

ANÁLISIS DE EVENTOS ELEMENTALES EN LAS SEÑALES INTRACELULARES DE CALCIO

A.C. Ventura*, S. Ponce Dawson**

Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires
Pabellón I - Ciudad Universitaria - Buenos Aires - Argentina
e-mail: alejandra@df.uba.ar

La liberación de calcio desde depósitos intracelulares hacia el citosol es utilizada por distintos tipos de células para regular funciones muy diversas. El avance en la tecnología de imágenes ha revelado que la liberación de calcio a través de canales modulados por IP_3 (inositol-trifosfato) ocurre discontinuamente, como eventos "elementales" de liberación de calcio. Estos eventos elementales forman los cimientos de las complejas señales espacio-temporales que permiten la regulación gradual y selectiva de las funciones celulares.

Recientemente se han realizado experimentos en los cuales se generan artificialmente esos eventos elementales. En este trabajo estudiamos, entre otras cosas, la difusión del calcio basándonos en esos datos experimentales y proponemos un modelo sencillo para analizar los mismos.

The liberation of calcium ions from the endoplasmic reticulum into the cytosol serves a central role in regulating numerous forms of cellular activity. Recent advances in imaging technology reveal that calcium signals through inositol trisphosphate-receptor/channels are constructed from elementary release events. Elementary events form the building blocks underlying the complex spatio-temporal patterns of cellular calcium signals, and offer a unique opportunity to analyze in intact cells how individual channels contribute to cellular calcium signaling.

Recently, experiments that mimic elementary events have been done. In the present work we study calcium diffusion using the experimental data provided by those experiments and we propose a simple model to analyze them.

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se basa en una colaboración con el grupo de I. Parker (UC, Irvine). Este grupo realiza experimentos en ovocitos de *Xenopus laevis* (células relativamente grandes) y utiliza un microscopio confocal para registrar las señales de calcio a partir de indicadores colorantes de longitud de onda visible^{(1), (2)}. Usando una técnica especial (con " IP_3 enjaulado") es posible producir variaciones prácticamente instantáneas en la concentración de IP_3 , de intensidad controlada, y estudiar la respuesta del calcio ante dichas variaciones. Los indicadores fluorescentes permiten observar la distribución de la concentración del calcio en el citosol y brindan información espacio-temporal (aunque promediada) sobre la dinámica del calcio⁽³⁾.

Dependiendo de la cantidad de IP_3 liberada, se observan distintos tipos de eventos^{(4), (5)}, todos los cuales se construyen a partir de "eventos elementales", los que involucran la liberación desde un solo canal abierto ("blips"). Estos eventos verdaderamente elementales son difíciles de observar experimentalmente. Eventos un poco más extensos ("puffs") que involucran la apertura

coordinada de múltiples canales que forman un conglomerado y que aparecen frente a concentraciones moderadas de IP_3 , resultan más fáciles de visualizar⁽⁶⁾. Para mayores concentraciones de IP_3 se observan ondas globales que se propagan de un modo saltatorio mediante el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). Los blips, puffs y ondas están esquematizados en la figura 1.

Es difícil obtener información cuantitativa sobre la magnitud y la cinética de los flujos subyacentes de Ca^{2+} a partir de las imágenes de Ca^{2+} , debido a que la señal fluorescente representa una integral de la liberación de Ca^{2+} a través del volumen finito de la mancha focal (alrededor de $0.5 \mu m^3$) y a que es afectada por factores tales como la difusión del Ca^{2+} y su interacción con el colorante. Para cuantificar estos factores y derivar una función de transferencia experimental entre el flujo de Ca^{2+} y la señal fluorescente, se han simulado puffs mediante la inyección ionofórica de Ca^{2+} desde un microelectrodo muy agudo insertado en el ovocito de manera que su punta yace en el nivel de los sitios donde se observan puffs.

* Becaria del CONICET

** Investigadora del CONICET

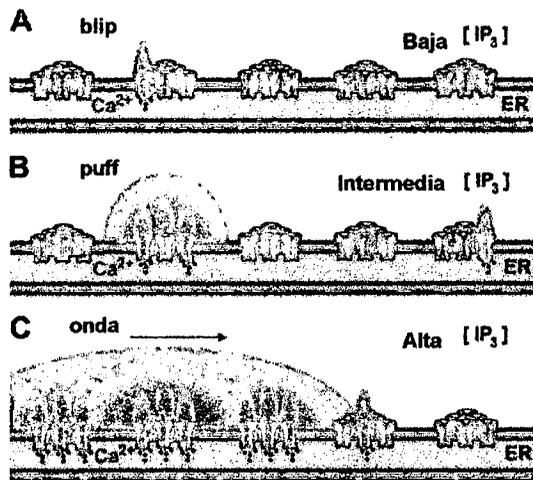


Figura 1. Esquema que muestra la actividad de canales y conglomerados de canales modulados por IP_3 , en presencia de concentraciones crecientes de dicha sustancia. A. Para bajas concentraciones, pocos receptores ligan IP_3 , entonces la retroalimentación debida al calcio liberado por un solo canal está restringida a ese canal, produciendo una señal de calcio pequeña y localizada (blip). B. Para concentraciones intermedias de IP_3 , el calcio liberado a través de la apertura espontánea de un canal causa la apertura de muchos otros canales dentro del mismo conglomerado y origina un puff, pero no logra activar conglomerados adyacentes. C. Altas concentraciones de IP_3 provocan ondas de propagación de calcio mediante el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR).

A partir del modelado de estos experimentos esperamos obtener una "función de transferencia" que proporcione una estimación de la corriente de Ca^{2+} a partir de las señales observadas de fluorescencia. De este modo, dado un evento no simulado, podremos estimar la corriente de Ca^{2+} asociada con el mismo y, eventualmente, determinar la dependencia de las propiedades de los eventos con el número y densidad de canales, las propiedades de transporte del calcio y la cinética del receptor.

II. DESARROLLO

Modelado y análisis de puffs de Ca^{2+} "sintéticos"

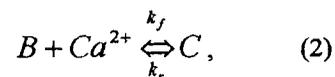
Los experimentos de puffs simulados o "sintéticos" proveen información sobre el ancho correspondiente a la amplitud mitad de la señal de Ca^{2+} (FWHM) como función de la corriente ionofórica total y la duración del pulso, pero resulta experimentalmente imposible determinar la proporción de Ca^{2+} dentro de la corriente total inyectada. Una vez liberado en el citosol, el calcio difunde en el mismo y a su vez reacciona con quelantes exógenos, como el indicador, y con otras sustancias presentes en el citosol ("buffers" en general). Por lo tanto, el transporte del calcio liberado está afectado por la presencia de estos buffers. Para inferir el flujo de Ca^{2+} , hemos desarrollado un modelo sencillo que supone que el efecto de todos los buffers presentes en el medio, incluyendo el colorante fluorescente, es

simplemente reescalar la concentración de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]$, y su coeficiente de difusión, y que este reescalo es tal que el coeficiente efectivo de difusión puede considerarse independiente de $[Ca^{2+}]$. Entonces, la dinámica de $[Ca^{2+}]$ queda descrita por una ecuación de la forma:

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]}{\partial t} = D\Delta [Ca^{2+}] + \text{fuente} \quad (1)$$

donde D es el coeficiente efectivo de difusión. Por simplicidad consideraremos una fuente con simetría esférica. Una ecuación cerrada para $[Ca^{2+}]$ similar a (1) puede obtenerse usando la aproximación de buffers rápidos, aunque en general, la ecuación resultante no es exactamente difusiva (tiene un "coeficiente de difusión" efectivo que depende de la concentración) (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14).

Como en la aproximación de buffers rápidos, suponemos que las reacciones entre Ca^{2+} y los buffers son suficientemente rápidas como para estar en equilibrio en cada punto del espacio. En particular, considerando una reacción de la forma:



entre el indicador, B , y Ca^{2+} (donde C representa el complejo indicador- Ca^{2+}), concluimos que:

$$[C] = \frac{[Ca^{2+}][B]_T}{K_d + [Ca^{2+}]}, \quad (3)$$

donde $[B]_T$ es la concentración total del indicador, la cual es considerada uniforme, y $K_d = k_f/k_r$.

Bajo este conjunto de suposiciones, obtenemos una fórmula implícita para FWHM, que puede ser invertida numéricamente.

Resultados

En la figura 2 se muestran los datos experimentales y las curvas obtenidas con el modelo, correspondientes a FWHM en función de la duración del pulso, para diferentes valores de la corriente inyectada. Para cada curva se determinaron los valores del coeficiente efectivo de difusión, D , y la corriente de calcio, I , que proporcionan los mejores ajustes. De dicho procedimiento, se obtuvieron valores razonables para el coeficiente efectivo de difusión. Sin embargo, considerando una constante de disociación $K_d \sim 1 \mu M$ para la reacción con el colorante y un coeficiente libre de difusión del orden de $220 \mu m^2/s$, se obtuvieron valores muy pequeños para la corriente de calcio: aproximadamente 0.1 % de la corriente total inyectada.

En la figura 3 se muestran las curvas correspondientes a FWHM en función de la corriente inyectada, para diferentes valores de la duración del pulso. En este caso se utilizaron los valores para el coeficiente efectivo de difusión obtenidos previamente y se determinó la corriente de calcio, obteniéndose valores del mismo orden de magnitud que los anteriores.

En todos los casos obtuvimos coeficientes de difusión y corrientes de calcio que crecen con la corriente total.

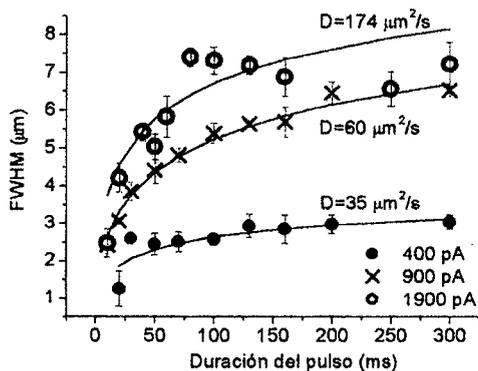


Figura 2. Datos experimentales y curvas obtenidas con el modelo, correspondientes a FWHM en función de la duración del pulso, para diferentes valores de la corriente inyectada. El tiempo está medido en ms, FWHM en μm y la corriente en pA. En cada curva se indican los valores obtenidos para el coeficiente efectivo de difusión.

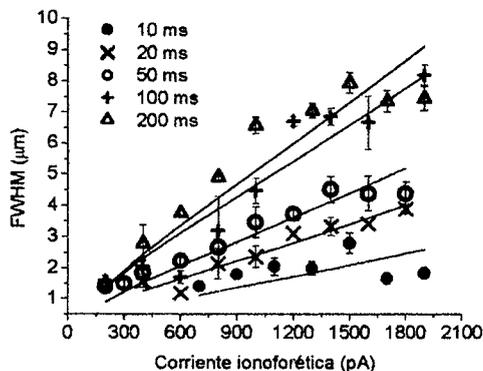


Figura 3. Datos experimentales y curvas obtenidas con el modelo, correspondientes a FWHM en función de la corriente inyectada, para diferentes valores de la duración del pulso. El tiempo está medido en ms, FWHM en μm y la corriente en pA.

III. CONCLUSIONES

El modelo provee un buen ajuste para valores de D que son independientes de la duración del pulso, cuando la corriente ionoforética no es muy grande. Sin embargo, los valores de D cambian cuando dicha corriente cambia. Podemos concluir, entonces, que la aproximación de tener un coeficiente efectivo de difusión independiente de la concentración puede ser utilizada para obtener una primera estimación de los parámetros principales que describen la señal, pero que la dependencia explícita con la concentración es

necesaria para comparar las señales en diversas amplitudes.

Como paso siguiente, haremos un modelado más realista de la señal, aunque el ajuste no podrá ser realizado de un modo automático como el descripto acá. A partir de este modelo más realista esperamos determinar en forma precisa las condiciones bajo las cuales las aproximaciones utilizadas son válidas, en particular, cuándo puede suponerse que, a pesar de la presencia de los distintos buffers, el transporte de Ca^{2+} es efectivamente difusivo.

Agradecimientos

Este trabajo fue respaldado por la Universidad de Buenos Aires y CONICET (Argentina). Agradecemos a I. Parker y colaboradores por útiles discusiones y por la figura 1.

Referencias

- 1- I. Parker, N. Callamaras and W. G. Wier. Cell Calcium **21**, 441-452 (1997).
- 2- N. Callamaras and I. Parker. EMBO J. **19**, 3608-3617 (2000).
- 3- N. Callamaras and I. Parker. J. Gen. Physiol. **113**, 199-213 (1999).
- 4- M.J. Berridge, M.D. Bootman and P. Lipp. Nature **395**, 645-648 (1998).
- 5- N. Callamaras, J. S. Marchant, X.-P. Sun and I. Parker. J. Physiol. **509**, 81 (1998).
- 6- I. Parker, J. Choi and Y. Yao. Cell Calcium **20**, 105 (1996).
- 7- G. D. Smith, J. Wagner and J. E. Keizer. Biophys. J. **70**, 2527-2539 (1996).
- 8- G. D. Smith. Biophys. J. **71**, 3064-3072 (1996).
- 9- M. Naraghi and E. Neher. J. Neurosci. **17**, 6961-73 (1997).
- 10- S. Swillens, G. Dupont, L. Combettes and P. Champeil. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 13750-13755 (1999).
- 11- S. Ponce Dawson, J. Keizer and J. E. Pearson. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 6060-6063 (1999).
- 12- G. D. Smith, I. Dai, R. M. Miura and A. Sherman (2000) (en prensa).
- 13- D. E. Strier and S. Ponce Dawson. J. Chem. Phys. **112**, 825-834 (2000).
- 14- D. E. Strier and S. Ponce Dawson (2001) (en preparación).