



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA JUAN JOSÉ GIAMBIAGI

Estudio de la dinámica y agregación
intracelular de proteínas a partir de
microscopías de fluorescencia

TESIS DE LICENCIATURA EN CIENCIAS FÍSICAS

Ignacio Sallaberry

Directora: Dra. Laura Estrada

2 de Marzo de 2020

Estudio de la dinámica y agregación intracelular a partir de microscopías de fluorescencia

ALUMNO: Ignacio Sallaberry

LU N°: 609/07

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Electrónica Cuántica (LEC) - Departamento de
Física - FCEyN - UBA

DIRECTORA DEL TRABAJO: Dra. Laura Estrada

FECHA DE INICIACIÓN:

FECHA DE FINALIZACIÓN:

FECHA DE EXAMEN:

INFORME FINAL APROBADO POR:

Autor

Jurado

.....

.....

Director

Jurado

.....

.....

Profesor

de Tesis de Licenciatura

Jurado

.....

.....

Resumen

En esta tesis aplicamos técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia al estudio de distintos sistemas de relevancia biológica. Por un lado estudiamos el estado de oligomerización de proteínas a partir del análisis de la distribución de intensidad colectada en cada píxel de la imagen. Aplicamos este método a dos casos de interés actual: la proteína M6a, que se encuentra asociada a la depresión bipolar, la esquizofrenia y fallas en el aprendizaje (entre otros trastornos neuropsiquiátricos); y la proteína de cápside del virus del dengue (C-DENV), causante de la enfermedad viral humana más importante transmitida por mosquitos a nivel mundial.

Por otro lado, estudiamos la dinámica de la proteína C-DENV en células infectadas enfocándonos en dos modelos dinámicos diferentes: un modelo de difusión pura y un modelo de asociación-disociación molecular.

Por último, a partir de experimentos simulados numéricamente, desarrollamos una herramienta basada en estadística que permite distinguir entre ambos modelos.

Índice general

Capítulos	Página
1. Introducción	3
1.1. Motivaciones	3
1.2. Microscopías de fluorescencia	5
1.2.1. Sondas fluorescentes	5
1.2.2. Microscopías de fluorescencia	5
1.2.3. Microscopía confocal	6
1.2.4. El límite de difracción	7
1.3. Algunos enfoques para estudiar procesos intracelulares a partir de microscopías de fluorescencia	8
1.4. Contenidos de la tesis	10
2. Número y Brillo - N&B	11
2.1. Generalidades	11
2.2. Determinación de N y B	14
2.3. Procedimiento experimental para implementar N&B	17
2.3.1. Intensidad del láser	18
2.3.2. Tiempo de permanencia por píxel	18
2.3.3. Cantidad de imágenes	19
2.3.4. Determinación del tamaño de los agregados	20
2.3.5. Distinción de moléculas móviles de inmóviles	21
2.4. Simulaciones N&B	21
2.5. Consideraciones finales	24

3. Estudio de la agregación de proteínas en células vivas por N&B	27
3.1. Caso de estudio 1: Proteína M6a de neuronas de ratón	27
3.1.1. Motivaciones	27
3.1.2. Resultados	30
3.2. Caso de estudio 2: Proteína cápside del Dengue	34
3.2.1. Motivaciones	34
3.2.2. Resultados	36
4. Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia	41
4.1. Generalidades	41
4.2. Espectroscopía de correlación en un punto	43
4.3. Separación de procesos dinámicos	47
4.4. Espectroscopía de correlación de imágenes	48
4.4.1. Adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia por barrido.	49
4.4.2. Cálculo de la correlación espacial	51
4.4.3. Expresión de la función de correlación espacial	52
4.4.4. Escalas temporales	53
4.4.5. Diferenciación de procesos dinámicos mediante RICS	56
5. Estudio de la dinámica de la proteína cápside del virus del dengue	59
5.1. Dinámica de C-DENV estudiada a partir de RICS	59
5.2. Análisis estadístico de los resultados de RICS	62
5.3. Errores tipo I y tipo II y Potencia del test	62
5.4. Estudio de dos procesos dinámicos a partir de simulaciones numéricas	65
Conclusiones	73
Bibliografía	77
Agradecimientos	82

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivaciones

Dentro de una célula existen numerosos procesos que ocurren en distintas escalas espacio temporales. Estos procesos son necesarios para llevar adelante funciones celulares básicas como son la nutrición, reproducción y comunicación con el entorno entre otras importantes funciones. El flujo de iones actúa como señal de activación de muchos mecanismos; el movimiento de motores moleculares permite transportar compuestos desde una región de la célula a otra; el transporte de proteínas entre el núcleo y citoplasma permite regular la actividad de la célula, son solo algunos de los complejos procesos que ocurren en el interior de una célula viva.

En la Figura 1.1 observamos un esquema donde están representados algunos de los procesos presentes en el interior de una célula viva. La imagen es una modificación de la que se encuentra en el trabajo [1].

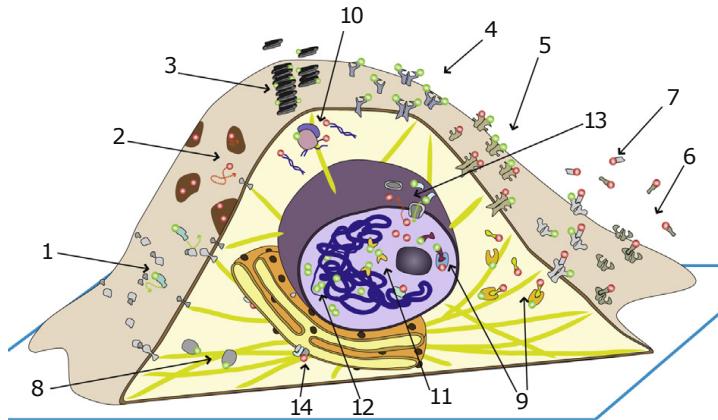


Figura 1.1: *Ejemplo de algunos de los procesos en el interior de una célula viva: difusión de proteínas y lípidos en membrana plasmática (1,2); agregación de péptidos amiloides en membrana plasmática (3); oligomerización de los receptores de membrana (4,5); unión de ligandos a receptores de membrana (6,7); difusión de proteínas en el citoplasma (8); interacciones proteína-proteína en el citoplasma y núcleo (9); interacción de proteínas con pequeñas moléculas de ácido nucleico (10); unión de proteínas a cromatina y ADN nuclear (11); influencia de la arquitectura de cromatina en la difusión de trazadores inertes (12); transporte pasivo o activo de moléculas entre núcleo y citoplasma (13); difusión anómala de complejos proteicos en el retículo endoplasmático (14).*

A través de los años el entendimiento sobre algunos de estos procesos, sus causas y consecuencias, ha ido en aumento. Las preguntas que han motivado los estudios sobre la dinámica intracelular han posibilitado (y lo seguirán haciendo) el entendimiento de numerosas enfermedades junto con la capacidad de prevenir riesgos, hacer diagnósticos tempranos y generar tratamientos efectivos [2–4].

Los experimentos a nivel celular han avanzado notablemente gracias a la tecnología. Es posible hoy en día, en el ámbito de la biología y la física, observar, entender y realizar experimentos *in vivo*. La ventaja de estos comparados con los experimentos *in vitro*, es que no presentan las desventajas de introducir artefactos y distorsiones [5].

Poder realizar mediciones de la cinética y el transporte que rigen los procesos moleculares dentro de una célula viva, da lugar a la necesidad de la creación de modelos que permitan extraer información cuantitativa.

Las microscopías de fluorescencia se han impuesto como poderosas herramientas dada su capacidad para estudiar sistemas vivos, de una forma casi o totalmente no invasiva, con alta resolución temporal.

1.2. Microscopías de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una de las herramientas más utilizadas para estudiar procesos biológicos a nivel molecular y celular [6–8]. Su resolución subcelular y la capacidad para trabajar en sistemas vivos, son las características que hacen de este tipo de microscopías, una herramienta extremadamente útil para dichos estudios. La microscopía de fluorescencia permite la visualización directa de procesos fisiológicos entre los que se incluyen la localización, asociación y dinámica de proteínas entre otros [9]

Durante las últimas décadas, junto con la aparición de nuevas sondas y marcadores fluorescentes [10] han aparecido una variedad de técnicas basadas en distintos aspectos observables a partir de la señal de fluorescencia.

1.2.1. Sondas fluorescentes

La cantidad de técnicas basadas en la detección de la fluorescencia ha crecido enormemente junto con la capacidad de marcar sitios específicos dentro de una célula.

Los marcadores fluorescentes o fluoróforos, son muy utilizados como sondas de prueba y permiten obtener información espacial y temporal tanto del sistema biológico como de su entorno [11]. Hoy en día existe una gran variedad de fluoróforos sintéticos de distintos tamaños y con diversas propiedades. Algunos permiten marcar estructuras celulares específicas mientras que otros sirven para reportar funciones celulares como cambios de concentraciones. El advenimiento de proteínas fluorescentes genéticamente codificadas ha permitido marcar una enorme cantidad de componentes intracelulares y medir tanto su localización, distribución, así como su dinámica.

1.2.2. Microscopías de fluorescencia

Algunos de los tipos de microscopías basadas en la fluorescencia más utilizadas en los laboratorios de biofísica pueden ser la microscopía de campo amplio o *Wide-Field*, multifotónica (dos o tres fotones) y confocal entre otras [12]. Cada una presenta ventajas y desventajas

respecto a las demás, ya sea por la resolución espacial o temporal, por el nivel de daño a la muestra biológica o en cuanto a los costos que requiere para su mantenimiento e implementación.

Los experimentos realizados en el marco de esta tesis, fueron llevados a cabo mediante microscopía de fluorescencia confocal. Por este motivo, en la siguiente sección se hace una breve descripción de los conceptos básicos de la microscopía confocal.

1.2.3. Microscopía confocal

Hoy en día los microscopios confocales son ampliamente utilizados para estudiar una gran variedad de procesos biológicos en tiempo real y existe una enorme cantidad de técnicas que se han desarrollado en base a este tipo de microscopía.

Brevemente, en un microscopio confocal de barrido, se ilumina la muestra utilizando el haz de un láser enfocado por una lente objetivo de alta apertura numérica. Esto permite concentrar la excitación en el plano xy en tamaños más pequeños que los obtenidos iluminando con otras fuentes de luz. La capacidad de la lente objetivo para enfocar en el eje z , es decir en la dirección de propagación del haz, es menor y esto conlleva a que la sección de iluminación de la muestra en esta dirección entre 3 y 5 veces más grande que en el plano de la muestra. Para aumentar la resolución en la dirección axial se utiliza una pequeña abertura o *pinhole* posicionado en el plano conjugado de la lente objetivo de forma tal de reducir la fluorescencia colectada proveniente de planos por encima y por debajo del plano focal [13,14]. En la imagen 1.2 observamos el efecto de variar la apertura confocal (imagen tomada de [15]).

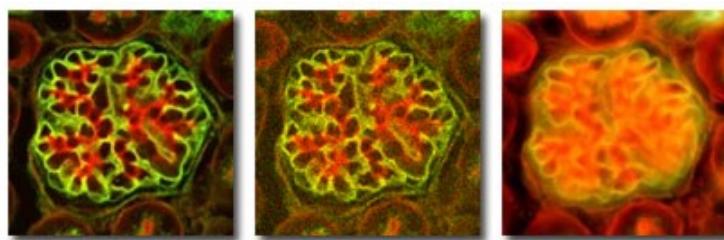


Figura 1.2: Comparación entre distintos tamaños de la apertura confocal, donde de izquierda a derecha se va abriendo el tamaño de la apertura confocal. Izq: apertura optimizada (1 AU). Medio: imagen menos nítida debido a un aumento de la apertura confocal. Der: Apertura confocal totalmente abierta.

En la Figura 1.3 se muestra de manera esquemática las regiones de excitación (o iluminación) y de detección (u observación) propias de un microscopio confocal. La región de excitación (delimitada por la línea negra en el esquema) está determinada por la capacidad de la lente objetivo para enfocar el haz y por las características del haz del láser para propagarse en el medio. En cambio la región de detección (delimitada por la línea verde) está determinada por el tamaño y la posición de la abertura confocal. De este modo el volumen de detección es una región reducida en altura del volumen de excitación. Esta propiedad de reducir el volumen de detección es característica de la microscopía confocal y permite aumentar la resolución espacial axial respecto de un microscopio de fluorescencia de campo amplio.

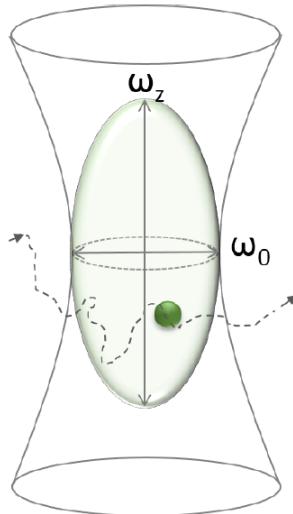


Figura 1.3: *Volumen de excitación (en línea negra) y volumen de observación (verde) en un microscopio confocal. La fluorescencia detectada proviene sólo de las moléculas que se encuentran dentro del volumen de observación, de dimensiones ω_0 y ω_z en las direcciones lateral y axial respectivamente.*

1.2.4. El límite de difracción

La limitación de los microscopios para poder resolver estructuras a escala molecular está dada por el límite de difracción de la luz. Esto fue por primera vez propuesto por el científico alemán Ernst Abbe en 1873 [16], quien lo describió mediante la relación:

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.1)$$

Donde λ es la longitud de onda de la fuente de iluminación y NA es la apertura numérica de la lente objetivo con la que se enfoca el haz. Cuando se ilumina un objeto brillante por debajo del tamaño de d , la imagen de ese objeto es un patrón que está dado por la interferencia de la luz con el objeto iluminado. Ese patrón consiste en discos concéntricos con un máximo central conocido como disco de Airy [17, 18] cuyo tamaño es d . Esto implica que un microscopio óptico no puede resolver objetos que estén más cercanos que esa distancia y que cualquier objeto más pequeño se verá de ese tamaño.

La dispersión de la luz producida por un objeto puntual también se conoce como función de dispersión de punto, o PSF por sus siglas en inglés. Los objetivos de microscopio modernos alcanzan aperturas numéricas entre 1.4 - 1.6, de modo que considerando $\lambda = 500$ nm para luz verde por ejemplo, el tamaño de la PSF es de aproximadamente 250 nm (sin considerar aberraciones ni otras imperfecciones en la óptica). La función matemática $W(\vec{r})$ que describe la PSF depende de la iluminación, es decir que varía dependiendo el tipo de microscopio utilizado.

$$W(\vec{r}) = e^{-2(x^2+y^2)/\omega_0^2} e^{-2z^2/\omega_z^2} \quad (1.2)$$

En la expresión 1.2 presentamos la función que describe la PSF para el caso de un microscopio confocal. En este caso, $W(\vec{r})$ corresponde a una función Gaussiana en las tres dimensiones, donde ω_0 y ω_z son las distancias en las que la función decae a $1/e^2$ en las direcciones lateral y axial respectivamente. Finalmente, integrando la función que describe la PSF en todo el espacio y normalizándola, obtenemos una expresión analítica para el volumen de observación:

$$V_{obs} = \frac{\left[\int_V W(\mathbf{r}) dV \right]^2}{\int_V W(\mathbf{r})^2 dV} = \pi^{3/2} \omega_0^2 \omega_z \quad (1.3)$$

1.3. Algunos enfoques para estudiar procesos intracelulares a partir de microscopías de fluorescencia

Los procesos que ocurren en el interior celular lo hacen en distintas escalas espacio temporales. En los últimos años, se han desarrollado diferentes técnicas en el campo de la microscopía

de fluorescencia que permiten extraer información de cada una de estas dinámicas [19, 20].

La técnica conocida como número y brillo (N&B por sus siglas en inglés) está basada en el análisis de los momentos para la determinación del número promedio de moléculas y brillo en cada píxel de imágenes de fluorescencia [21, 22]. La posibilidad de detectar y cuantificar las interacciones entre proteínas con buenas resoluciones espaciales y temporales en células vivas es crucial en biología. En este sentido N&B es un enfoque poderoso que permite detectar la interacción entre proteínas y obtener información del estado oligomérico del sistema. Proporciona información píxel por píxel sobre estos estados y la ubicación de los mismos dentro de la célula.

Otro caso son las técnicas conocidas como espectroscopías de correlación (o FCS por sus siglas en inglés). En esta familia de técnicas, se mide la intensidad de fluorescencia en una o varias regiones de la célula. La difusión de las moléculas a través de la región observada genera fluctuaciones en la intensidad que se detectan a lo largo del tiempo. A partir de la correlación temporal de la intensidad de fluorescencia se puede extraer información de la dinámica que gobierna el sistema. Las espectroskopías de correlación tienen una resolución temporal desde los microsegundos a los milisegundos, razón por la cual son especialmente interesantes para estudiar difusión de moléculas pequeñas que difunden rápidamente. Por último, cabe destacar que las técnicas basadas en FCS son modelo dependiente, es decir que la dinámica que se quiere observar va a depender del proceso que esté ocurriendo de fondo en el sistema que estemos estudiando.

Si bien los dos enfoques presentados son distintos, ambos están basados en el estudio de imágenes de fluorescencia. Debemos resaltar que dado un conjunto de imágenes, podemos aplicar tanto la técnica de N&B como algunas de las técnicas asociadas a FCS y así obtener información tanto del estado oligomérico del sistema como de la dinámica del mismo. Cada uno de estos enfoques tiene sus ventajas, y el más apropiado dependerá de la pregunta específica que se persigue, el sistema que se está estudiando y el instrumental disponible. Los dos enfoques requieren que las fluctuaciones de intensidad registradas sean lo más grandes posibles. Dado que las fluctuaciones relativas aumentan al disminuir la cantidad de moléculas, es importante mantener en promedio un número pequeño de moléculas simultáneamente en el volumen de observación. Esto puede hacerse por dilución de la muestra y/o reduciendo

el volumen de observación. Esto lo logramos usando el microscopio confocal el cual permite obtener volúmenes $\sim 1 \mu\text{m}^3 = 1 \text{ fl}$

1.4. Contenidos de la tesis

En esta tesis aplicamos técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia para el estudio de dos sistemas de relevancia biológica. Por un lado realizamos un estudio basado en la técnica de N&B, sobre el estado de oligomerización de la proteína M6a asociada a trastornos neuropsiquiátricos como la bipolaridad, la esquizofrenia y el Alzheimer. Luego repetimos este análisis sobre la proteína cápside del virus del dengue. Posteriormente estudiamos la dinámica de esta última proteína en células durante el proceso de infección, concentrándonos en dos modelos diferentes: un modelo de difusión pura y un modelo de asociación-disociación. Para esto estudiamos y aplicamos una de las técnicas de FCS, Espectroscopía de Correlación de Imágenes de Barrido (RICS), en células infectadas con la proteína cápside de dengue. Por último, mediante simulaciones, desarrollamos una herramienta basada en estadística que permita distinguir entre ambos modelos.

En el **Capítulo 2** realizamos una introducción general a la técnica N&B, incluyendo el desarrollo de las bases teóricas y presentando dos casos de interés estudiados mediante simulaciones numéricas.

En el **Capítulo 3** presentamos el análisis del estado de oligomerización para dos casos de relevancia biológica: la proteína M6a y la proteína cápside del virus del dengue.

La descripción de la Espectroscopía de correlación (FCS) y un desarrollo detallado de la técnica RICS utilizada para el estudio de la dinámica de la proteína cápside del dengue la realizamos en el **Capítulo 4**.

Los resultados de la técnica de espectroscopía de correlación de imágenes de barrido para la proteína cápside de dengue los exponemos en el **Capítulo 5**. Además presentamos una herramienta estadística, la cual fue desarrollada mediante simulaciones numéricas.

Por último, en el Capítulo **Conclusiones** exponemos las conclusiones de este trabajo junto con las perspectivas que se abren a partir de los resultados obtenidos.

Capítulo 2

Número y Brillo - N&B

En este capítulo se presentará la técnica *N&B* la cual permite obtener información del estado agregación de moléculas fluorescentes. Presentaremos el marco teórico de esta técnica junto con algunas características principales. Por último, mediante el uso de simulaciones, mostraremos el uso de *N&B* para la diferenciación entre moléculas monoméricas y oligoméricas.

2.1. Generalidades

Las métodos basados en el análisis de las fluctuaciones de la señal de fluorescencia están siendo cada vez más utilizados para el estudio cuantitativo de sistemas biofísicos. La técnica de Número y Brillo (o Number & Brightness *N&B* por sus siglas en inglés) pertenece a esta familia de métodos [21] y permite la observación de procesos de agregación molecular a partir del cálculo de los momentos de la distribución de intensidad colectada.

Dado un conjunto de valores x_k , se llama momento muestral de orden r , m_r , respecto de a , a la siguiente medida:

$$m_r = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (x_k - a)^r \quad (2.1)$$

donde n es la cantidad total de datos. Cuando $a = 0$ se habla de momentos respectos del origen. Si $a = \bar{x}$ se dice que son momentos respecto del valor medio. El valor medio es el momento de primer orden ($r = 1$) respecto del origen ($a = 0$), mientras que la varianza

es el momento de segundo orden ($r = 2$) respecto del valor medio ($a = \bar{x}$). Ha sido reportado previamente que el grado de agregación de moléculas marcadas fluorescentemente puede obtenerse a partir del valor medio y la varianza de la distribución de intensidad de fluorescencia.

Supongamos dos situaciones como las esquematizadas en la Figura 2.1. En el panel izquierdo se dibujaron muchos puntos *pequeños* mientras que en el panel derecho pocos puntos *grandes*. Esta manera de dibujar puntos de diferentes tamaños será nuestra manera esquemática de indicar el brillo (definido como la cantidad de fotones emitidos por unidad de tiempo por molécula) de una especie molecular, donde puntos *pequeños* indicarán moléculas poco brillantes y puntos *grandes* moléculas muy brillantes.

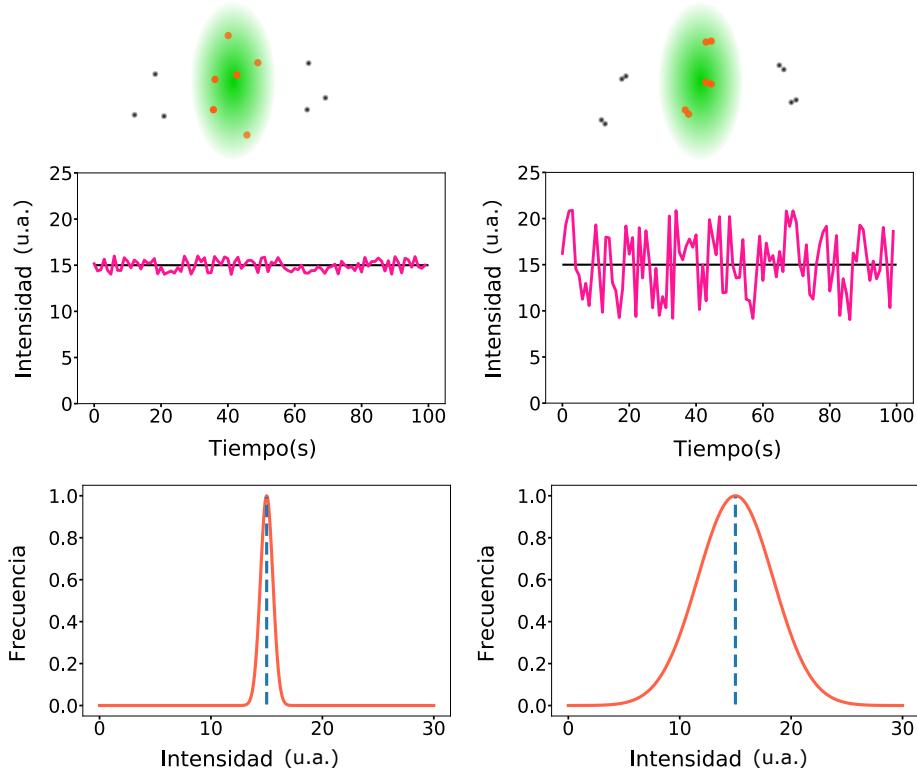


Figura 2.1: *Esquema de dos situaciones distintas donde se registra la misma intensidad promedio. Arriba: moléculas fluorescentes difunden libremente, al atravesar el volumen iluminado por el haz (región verde) emiten y su fluorescencia es detectada. Medio: Fluorescencia medida durante el experimento esquematizado arriba. Las fluctuaciones en la intensidad son menores al aumentar la concentración de moléculas en el volumen de observación. Abajo: Distribución de las intensidades medidas. En ambos casos esquematizados, la intensidad media se conserva mientras que la varianza de la distribución aumenta con el aumento de las fluctuaciones de intensidad. Los casos esquematizados representan una región con una concentración alta de moléculas poco brillantes (o monómeros) a la izquierda, y una región con una concentración baja de moléculas muy brillantes (oligómeros) a la derecha.*

El brillo molecular puede depender de muchos factores como: la especie molecular, la longitud de onda de excitación, la eficiencia cuántica de fluorescencia de la especie, y el entorno molecular entre otros. El caso más sencillo es aquel en el cual se tiene una única especie molecular inmersa en un mismo entorno, por ejemplo, el estudio de una única proteína en el interior celular. En ese caso, un aumento del brillo (en la cantidad de fotones emitidos por la proteína por unidad de tiempo) indica un aumento en el tamaño de la proteína, o mejor dicho, la formación de un agregado proteico.

Como puede verse en los casos esquematizados en la Figura 2.1, si bien el valor medio de señal de intensidad medida es el mismo en ambos casos, la distribución de intensidad en el caso A (muchas moléculas poco brillantes) tiene una varianza mucho mas pequeña que en el caso B (pocas moléculas muy brillantes). Por lo tanto, es posible distinguir regiones compuestas por muchas moléculas tenues de regiones con pocas moléculas brillantes. Una vez que se fija el promedio, cuanto mayor es la varianza, menos moléculas contribuyen al promedio [23].

Como se explicó anteriormente, la determinación del valor medio y la varianza de una distribución de intensidades permite distinguir regiones compuestas por moléculas de diferente grado de agregación. Si en vez de medir la fluorescencia en una única posición de una muestra hacemos un barrido con el haz de excitación, el mismo análisis podría aplicarse a una secuencia de imágenes de fluorescencia distinguiendo píxeles con muchos agregados pequeños (o moléculas tenues) de píxeles con pocos agregados grandes (moléculas brillantes).

La agregación de proteínas es uno de los temas últimamente más debatidos en biofísica y bioquímica debido a la relación que se ha encontrado entre este fenómeno y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Algunas de las patologías asociadas a la agregación de proteínas son el Alzheimer, Parkinson, Huntington, y la diabetes tipo II entre otras. Actualmente millones de personas se ven afectadas por estas enfermedades, y se prevé que el número afectado por estas patologías irá en aumento. Es claro entonces que la posibilidad de identificar agregados de proteínas es de gran interés.

2.2. Determinación de N y B

El enfoque de la técnica N&B para obtener el número y brillo de moléculas, está basado en el cálculo de los momentos de primer y segundo orden de la distribución de intensidad. Estos son el valor medio de la intensidad $\langle k \rangle$ y la varianza σ^2 respectivamente [21].

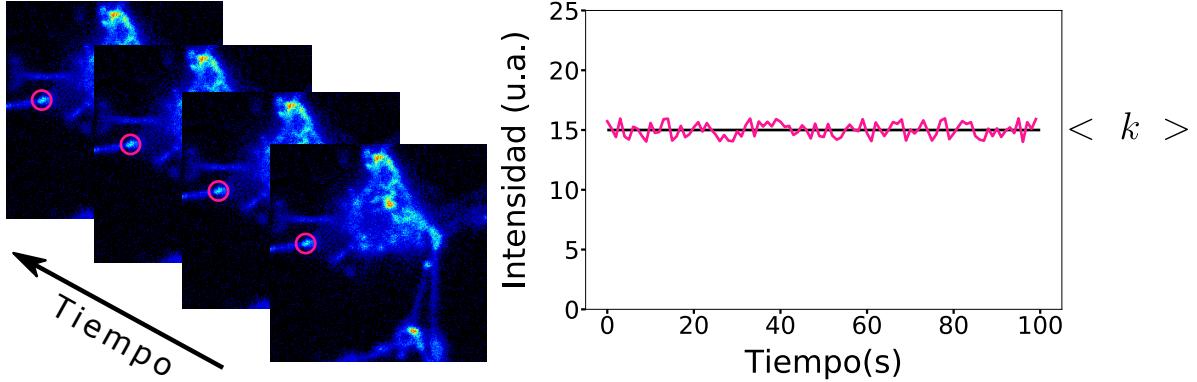


Figura 2.2: Procedimiento para el cálculo del valor medio de intensidad $\langle k \rangle$ para la técnica N&B. Izquierda: Conjunto de imágenes adquiridas a tiempos sucesivos. El círculo rojo resalta una misma zona en cada imagen. Derecha: Fluctuaciones de intensidad a lo largo del tiempo para la región resaltada.

En la Figura 2.2 mostramos el procedimiento para calcular el valor medio de la intensidad. Observamos que dada una secuencia de K imágenes tomadas a lo largo del tiempo, podemos registrar las fluctuaciones en un mismo píxel de cada imagen. Luego calculamos el valor medio de la intensidad en ese píxel, sumando las intensidades a lo largo del tiempo y dividiendo por el total de imágenes, tal como se muestra en la ecuación 2.2:

$$\langle k \rangle = \frac{\sum_i k_i}{K} \quad (2.2)$$

donde k_i es el valor de la intensidad del píxel en la i -ésima imagen ($1 \leq i \leq K$). Para el mismo píxel calculamos el momento de segundo orden de la distribución de intensidad como:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_i (k_i - \langle k \rangle)^2}{K} \quad (2.3)$$

Es posible demostrar que la varianza en los datos σ^2 tiene dos términos [23]. Un término debido a las fluctuaciones en el número medio de moléculas en la región de análisis, σ_n^2 , y otro término debido a la naturaleza estocástica del proceso de detección, σ_d^2 , efecto conocido como *shot noise* [24].

$$\sigma^2 = \sigma_n^2 + \sigma_d^2 \quad (2.4)$$

El valor medio de la intensidad y los términos de la varianza se pueden expresar en términos de otras dos cantidades. Por un lado el número medio de moléculas dentro del volumen de observación, n . Por otro lado el brillo molecular ϵ , definido como el número de fotones emitidos por segundo por molécula.

Por lo tanto, el valor medio de la intensidad medida no es otra cosa que el producto entre el brillo molecular y el número medio de moléculas (2.5). La varianza debido al proceso de detección, σ_d^2 , al ser un proceso intrínsecamente Poissoniano es igual al valor medio de la intensidad (2.6); mientras que la varianza debido al cambio en el número medio de moléculas en el volumen de observación, σ_n^2 , es proporcional al cuadrado del brillo molecular (2.7);

$$\langle k \rangle = \frac{\sum_i k_i}{K} = \epsilon n \quad (2.5)$$

$$\sigma_d^2 = \epsilon n \quad (2.6)$$

$$\sigma_n^2 = \epsilon^2 n \quad (2.7)$$

A partir de un conjunto de imágenes, uno no sabe en principio la cantidad de moléculas en cada región. Por este motivo, *N&B* extrae un valor de brillo y de número promedio

de moléculas por píxel que define como *aparentes*. De este modo, el brillo aparente B y el número de moléculas aparente N , están dados por la relación entre la varianza y el valor medio de la intensidad; y por la relación entre el cuadrado del valor medio de la intensidad y la varianza:

$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} = \frac{\epsilon n}{\epsilon + 1} \quad (2.8)$$

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} = \frac{\sigma_n^2}{\langle k \rangle} + \frac{\sigma_d^2}{\langle k \rangle} = \frac{\epsilon^2 n}{\epsilon n} + \frac{\epsilon n}{\epsilon n} = \epsilon + 1 \quad (2.9)$$

El valor de B , está relacionado con el brillo molecular y es independiente del número medio de moléculas. Por otro lado, N es directamente proporcional al número medio de moléculas.

La ventaja de un análisis de este tipo es que permite crear un mapa (una imagen) de B y N píxel por píxel, lo que resulta en la localización de agregados de distintos tamaños, de distinto valor de B , (siempre y cuando se encuentren en distintos píxeles).

No solo es posible determinar la localización de los agregados, sino que es posible a su vez determinar su tamaño (determinar la cantidad de moléculas que lo componen).

En la Figura 2.3 se presenta un esquema de la implementación de la técnica de $N\&B$ la cual es muy sencilla y no requiere de instrumental sofisticado. La secuencia de pasos puede resumirse en cuatro etapas:

- Se adquiere un conjunto de imágenes consecutivas sin variar la zona de muestreo. Típicamente 100 imágenes de 256x256 píxeles son suficientes para tener una relación señal/ruido razonables.
- Para cada píxel de las imágenes se calcula el histograma de intensidad de fluorescencia colectada. Al final de este proceso se habrán obtenido tantos histogramas de intensidad como píxeles en una imagen (65536 histogramas en el caso de imágenes de 256x256) donde cada histograma contendrá tantos puntos como imágenes adquiridas (100 en

este caso).

- Se determina el valor medio y la varianza de cada uno de los histogramas.
- A partir del valor medio y la varianza calculados en cada píxel de las imágenes, y haciendo uso de las expresiones 2.8 y 2.9, se calcula el número de moléculas N y el brillo B en cada píxel de la imagen.

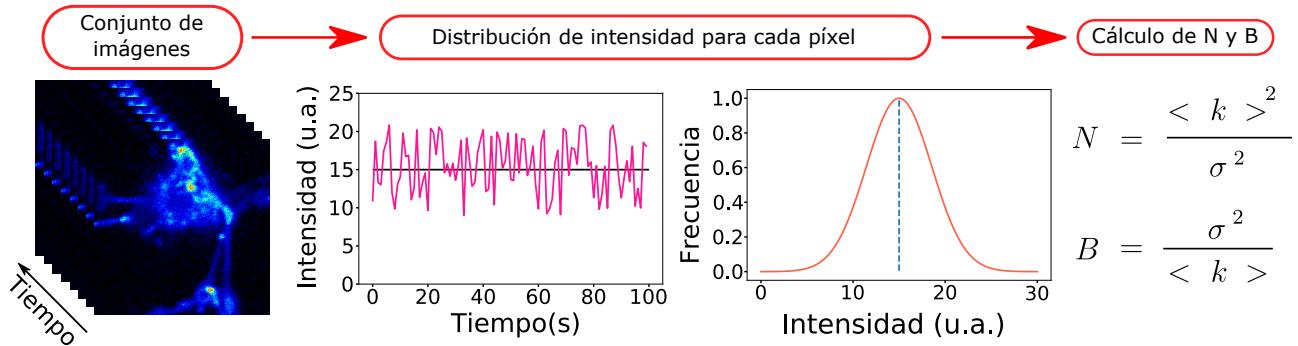


Figura 2.3: Esquema de la implementación de $N\&B$. Se adquiere un conjunto de imágenes. Se calcula el valor medio de la intensidad y la varianza en cada píxel de la imagen. Se determina el número aparente de moléculas N y el brillo aparente B píxel por píxel.

2.3. Procedimiento experimental para implementar N&B

La implementación de $N\&B$ se basa en el análisis de la distribución de intensidad en cada píxel de una imagen lo cual permite recuperar el número y el brillo de las partículas presentes en el volumen de observación. El brillo depende de la intensidad del láser de excitación así como del tiempo de permanencia del haz por píxel; por lo tanto, estos parámetros son muy importantes y deben elegirse cuidadosamente durante el experimento. Otros factores importantes son la cantidad de imágenes adquiridas durante un experimento [23].

A continuación se presentan algunas consideraciones experimentales importantes para la correcta implementación de $N\&B$.

2.3.1. Intensidad del láser

La intensidad de luz detectada depende entre otros factores de la potencia del láser utilizado. Por lo tanto, el brillo aparente B calculado por $N\&B$ se encuentra asociado a la potencia incidente.

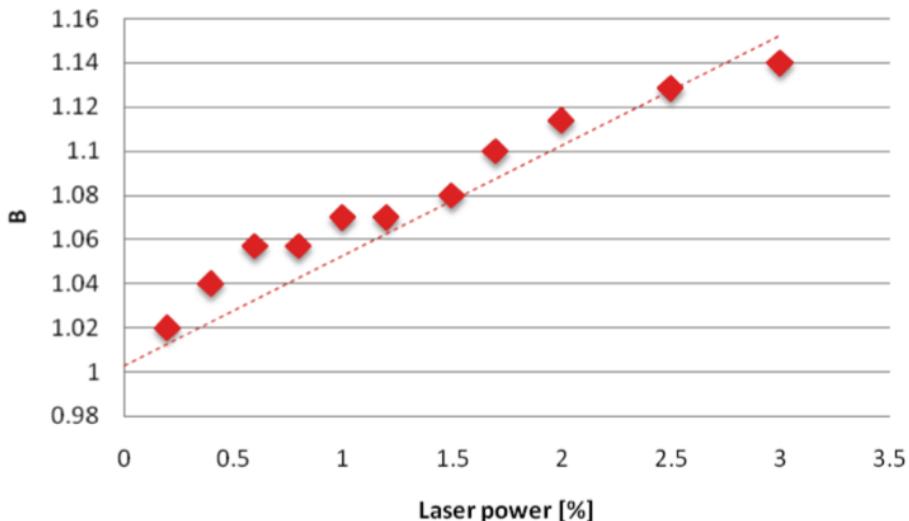


Figura 2.4: Relación entre el brillo B y la potencia nominal incidente del láser de excitación, de una célula transfectada con EGFP.

En la Figura 2.4 (tomada de [23]) observamos dicha relación, cuya dependencia se espera sea lineal mientras que no haya fotodegradación de la sonda fluorescente.

2.3.2. Tiempo de permanencia por píxel

En una imagen de barrido, el tiempo de permanencia del haz de excitación en cada píxel, t_p , es un parámetro de importancia debido a que $N\&B$ está basada en el análisis de las fluctuaciones de la intensidad.

Dependiendo del caso de estudio, el tiempo de permanencia por píxel típico se encuentra entre los $4\ \mu\text{s}$ y los $40\ \mu\text{s}$. Hay que tener en consideración que si el tiempo por píxel es muy grande, las fluctuaciones son promediadas y la varianza se verá reducida, logrando así que las moléculas parezcan estar en mayor cantidad y con menos brillo. Por otro lado, el tiempo por píxel no debe ser muy chico debido a que es necesario medir con precisión las fluctuaciones.

El tiempo por píxel para medir fluctuaciones en una solución es de $4\ \mu\text{s}$, mientras que para medir fluctuaciones en una célula debe estar entre $10\ \mu\text{s}$ y $20\ \mu\text{s}$.

Esto se puede entender a partir de la Figura 2.5, en la cual se graficó la típica curva de la función de correlación temporal para un proceso difusivo. El tiempo característico, τ_c , se define como aquel valor para el cual la amplitud decae a la mitad del valor inicial.

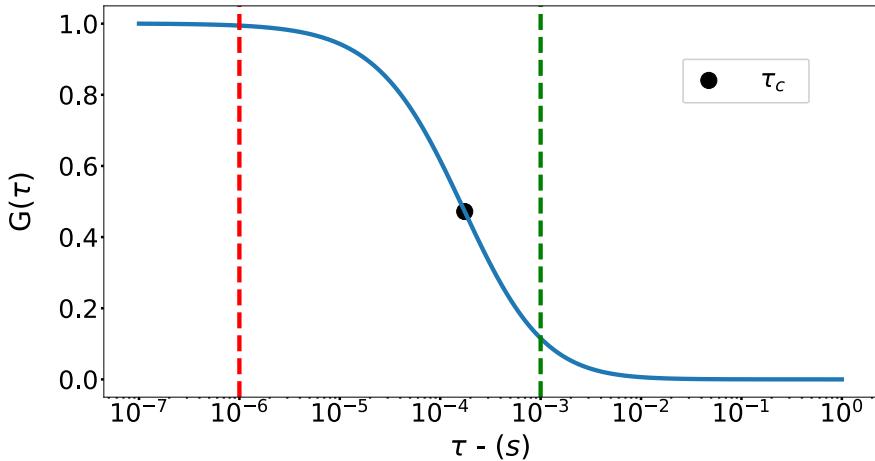


Figura 2.5: Comparación entre el tiempo de adquisición, t_p , y el tiempo de correlación del proceso τ_c . Curva de correlación temporal típica para un experimento difusivo (azul). El tiempo característico (τ_c marcado con punto) es aquél donde la amplitud decae a la mitad del valor inicial. Si $t_p \ll \tau_c$, caso rojo, será posible recuperar el τ_c . Por el contrario si $t_p > \tau_c$, caso verde, las fluctuaciones estarán promediadas y, por lo tanto, no será posible recuperar el τ_c .

Para poder estudiar un proceso con un dado τ_c es necesario que el tiempo de adquisición por píxel sea menor que tiempo característico ($t_p \ll \tau_c$) para poder observar las fluctuaciones de la señal. De lo contrario las fluctuaciones estarán promediadas y la función de correlación dará cero.

2.3.3. Cantidad de imágenes

La precisión de $N\&B$ crece al aumentar la estadística sobre la distribución de intensidad. El error en la determinación del valor medio de la intensidad y de la varianza decrece como la raíz cuadrada del número de mediciones independientes. Es decir, que cuantas más imágenes se tomen, mejor será la distribución de intensidad y por lo tanto mejora el cálculo de B . Sin embargo, es importante tener en cuenta que un tiempo de adquisición largo puede llegar

a incluir otras fluctuaciones, no debido a moléculas que entran y salen del volumen de observación, sino debido a la dinámica propia de la célula ó efectos de *bleaching* sobre los fluoróforos.

Dado que las ecuaciones de N&B no consideran este tipo de fluctuaciones, es importante adquirir una cantidad de imágenes que permita ampliar la estadística para el cálculo de B, pero que a su vez, minimice las fluctuaciones indeseadas. Típicamente la adquisición de 100 imágenes (~ 100 segundos) permite obtener una buena estadística al reducir el movimiento de la célula y limitando los efectos indeseados del láser sobre la muestra.

2.3.4. Determinación del tamaño de los agregados

Para determinar el tamaño del agregado primero debemos determinar el brillo de la sonda fluorescente utilizada en la marcación de la proteína de interés. Esto se hace a partir de la medición de una solución de la sonda en algún estado oligomérico conocido. Dado que para algunos marcadores fluorescente su brillo puede depender muy fuertemente del entorno [11] es necesario hacerlo en las mismas condiciones (o en las más parecidas posible) en las cuales se realizará luego el experimento de interés. En los casos mostrados en esta tesis se optó por medir la sonda citoplasmática: proteína fluorescente roja, RFP, para los experimentos en M6a, y mCherry para los experimentos en cápside.

Es importante recalcar que dado que el brillo depende de la intensidad de excitación, una vez determinado el brillo de la sonda fluorescente, la potencia del láser debe mantenerse constante durante todo el experimento. En este caso, y solo en este caso, el brillo de un dímero será dos veces el brillo de un monómero y así sucesivamente. El tamaño del oligómero quedará determinado a partir de la medición del brillo:

$$\text{Tamaño del oligómero} = \frac{B_{\text{oligómero}} - 1}{B_{\text{monómero}} - 1} = \frac{\epsilon_{\text{oligómero}}}{\epsilon_{\text{monómero}}} \quad (2.10)$$

2.3.5. Distinción de moléculas móviles de inmóviles

Por moléculas inmóviles nos referimos a moléculas que se mueven suficientemente lento como para permanecer dentro del volumen de observación durante el tiempo de adquisición. Las móviles en cambio, tienden a salir (o incluso salir y volver a entrar) del volumen de observación durante la adquisición. La técnica *N&B* está basada en las fluctuaciones de intensidad, por lo tanto para el cálculo de B necesitamos distinguir las moléculas inmóviles de las móviles [22]. La fracción de moléculas inmóviles tienen un brillo aparente $B = 1$, porque la única variación de la señal está dada por el *shot noise*. Además su brillo es independiente de la potencia del láser de excitación, mientras que el brillo B de la fracción móvil depende de la potencia utilizada. Por lo tanto, variando la potencia del láser, es posible distinguir la fracción inmóvil de la móvil. Esta característica de *N&B* es importante para la interpretación de los datos.

$$\sigma_n^2 = 0 \Rightarrow B = \frac{\sigma_k^2}{\langle k \rangle} + \frac{\sigma_d^2}{\langle k \rangle} = \frac{0}{\epsilon n} + \frac{\epsilon n}{\epsilon n} = 1 \quad (2.11)$$

2.4. Simulaciones N&B

Para comprender mejor los alcances y limitaciones de la técnica, simulamos imágenes a las que les aplicamos luego el análisis de *N&B*. Para las simulaciones utilizamos un programa comercial simFCS (LFD, University of California, Irvine). Simulamos imágenes correspondientes a experimentos donde las moléculas difunden libremente en toda la región de la simulación. Simulamos dos casos diferentes: el primero corresponderá a los monómeros, para lo cual simulamos un sistema en el que cada molécula emite 1×10^6 fotones por segundo. En una segunda etapa simulamos experimentos donde la emisión de fotones de un oligómero serán múltiplos de la emisión del monómero. De ese modo podíamos incluir de manera controlada en nuestras simulaciones, especies adicionales a los monómeros las cuales constituirán los oligómeros.

En todos los casos simulados el tiempo por píxel fue de $5 \mu\text{s}$, y se simularon 100 imágenes por

cada experimento. Las dimensiones de la PSF fueron $w_0 = 0.25 \mu\text{m}$ y $w_z = 1.5 \mu\text{m}$ para las direcciones axial y azimutal respectivamente que corresponde a valores típicos de una PSF en un microscopio confocal comercial como el utilizado durante los experimentos presentados en los siguientes capítulos.

Simulaciones para el caso de monómeros:

La cantidad de moléculas presentes en la PSF se corresponde con utilizar una solución 3 nM. Cada molécula emite 1×10^6 fotones por segundo y presentan un coeficiente de difusión $D = 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$, que corresponde al valor de difusión libre para la EGFP en solución. En la Figura 2.6a observamos la relación entre brillo e intensidad que surge del análisis. En ella se puede ver una distribución de puntos que corresponden a la cantidad de píxeles que tienen un determinado brillo y una determinada intensidad, siendo que si tenemos muchos píxeles con un brillo y una intensidad dados, entonces se representa con un punto rojo en la nube. En ella se presenta una distribución unimodal uniforme de los valores de brillo e intensidad calculados.

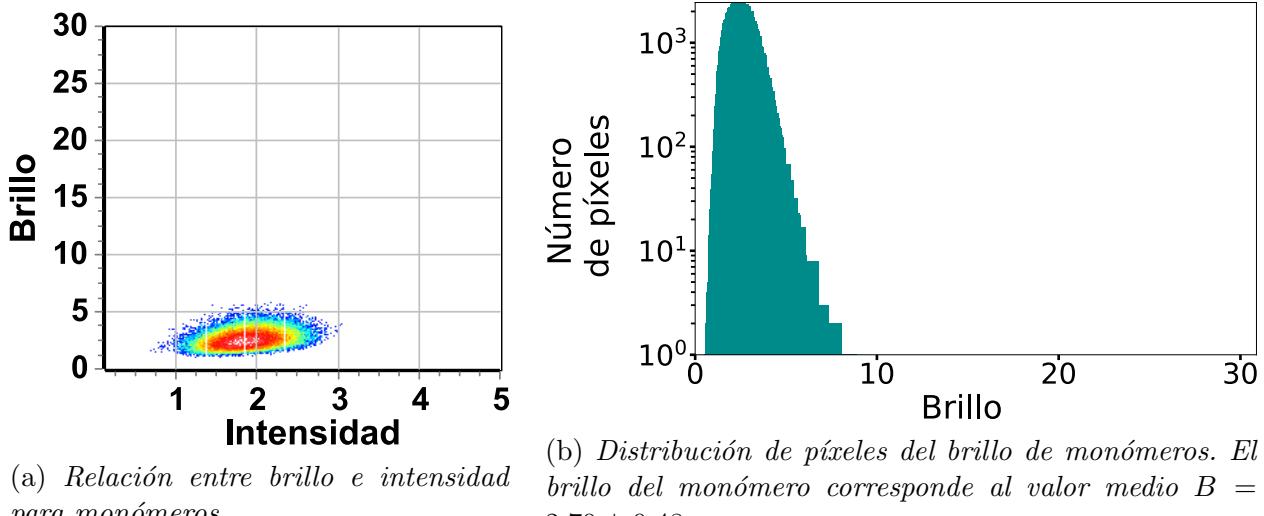


Figura 2.6

Proyectando sobre el eje de los brillos, realizamos un histograma de estos valores (Figura 2.6b), obteniendo unimodal no simétrica. Para calcular el brillo del monómero, calculamos el valor medio de esta distribución y, centrados tomamos la desviación estandar de forma tal de encerrar la mayor cantidad de valores debajo de una curva gaussiana. El brillo resultante para el monómero es $B = 2,70 \pm 0,48$

Simulaciones para el caso de oligómeros:

El coeficiente de difusión está relacionado con el tamaño de la molécula a través de la ecuación de Stokes-Einstein, siendo que cuanto mayor sea su peso molecular, menor será el coeficiente de difusión [25]. Por lo tanto, la relación entre el coeficiente de difusión de un oligómero y el de un monómero está dada por: 2.12:

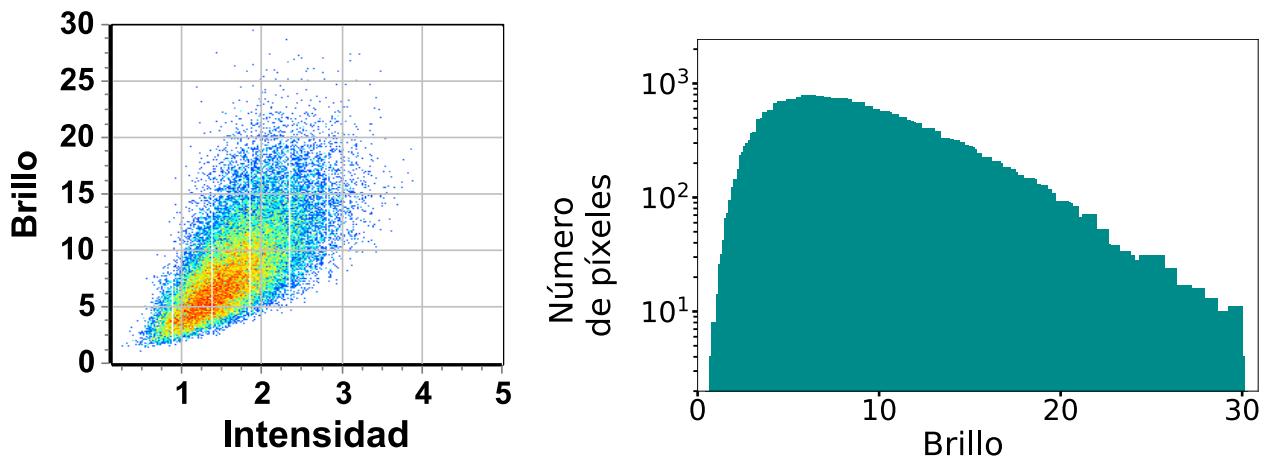
$$D_{\text{oligomero}} = \frac{D_{\text{monomero}}}{\sqrt[3]{\#_{\text{oligomero}}}} \quad (2.12)$$

donde $D_{\text{oligomero}}$ es el coeficiente de difusión del oligómero, D_{monomero} el de los monómeros y $\#_{\text{oligomero}}$ va a depender del tamaño del oligómero (siendo 2 para un dímero, 3 para un trímero y así siguiendo). Conjuntamente con el cambio de tamaño, es necesario ajustar el número de fotones emitidos por segundo por molécula (η) de la especie. De este modo la emisión de un dímero será el doble que la de un monómero, el del trímero será tres veces mayor que la del monómero, etc. La configuración de parámetros utilizada para cada simulación puede verse en la tabla 2.1:

Oligómero	Moléculas	η	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
Monómero	250	1×10^6	90
Dímero	250	2×10^6	71
Tetrámero	250	4×10^6	57
Octámero	250	8×10^6	45

Tabla 2.1: *Configuración de parámetros utilizada durante las simulaciones de difusión libre de oligómeros.*

Observamos la relación entre brillo e intensidad para la difusión libre de oligómeros en la Figura 2.7a. Comparado con el caso de los monómeros, vemos que tenemos una “nube” de píxeles mucho más amplia. Los valores de brillo obtenidos son notoriamente mayores, lo que es esperable debido a la presencia de oligómeros.



(a) Relación entre brillo e intensidad para oligómeros.

(b) Distribución de píxeles del brillo de oligómeros.

Figura 2.7

Realizando el histograma de la proyección de los píxeles sobre el brillo (Figura 2.7b) vemos que hay presentes brillos mayores a los del monómero. Por lo tanto, al haber obtenido que el brillo del monómero es $B = 2,70 \pm 0,48$, podemos tomar que el brillo de agregados mayores o igual es 4 unidades por ejemplo, se corresponde a tomar brillos mayores a 10,4.

Es notoria la separación que se puede realizar entre monómeros y oligómeros. Ambas relaciones entre el brillo y la intensidad presentan diferencias en sus distribuciones, las cuales se manifiestan al realizar un histograma de los valores del brillo. Si bien esta es una separación cualitativa, contamos también con la diferencia cuantitativa. Caracterizando el brillo del monómero y su valor, podemos evidenciar la presencia de agregados cuando, en la distribución de los oligómeros, reconocemos el brillo monomérico y otros de mayor valor.

2.5. Consideraciones finales

- La técnica aquí descripta permite determinar el estado de agregación molecular en sistemas biológicos *in vivo*.
- La potencia del láser debe mantenerse constante a lo largo de todo el experimento, ya que la cantidad de fotones emitidos por una molécula fluorescente depende de la tasa de excitación.

- El tiempo de adquisición por píxel (t_p), debe estar por debajo del tiempo característico de las fluctuaciones que deseo observar.
- Es necesario adquirir al menos 100 imágenes por cada experimento.
- Especial cuidado debe tenerse para reducir efectos de *photobleaching* ya que estos pueden alterar los resultados obtenidos.
- Es necesario calibrar utilizando la misma sonda fluorescente utilizada para marcar la proteína cuyo estado oligomérico se quiera estudiar.
- La técnica permite separar los distintos tipos de oligómeros eligiendo regiones de distinto brillo.

Capítulo 3

Estudio de la agregación de proteínas en células vivas por N&B

En este capítulo se presentarán los resultados de agregación molecular para dos sistemas de interés. El primer caso de estudio corresponde a la glicoproteína de membrana neuronal M6a, la cual está involucrada en la plasticidad neuronal y se presenta como candidato para entender algunos procesos neurodegenerativos como la depresión, la enfermedad de Alzheimer o la esquizofrenia. El segundo caso de estudio corresponde a la proteína cápside del virus del dengue. El virus del dengue es un serio patógeno humano de gran relevancia en salud pública en Argentina y la región. Sin embargo aún no se cuenta con estrategias de control, como ser vacunas o agentes antivirales. Los experimentos aquí presentados caracterizan una de las proteínas indicadas en el último tiempo como blanco para el desarrollo de antivirales.

3.1. Caso de estudio 1: Proteína M6a de neuronas de ratón

3.1.1. Motivaciones

Las neuropatologías representan un importante problema de la salud pública en las sociedades modernas y tiene una incidencia de aproximadamente 340 millones de nuevos casos al

año. Entre ellas se distinguen los trastornos neuropsiquiátricos (TNs) como la esquizofrenia, la depresión y el Alzheimer. El conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a los TNs u otros desórdenes en donde la plasticidad neuronal esté comprometida permitirán mejorar la prevención, el diagnóstico y las opciones terapéuticas.

La plasticidad neuronal se refiere a la capacidad del sistema nervioso de cambiar su estructura anatómica y su función a lo largo de la vida de un individuo. Estos cambios se producen en reacción a la diversidad ambiental. En este sentido, se utiliza el término de plasticidad para referir a cambios a nivel molecular, celular, expresión génica y de comportamiento. Asimismo, la neuroplasticidad es la capacidad que tiene el cerebro de recuperarse y re-estructurarse a sí mismo. Esto último, le permite recuperarse de desórdenes neuronales o injurias y, también, le permite reducir las alteraciones estructurales patológicas que provocan algunas enfermedades, como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, entre otras [26].

La proteína M6a es una glicoproteína de membrana perteneciente a la familia de proteínas proteolipídicas (PLPs) y está codificada por el gen GPM6A. Las PLPs (PLP/DM20, M6a y M6b), están consideradas entre las proteínas más abundantes en el sistema nervioso.

M6a, es una proteína de 278 aminoácidos de aproximadamente 35 kDa, tiene cuatro dominios de transmembrana (TMD); dos “loops” extracelulares, uno menor (EC1) y uno mayor (EC2); un “loop” intracelular pequeño y los extremos N- y C- terminales hacia el citoplasma celular [27]. Está extensamente distribuida en las neuronas del sistema nervioso central. En estadios embrionarios, fue hallada en el cerebro y la médula espinal, así como también en células neuronales totipotenciales del cerebro. En el adulto se expresa principalmente en hipocampo, corteza, cerebelo y retina.

En humanos, alteraciones en la dosis o la presencia de variantes poblacionales en el gen GPM6A han sido asociados a la depresión bipolar, esquizofrenia, claustrofobia, desórdenes de la personalidad y a fallas en el aprendizaje [28–32]. En ratones, variaciones en la expresión de GPM6a han sido asociadas al estrés crónico/depresión, la claustrofobia y a la enfermedad de Alzheimer [28, 33, 34]. Por ello, en los últimos años varios trabajos publicados por nuestros colaboradores del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad de San Martín (IIB-UNSAM) ([35–41]),

pretenden establecer cual/es son los mecanismos moleculares por los cuales M6a produce su efecto plástico en la neurona. Entendiéndose por este último la extensión y formación de neuritas, aumento de la densidad y movimiento de filopodios y la formación de sinapsis.

Asimismo, determinar los procesos neurobiológicos que subyacen a la plasticidad neuronal, permitiría desarrollar tratamientos más adecuados para aquellas enfermedades en donde se ve comprometida. A la fecha se desconoce el mecanismo de acción exacto así como también la existencia de ligandos endógenos. Sin embargo, existe bibliografía y evidencia experimental que sugiere que la función de M6a dependería de señales externas que recibe a través de su loop extracelular mayor (EC2) (Figura 3.1). El inicio de la cascada de señalización intracelular se llevaría a cabo en la membrana plasmática a partir de asociaciones específicas (homo/heterotípicas). En este sentido, M6a sería capaz de asociarse consigo misma, a lípidos y a otras proteínas residentes de lipid rafts estabilizando y propagando la señal hacia el interior celular. Finalmente, la fosforilación de ciertos residuos en el extremo C-terminal de M6a conduciría a la propagación de la señal y la consecuente plasticidad estructural.

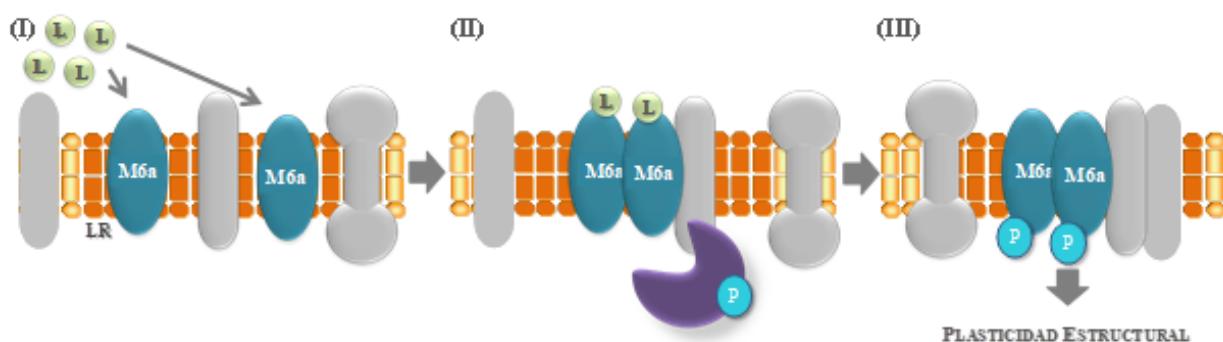


Figura 3.1: Esquema representativo de un posible mecanismo de acción de M6a. (I) M6a sería capaz de recibir señales (L) externas a través de su dominio EC2 [32]. (II) Esta señal sería integrada/estabilizada por asociaciones que presenta en la superficie celular: por interacciones homotípicas (consigo misma), heterotípicas (con otras proteínas o lípidos) en lipid rafts (LR). De esta manera reclutaría proteínas fosforiladas (P) o quinasas que fosforilen a M6a. (III) La fosforilación ocurriría en residuos del dominio C-terminal desencadenando una cascada de señalización que llevaría finalmente a la plasticidad estructural.

3.1.2. Resultados

En colaboración con la Dra. Camila Scorticati y la becaria doctoral Antonella León, investigadoras del IIB-UNSAM, realizamos un estudio de agregación de la proteína M6a en neuronas de ratón aplicando la técnica *N&B*, la cual fue descripta en el capítulo anterior. Es estudio se realizó sobre una variante fluorescente de M6a conjugada con la proteína fluorescente roja monomérica, mRFP, M6a-mRFP.

Estudio de la proteína fluorescente roja, mRFP:

Como se describió anteriormente, para el estudio de agregación es necesario tener calibrado el brillo de la proteína marcante, mRFP en este caso. Para esto tomamos imágenes de fluorescencia de barrido de 256x256 píxeles con un microscopio confocal Olympus FV1000, utilizando una longitud de onda de excitación de 543 nm. El tiempo de adquisición por píxel fue de 10 μ s. Realizamos el análisis de las imágenes utilizando el programa comercial simFCS. De este análisis obtenemos la Figura 3.2, en la cual se puede observar la relación entre el brillo y la intensidad para la región de la célula transfectada con mRFP.

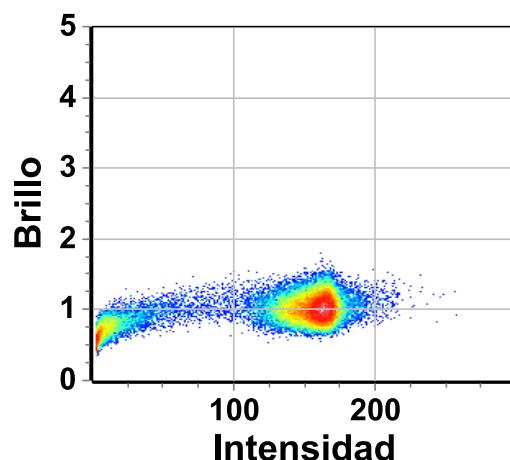
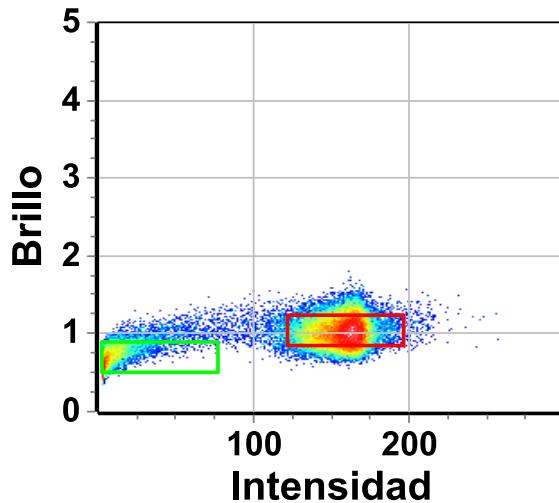


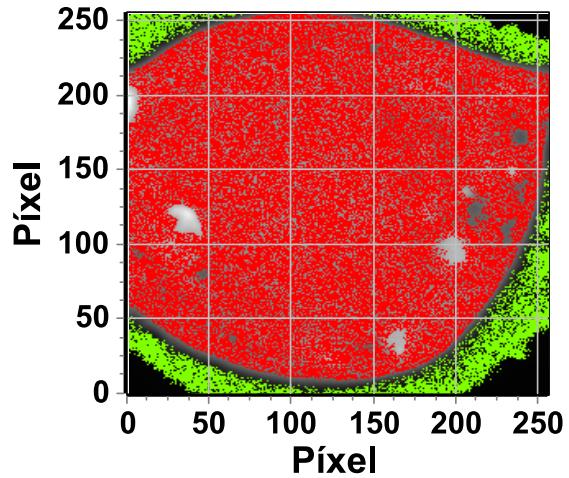
Figura 3.2: Relación entre brillo e intensidad para la proteína mRFP en citoplasma.

Teniendo en consideración todos los valores posibles del brillo, miramos el eje de intensidad y diferenciamos dos distribuciones de píxeles, una para valores menores y otra para valores mayores a 100. Por lo tanto, para analizar estas distribuciones seleccionamos dos cuadrantes (Figura 3.3a), uno para intensidad más baja y otro para intensidades altas. En la Figura 3.3b se muestra la imagen de microscopía de la célula, en la cual fueron resaltados, con el

color correspondiente de cada cuadrante, los píxeles dentro de cada uno. Para el cuadrante de intensidad baja, los píxeles seleccionados corresponden a proteína que se encuentra fuera del cuerpo celular, mientras que en el segundo cuadrante la proteína se encuentra en el interior de la célula. Por lo tanto descartamos el conjunto de píxeles correspondientes a intensidades bajas. Es importante además observar que la proteína monomérica RFP no tiene zonas preferenciales donde alojarse, dado que presenta una distribución uniforme en el cuerpo celular.



(a) Selección de cuadrantes de baja (verde) y alta (rojo) intensidad, para la distribución de píxeles de la proteína mRFP en citoplasma.



(b) Imagen representativa del soma de una neurona del hipocampo de ratón que sobreexpresa a mRFP citoplasmática. Los píxeles verdes corresponden a bajas intensidades, los rojos a altas intensidades.

Figura 3.3

Para determinar el brillo del monómero de RFP, tomamos la proyección de los píxeles correspondientes a intensidades altas sobre el eje de los brillos. En la Figura 3.4 se observa el histograma resultante de estos valores. El valor medio de esta distribución corresponde al valor del brillo de mRFP, resultando ser $B_{mRFP} = 1,05 \pm 0,18$.

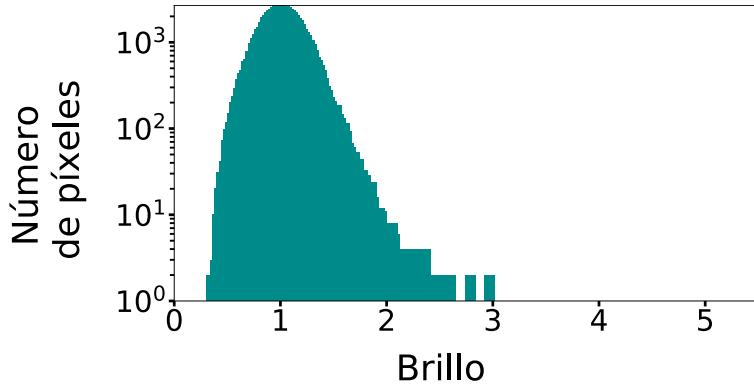


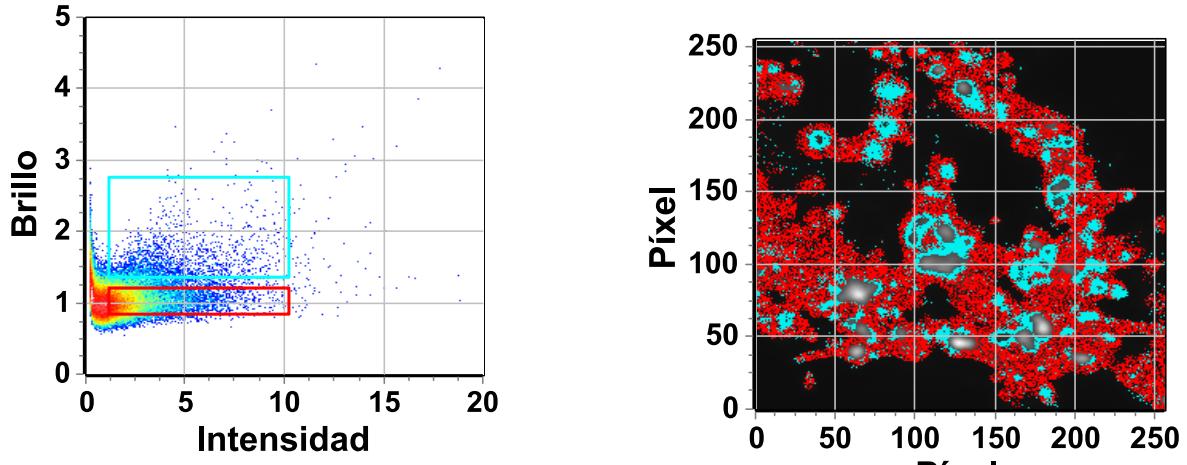
Figura 3.4: *Histograma de la distribución de valores del brillo para la proteína mRFP.*

Si bien se sabe que esta proteína, no presenta agregación cuando se encuentra libre en citoplasma, mediante este análisis del brillo podemos ver que no hay presentes oligómeros. La distribución del histograma presenta cierta simetría respecto del valor medio mientras que, como se mostró en la sección 2.4, si hubiese agregación de partículas veríamos una fuerte ruptura de esta simetría.

Estudio de M6a-mRFP:

Una vez calibrado el brillo del monómero de RFP, procedimos al estudio de agregación de la proteína M6a en neuronas de ratón. Brevemente, cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón fueron transfectadas con el plásmido M6a-mRFP. Es decir, aquellas neuronas que incorporen el plásmido sintetizarán a M6a acoplada a mRFP en el extremo C-terminal. Por lo tanto, cada vez que observemos partículas fluorescentes en la imagen, sabremos que estamos observando a la proteína M6a.

La configuración de los parámetros de adquisición del microscopio para las imágenes de fluorescencia se mantuvo en idénticas condiciones que el utilizado durante la calibración de mRFP. Es decir que usamos el láser de longitud de onda 543 nm, manteniendo fija la potencia incidente, y el mismo tiempo de adquisición y el tamaño de imágenes siguieron siendo de 10 μ s y 256x256 píxeles respectivamente.



(a) Relación entre brillo e intensidad para una célula transfectada con *M6a-mRFP*. Se seleccionó los monómeros (rojo) y oligómeros mayores a 8 unidades (cian).

(b) Píxeles correspondientes a monómeros (rojo) y a oligómeros mayores a 8 unidades (cian).

Figura 3.5

En la Figura 3.5a observamos la relación entre brillo e intensidad, resultantes para la proteína M6a-mRFP. Procedimos a tomar dos regiones. Una que muestre los monómeros (cuadrante rojo) y otra que muestre los oligómeros (cuadrante cian).

Para marcar los monómeros tuvimos en cuenta la calibración del brillo de la proteína mRFP hecha anteriormente. Nos situamos en el valor del brillo calculado, $B_{mRFP} = 1,05$, y seleccionamos una región de altura 0,36 (dos veces la desviación estándar del histograma de la Figura 3.4). Recordando que el brillo aparente se define como $B = \epsilon + 1$, podemos calcular el brillo del monómero y determinar $\epsilon = 5000$ cpsm, el cual es un número razonable para una proteína fluorescente en estos niveles de excitación [23]. Luego, para seleccionar los píxeles de la imagen con octámeros, o agregados mayores, buscamos regiones de la imagen cuyos valores de B sean ocho veces el brillo del monómero. Es decir, regiones tales que se cumpla $B \geq 1,40$ (cuadrante cian de la Figura 3.5a)

En la Figura 3.5b observamos una imagen confocal de fluorescencia de una neurona de ratón. En ella fueron resaltados los píxeles correspondientes a monómeros (rojo) y a los oligómeros (cian). Los cuadrantes se tomaron despreciando intensidades bajas debido a que los píxeles asociados a estas intensidades corresponden al exterior celular y, por lo tanto, no son regiones de interés. Por razones de visualización, esto no se muestra en esta Figura. Nos

concentramos solamente en intensidades mayores a 1,5. Podemos entonces observar que, contrario al caso de mRFP sola, encontramos una distribución no uniforme del complejo M6a-mRFP en el citoplasma. Los oligómeros muestran una marcada preferencia por alojarse en zonas determinadas de la neurona.

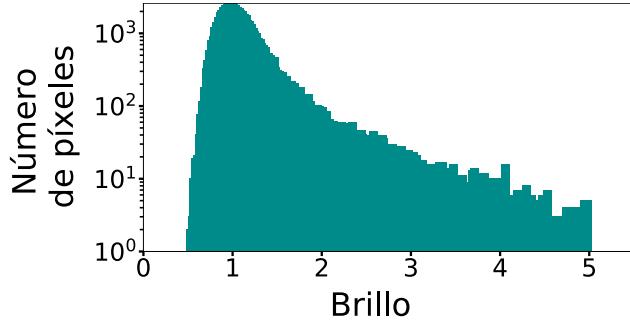


Figura 3.6: *Histograma de la distribución de valores de brillo obtenidos para la proteína M6a-mRFP.*

Teniendo en cuenta las intensidades mencionadas, realizamos el histograma que se obtiene de proyectar la distribución de píxeles sobre el eje de los brillos (Figura 3.6).

En la sección 2.4 mostramos cómo la presencia de oligómeros rompe notoriamente con la simetría que se obtiene cuando solamente hay presentes monómeros. En este caso sucede lo mismo, lo que nos indica que la proteína M6a-mRFP está formando oligómeros. Del estudio de mRFP sabíamos que, como era de esperar, se encontraba en estado monomérico por lo que estos oligómeros hallados indican una agregación mediada por M6a.

3.2. Caso de estudio 2: Proteína cápside del Dengue

3.2.1. Motivaciones

El virus del dengue (DENV) es una de las enfermedades virales transmitidas por insectos más importantes del mundo. Se estiman 400 millones de infecciones de dengue cada año en el mundo [42]. En los últimos años se ha producido un aumento significativo en los casos de infecciones, especialmente en países latinoamericanos. A pesar de los incrementos en los esfuerzos por encontrar un antiviral contra dengue, aún no se dispone de una vacuna efectiva o de agentes terapéuticos. Esto se debe, en gran medida, a la falta de conocimiento acerca

del virus y su patogénesis. El virus del dengue pertenece al género Flavivirus junto con otros virus causantes de importantes enfermedades humanas como son el virus de Zika, el de la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental, y otros virus causantes de encefalitis [43]. Este virus, cuya forma es icosaédrica de 50 nm de tamaño, está formado por una membrana lipídica obtenida de la célula huésped (es decir, aquella que infecta) que lo recubre, sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura.

En su interior aloja una única hebra de ARN (el genoma viral) y la proteína de cápside (C-DENV). Esta proteína tiene el rol de reclutar al genoma viral durante la formación de nuevas partículas virales, pero también tiene la función de liberar dicho genoma durante una nueva infección. Estos dos roles opuestos son procesos fundamentales en el ciclo de replicación viral, sin embargo, sus mecanismos son poco conocidos para dengue y otros flavivirus.

El ingreso del DENV a la célula huésped (tanto a células de mamífero como de mosquito) se lleva a cabo a través de la endocitosis. El ciclo comienza con el acercamiento del virus a la membrana de la célula, y es ahí cuando se produce una interacción entre una proteína viral y una proteína de la membrana plasmática de dicha célula, facilitando el ingreso. Una vez endocitado, el virus comienza un complejo proceso de replicación dando como resultado final nuevas partículas virales. En la figura 3.7 se muestra el ciclo de replicación y amplificación viral del dengue.

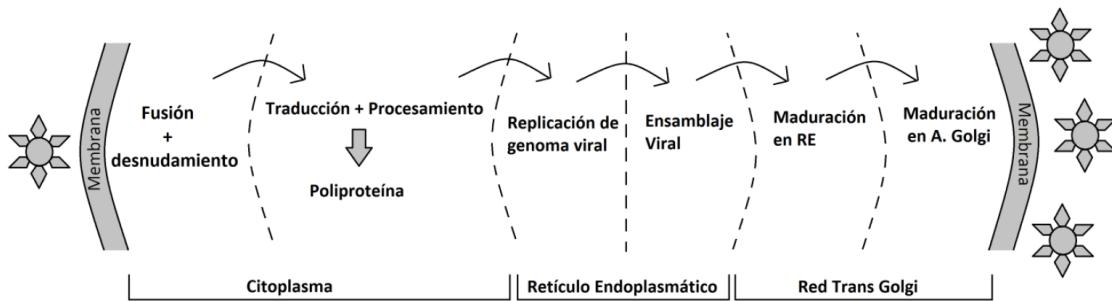


Figura 3.7: Esquema de las principales etapas durante el ciclo de infección viral.

El genoma viral del dengue tiene múltiples funciones durante la replicación. En una primera etapa actúa como mensajero para las proteínas virales, para luego utilizarse como molde para su propia amplificación. Finalmente interactúa con la C-DENV durante la morfogénesis de nuevas partículas virales.

Estudios realizados por colaboradores en el laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir (VM-FIL) demostraron que durante la infección, la proteína viral de cápside se distribuye entre el núcleo y el citoplasma de las células infectadas. Mediante el uso de fluoróforos (como mCherry o EGFP) y técnicas de microscopía de fluorescencia, los colaboradores son capaces de marcar y seguir temporalmente dicha proteína viral.

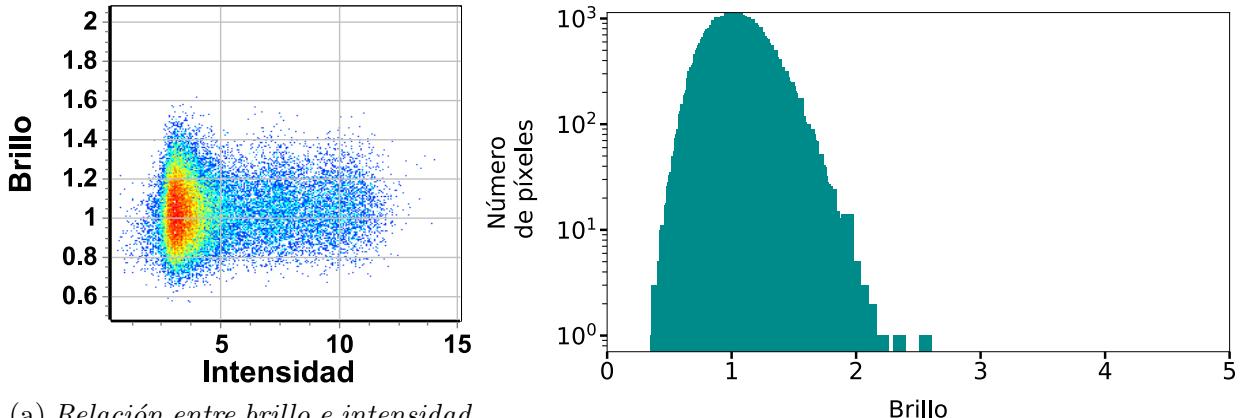
En este marco surgen algunas preguntas. ¿Cómo es la dinámica de la proteína viral de cápside?, ¿Cuáles son los procesos que gobiernan dicha dinámica?, ¿Está difundiendo libremente en la célula ó hay presente un proceso de asociación-disociación?

Para responder a ellas es necesario introducirnos en técnicas de correlación de imágenes de microscopía de fluorescencia.

3.2.2. Resultados

En colaboración con Andrea Gamarnik, Guadalupe Costa Navarro y Luana De Borba, investigadoras y becarias del Instituto Leloir; realizamos un estudio de agregación de la proteína cápside del virus del dengue (C-DENV). Para observar esta proteína mediante imágenes de microscopía de fluorescencia, se la marcó con el fluoróforo mCherry y se la transfeció en una célula de riñón de hamster. Como fue mencionado en la sección 3.1.1, esto último indica que cuando se sintetice proteína viral, esta lo hará produciendo a su vez un fluoróforo mCherry que se encontrará asociado a la misma. Esta proteína fluorescente se encuentra siempre en estado monomérico al igual que mRFP, por lo que no puede juntarse con otras proteínas mCherry para formar oligómeros. Por lo tanto, al observar moléculas fluorescentes, sabemos que estamos observando proteína viral ya sean monómeros u oligómeros. Tomamos las imágenes de microscopía 25hs post transfección, utilizando un microscopio Zeiss 880 el cual cuenta con una longitud de onda de excitación de 543 nm. El tiempo de observación por píxel fue de 10 μ s y el tamaño de las imágenes 256x256 píxeles.

Estudiamos la agregación de C-DENV en el núcleo de la célula. Observamos la relación entre brillo e intensidad en la Figura 3.8a. Nuevamente proyectando la distribución de píxeles sobre el eje de los brillos, podemos obtener un histograma.



(a) Relación entre brillo e intensidad para una célula transfectada con C-DENV. (b) Histograma de valores de brillo para una célula transfectada con C-DENV.

Figura 3.8

En la Figura 3.8b se puede ver el histograma de los valores de brillo. La distribución de los valores se corresponden con el histograma de monómeros de las simulaciones presentado en la sección 2.4. El valor medio de este histograma es $B = 1,05 \pm 0,15$, el cual es un valor semejante al brillo de la mCherry aislada. Cabe resaltar sin embargo que la relación entre brillo e intensidad de la Figura 3.8a no es monomérica. No se asemeja a la distribución de monómeros de las simulaciones. La proteína cápside presenta una mayor distribución de píxeles en intensidad y, más importante aún, hay presentes píxeles más brillantes que los monómeros.

En la Figura 3.9 mostramos un análisis cualitativo de lo mencionado anteriormente. Para esto tomamos el brillo de la proteína monomérica, mCherry, $B = 1,04 \pm 0,15$ y seleccionamos un cuadrante para los monómeros (rojo) y un cuadrante del doble de área para los oligómeros mayores a 5 unidades (cian). Para estos últimos, tuvimos en cuenta que el brillo molecular de mCherry resulta $\epsilon = 4000$ cpsm, por lo que los brillos correspondientes a los oligómeros seleccionados serán mayores que $B = 1,20$.

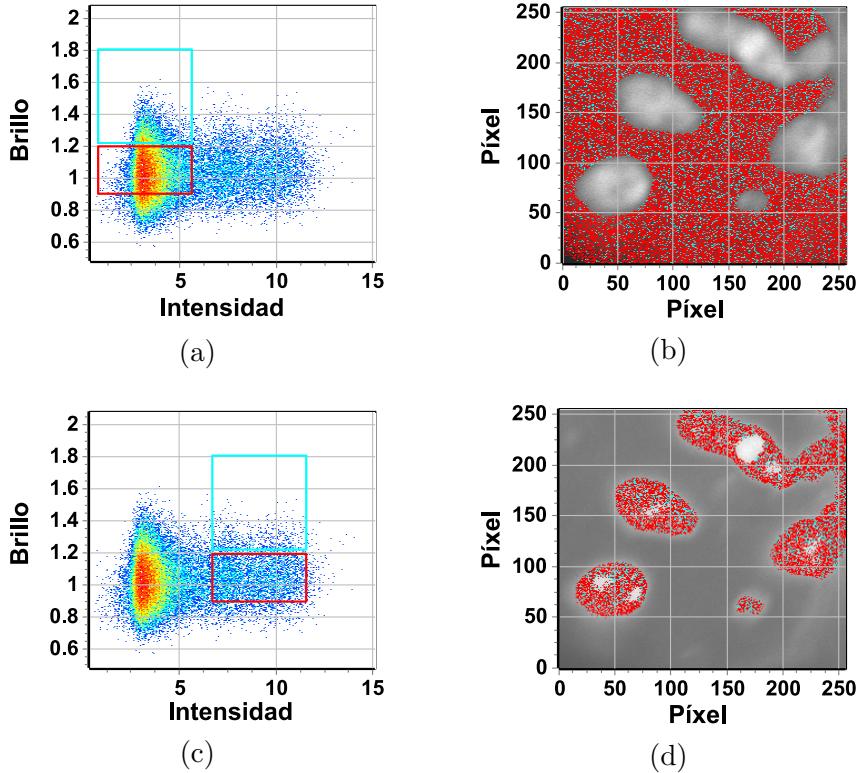


Figura 3.9: **a** y **c**: Relación entre brillo e intensidad para una célula de hígado de ratón transfectada con proteína C-DENV conjugada con mCherry. Se seleccionó los monómeros (rojo) y oligómeros mayores a 5 unidades (cian). **b** y **d**: Píxeles correspondientes a monómeros (rojo) y a oligómeros mayores a 5 unidades (cian).

En la Figura 3.9 a tomamos los cuadrantes en intensidades bajas, lo que corresponde a seleccionar las proteínas virales sintetizadas que se encuentran en el núcleo de la célula. Mientras que en la Figura 3.9c marcamos los cuadrantes de intensidades altas, que son las proteínas dentro de los nucleolos de la célula. Esto último se muestra en las Figuras 3.9 b y d respectivamente. En ellas se muestran la imagen de fluorescencia de la célula donde se resaltan los píxeles seleccionados de dichos cuadrantes. En la Figura 3.9b observamos que tanto para monómeros como para los oligómeros la distribución es uniforme. Es decir que C-DENV marcada con mCherry no presenta zonas preferenciales donde alojarse.

Una situación similar sucede cuando analizamos la distribución de píxeles para altas intensidades. En la Figura 3.9d observamos que corresponde a visualizar los nucleolos de la célula. En ellos la distribución de monómeros y oligómeros presenta el mismo comportamiento que

en el núcleo. En el nucleolo, no se observan zonas donde haya aglomeración de monómeros u oligómeros de cápside.

Vemos que para todo el rango de intensidades, hay presentes píxeles 5 veces más brillantes que los píxeles de la proteína monomérica. Sin embargo estos son muy pocos en comparación con los que corresponden a los monómeros. Cuando teníamos la distribución de brillo de los oligómeros, vimos que esta presentaba valores en un rango más amplio en el brillo y, a su vez, una mayor cantidad de píxeles que el que se presenta para la proteína cápside.

Podemos entonces afirmar que biológicamente no hay información concluyente que permita asociar los píxeles más brillantes a estados de oligomerización de la proteína C-DENV. Es decir, cápside no se está juntando entre sí para formar oligómeros. Una de las razones que hay que considerar para futuros experimentos, es la posibilidad de realizar este estudio de agregación pero utilizando otro fluorósforo que sea monomérico. Esto es debido a que puede existir la posibilidad de que la molécula fluorescente mCherry esté actuando sobre la proteína de cápside evitando que se formen oligómeros.

Capítulo 4

Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia

En este capítulo presentaremos dos técnicas de espectroscopía de correlación de fluorescencia. Ambas se encuentran asociadas al estudio de la dinámica de moléculas. La primera de ellas corresponde a la espectroscopía de correlación en un punto (FCS). La segunda técnica corresponde a la espectroscopía de correlación de barrido (RICS). Por ultimo, para cada una de ellas, analizaremos la separación de modelos dinámicos.

4.1. Generalidades

La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) es un poderoso método de estudio para la dinámica de moléculas en una solución, en células o en tejidos. Está basada en el estudio de las fluctuaciones de intensidad proveniente de moléculas fluorescentes que ingresan y egresan del volumen de observación de un láser.

Muchas veces se quiere estimar el tiempo característico asociado a una perturbación externa en un sistema. La perturbación aparta ligeramente al sistema de su posición de equilibrio, siendo este instante fácilmente identificable. El tiempo característico se obtiene como el tiempo que necesita el sistema para disminuir el apartamiento del equilibrio a $1/e$ del apartamiento inicial (Figura 4.1a).

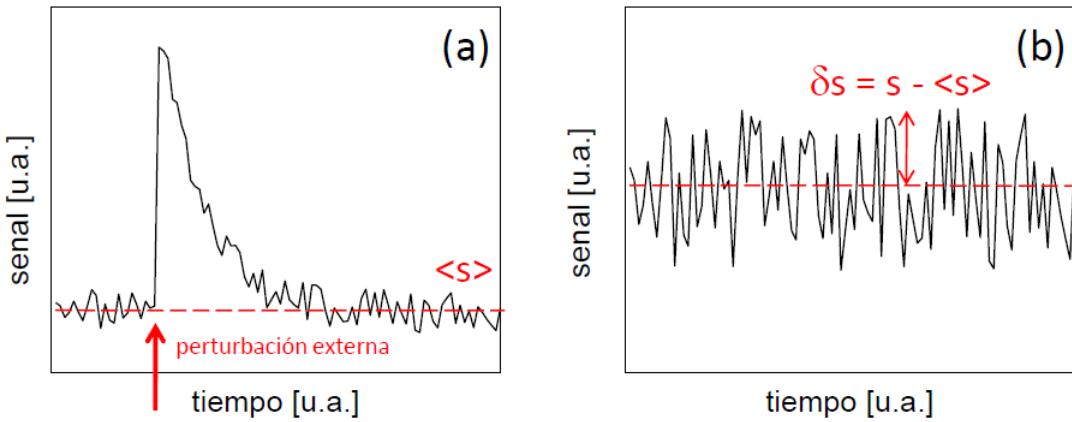


Figura 4.1: (a): Una perturbación externa saca al sistema de su valor de equilibrio, (b): Fluctuaciones espontáneas alrededor del valor de equilibrio.

Las fluctuaciones espontáneas propias del sistema, también apartan a este del equilibrio y el tiempo de retorno es en promedio el mismo que para la perturbación externa. Sin embargo esta información se encuentra distribuida a lo largo de la señal siendo que no es fácilmente identificable (Figura 4.1b). Por lo tanto, es necesario un método que sea independiente del intervalo de análisis. Los algoritmos de correlación permiten analizar este tipo de series temporales [44].

Como fue mencionado en el Capítulo 1.4, las técnicas de FCS dan, tanto información temporal sobre procesos que ocurren en una solución o en una célula, como así también información sobre concentraciones. Esto último es debido a que la concentración de moléculas está relacionada con la intensidad emitida dentro del volumen de observación. Algunos de los procesos asociados a dichas variaciones de intensidad pueden ser:

- Difusión de partículas
- Proceso de asociación - disociación
- Proceso de Prendido-Apagado
- Replegado de proteínas

Existen varias técnicas distintas que se basan en la espectroscopía de correlación. El uso de una u otra dependerá del tiempo característico que se desee observar propio de la dinámica del sistema, de la zona celular que se observe y del tipo de molécula que se quiera estudiar [1,45]

4.2. Espectroscopía de correlación en un punto

La espectroscopía de correlación en un punto, consiste en registrar las fluctuaciones de intensidad de una zona fija en una célula o tejido. Ubicando el haz del láser en un punto fijo, adquirimos las variaciones de intensidad en el mismo, producto de la dinámica de moléculas fluorescentes que entran y salen del volumen de observación.

Como se mencionó anteriormente, la función de correlación temporal $G(\tau)$ permite obtener los tiempos característicos de la dinámica del sistema. En los experimentos de FCS la señal de interés es la intensidad de fluorescencia, $I(t)$, y la correlación de la intensidad de fluorescencia se define como:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t)\delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (4.1)$$

donde $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$ es la fluctuación de la intensidad con respecto a su valor medio. La función de correlación $G(\tau)$, dà la probabilidad de detectar un fotón a tiempo $t = \tau$ si se detectó un fotón de la misma molécula a $t = 0$. Cuando los dos fotones detectados provienen de una misma molécula (están correlacionados entre sí), darán lugar a una componente dependiente del tiempo en la correlación. Cuando no estén correlacionados, es decir que provengan de moléculas distintas, contribuirán a una señal de fondo constante en $G(\tau)$. En la Figura 4.2 se muestra una curva de correlación típica de un experimento de espectroscopía de correlación en un punto, para el caso de moléculas que difunden libremente en una solución.

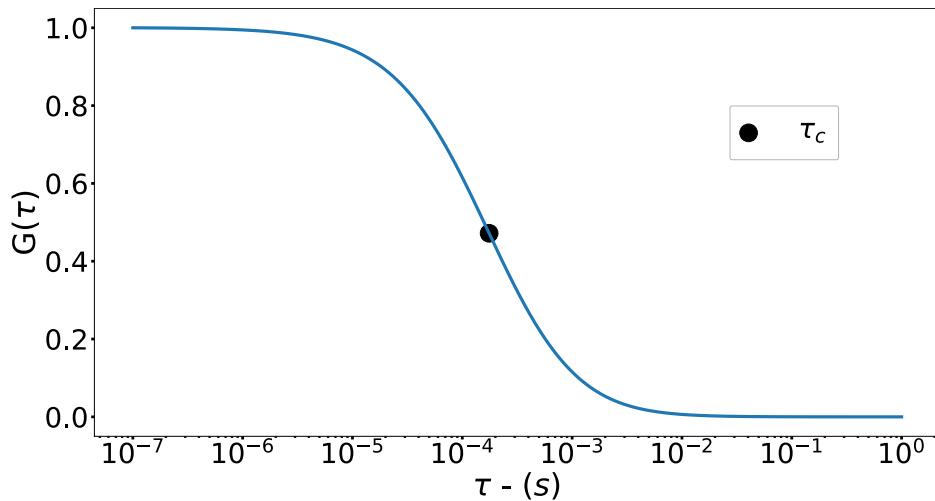


Figura 4.2: Curva de correlación $G(\tau)$ típica de un experimento de FCS en un punto.

El tiempo característico τ_c corresponde al valor de t donde $G(\tau)$ cae a la mitad de su amplitud inicial. Para el caso de moléculas que difunden libremente, la expresión de la función de correlación está dada por:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c^{\omega_0}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c^{\omega_z}}\right)^{-1/2} \quad (4.2)$$

donde N es el número medio de moléculas en el volumen de observación; y $\tau_c^{\omega_0}$ y $\tau_c^{\omega_z}$ son los tiempos característicos de correlación de las moléculas en el volumen de observación. Es decir, son los tiempos que tardan las moléculas en atravesar el volumen de observación en las direcciones de los semiejes ω_0 y ω_z respectivamente. En la ecuación 4.2, cada grado de libertad aporta a la correlación un término de la forma $\left(1 + \frac{\tau}{\tau_c}\right)^{-1/2}$. Dado que en la práctica $\omega_z \gg \omega_0$, el tiempo característico que rige el decaimiento de las fluctuaciones está determinado por un único tiempo de correlación que corresponde a la difusión de las moléculas a través de la dimensión más corta del volumen de observación (ω_0 en este caso). El tiempo característico de difusión de las moléculas τ_c , se relaciona con el coeficiente de difusión D , en unidades de $\mu\text{m}^2/\text{s}$, a partir de la expresión:

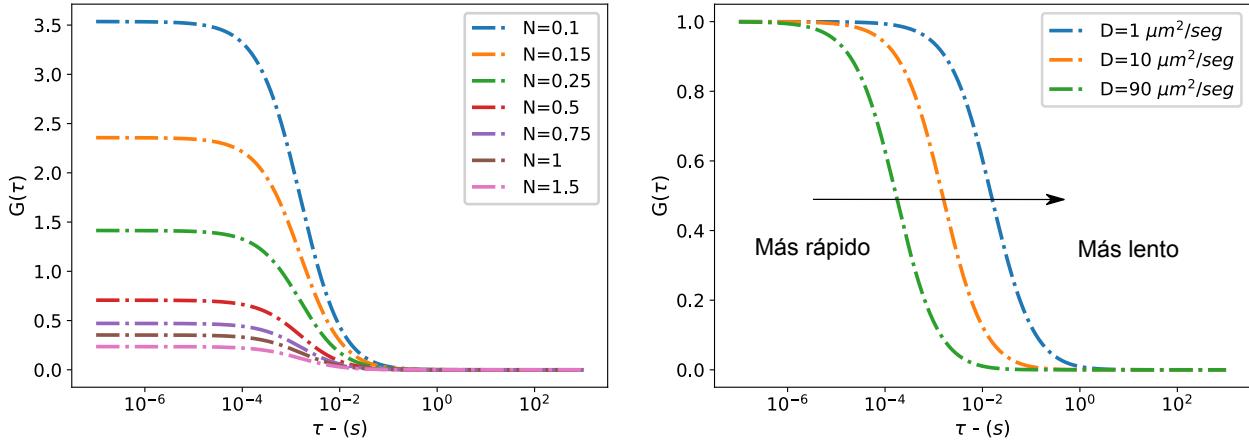
$$\tau_c = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (4.3)$$

Dado que en general se calcula el coeficiente de difusión a partir de ajustar la curva de correlación con la ecuación 4.2, podemos reescribir a esta última para que aparezca el parámetro de interés.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_z^2}\right)^{-1/2} \quad (4.4)$$

En las Figuras 4.3 podemos observar el gráfico de expresión analítica de la ecuación 4.4. En esta ecuación podemos observar que la amplitud máxima de la función de correlación $G(\tau)$ se da cuando $\tau = 0$. Esta amplitud es inversamente proporcional al número medio de partículas que se encuentran dentro de la PSF. En la Figura 4.3a visualizamos el efecto de un aumento del número de partículas, lo que correspondería a trabajar con una mayor cantidad de moléculas fluorescentes. Al aumentar N , la amplitud disminuye. Es por esto que para poder tener correlación es necesario contar con bajas concentraciones de moléculas a fin de maximizar la amplitud. En esta misma Figura podemos ver que el coeficiente de difusión

no cambia al variar N. El tiempo de correlación se mantiene constante en el valor 1.56ms.



(a) Disminución de la amplitud ante un aumento del número de partículas en el volumen de observación

(b) Incremento del tiempo de correlación ante una disminución del coeficiente de difusión

Figura 4.3: Curvas analíticas de la expresión de la función de correlación para el caso difusivo puro.

Podemos observar que si mantenemos constante el número de partículas pero variamos el coeficiente de difusión, se produce un corrimiento de la función de correlación. En la ecuación 4.3 podemos observar que el coeficiente de difusión se encuentra en el denominador, por lo que un aumento de este dará como resultado una disminución del tiempo característico. En la Figura 4.3b observamos este efecto para tres coeficientes de difusión.

Es común dentro de una célula o tejido encontrarse con más de un proceso biológico. Por cada nuevo proceso fotofísico que produzca variaciones de la intensidad registrada, debemos considerar que habrá presente un tiempo característico propio de ese proceso. En la ecuación 4.10 podemos observar la expresión de la función de correlación para un proceso que sea de asociación-disociación. En este proceso, las fluctuaciones de intensidad se producen cuando las moléculas se asocian o disocian de una determinada proteína. Es decir que el cambio en la intensidad de fluorescencia se da cuando la molécula fluorescente se pega a una proteína o una región específica de la célula.

$$G_{asoc-disoc}(\tau) = A_{asoc-disoc} e^{(-\tau/t_{asoc-disoc})} \quad (4.5)$$

Supongamos un sistema donde tenga presente dos procesos: Un proceso de difusión libre de

moléculas, y otro proceso de asociación-disociación. La función de correlación total para este sistema será:

$$G_{total}(\tau) = G_{difusión}(\tau) \cdot G_{asociación-disociación}(\tau) \quad (4.6)$$

En la Figura 4.4 podemos observar el gráfico de la expresión analítica de la función de correlación $G(\tau)$ para tres sistemas distintos. En el primer sistema consideramos un proceso difusivo puro con un coeficiente de difusión $D = 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Un segundo sistema en el que solo haya un proceso de asociación-disociación puro, y un tercer sistema donde estén presentes ambos procesos. El total de moléculas dentro del volumen de observación se corresponde a utilizar una solución 3 nM. Además mantuvimos constante el tamaño de la PSF considerando $\omega_0 = 0.5 \mu\text{m}$ y $\omega_z = 1.5 \mu\text{m}$,

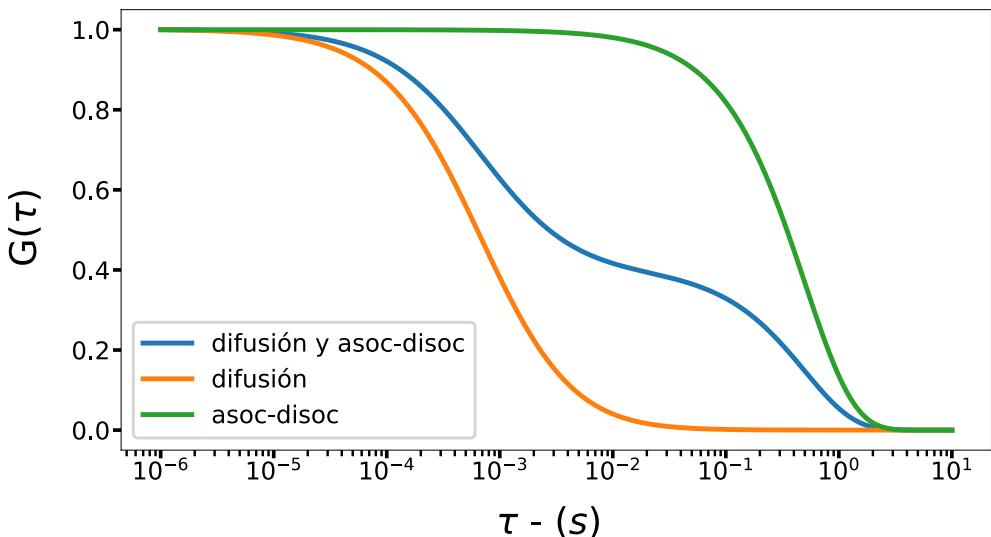


Figura 4.4: *Curvas de correlación $G(\tau)$ normalizadas para tres sistemas con diferentes procesos: proceso difusivo puro (naranja), proceso de asociación-disociación (verde) y proceso que sea combinación de ambos (azul).*

Cada proceso dinámico presenta su propio tiempo característico. El tiempo característico del proceso de difusión, asociado al coeficiente D elegido, fue $\tau_{dif} = 0,7 \text{ ms}$; mientras que para el proceso de asociación-disociación, el tiempo elegido resultó $\tau_{asoc-disoc} = 500 \text{ ms}$. Observamos que hay más de un hombro en el gráfico de la función de correlación, cada uno asociado al tiempo característico de cada proceso.

4.3. Separación de procesos dinámicos

Comúnmente deseamos separar los distintos procesos dinámicos presentes en una célula. Como mencionamos anteriormente, estos procesos tienen asociado un tiempo característico propio. En la Figura 4.4 las curvas se encuentran separadas debido a que los tiempos característicos difieren en varios órdenes de magnitud. Sin embargo, dado que las curvas de correlación $G(\tau)$ no presentan la forma de una línea continua debido a la naturaleza estocástica de la adquisición de la señal de fluorescencia, procedimos a agregarle ruido a estas curvas.

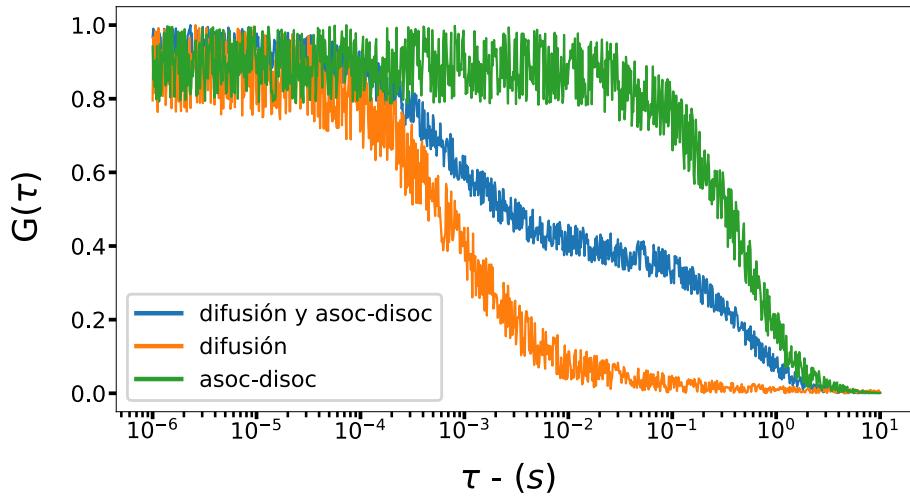


Figura 4.5: Curvas de correlación normalizadas $G(\tau)$ para tres sistemas con procesos diferentes a los que agregamos ruido. Observamos que aún en presencia de ruido los tiempos característicos son fácilmente separables.

En la Figura 4.5 observamos que aún con una función de correlación ruidosa los tiempos característicos son fácilmente separables mediante un ajuste. Por lo que, si un sistema presenta procesos con tiempos característicos que se diferencian en varios órdenes de magnitud uno del otro, podremos distinguirlos y estudiar su dinámica con mayor facilidad.

Sin embargo existe la posibilidad de que los tiempos característicos de los procesos sean similares. En la Figura 4.6 observamos las mismas funciones de correlación con ruido, pero esta vez los tiempos característicos son $\tau_{dif} = 0,7$ ms y $\tau_{asoc-disoc} = 0,5$ ms.

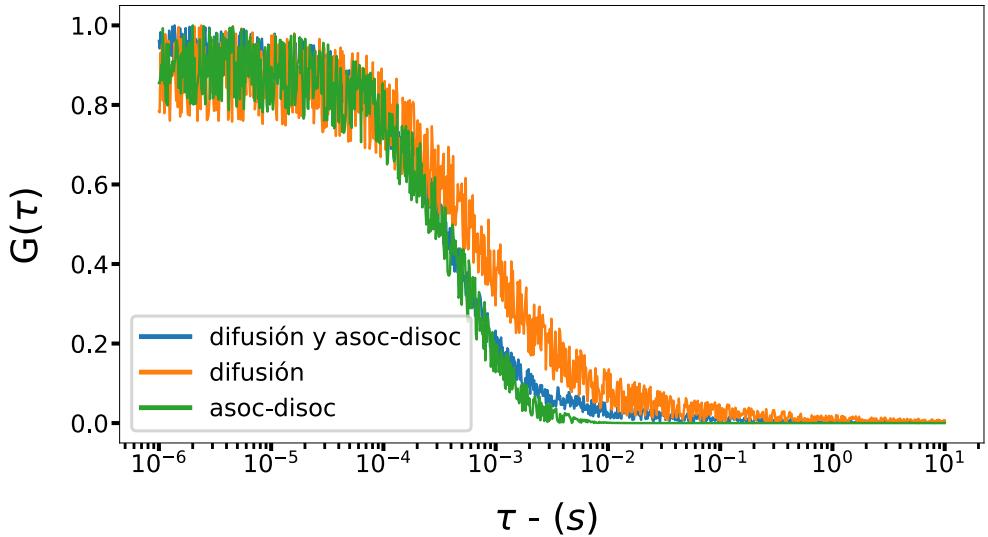


Figura 4.6: Curvas de correlación normalizadas $G(\tau)$ para tres sistemas con procesos diferentes a los que agregamos ruido. Observamos que, dado que los tiempos característicos son muy similares, no es posible separar fácilmente los procesos.

Vemos que los gráficos no son fácilmente separables si los tiempos característicos son similares. Es claro que si se realiza un ajuste, no será posible diferenciar los procesos de fondo. No podremos decir con certeza cuál es el presente en la célula: si el de difusión, el de asociación-disociación o ambos.

4.4. Espectroscopía de correlación de imágenes

Cuando utilizamos la espectroscopía de correlación en un punto, explicada al comienzo de este capítulo, obtenemos información de la dinámica de los procesos que ocurren dentro de una célula en un punto fijo de la misma. Estamos entonces limitados a conocer solamente los procesos que ocurren en ese punto. Si queremos estudiar la dinámica en un región y no solamente en un punto podemos utilizar la espectroscopía de correlación en varios puntos separados. Pero aún así no obtendríamos un estudio que nos permita vincular lo que pasa en un punto con lo que sucede en el otro.

Es necesario entonces utilizar la espectroscopía de correlación de imágenes. Para esto, registramos las fluctuaciones de intensidad a lo largo de una línea, haciendo espectroscopía de correlación en un punto varias veces. Esto nos dá la posibilidad de estudiar lo que pasa en

la región donde haya transporte, por ejemplo entre el citoplasma y el núcleo.

Si en vez de una sola línea, realizamos un barrido de líneas sucesivas una sobre la otra, podemos estudiar la dinámica en una región más amplia y localizada de la célula. Estas pueden ser el citoplasma, el núcleo o los nucleolos de la misma. Además nos permite estudiar procesos en escalas temporales muy variadas, desde los μs a los segundos. A esta técnica se la denomina espectroscopía de correlación de imagen de barrido (RICS por sus siglas en inglés) [19].

La técnica de RICS consiste en hacer un barrido espacio temporal de una zona determinada que nos interese, ya sea en una solución o en una célula, para luego realizar la correlación entre los distintos puntos. El tamaño de la región estudiada dependerá del aumento utilizado, de la cantidad de píxeles y del tamaño de los mismos. Cabe destacar que estos tres parámetros están vinculados entre sí y que la adquisición de fluctuaciones va a variar dependiendo de la relación entre ellos. Típicamente una imagen de microscopía consta de 256x256 píxeles, donde cada píxel tiene un tamaño de $0.05 \mu\text{m}$. Debemos destacar que el estudio de la dinámica puede hacerse tanto en zonas de frontera como en una zona que sea uniforme, es decir donde no se mezclen distintos compartimentos celulares. Esto último dependerá de que se quiere estudiar, si un proceso dinámico que implique transporte entre membranas o simplemente la dinámica celular del núcleo ó citoplasma por ejemplo.

4.4.1. Adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia por barrido.

Un experimento consiste en hacer un barrido de derecha a izquierda y de arriba a abajo registrando las fluctuaciones de la intensidad en cada punto. Dado la relación entre el tamaño de los píxeles y la PSF, la dirección axial del volumen de observación, ω_0 , se compondrá de varios píxeles. Por ejemplo, cuando $\omega_0 = 0.25 \mu\text{m}$, esta distancia estará conformada por 5 píxeles. Así, cuando nos referimos a adquirir las fluctuaciones “en un punto”, nos referimos a adquirir en esa región determinada por los 5 píxeles.

En la Figura 4.7 observamos esquemáticamente el proceso de barrido para adquirir una imagen.

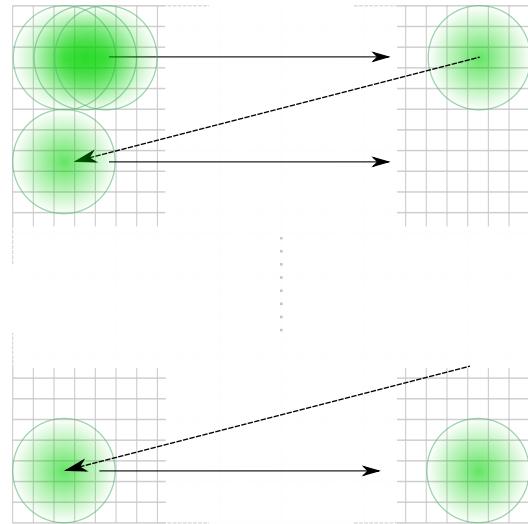


Figura 4.7: *Método de barrido para la adquisición de imágenes de fluorescencia.*

Para adquirir una imagen en un microscopio de barrido, el haz enfocado primero recorre de izquierda a derecha la región de interés permaneciendo un tiempo t_p en cada posición (cada píxel). Al terminar la línea, el haz vuelve a la posición inicial pero desplazado un píxel hacia abajo, y procedemos a barrer otra línea. La adquisición de una línea se repite tantas veces como cantidad de píxeles tenga la imagen (en este trabajo típicamente 256).

Luego del barrido, habremos obtenido una imagen como la que se muestra en la Figura 4.8

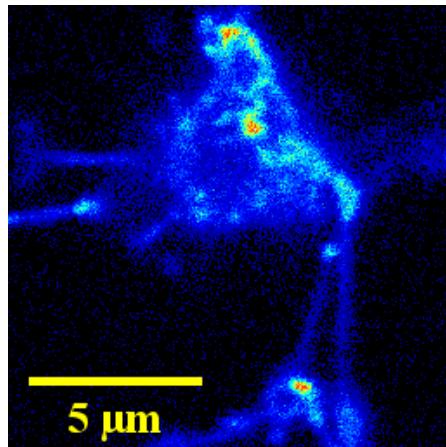


Figura 4.8: *Imagen confocal de fluorescencia de una célula de neurona de ratón, marcada con mRFP.*

El tiempo de permanencia por píxel, o t_p , es el tiempo que el haz permanece en una posición y, en general, se encuentra dentro del orden de los μs . El tiempo por línea, o t_l , es el tiempo que

se tarda en recorrer toda una línea de la imagen. Este tiempo no es simplemente el producto del t_p por la cantidad de píxeles de una línea, sino que además contiene un tiempo adicional de aproximadamente $4\mu s$ por píxel debido al tiempo de retorno del láser al inicio de la línea. De esta forma se deduce que $t_l = (t_p + 4\mu s) / \# \text{píxel}$. El tiempo de línea es del orden de los ms y, por lo tanto, el tiempo total de la adquisición de una imagen resultará $t_{\text{imagen}} = t_l \# \text{píxel}$, siendo este del orden de los segundos para imágenes cuadradas de 256x256 píxeles.

4.4.2. Cálculo de la correlación espacial

Para calcular $G(\xi, \psi)$ procedemos a calcular la autocorrelación de la imagen. Esto lo haremos superponiendo a la imagen con una copia de ella misma. A la imagen superpuesta la iremos desplazando una distancia en píxeles ξ y ψ en la dirección horizontal y vertical respectivamente. Para cada desplazamiento calculamos el producto entre la intensidad de cada píxel (x, y) de la imagen original con los de la imagen desplazada $(x + \xi, y + \psi)$. Luego sumamos estos valores y dividimos por el valor medio de la intensidad al cuadrado para normalizar [46].

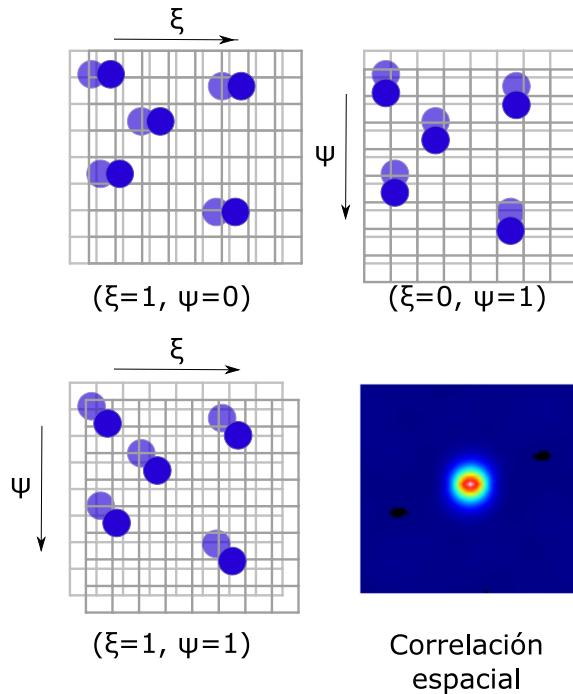


Figura 4.9: Procedimiento para calcular la correlación espacial de una imagen. Los desplazamientos ξ y ψ , se dan en todas las direcciones posibles.

En la Figura 4.9 observamos cómo es el procedimiento para calcular la correlación espacio temporal. Los desplazamientos se dan en todas las direcciones posibles (izquierda, derecha, abajo y arriba) y en más de una dirección al mismo tiempo. Por ejemplo, nos desplazamos hacia la derecha un lugar tomando $\xi = 1$ y manteniendo fijo $\psi = 0$ (Figura 4.9 arriba a la izquierda). Para cada valor de desplazamiento en ξ calculamos $G(\xi, \psi = 0)$. El procedimiento se repite aumentando el valor de ψ .

Para cada desplazamiento en ambas direcciones obtendremos un valor de $G(\xi, \psi)$. Al final, obtendremos la imagen de correlación en escala de intensidades. en la cual el máximo se encuentra en el centro. Esto es debido a que la mayor correlación la obtendremos cuando $(\xi, \psi) = (0, 0)$, es decir, cuando no haya ningún desplazamiento de la imagen superpuesta.

Una imagen de correlación corresponde a hacer un experimento utilizando la técnica de RICS. Por lo tanto para aumentar la estadística, procedemos a tomar un número grande de imágenes de microscopía de barrido (típicamente 100). A cada una de ellas se les calcula la autocorrelación y luego se promedian todas las correlaciones resultando en una sola.

4.4.3. Expresión de la función de correlación espacial

La expresión de la función de correlación espacio temporal cuenta con un término fundamental debido al barrido espacial del volumen de observación. Este término es la correlación espacial de la PSF en la dirección axial w_0 . A este término se lo denomina $G_{barrido}(\xi, \psi)$ y tiene la forma [20]:

$$G_{barrido}(\xi, \psi) = \exp\left(-\frac{1}{2}\left[\left(\frac{2\xi\delta r}{w_0}\right)^2 + \left(\frac{2\psi\delta r}{w_0}\right)^2\right]\left(1 + \frac{4D(t_p\xi + t_l\psi)}{\omega_0^2}\right)^{-1}\right) \quad (4.7)$$

donde δr es el tamaño de píxel, ξ y ψ el desplazamiento de la imagen, D es el coeficiente de difusión, w_0 el ancho del volumen de observación y t_p y t_l el tiempo de permanencia del haz de excitación en un píxel y en una línea respectivamente. Cada proceso dinámico presente en una célula, va a contribuir con un término adicional a la función de correlación del análisis de RICS. Para un proceso difusivo puro, el término de correlación resulta muy similar al término para el caso de la adquisición en un punto descripta en la sección 4.2. Este término

tiene la forma:

$$G_{\text{diffusion}}(\xi, \psi) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{4D(t_p\xi + t_l\psi)}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D(t_p\xi + t_l\psi)}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} \quad (4.8)$$

Observamos que, contrario al caso de espectroscopía en un punto, acá no aparece explícitamente el tiempo. La función de correlación presenta una dependencia sobre el desplazamiento de la imagen y el tiempo está implícito en los tiempos de adquisición, t_p y t_l .

La función de correlación espacial total corresponde al producto del término de barrido y del término de difusión:

$$G_{\text{total}}(\xi, \psi) = G_{\text{barrido}}(\xi, \psi) \cdot G_{\text{diffusion}}(\xi, \psi) \quad (4.9)$$

Si hubiera presente más de un proceso que ocasione fluctuaciones de la señal, aparecería un término adicional en la $G_{\text{total}}(\xi, \psi)$, por cada proceso de fluctuación. Para un proceso de asociación-disociación, que presenta variaciones de intensidad cuando una molécula se asocia o disocia, la función de correlación espacio temporal tiene la forma:

$$G_{\text{asoc-disoc}}(\xi, \psi) = A_{\text{asoc-disoc}} e^{(-t_p\xi + t_l\psi)/t_{\text{asoc-disoc}}} \quad (4.10)$$

donde la constante $A_{\text{asoc-disoc}}$ depende de la inversa del número de sitios disponibles para unirse, y el tiempo $t_{\text{asoc-disoc}}$ depende del tiempo que la molécula permanezca asociada. De esta forma se agrega un factor a la función de correlación total:

$$G_{\text{total}}(\xi, \psi) = G_{\text{barrido}}(\xi, \psi) \cdot G_{\text{diffusion}}(\xi, \psi) \cdot G_{\text{asoc-disoc}}(\xi, \psi) \quad (4.11)$$

4.4.4. Escalas temporales

En la Figura 4.10 presentamos el resultado de calcular la correlación espacial en 2D y 3D. En ella resaltamos la coordenada horizontal y vertical. Las mismas corresponden a los valores de $G(\xi, \psi = 0)$ y $G(\xi = 0, \psi)$ respectivamente. Los tiempos de barrido del láser son muy

distintos entre píxeles y entre líneas (μs y ms respectivamente).

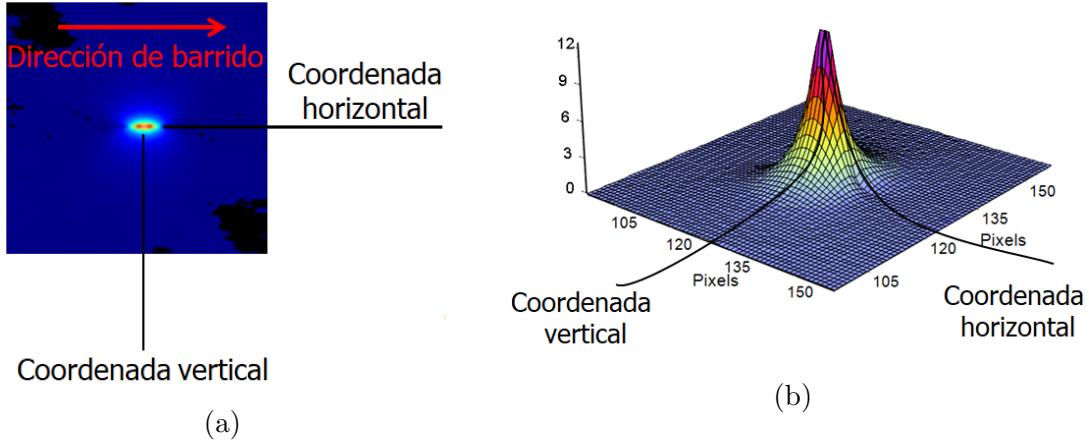


Figura 4.10: *Imagen de correlación 2D (a) y 3D (b). La coordenada horizontal y vertical corresponden a la correlación para los desplazamientos variando ξ y manteniendo $\psi = 0$; y manteniendo $\xi = 0$ y variando ψ respectivamente.*

La coordenada horizontal está asociada a tiempos cortos del orden de los μs , mientras que la coordenada vertical corresponde a tiempos más largos del orden de los ms . Esto es debido a que el tiempo entre píxeles horizontales es el tiempo de adquisición por píxel t_p , mientras que el tiempo entre píxeles verticales es el tiempo de línea t_l . Podemos decir por lo tanto que tenemos una coordenada rápida y una coordenada lenta.

En la primera fila de la Figura 4.11 podemos observar las imágenes de microscopía para una difusión libre de moléculas con tres coeficientes de difusión distintos. Estas imágenes surgen a partir de simulaciones utilizando el programa comercial *simFCS* mencionado anteriormente en esta tesis. El tamaño de píxel fue 0.05 nm y el volumen de observación tenía dimensiones $\omega_0 = 0.25 \mu\text{m}$ y $\omega_z = 1.5 \mu\text{m}$. La cantidad de moléculas dentro del volumen de observación corresponde a utilizar una solución 2 nM . El tiempo de adquisición por píxel fue $t_p = 5 \mu\text{s}$. En total se tomaron 100 imágenes.

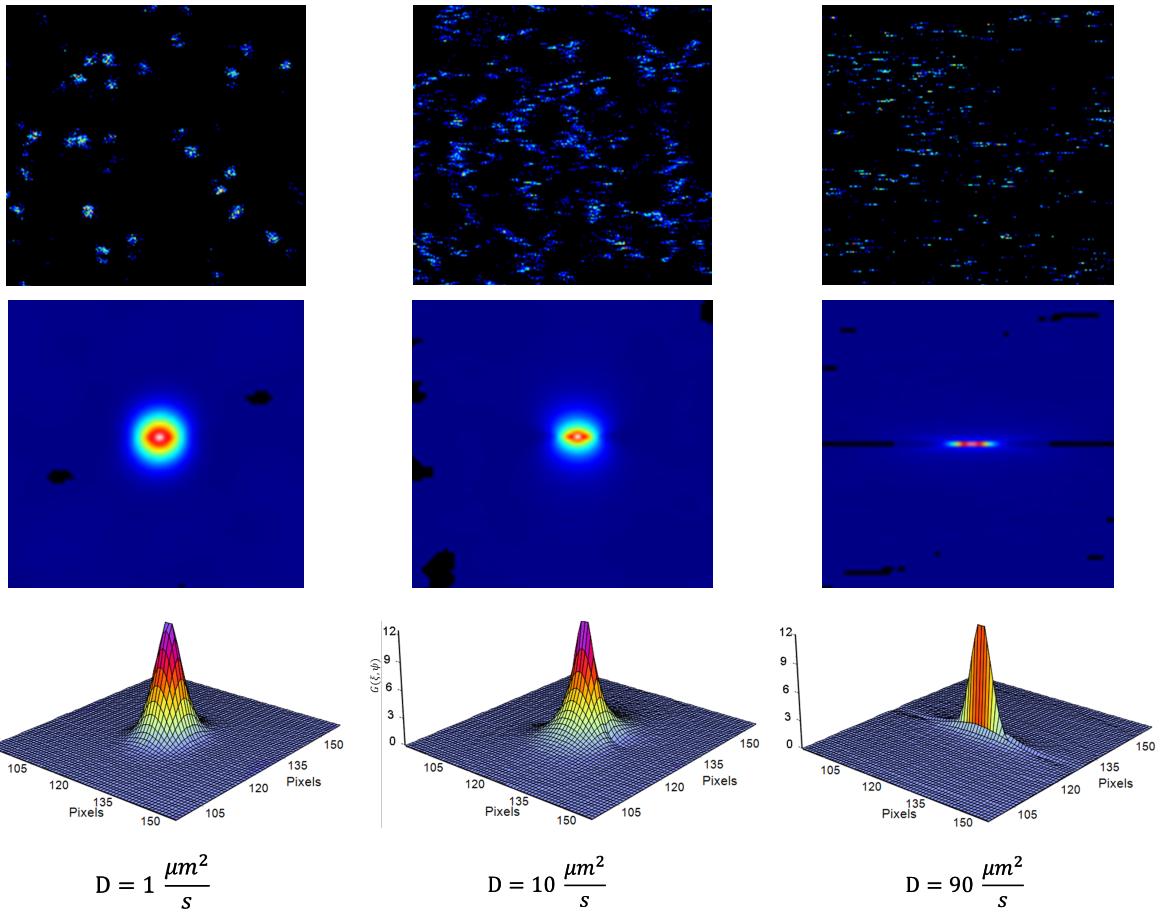


Figura 4.11: Fila superior: Imágenes de microscopía de barrido para moléculas que difunden libremente para tres coeficientes de difusión diferentes. Fila del medio e inferior: Autocorrelación en 2D y 3D respectivamente, de las imágenes de intensidad de fluorescencia. Se observa la pérdida de correlación en la coordenada vertical ante un aumento del coeficiente de difusión

Para un coeficiente de difusión bajo, $D = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, podemos observar que luego de barrer una línea, al barrer la línea de abajo volvemos a encontrar a la molécula. Esta aparece como un punto. Esto es debido a que la velocidad de barrido es mucho mayor a la velocidad de difusión de la partícula. A medida que el coeficiente de difusión aumenta, vemos que perdemos la forma de la molécula. Cuando $D = 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$, estas ya no aparecen enteras sino que algunas parecen cortadas. La razón es que al barrer una línea observamos la molécula, pero al barrer la línea de abajo ya no la observamos más y por lo tanto se ve este efecto. Ya para coeficientes de difusión altos, $D = 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$, dejamos de observar moléculas y se observan rayas.

En la segunda y tercera fila de la Figura 4.11, observamos la autocorrelación, en 2D y 3D respectivamente, de estos tres procesos difusivos. Lo mencionado anteriormente sobre

observar o no la misma molécula cuando barremos una línea debajo de otra, lo podemos observar en el achatamiento de la función de correlación en la coordenada vertical. Aumentar el coeficiente de difusión se traduce en una disminución de la probabilidad de encontrar a la molécula al barrer varias líneas.

Podemos entonces decir que la técnica de RICS permite separar los procesos dinámicos en dos escalas temporales. Una escala temporal asociada a la coordenada horizontal, la coordenada de los procesos rápidos, cuyos tiempos son los tiempos de adquisición de las fluctuaciones, del orden de los μs . Por otro lado, la escala temporal asociada a la coordenada vertical, la de los procesos lentos, con tiempos característicos del orden de los ms.

4.4.5. Diferenciación de procesos dinámicos mediante RICS

Bajo ciertas condiciones la forma de la correlación obtenida mediante la técnica de RICS, es diferente según estén presentes diferentes procesos como pueden ser difusión y/o asociación-disociación. Dado que la espectroscopía de barrido tiene la habilidad intrínseca de mostrar correlaciones espacio-temporales y medir procesos rápidos (debido al tiempo entre píxeles) y procesos lentos (debido al tiempo entre líneas), el proceso de difusión y el de asociación-disociación, resultan distinguibles bajo ciertas condiciones que dependen del tiempo característico de cada proceso, en relación con el tiempo de permanencia de cada píxel y el tiempo de línea. Observamos que, en principio, siempre es posible cambiar estos tiempos (tiempos de permanencia y de línea) para llevar el proceso que causa la fluctuación en la escala de tiempo observable [20].

Queremos estudiar cómo distinguir si un proceso corresponde a difusión o a asociación-disociación. Para esto elegimos simular un proceso difusivo, utilizando el software comercial *simFCS* y estudiamos las diferencias entre el ajuste de la correlación espacio temporal de esta simulación por dos modelos diferentes, un modelo difusivo y un modelo de asociación-disociación. El volumen de observación tiene dimensiones $\omega_0 = 0.25 \mu\text{m}$ y $\omega_z = 1.5 \mu\text{m}$, y la cantidad de moléculas dentro de la PSF corresponde a utilizar una solución 2 nM. Para la adquisición, el tiempo de píxel fue $t_p = 5 \mu\text{s}$, mientras que el coeficiente de difusión de las moléculas fue $D = 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Con las 100 imágenes adquiridas de la simulación, calculamos la autocorrelación que se muestra en la parte superior de la Figura 4.12. En el medio de la misma Figura mostramos los ajustes de la función de correlación: a la izquierda el ajuste por modelo difusivo y a la derecha por modelo de asociación-disociación. Estos ajustes los obtuvimos utilizando las ecuaciones de los modelos dinámicos descriptos en la sección 4.4.3.

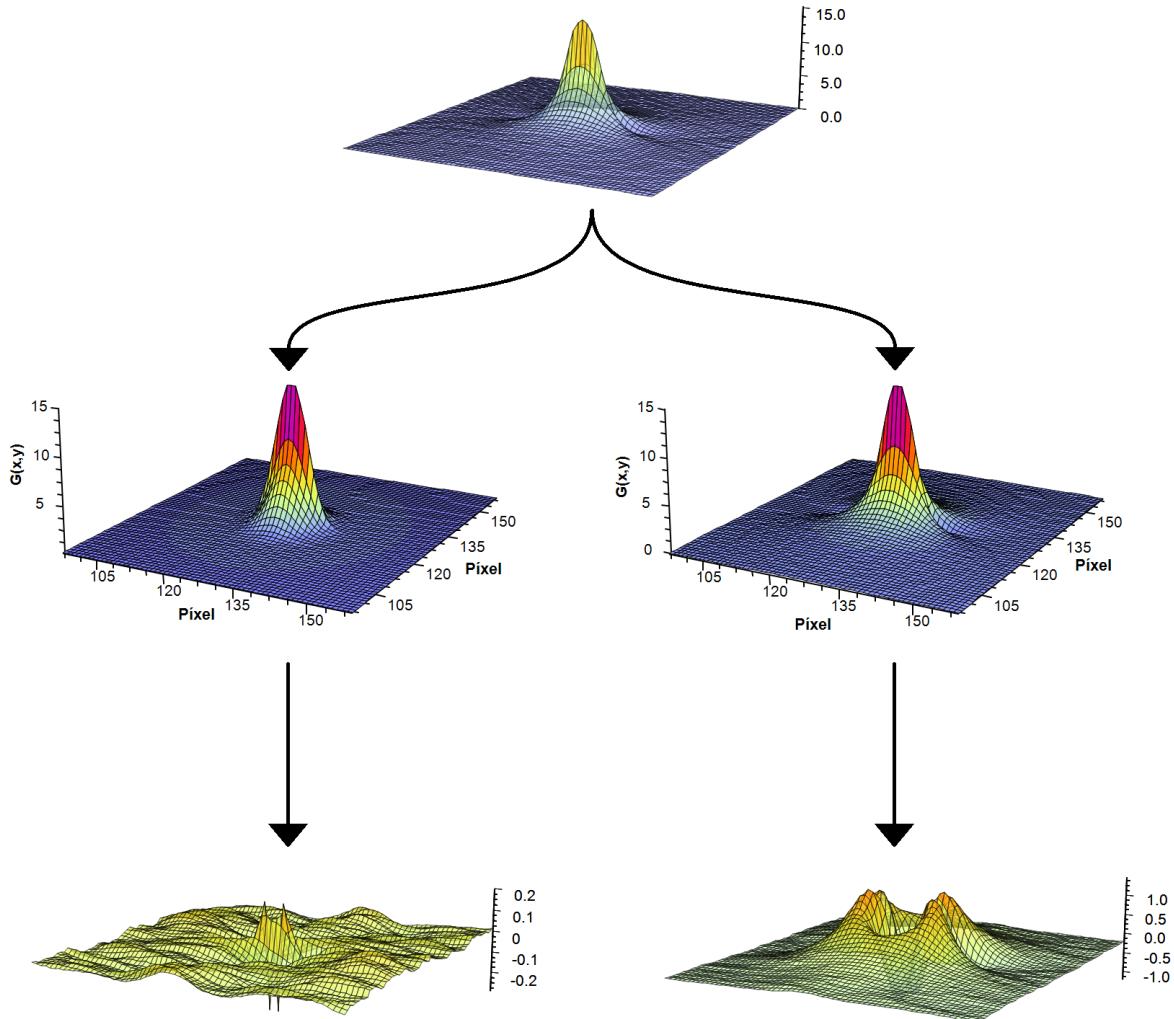


Figura 4.12: Superior: Correlación espacio temporal para una simulación de proceso difusivo puro. Medio: Ajuste de la autocorrelación por modelo difusivo (izq.) y modelo de asociación-disociación (der.). Inferior: Diferencias píxel a píxel entre la autocorrelación y el ajuste por modelo difusivo (izq.) y modelo de asociación-disociación (der.)

Restando los valores de la función de correlación con los del ajuste píxel a píxel, es decir, el valor del píxel (1,1) de la correlación con el píxel (1,1) del ajuste, obtenemos como resultado el valor del píxel (1,1) de la diferencia entre proceso y ajuste. Esto se repite para cada par de píxeles de la correlación y el ajuste. El resultado de este procedimiento son las diferencias

entre proceso y ajuste. En la parte inferior de la Figura 4.12 observamos las diferencias entre proceso y ajuste por modelo difusivo a la izquierda; y entre proceso y ajuste por modelo de asociación-disociación a la derecha.

Si observamos las diferencias, vemos que cuando ajustamos la simulación del proceso difusivo por el modelo correspondiente, es decir el modelo de difusión, estas son aproximadamente un orden de magnitud menor que cuando ajustamos por un modelo de asociación-disociación. Tener distintos órdenes de magnitud en las diferencias nos dice que el modelo difusivo ajusta mejor que el modelo de asociación-disociación. Lo que queremos remarcar con esta obviedad es que, si no supiéramos que la simulación fuera de un proceso difusivo, si alguien nos entregase la autocorrelación espacio temporal y no nos dijera de qué proceso proviene, mediante los ajustes podríamos decir con mayor probabilidad que este proceso es el difusivo gracias a que presenta diferencias más chicas.

Si bien la técnica de RICS es una herramienta poderosa para la diferenciación de procesos con escalas temporales en un amplio rango de tiempos ($\mu s - ms - s$), no siempre es posible hacer esto. Como veremos en el próximo capítulo, cuando los tiempos característicos de los procesos son muy similares, los ajustes de la función de correlación espacio temporal no permitirán distinguirlos. Es decir, sucederá algo similar a lo descripto en la sección 4.3 cuando estudiamos cómo podía influir en la distinción de procesos dinámicos la relación entre los tiempos característicos cuando hacíamos correlación temporal en un punto.

Capítulo 5

Estudio de la dinámica de la proteína cápside del virus del dengue

En este capítulo se presenta un estudio de la dinámica intracelular de la proteína de cápside del virus del dengue (C-DENV) a partir de la correlación de imágenes usando RICS. Se analizaron los datos aplicando dos modelos de dinámica distintos (difusión pura y asociación-disociación) encontrando que no era posible distinguir qué modelo ajustaba mejor los datos. Motivados por este resultado, se realizaron simulaciones numéricas que permitieron a partir de herramientas estadísticas, determinar parámetros para diferenciar entre estos dos modelos de ajuste.

5.1. Dinámica de C-DENV estudiada a partir de RICS

Como se mencionó en la sección 3.2.1, el dengue es una de las enfermedades virales de mayor incidencia en los últimos años. Se estiman del orden de 400 millones de infecciones de dengue cada año en el mundo y el número va en aumento especialmente en países de América Latina. A pesar de los esfuerzos y el creciente interés público para desarrollar antivirales contra dengue, aún no están disponibles vacunas efectivas o agentes terapéuticos.

En los últimos años algunos descubrimientos han aparecido. Por ejemplo, actualmente es sabido que las proteínas de cápside del virus tienen un rol central durante el proceso de

infección y, por lo tanto, han surgido como importantes candidatas para el diseño de agentes antivirales. Es claro, entonces, que un entendimiento profundo acerca del rol y función de cápside es actualmente de gran interés.

En este capítulo nos centramos en el estudio de la dinámica de una variante fluorescente de cápside marcada con mCherry (C-mCherry) a partir de experimentos de correlación de imágenes (RICS) descripta en la sección 4.4. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Andrea Gamarnik del laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir y la Dra. Manuela Gabriel del Departamento de Física (FCEN/UBA).

Para cada experimento se adquirieron 100 imágenes consecutivas de 256 x 256 píxeles en un microscopio confocal comercial Zeiss 880 utilizando una longitud de onda de excitación de 543 nm y un tamaño de píxel de 50 nm/píxel. El tiempo de adquisición por píxel fue de $t_p = 16 \mu\text{s}$ y el tiempo total por experimento de aproximadamente 1 minuto. Con cada conjunto de 100 imágenes se calculó la correlación espacial. La correlación obtenida fue ajustada usando la expresión de la autocorrelación para un modelo difusivo o un modelo de asociación-disociación molecular.

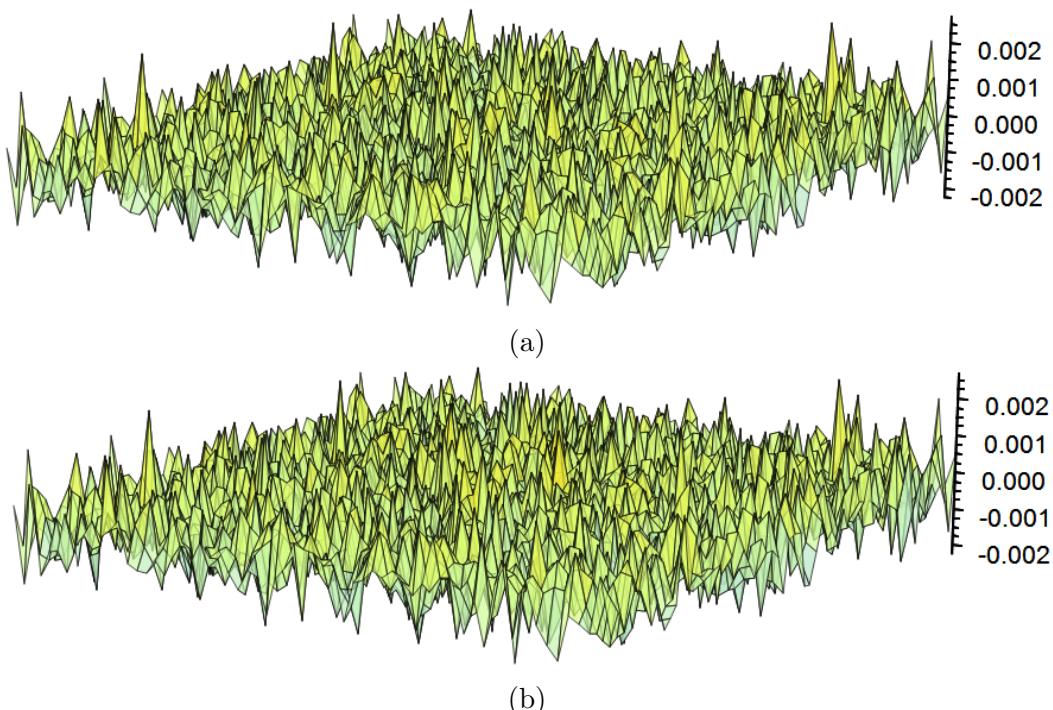


Figura 5.1: Diferencias píxel a píxel entre los datos experimentales y el ajuste por un modelo difusivo puro (a) y por un modelo de asociación-disociación molecular (b).

En la Figura 5.1 observamos las diferencias píxel a píxel entre la correlación de los datos experimentales y el ajuste por un modelo puramente difusivo (5.1a) y las diferencias entre la correlación y el ajuste por un modelo de asociación-disociación molecular (5.1b). Como se desprende de esta figura no es evidente a simple vista cual de los modelos (si hubiera alguno) ajusta mejor los datos. Otra manera alternativa de visualizar este punto es graficando el histograma normalizado de las diferencias obtenidas al ajustar por cada modelo, el cual puede observarse en la Figura 5.2.

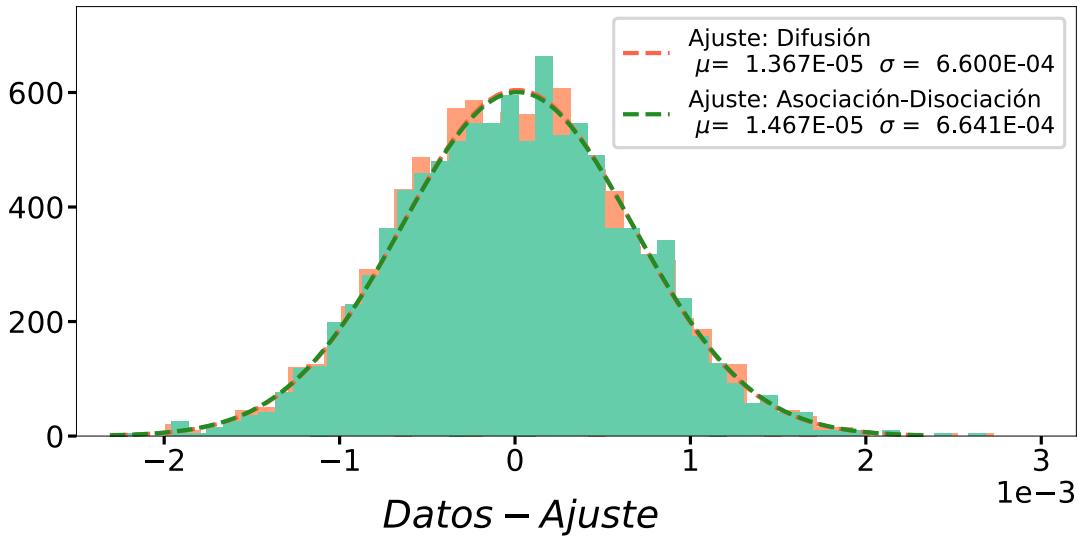


Figura 5.2: *Histogramas de las diferencias píxel a píxel para los dos modelos utilizados. En naranja la correlación de las imágenes fue ajustada por un modelo difusivo y en celeste fue ajustada por un modelo de asociación-disociación molecular.*

En la sección 4.4.5 mostramos un caso donde, a partir de ajustar la función de correlación espacio temporal con dos modelos diferentes, era posible determinar la dinámica subyacente a partir de analizar la bondad del ajuste. Es evidente que en este caso, hacer esa determinación no es tan sencillo. El ajuste de la correlación utilizando dos modelos biológicamente muy distintos resulta en distribuciones similares de las diferencias.

En otras palabras, no encontramos que las diferencias entre la correlación calculada a partir de los datos experimentales y el ajuste por uno de los dos modelos, sean menores que las asociadas al ajuste por el otro modelo. Esto nos impide, por lo tanto, afirmar que la dinámica está gobernada por uno u otro proceso. En este marco, en la próxima sección, desarrollaremos algunas herramientas para, de ser posible, determinar en qué casos es posible distinguir cuál de los dos modelos propuestos ajustan mejor los datos.

5.2. Análisis estadístico de los resultados de RICS

Definimos el estadístico S^2 como el valor medio del cuadrado de las diferencias entre los datos de la correlación y el ajuste. Es decir:

$$S^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i))^2 \quad (5.1)$$

donde y_i es el valor de la correlación en el píxel i , $f(x_i)$ es el valor del ajuste en el píxel i por un modelo dado y N es el número total de píxeles en una imagen.

Dado que el estadístico S^2 representa una medida de distancia es de esperar que dada una función de correlación de los datos y dos ajustes por modelos diferentes, el modelo que arroje el valor de S^2 más chico indicará el modelo que mejor describe a los datos. Para el caso mostrado en la Figura 5.1 los valores de S^2 obtenidos fueron: $S^2 = 4,37 \cdot 10^{-7}$ para el ajuste por el modelo de difusión y $S^2 = 4,41 \cdot 10^{-7}$ para el modelo de asociación-disociación.

Sería deseable entonces encontrar una manera alternativa que nos permita discernir entre ambos procesos.

5.3. Errores tipo I y tipo II y Potencia del test

Como se dijo anteriormente, queremos encontrar la manera de distinguir entre dos procesos biológicamente posibles: la difusión de cápside o la asociación-disociación de cápside con otro componente intracelular. Esta pregunta podemos plantearla en términos estadísticos. Supongamos que tenemos dos hipótesis: la hipótesis nula H_0 y la hipótesis alternativa H_1 , las cuales están asociadas a una distribución de valores de un estadístico X . Sea un parámetro arbitrario θ , la hipótesis nula H_0 asume $\theta = \theta_0$, mientras que la hipótesis alternativa H_1 asume que $\theta = \theta_1$. Podemos entonces definir a la distribución de valores del estadístico X asociado a la hipótesis nula como $f(x | \theta_0)$ y a la hipótesis alternativa como $f(x | \theta_1)$ [47].

Debemos definir los criterios para decidir cuándo aceptar la hipótesis nula (y rechazar la

hipótesis alternativa) o cuándo rechazar la hipótesis nula (y aceptar la hipótesis alternativa) utilizando estas distribuciones.

Dado un experimento obtendremos un valor observado, X_{obs} .

Asumiendo que H_0 es cierta, podemos determinar un X_c a partir del cual podemos definir una región de rechazo para la variable aleatoria X_{obs} . Es decir, una región en la cual, si X_{obs} cae a la izquierda de esta zona debemos aceptar H_0 , caso contrario debemos rechazar dicha hipótesis nula (Figura 5.3).

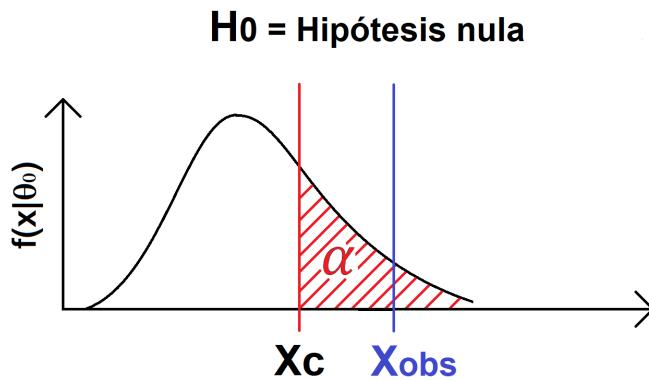


Figura 5.3: Distribución esquemática de valores de un estadístico X para la hipótesis nula H_0 . Se marca el valor crítico X_c para el cual rechazamos H_0 si $X_c \leq X_{obs}$

Tomando como base que H_0 es verdadera, el valor del observable puede indicar que rechazemos H_0 por dos motivos diferentes. O bien la hipótesis alternativa era verdadera (y la hipótesis nula era falsa) o porque al hacer el experimento obtuvimos un valor X_{obs} que nos hizo cometer el error de pensar que la hipótesis nula era falsa.

Al error de rechazar H_0 cuando en realidad es verdadera, se lo llama “Error Tipo I”. Este tipo de error está siempre presente. Surge cuando al hacer un experimento obtenemos un valor raro y nos inclinamos a pensar que como es raro debe ser que la hipótesis nula es falsa y no que realizamos una buena medición pero las fluctuaciones estadísticas la hicieron parecer rara, osea lo que llamamos “tener mala suerte”.

La probabilidad de cometer este error es la significancia, α . La significancia está dada por:

$$\alpha = \int_{X_c}^{+\infty} f(x | \theta_0) \quad (5.2)$$

Si por el contrario suponemos que H_0 es falsa, existe la posibilidad de aceptarla como verdadera cuando en realidad es falsa y la que es verdadera es la hipótesis alternativa H_1 . A este error se lo llama “Error Tipo II”. La probabilidad de cometer un error de este tipo (β) está dada por:

$$\beta = \int_{-\infty}^{X_c} f(x | \theta_1) \quad (5.3)$$

En la Figura 5.4 mostramos una distribución esquemática de valores del estadístico X para la hipótesis nula y para la hipótesis alternativa. En ella se destacan las zonas correspondientes a las probabilidades de cometer un error tipo I o tipo II.

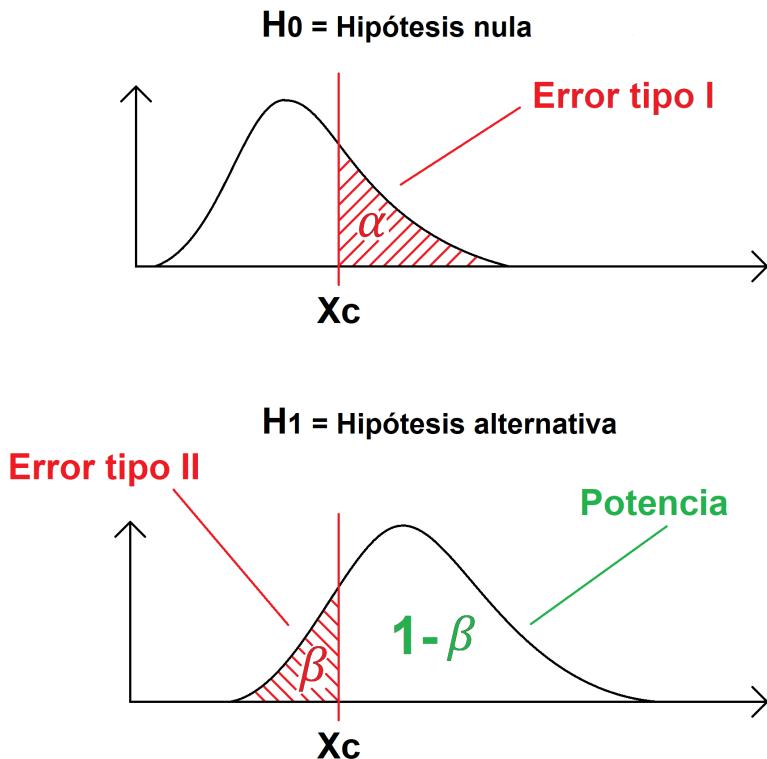


Figura 5.4: *Distribuciones esquemáticas para las hipótesis nula (arriba) y alternativa (abajo). El valor de X_c determina las zonas correspondientes a los errores tipo I, tipo II y a la potencia.*

Esto lo logramos mediante nuestro valor X_{obs} proveniente de un experimento. Si $X_{obs} \leq X_c$ aceptaremos H_0 y rechazaremos la hipótesis alternativa con una significancia α . Es decir, con una probabilidad tan chica como α de estar cometiendo un error tipo I. Mientras que si $X_{obs} \geq X_c$ habrá mayor probabilidad de que H_1 sea verdadera y la hipótesis nula falsa. Cuando $\alpha = \beta$ la probabilidad de rechazar H_0 cuando es verdadera es igual a aceptarla cuando esta sea falsa.

Esto nos genera un test que es capaz de determinar con qué hipótesis es más compatible nuestro X_{obs} . La potencia de un test está definida como la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta sea falsa. Es decir, la probabilidad de que X_{obs} quede a la derecha de X_c cuando H_1 es verdadera. La potencia depende de quien es la hipótesis alternativa y está dada por:

$$Potencia = 1 - \int_{-\infty}^{X_c} f(x | \theta_1) \quad (5.4)$$

Cuando las dos distribuciones estén muy separadas, la potencia se acercará a su máximo valor ($1 - \beta \approx 1$). Esto nos dirá que el estadístico X que utilizamos para la construcción de las distribuciones es muy sensible a la realidad. Es decir, que el test es muy poderoso en el sentido de que es capaz de rechazar, casi siempre, la hipótesis nula cuando sea falsa. Si hubiese alguna zona donde los dos test rechacen la hipótesis nula, entonces debería haber un tercer modelo con su distribución de estadístico como nueva hipótesis.

Por último podemos mencionar que una persona cualquiera puede utilizar este test, debido a que lo único que necesita es el parámetro X_c con el cual comparar un X_{obs} obtenido de su propio experimento. Una de las formas de determinar el valor de X_c es eligiendo un valor de la significancia (típicamente $\alpha = 0,05$). Otra es elegir X_c de forma tal que maximice la potencia del test. Esto último se lo conoce como el lema de Neyman-Pearson.

5.4. Estudio de dos procesos dinámicos a partir de simulaciones numéricas

Para estudiar la capacidad de RICS para diferenciar entre estas dos dinámicas posibles calculamos la distribución de S^2 para imágenes simuladas numéricamente según dos procesos: de difusión pura y de asociación-disociación molecular. Dado que conocemos a priori la dinámica impuesta durante las simulaciones, estas nos permitirán extraer la respuesta del S^2 al ajustar las correlaciones por ambos modelos. Como mencionamos anteriormente S^2 mide las diferencias entre la correlación obtenida a partir de los datos (experimentales o simulados) y el ajuste por un modelo determinado, en nuestro caso: difusión y de asociación-disociación.

Las distribuciones se realizaron a partir de la simulación de experimentos, suponiendo dos tipos de movimiento de cápside: un movimiento puramente difusivo y otro de asociación-disociación. Se simularon 100 experimentos de cada tipo. De cada uno se extrajo el valor de S^2 mediante el ajuste de cada simulación por nuestros dos modelos. En total, con los dos experimentos simulados y los dos modelos de ajuste, obtuvimos cuatro distribuciones del estadístico S^2

Para todas las simulaciones consideramos un volumen de observación, cuyas dimensiones fueron $w_0 = 0,25\mu m$ y $w_z = 1,5\mu m$ y en cuyo interior la cantidad de partículas correspondía a utilizar una solución 0.16 nM. El tamaño de píxel fue de $50nm$ y el tiempo por píxel fue de $t_p = 5\mu s$. Para las simulaciones de procesos difusión utilizamos un coeficiente de difusión $D = 10\frac{\mu m^2}{seg}$ que es un tiempo compatible con una difusión citoplasmática, lo que dà un tiempo característico de difusión a través del volumen de observación de $\tau_{dif} = 1,5ms$.

Como mencionamos anteriormente, para cada experimento simulado calculamos la autocorrelación espacio temporal y luego la ajustamos por dos modelos, un modelo difusivo y un modelo de asociación-disociación. Para cada uno de estos ajustes calculamos el valor del estadístico S^2 utilizando código propio escrito en entorno Python, y definido como:

$$S_m^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i))^2 \quad (5.5)$$

donde para la m -ésima simulación, N es el total de puntos de la función de correlación (en nuestro caso $N = 3969$), y_i es el valor de la correlación en el i -ésimo píxel y $f(x_i)$ es el valor del ajuste en el i -ésimo píxel. Finalmente obtuvimos 100 valores para el estadístico S^2 , uno por cada experimento simulado.

En la Figura 5.5 observamos el histograma normalizado calculado con los valores del estadístico S^2 calculados a partir de los experimentos simulados para un proceso difusivo pero ajustado por dos modelos diferentes (modelo difusivo en celeste y un modelo de asociación-disociación en azul).

A modo de referencia, en linea punteada se graficó la función de densidad de probabilidad

(PDF por sus siglas en inglés) la cual consiste en una gaussiana de centro y ancho correspondiente al valor medio y la dispersión de los valores de S^2 en cada caso.

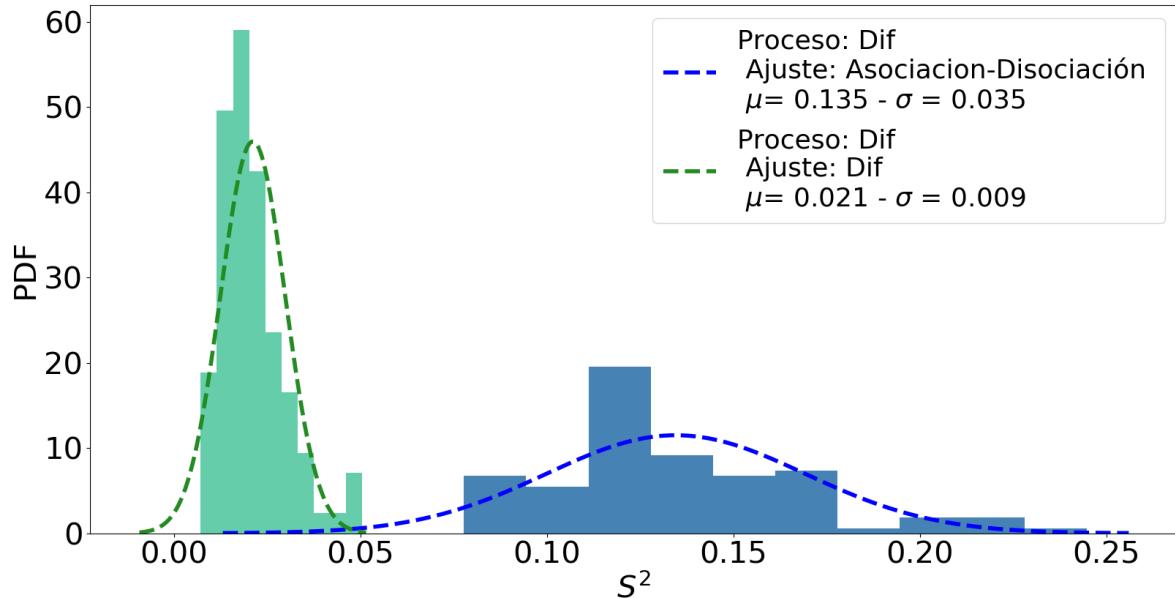


Figura 5.5: *Distribución de los S^2 obtenidos para experimentos simulados a partir de un proceso de difusión, ajustado por un modelo difusivo (en celeste) y por un modelo de asociación-disociación (en azul).*

Observamos que el valor medio de la distribución de S^2 , correspondiente a las simulaciones de experimentos difusivos y ajustadas por el modelo correspondiente, es menor que el valor medio de la distribución resultante de ajustarlas por un modelo que no corresponde al utilizado durante la simulación (el de asociación-disociación). O lo que es lo mismo, las diferencias entre los datos y el ajuste son más chicas cuando al proceso se lo ajusta por el modelo correspondiente.

Análogamente, repetimos este procedimiento pero donde ahora se simularon experimentos cuyas fluctuaciones obedecían a un proceso de asociación-disociación molecular. Para las simulaciones del proceso de asociación-disociación, mantuvimos las dimensiones de la PSF y la concentración dentro de la misma; y el tamaño y tiempo de píxel que utilizamos para las primeras simulaciones. Para simular correctamente un proceso de esta naturaleza es necesario hacer que las partículas difundan sin brillar, por lo que no van a contribuir a las fluctuaciones de intensidad mientras estén en este estado, y que brillen solo cuando están quietas, es decir cuando no difundan. Es un sistema con dos estados, “brillo” y “no brillo”. Elegimos que el

tiempo de permanencia en un estado y en el otro sea el mismo, siendo este $\tau_{asoc-disoc} = 5ms$.

Cabe destacar que si las moléculas pasan mayor tiempo en un estado que en otro, se producirá a una acumulación de moléculas en un estado. Por ejemplo, si las partículas están un tiempo más largo en el estado de “no brillo” entonces veremos que la cantidad de partículas que brillan irán disminuyendo con el tiempo, provocando que la intensidad media que registramos sea menor.

De la misma forma que hicimos para el proceso de difusión, calculamos la distribución de S^2 para el proceso de asociación-disociación y realizamos el histograma normalizado de la Figura 5.6.

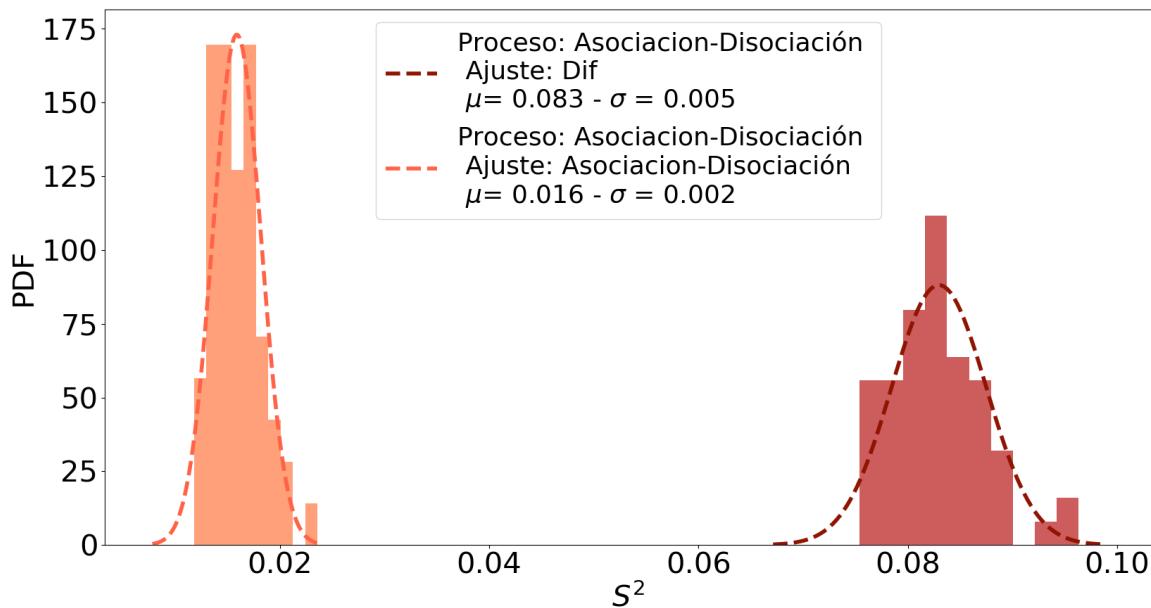


Figura 5.6: Distribución de los S^2 obtenidos para experimentos simulados a partir de un proceso de asociación-disociación ajustado por un modelo difusivo (en rojo) y por un modelo de asociación-disociación (en naranja).

Nuevamente podemos observar que las diferencias entre la correlación de la imágenes y el ajuste son más chicas cuando el experimento simulado es ajustado por su modelo correspondiente, lo que se traduce en un valor medio más chico para la distribución de S^2 .

El resultado obvio hasta el momento es que dado un experimento simulado (y como es simulado sabemos exactamente la dinámica que genera las fluctuaciones de la señal), el valor de S^2 es significativamente mas chico para el caso en donde la correlación obtenida a partir de las imágenes simuladas es ajustada utilizando el modelo correcto (el modelo correspondiente

a la dinámica utilizada durante las simulaciones) que cuando la correlación se ajusta por el modelo alternativo.

Sin embargo esto no es lo que sucede en un experimento real. En un experimento real uno elige que modelo usa para ajustar la correlación obtenida a partir de las imágenes medidas, pero no conoce la dinámica que originó las fluctuaciones de la señal. En este sentido lo que nos interesa estudiar ahora es la pregunta inversa: ¿Qué podemos decir sobre experimentos que no sabemos a qué proceso dinámico responden pero que si conocemos con qué modelo ajustamos los datos? Para responder esta pregunta tomamos las distribuciones de S^2 de los experimentos simulados por dos dinámicas distintas pero ajustados por un mismo modelo.

En la Figura 5.7 observamos las gaussianas de centro y ancho correspondiente al valor medio y la dispersión de las distribuciones del estadístico S^2 para los experimentos simulados, a partir de considerar un proceso de difusión (arriba) y el proceso de asociación-disociación (abajo), ambos ajustados por un modelo difusivo. El valor del estadístico S^2 crítico, elegido de forma tal que la significancia sea $\alpha = 0,05$, resultó $S_c^2 = 0,035$. El mismo lo marcamos con una línea roja en las curvas de la Figura 5.7.

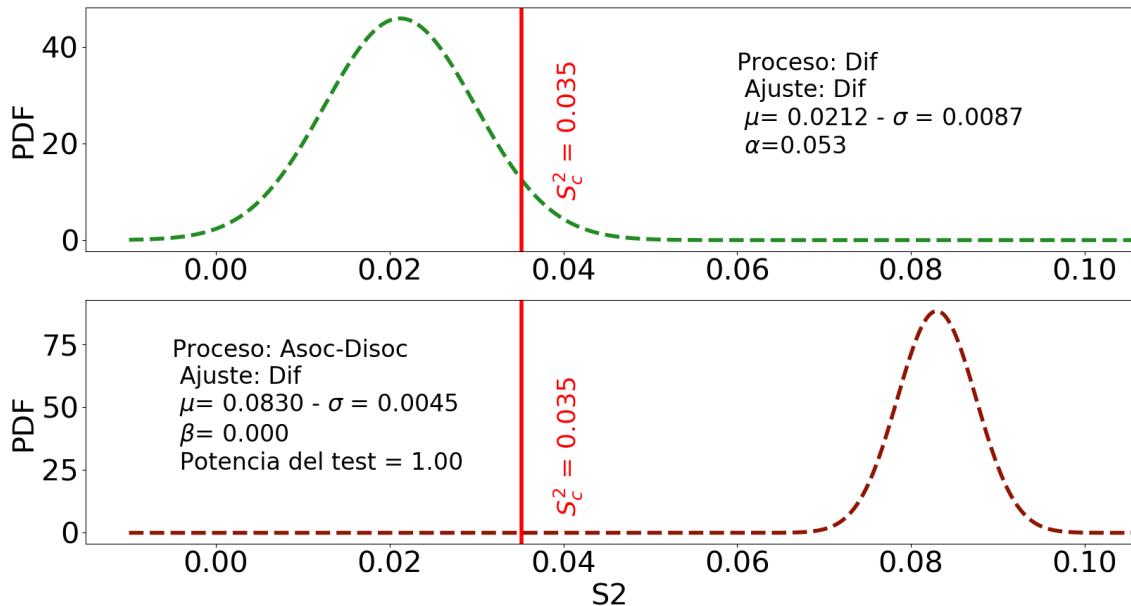


Figura 5.7: Gaussianas de las distribuciones de S^2 de simulaciones de un proceso de difusión (arriba) y de asociación-disociación (abajo). Ambos procesos ajustados por modelo difusivo. En linea roja se marcó el valor crítico de S^2 , el cual fue definido de forma tal que la significancia sea $\alpha = 0,05$.

Dada la separación entre las distribuciones obtenidas, tanto la significancia como la probabilidad de cometer un error tipo II (β) son bajas. Este resultado implica que la potencia del test generado por estas dos distribuciones es máxima, siendo que el valor calculado de la misma, tal como se definió en la sección 5.3, resulta en 1.

Veamos ahora como podemos utilizar los resultados obtenidos en la Figura 5.7 a partir de experimentos simulados, para el caso de un experimento real en el que obtenemos un valor de estadístico S_{obs}^2 a partir de un ajuste por un modelo. Para esto nos valdremos de lo expuesto en la sección 5.3, eligiendo como hipótesis nula la gaussiana de la distribución de S^2 del proceso de difusión y como hipótesis alternativa la gaussiana de la distribución de S^2 del proceso de asociación-disociación, ambos procesos ajustados por un modelo difusivo.

Supongamos que queremos averiguar si nuestro experimento se trata de un proceso difusivo o no. A partir del ajuste de los datos experimentales por un modelo de difusión, obtendremos el valor del S^2 observado, S_{obs}^2 . Determinando entonces en que lugar de las gaussianas cae, podremos decir que hay mayor probabilidad de que el proceso medido corresponda a un proceso de tipo difusivo si el $S_{obs}^2 < S_c^2$; y, si por el contrario, el $S_{obs}^2 > S_c^2$ será mayor la probabilidad de que el proceso medido no sea difusivo sino que corresponda al de una asociación-disociación.

En la Figura 5.8 se presentan las gaussianas de las distribuciones del estadístico S^2 para los procesos de asociación-disociación y de difusión ajustados por un modelo de asociación-disociación. De nuevo elegimos el S_c^2 de forma tal que la significancia sea $\alpha = 0,05$, en este caso resultando su valor $S_c^2 = 0,02$. La potencia calculada para el test generado por estas gaussianas es 0.99. Como en el caso anterior, este resultado sobre la potencia está asociado a la separación entre las distribuciones. Aquí también la potencia del test generado por estas dos distribuciones es máxima.

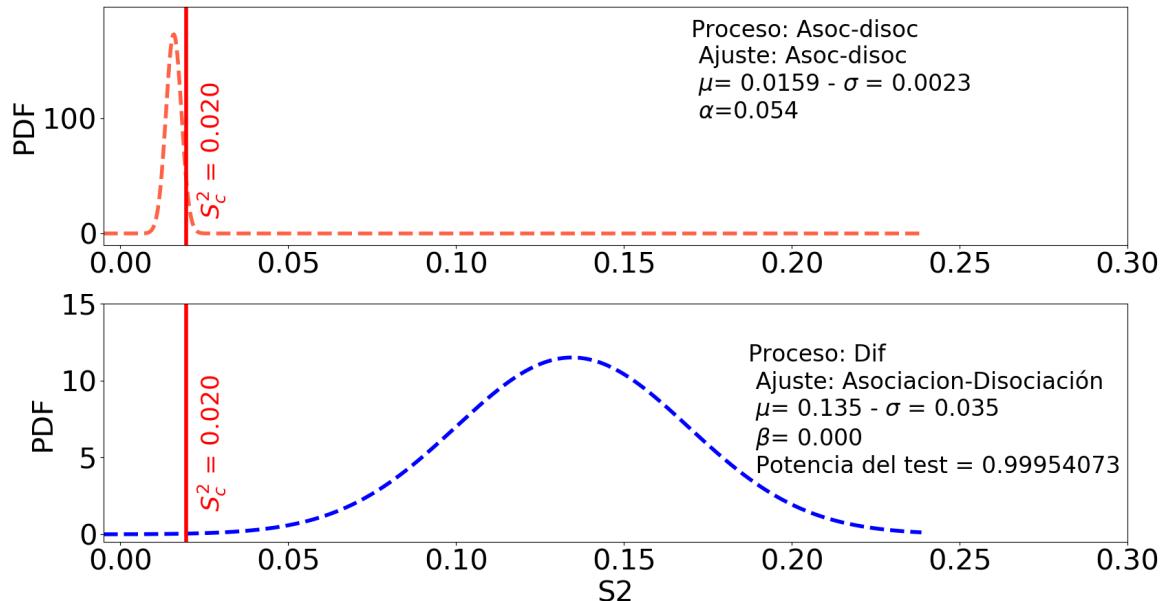


Figura 5.8: Gaussianas de las distribuciones de S^2 de simulaciones de un proceso de asociación-disociación (arriba) y de difusión (abajo). Ambos procesos ajustados por modelo de asociación-disociación. En linea roja se marcó el valor crítico de S^2 , el cual fue definido de forma tal que la significancia sea $\alpha = 0,05$.

Realizando un análisis similar al que hicimos para las distribuciones de la Figura 5.7, podemos pensar que al realizar un experimento obtenemos un valor S_{obs}^2 y queremos determinar si el proceso dinámico es un proceso de asociación-disociación. En este caso la hipótesis nula será el proceso de asociación-disociación ajustado por su modelo correspondiente. Vemos que, como en el caso anterior, si S_{obs}^2 es menor que el valor crítico calculado a partir de la elección de α , entonces será más probable que el proceso sea de asociación-disociación. Caso contrario solo podremos decir que la dinámica observada no se corresponde a la de un proceso de asociación-disociación, siendo que hay mayor probabilidad que sea de difusión.

Si bien ambos test tienen potencias muy altas, hay leves diferencias entre los dos valores y eso es en parte debido a que la potencia de un test depende de cual es la hipótesis alternativa. Sin embargo, en ambos casos obtuvimos un test de potencia muy cercana a 1. Es decir que obtuvimos un test muy poderoso ya que permite, casi siempre, determinar con muy baja probabilidad de equivocarnos si un proceso es o no difusivo (ó equivalentemente si es o no un proceso de asociación-disociación)

Conclusiones

En esta tesis estudiamos la agregación y dinámica de proteínas intracelulares en células vivas a partir de la puesta a punto e implementación de dos técnicas avanzadas basadas en el análisis de las fluctuaciones de intensidad en imágenes de microscopía de fluorescencia: Número y Brillo (N&B) y Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS). De esta última nos concentraremos específicamente en la espectroscopía de correlación en un punto y la espectroscopía de correlación de imágenes de barrido (RICS).

Aplicamos las técnicas aprendidas a dos problemas de relevancia biológica actual: el estudio de la proteína M6a en neuronas de ratón, y el estudio de la proteína cápside del virus del dengue. En el caso del estudio de M6a, se encontró que la proteína estaba presente en forma de oligómeros formados por agregados de 8 moléculas o más y que estos presentan preferencias de alojamiento en ciertas zonas de la célula. Como ya se mencionó, M6a es una proteína que se localiza principalmente en membrana o superficie celular. Sin embargo, se la ha caracterizado en endomembranas (ensdomas de reciclado) y en la membrana de vesículas presinápticas.

En el caso del estudio de la proteína de cápside del virus del dengue, si bien observamos píxeles de las imágenes con brillos mayores a los correspondientes a moléculas monoméricas, no fue posible determinar de manera concluyente la formación de agregados de C-DENV.

Para profundizar en el estudio de cápside, aplicamos la Espectroscopía de Correlación de Imágenes para analizar la dinámica de la proteína. Teniendo en consideración los múltiples procesos dinámicos a los que puede estar sometida una proteína intracelular, nos concentramos en caracterizar minuciosamente dos de los procesos dinámicos biológicamente más probables: un proceso difusivo (puro) y un proceso de asociación-disociación de la proteína

con otras proteínas o con otros componentes del interior celular. Aplicando la técnica de RICS a imágenes de microscopía confocal, encontramos que no era posible afirmar concluyentemente sobre el proceso dinámico de fondo a la que se encontraba sometida la proteína de cápside. Esto se debió fundamentalmente a que las diferencias entre los datos obtenidos experimentalmente y el ajuste para dos modelos de dinámica distintos, eran muy similares.

Frente a esto, exponemos una herramienta estadística basada en distribuciones de valores de S^2 provenientes del ajuste de imágenes simuladas numéricamente por distintos modelos dinámicos. Esta herramienta está basada en la creación de un test de hipótesis que permita la distinción entre procesos dinámicos. Dichas distribuciones las obtuvimos mediante simulaciones computacionales de dos procesos distintos (difusión y asociación-disociación). Obtuvimos que el test resultante de las distribuciones es muy bueno para discernir entre estos dos procesos diferentes.

El conocimiento profundo sobre cápside (en este caso sobre su la dinámica y su capacidad de agregación), genera entusiasmo y es de vital importancia para el desarrollo de potenciales barreras que actúen frente a la replicación viral.

Perspectivas

Dado los resultados obtenidos, podría ser que el estado de oligomerización de M6a en los distintos compartimientos subcelulares esté asociado a una función determinada como puede ser la formación de protusiones de membrana (espinas dendríticas, filopodios), o el reciclado o liberación de vesículas sinápticas conteniendo neurotransmisores. Estas conclusiones están por fuera del alcance de esta tesis, pero los resultados que aquí se presentan sientan las bases experimentales para contestar estas preguntas.

Los resultados presentados en el estudio de agregación de la proteína cápside, dejan las puertas abiertas para continuar el estudio de la misma en el campo de la biofísica. Además, con respecto al estudio de la dinámica de C-DENV dentro de la célula, será necesario conocer la relación entre el estadístico S^2 que obtuvimos de las simulaciones y el que se obtiene de manera experimental. Estos dos valores presentan órdenes de magnitud de diferencia y por

lo tanto, el test que obtuvimos a partir de las simulaciones no nos ayuda para conocer la dinámica a través de datos experimentales.

Bibliografía

- [1] Radek Macháň and Thorsten Wohland. Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Letters*, 588(19):3571–3584, 2014.
- [2] Ravina Singh and Hari Singh Nalwa. Singh, R. and Nalwa, H.S., 2011. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(4), pp.489-503. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011.
- [3] Hans Clevers. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 2011.
- [4] Janice M. Reichert and Julia B. Wenger. Development trends for new cancer therapeutics and vaccines, 2008.
- [5] Ulrike Schnell, Freark Dijk, Klaas A. Sjollema, and Ben N.G. Giepmans. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging, 2012.
- [6] Steffen J. Sahl, Stefan W. Hell, and Stefan Jakobs. Fluorescence nanoscopy in cell biology, 2017.
- [7] Ying Li, Warren A. Dick, and Olli H. Tuovinen. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms - A review, 2004.
- [8] Sviatlana Shashkova and Mark C. Leake. Single-molecule fluorescence microscopy review: Shedding new light on old problems, 2017.
- [9] Christian A. Combs. Fluorescence microscopy: A concise guide to current imaging methods, 2010.

- [10] Malte Renz. Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective, 2013.
- [11] Bernard Valeur. *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*. 2001.
- [12] John SH Danial, Yasmine Aguib, and Magdi H Yacoub. Advanced fluorescence microscopy techniques for the life sciences. *Global Cardiology Science and Practice*, 2016.
- [13] José Angel Conchello and Jeff W. Lichtman. Optical sectioning microscopy, 2005.
- [14] Karel Svoboda, Winfried Denk, David Kleinfeld, and David W. Tank. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, 1997.
- [15] Signal to noise considerations. <https://www.olympus-lifescience.com/zh/microscope-resource/primer/techniques/confocal/signaltonoise/>.
- [16] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1873.
- [17] Eugene Hecht. *fifth edition 5 Optics*.
- [18] Yakov G. Soskind. *Field Guide to Diffractive Optics*. 2011.
- [19] Michelle A. Digman, Claire M. Brown, Parijat Sengupta, Paul W. Wiseman, Alan R. Horwitz, and Enrico Gratton. Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophysical Journal*, 89(2):1317–1327, 2005.
- [20] Michelle A. Digman and Enrico Gratton. Analysis of diffusion and binding in cells using the RICS approach. *Microscopy Research and Technique*, 72(4):323–332, apr 2009.
- [21] Michelle A. Digman, Rooshin Dalal, Alan F. Horwitz, and Enrico Gratton. Mapping the Number of Molecules and Brightness in the Laser Scanning Microscope. *Biophysical Journal*, 94(6):2320–2332, mar 2008.
- [22] Rory Nolan, Maro Iliopoulou, Luis Alvarez, and Sergi Padilla-Parra. Detecting protein aggregation and interaction in live cells: A guide to number and brightness. *Methods*, 140-141:172–177, 2018.
- [23] Giulia Ossato, Michelle A. Digman, Charity Aiken, Tamas Lukacsovich, J. Lawrence Marsh, and Enrico Gratton. A two-step path to inclusion formation of huntingtin peptides revealed by number and brightness analysis. *Biophysical Journal*, 98(12):3078–

3085, 2010.

- [24] What is photon shot noise? https://camera.hamamatsu.com/jp/en/technical_guides/photon_shot_noise/index.html.
- [25] Christina Cruickshank Miller. The stokes-einstein law for diffusion in solution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 106(740):724–749, 1924.
- [26] Bryan Kolb, Arif Muhammad, and Robbin Gibb. Searching for factors underlying cerebral plasticity in the normal and injured brain, 2011.
- [27] María E. Fernández, Julieta Alfonso, Marcela A. Brocco, and Alberto C. Frasch. Conserved cellular function and stress-mediated regulation among members of the proteolipid protein family. *Journal of Neuroscience Research*, 2010.
- [28] A. El-Kordi, A. Kästner, S. Grube, M. Klugmann, M. Begemann, S. Sperling, K. Hammerschmidt, C. Hammer, B. Stepnjak, J. Patzig, P. De Monasterio-Schrader, N. Strenzke, G. Flügge, H. B. Werner, R. Pawlak, K. A. Nave, and H. Ehrenreich. A single gene defect causing claustrophobia. *Translational Psychiatry*, 2013.
- [29] Marco P.M. Boks, Mechteld Hoogendoorn, Bart J. Jungerius, Steven C. Bakker, Iris E. Sommer, Richard J. Sinke, Roel A. Ophoff, and René S. Kahn. Do mood symptoms subdivide the schizophrenia phenotype? Association of the GMP6A gene with a depression subgroup. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 2008.
- [30] Anne Gregor, Jamie M. Kramer, Monique van der Voet, Ina Schanze, Steffen Uebe, Roger Donders, André Reis, Annette Schenck, and Christiane Zweier. Altered GPM6A/M6 dosage impairs cognition and causes phenotypes responsive to cholesterol in human and drosophila. *Human Mutation*, 2014.
- [31] Insu Park, Hyun-Sik Lee, Hyun-Jun Kim, Kyung-Mi Moon, Seung-Gol Lee, Beom-Hoan O, Se-Geun Park, and El-Hang Lee. Photonic crystal power-splitter based on directional coupling. *Optics Express*, 2004.
- [32] Bong Kyung Shin, Hong Wang, Anne Marie Yim, Francois Le Naour, Franck Brichory,

- Jun Ho Jang, Rong Zhao, Eric Puravs, John Tra, Claire W. Michael, David E. Misek, and Samir M. Hanash. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *Journal of Biological Chemistry*, 2003.
- [33] Julieta Alfonso, Luciana R. Frick, Dafne M. Silberman, María L. Palumbo, Ana M. Genaro, and Alberto C. Frasch. Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biological Psychiatry*, 2006.
- [34] Mercedes Lachén-Montes, Andrea González-Morales, Xabier Martínez de Morentin, Estela Pérez-Valderrama, Karina Ausín, María Victoria Zelaya, Antonio Serna, Ester Aso, Isidro Ferrer, Joaquín Fernández-Irigoyen, and Enrique Santamaría. An early dysregulation of FAK and MEK/ERK signaling pathways precedes the β -amyloid deposition in the olfactory bulb of APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Proteomics*, 2016.
- [35] Micaela D. Garcia, Karina Formoso, Gabriela I. Aparicio, Alberto C. C. Frasch, and Camila Scorticati. The membrane glycoprotein m6a endocytic/recycling pathway involves clathrin-mediated endocytosis and affects neuronal synapses. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:296, 2017.
- [36] Karina Formoso, Micaela D. Garcia, Alberto C. Frasch, and Camila Scorticati. Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2016.
- [37] Karina Formoso, Silvia C. Billi, Alberto C. Frasch, and Camila Scorticati. Tyrosine 251 at the c-terminus of neuronal glycoprotein m6a is critical for neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Research*, 93(2):215–229, 2015.
- [38] Karina Formoso, Micaela D. García, Alberto C. Frasch, and Camila Scorticati. Filopodia formation driven by membrane glycoprotein m6a depends on the interaction of its transmembrane domains. *Journal of Neurochemistry*, 134(3):499–512, 2015.
- [39] Camila Scorticati, Karina Formoso, and Alberto C. Frasch. Neuronal glycoprotein m6a induces filopodia formation via association with cholesterol-rich lipid rafts. *Journal of*

Neurochemistry, 119(3):521–531, 2011.

- [40] Julieta Alfonso, María E. Fernández, Benjamin Cooper, Gabriele Flugge, and Alberto C. Frasch. The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005.
- [41] Beata Fuchsova, María E. Fernández, Julieta Alfonso, and Alberto C. Frasch. Cysteine residues in the large extracellular loop (EC2) are essential for the function of the stress-regulated glycoprotein M6a. *Journal of Biological Chemistry*, 2009.
- [42] Samir Bhatt, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, John S. Brownstein, Anne G. Hoen, Osman Sankoh, Monica F. Myers, Dylan B. George, Thomas Jaenisch, G. R. William Wint, Cameron P. Simmons, Thomas W. Scott, Jeremy J. Farrar, and Simon I. Hay. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 2013.
- [43] Brett D Lindenbach and Charles M Rice. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, 2007.
- [44] Laura Cecilia Estrada. Espectroscopía de correlación de fluorescencia en la nanoscala. 2009.
- [45] S.C.P. Norris, J. Humpolíčková, E. Amler, M. Huranová, M. Buzgo, R. Macháň, D. Lukáš, and M. Hof. Raster image correlation spectroscopy as a novel tool to study interactions of macromolecules with nanofiber scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 7(12):4195–4203, dec 2011.
- [46] Michelle A. Digman and Enrico Gratton. Lessons in Fluctuation Correlation Spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62(1):645–668, may 2011.
- [47] A. G. Frodesen, O. Skjeggestad, H. Tøfte, and Reklametrykk). *Probability and statistics in particle physics*. Universitetsforl, 1979.

Agradecimientos

Detrás de un trabajo de tesis se ve el resultado de un estudio, de una investigación. Creo, sin embargo, que es egoísta y erróneo pensar que este es un logro meramente personal. Por lo tanto quiero agradecer a todos aquellos (seguramente olvidándome de muchos) que de una u otra forma aportaron a que pueda estar escribiendo estas líneas, las cuales significan el fin de una etapa tan importante y el comienzo de una nueva.

A mi facultad y su personal, la cual amo y considero mi segunda casa, con todo lo que representa: que sea pública, que sea una de las mejores del mundo, que aporte al conocimiento y la divulgación científica, que tenga científicos de calidad que luchan por mejorar la ciencia nacional y aportar conocimiento al mundo.

A mis compañeros de cursada durante estos años. Son muchos y a todos les tengo mucho cariño. He aprendido mucho con ustedes y siempre me han dado su mejor onda. Gracias por los mates, apuntes y anécdotas. Ojalá sigamos cruzándonos mate en mano.

A Guille Mattei de todo corazón, quien me contagió su hermosa e importantísima labor, por confiar en mí y darme la oportunidad de llevar adelante la tarea de divulgación científica que tanto me gusta y que haré cada vez que pueda.

A mis amigos de la vida, Lauta, Sebas, Santi, Romi y Mati. Por las charlas, por estar siempre al pie del cañón, los debates y su amistad.

A Ignacio Sticco y Hernan Martinelli. Amigos y compañeros. Por los tantos exámenes y cursadas a la par, el compañerismo, las risas, los mates, las cervezas y las charlas.

Al LEC en su totalidad. No solo crean un ambiente hermoso en el que es un placer estar, sino que me han dado un espacio, su cariño, su consejo, su compañerismo y su ayuda.

A Fernando Alonso, por ser un oído, un abrazo, un consejo, un gran amigo, un hermano en la vida.

A Darío Rodriguez, por la enorme predisposición y paciencia para ayudarnos en este trabajo.

A Laura Estrada, mi guía en este trabajo, quien desde el día uno me dió un lugar, se dedicó a enseñarme, me empujó a mejorar, a crecer y a aspirar a cosas más grandes. Gracias por la confianza y el crecimiento.

Por último, para que se note lo importantes que son y la marca que dejaron:

A trufa, por comerte los libros que me atacaban, por rascarme el pie cuando escribo esto, por los juegos, ladridos y la felicidad que me das cada vez que llego. Siempre ayudas a relajar generando sonrisas y alegría.

A la familia Crnko: Alejandra, Eduardo y Milagros. No tengo más que agradecimientos para ustedes por su constante cariño y su enorme ayuda en estos años. Los tengo siempre presentes en el corazón con mucha alegría.

A Cecilia Benedetic, quien desde su lugar se dedicó a ayudarme a que me ayude y estar presente en momentos difíciles. Gracias de todo corazón. Este logro tiene una buena cuota tuya.

A Florencia Crnko. Has sabido alojarme en tu corazón, me has dado tu cariño, tus abrazos y tu compañía durante todos estos años. Gracias por estar y empujarme, por los viajes, las aventuras, las risas y los sueños. Saberte parte de estos años me hace muy feliz.

A Sofía Sallaberry, mi hermana, por ser una persona de hierro, por ayudarme, por darme tantísimo cariño, fuerzas, contención, consejos y por siempre estar a mi lado. Sos, sin lugar a dudas, uno de los pilares en mi vida.

A mis viejos, Graciela Lila Martínez y Alfredo Roberto Sallaberry, quienes cada uno con sus errores y aciertos, me acompañaron y aconsejaron toda la vida, dándome valores, siempre apoyándome, dejándome ser, enseñándome a no bajar nunca los brazos y siempre volver a intentarlo cuantas veces sea necesario. Ustedes dos están acá abajo porque son los cimientos de lo que soy. Los amo y los elegiría siempre.

Gracias.