-Arish et al, 2010 hicieron experimento de FCS para determinar el coeficiente de difusión,  $D$ , del producto de bicoid.



Funciones de autocorrelación normalizadas para Bcd-EGFP y NLS-EGFP en el citoplasma cortical durante la interfase de los ciclos 12-14. Azul: funciones esperadas en el caso de una especie difundiendo para distintos valores de  $D$ .

Intentaron diversos ajustes, los mejores eran de la forma:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \sum_i \frac{F_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\omega^2 \tau_{Di}}}}$$

$i = 2, 3$

Haciendo:

$$D_{Bcd} = \sum_i F_i D_i$$

Obtuvieron:

$$D_{Bcd}^{FCS} \approx [7 - 9] \mu m^2 / s$$

Esgrimieron un problema técnico para explicar la diferencia con FRAP (ellos también hicieron FRAP).

Más adelante vamos a ver una posible explicación para esta (aparente) discrepancia (en la que yo trabajé)

Volvamos a la solución que encontramos para el modelo SDD

$$c_s = \frac{j}{(\alpha D)^{1/2}} \exp\left(-\frac{x}{(D/\alpha)^{1/2}}\right)$$

Esta es una solución estacionaria que se alcanza porque hay una inyección permanente de moléculas (de paseadorxs) y una degradación (un consumo).

Hay muchas otras situaciones en las que las soluciones estacionarias son de interés, no solo cuando hay fuentes sino también sumideros.

Un caso particular interesante es el de suponer que hay una superficie que “absorbe” a los paseadores de modo que sobre los puntos de esa superficie podemos pensar que la concentración es igual a 0. Suponiendo que muy lejos de la superficie la concentración no varía debido a esa absorción, es decir, permanece constante e igual a  $c_0$ , es posible encontrar la solución estacionaria para distintas geometrías.

Por ejemplo, supongamos una esfera absorbente de radio  $a$ . Si bien éste es un problema en 3 dimensiones, como tiene simetría esférica la solución estacionaria solo depende de la coordenada radial,  $r$ , y eso facilita las cuentas.

El laplaciano es:

$$\nabla^2 c = \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dc}{dr} \right)$$

el equivalente en 3 dimensiones de hacer, en el caño de área transversal  $A$ :

$$\nabla^2 c = \frac{1}{A} \frac{d}{dx} \left( A \frac{dc}{dx} \right)$$

Solución estacionaria,  $c_s$ , de  $\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c$  es tal que:  $D\nabla^2 c_s = 0$

y, con simetría esférica:  $\frac{D}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dc_s}{dr} \right) = 0$  o  $\frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dc_s}{dr} \right) = 0$

$$\Rightarrow r^2 \frac{dc_s}{dr} = \text{constante} = A \iff \frac{dc_s}{dr} = \frac{A}{r^2} \Rightarrow$$

$$c_s = -\frac{A}{r} + \text{constante}' = -\frac{A}{r} + B$$

Determinamos la solución fuera de la esfera absorbente ( $r \geq a$ ) usando condiciones de borde:  $c_s(r = a) = 0$   $c_s(r \rightarrow \infty) = c_0$

Esto fija las constantes A y B de la cuenta anterior:

$$c_s(r \rightarrow \infty) = B = c_0 \quad c_s(r = a) = -\frac{A}{a} + B = -\frac{A}{a} + c_0 = 0 \quad A = c_0 a$$

$$\Rightarrow c_s = -\frac{c_0 a}{r} + c_0$$

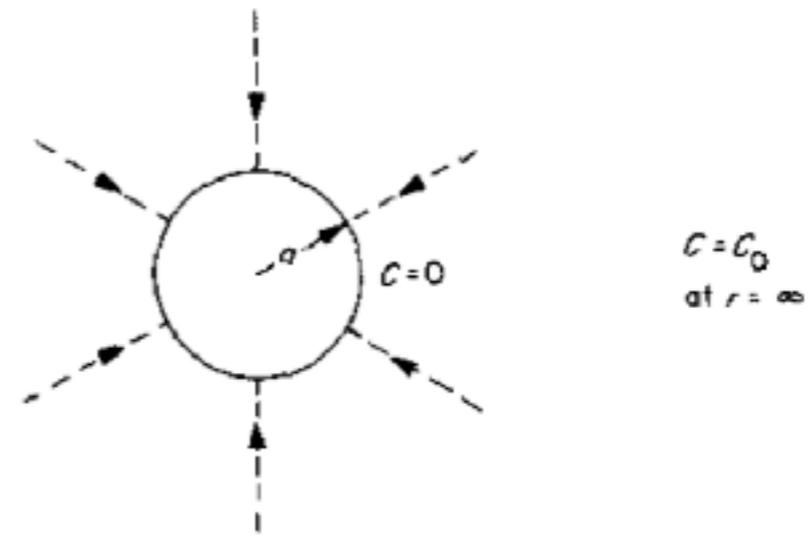
## Notación del libro de Berg:

Solución:

$$C(r) = C_0 \left( 1 - \frac{a}{r} \right).$$

Flujo:

$$J_r(r) = -DC_0 \frac{a}{r^2}.$$



Número de moléculas (paseadoras) por unidad de tiempo que absorbe la esfera de radio  $a$  (es igual al número que llegan a esa esfera por unidad de tiempo, es decir, igual al número de encuentros entre paseadoras y esfera por unidad de tiempo):

$$I = 4\pi DaC_0.$$

Si en lugar de una esfera se tiene un disco absorbente de radio  $s$ , el número absorbido por unidad de tiempo resulta:

$$I = 4DsC_0.$$

O sea, es proporcional a la concentración lejos de la superficie absorbente por el coeficiente de difusión de las moléculas absorbidas por una longitud característica de la superficie absorbente.

Algo más para recordar:

$$[D s] = [\text{long}^2] [\text{long}]/[\text{tiempo}] = [\text{Vol}]/[\text{t}] = 1/([\text{conc}] [\text{t}])$$