

Etapa intermediara (2009)
(Sinteza)

OBIECTIVUL 1

Modelarea procesului de eliberare a ionilor de calciu in celule neexcitabile

1.1. Documentare asupra datelor si observatiilor experimentale din literatura, precum si a formalismelor de modelare existente

Ionii de calciu joaca un rol important in numeroase procese celulare implicate in proliferare, diviziune, contractie, secretie sau fertilizare (Clapham, 1995; Berridge et al., 1998). Ionii Ca^{2+} sunt eliberati din reticulul endoplasmatic (ER) in urma activarii receptorilor de inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3), care functioneaza ca si canale ionice de Ca^{2+} (Foskett et al., 2007). Receptorii de IP_3 (IP_3R) sunt organizati in clusteri compacti in interiorul celulei (Mak si Foskett, 1997; Sun et al., 1998; Thomas et al., 1998). In urma unei stimulari de intensitate medie, astfel de clusteri genereaza gradienti de Ca^{2+} care raman localizati spatiali si se disipeaza rapid dupa inactivarea receptorilor. Ca urmare, un eveniment local de eliberare de calciu prezinta o faza ascendenta a concentratiei locale de Ca^{2+} , urmata de o faza descendenta de revenire la nivelul de repaus. Cuplajul spatial al unor astfel de gradienti de Ca^{2+} poate declansa unde intracelulare de calciu, procese de transcriere genetica, de exocitoza sau deschiderea unor canale ionice din membrana plasmatica (Clapham, 1995; Berridge et al., 1998). In celulele neexcitabile, semnalele locale de calciu cu amplitudine mare sau mica au fost denumite puff si respectiv blip (Sun et al., 1998; Thomas et al., 1998). Acestea sunt evenimente nestereotipe care apar prin activarea stocastica a unuia sau a mai multor canale din unitatea de eliberare reprezentata de clusterul de IP_3R . Diverse tehnici de microscopie confocala permit vizualizarea semnalelor locale de calciu. Totusi, masurarea fluorescentei indicatorului de calciu prezent in citosol in vecinatatea clusterului de IP_3R nu poate furniza informatii directe asupra valorii fluxului de Ca^{2+} eliberat. De aceea, desi exista unele estimari ale parametrilor din datele de microscopie confocala de fluorescenta (Sun et al., 1998; Thomas et al., 1998; Bootman et al., 1997; Izu et al., 1998; Soeller and Cannell, 2002), in prezent nu se cunoaste cu exactitate care este durata de eliberare, cantitatea de Ca^{2+} eliberat, numarul de canale active in timpul eliberarii sau extinderea spatiala a unui cluster de IP_3R . In general, modelele teoretice ale imaginii asociate cu un eveniment local de calciu nu includ efectul barierelor locale pentru difuzie si considera o sursa punctiforma de Ca^{2+} , plasata intr-un mediu omogen. Exista foarte putine studii care iau in considerare o forma particulara a segmentului ER care contine o sursa extinsa de Ca^{2+} (un cluster de IP_3R) (Baran, 2003; Thul and Falcke, 2004), dar acestea nu au investigat modul in care se formeaza imaginile obtinute experimental prin baleiaj unidimensional al razei laser (linescan image). Modelele bazate pe simetrie sferica sau difuzie izotropa in citosol (Izu et al., 1998; Smith et al., 1998; Swillens et al., 1998, 1999; Shuai et al., 2006) obtin un timp de injumatatire ($t_{1/2}$) de cca. 10-20 ms pentru semnalele locale de calciu, in timp ce semnalele observate in ovocite de *Xenopus laevis* sunt mult mai lente, avand $t_{1/2}$ ~40-100 ms (Callamaras et al., 1998; Sun et al., 1998; Callamaras and Parker, 1999). In plus, intr-o geometrie particulara in care sursa de Ca^{2+} este distribuita pe un cerc cu raza de 0,3 μm , simulările numerice care includ estomparea optica a imaginii nu difera semnificativ de cele cu simetrie sferica (Smith et al., 1998).

1.2. Elaborarea si implementarea algoritmilor de calcul. Testarea metodei prin simulari numerice. Optimizarea parametrilor modelului

Am considerat ca sursa de eliberare (un cluster de canale IP_3R) se extinde pe o distanta laterala de cca. 300-400 nm si este situata pe un segment tubular al reticulului endoplasmatic (Fig. 1), care introduce o bariera fizica pentru difuzia locala a ionilor Ca^{2+} si a speciilor-tampon in vecinatatea sursei. In unele simulari am considerat 2 sau 3 clusteri identici cuplati (care elibereaza Ca^{2+} simultan), distanta inter-cluster fiind δ . Am modelat difuzia in citosol cuplata cu reactii de legare a ionilor de calciu la diverse specii-tampon, incluzand indicatorul fluorescent. Am construit imaginea corespunzatoare unei observatii la un microscop confocal de fluorescenta, luand in considerare estomparea optica a imaginii si rezolutia microscopului. Am efectuat simulari numerice ale procesului de eliberare de calciu, prin elaborarea si implementarea unui program in limbaj FORTRAN, care a fost executat pe statii de calcul in sistem UNIX (la Istituto Nazionale di Fisica Nucleare - Laboratori Nazionali del Sud Catania, Italia) sau pe calculatoare PC in sistem LINUX, la UMFCD Bucuresti. Am considerat un cluster cuprinzand 25-49 de canale IP_3R , dipuse intr-o latice regulata pe un segment tubular de reticul endoplasmatic cu raza $r_T = 200$ nm, si am calculat numeric variatia in timp

si spatiu a concentratiilor diferitelor specii in urma eliberarii sincrone de calciu prin toate canalele din cluster. Lungimea segmentului de ER a fost de 9 μm , iar mediul citosolic simulat a cuprins tot volumul din jurul segmentului ER pana la o distanta de 7 μm masurata de la membrana tubului. In citosol s-au considerat 3 specii moleculare mobile (Ca^{2+} , un tampon endogen de Ca^{2+} si indicatorul fluorescent exogen) si o specie fixa (un alt tampon endogen de Ca^{2+} , fix). S-a considerat ca membrana ER este impermeabila la toate speciile citosolice endogene, iar timpul in care indicatorul fluorescent permeaza membrana ER este mult mai mare decat durata evenimentului de calciu, astfel incat ER este incarcat permanent dar la un nivel scazut de indicator fluorescent (Callamaras si Parker, 1999), pe care il consideram constant. Am folosit o discretizare spatiala in geometrie cilindrica in coordonate (r, φ, z) , rezolvarea ecuatiilor diferentiale ordinare fiind realizata prin integrare numerica cu pas de timp variabil, iar rezolvarea ecuatiilor de reactie-difuzie (ecuatii diferentiale cu derivate partiale) a fost realizata printr-o metoda numerica standard adaptata la conditiile modelului si in care am folosit o formula explicita cu diferente finite. Dinamica speciilor mobile satisface ecuatii de reactie-difuzie avand forma generala:

$$\frac{\partial Y_m(r, \varphi, z, t)}{\partial t} = D_m \nabla^2 Y_m(r, \varphi, z, t) + F_{Y_m}(r, \varphi, z, t) \quad (1)$$

unde D_m este coeficientul de difuzie al speciei mobile m , Y_m este concentratia speciei m , iar F_{Y_m} este termenul de reactie corespunzator speciei respective. Pentru speciile fixe, termenul datorat difuziei este nul. Curentul ionic printr-un canal IP_3R deschis este considerat ca fiind determinat de potentialul Nernst:

$$I_N(\varphi, z, t) = \frac{gRT}{nF} \times \ln \left[\frac{Y(r_T - \Delta r / 2, \varphi, z, t)}{Y(r_T + \Delta r / 2, \varphi, z, t)} \right] \quad (2)$$

impunand insa, la valori mari, conditia de saturare prin difuzie (Hille, 1992):

$$I_{\text{sat}}(\varphi, z, t) = 2\pi n F D_{\text{Ca}}^{\text{ER}} r_{\text{cp}} Y(r_T - \Delta r / 2, \varphi, z, t) \times 10^{-3} \quad (3)$$

unde $g = 113$ pS este conductanta canalului IP_3R (Mak and Foskett, 1997); $n = 2$, valenta ionului de calciu; $R = 8.314$ J/K·mol, constanta gazelor ideale; $T = 298$ K, temperatura; $F = 96500$ C/mol, constanta Faraday; Y este concentratia molară de Ca^{2+} in voxelul care cuprinde vestibulul luminal sau citosolic al canalului; $r_{\text{cp}} = 12$ nm este raza de captura a porului.

Conditii de frontiera pe care le-am impus corespund situatiei fiziologice, si anume: conditii Neumann la nivelul membranei reticulului endoplasmatic (prin specificarea fluxurilor de substanta care traverseaza suprafata acestuia), conditii Dirichlet la extremitatea volumului citosolic simulat (concentratii constante), conditii periodice pentru elementele de volum in care coordonata unghiulara este 2π , si conditii de flux nul de substanta in centrul tubului reticulului endoplasmatic (unde coordonata radiala este zero). In timpul integrarii numerice, se testeaza stabilitatea solutiei la fiecare pas de timp si, daca este necesar, se micsoareaza pasul de timp pentru a minimiza erorile datorate aproximatiilor numerice. Centrul segmentului tubular de ER este considerat originea sistemului de coordonate, O . S-a presupus simetrie fata de planul $z = 0$. Tubul de ER este orientat de-a lungul axei Oz . Linia de scanare este considerata paralela cu axa Oz si aflata la o distanta de 350 nm fata de suprafata tubului, iar sirul longitudinal central de canale din cluster este vazut sub un unghi α fata de axa Ox . Estomparea optica a imaginii este modelata prin integrala de convolutie a fluorescetei emise de complexul indicator- Ca^{2+} in fiecare element de volum din spatiul simulat, cu functia de imprastiere a microscopului reprezentata de o functie Gaussiana tri-dimensională (Izu et al., 1998; Smith et al., 1998), avand o largime FWHM = 400 nm:

$$F(r, \varphi, z, t) = (\sigma^3 \pi^{3/2})^{-1} \iiint [\text{DyeCa}](r', \varphi', z', t) \times \exp[-(r \cos \varphi - r' \cos \varphi')^2 / \sigma_{\text{lat}}^2] \times \exp[-(r \sin \varphi - r' \sin \varphi')^2 / \sigma^2] \times \exp[-(z - z')^2 / \sigma^2] \times r' dr' d\varphi' dz' \quad (4)$$

unde $\sigma = \text{FWHM} / [2(\ln 2)^{1/2}]$, iar $[\text{DyeCa}]$ este concentratia complexului indicator- Ca^{2+} .

Marimea observata a fluorescetei intr-un anumit punct al liniei de scanare este calculata, la fiecare moment de timp, prin medierea spatiala a valorii estompeate a fluorescetei (obtinuta din integrala de convolutie) pe elementele de volum pe care le intersecteaza linia de baleiaj, considerand segmente succesive de 200 nm de-a lungul liniei. Pentru a optimiza timpul de simulare, algoritmul a fost testat la diferite valori ale pasului maxim de timp si incrementelor spatiale, stabilind astfel $\Delta z = \Delta r = 100$ nm, $\Delta \varphi = 10^\circ$ si $\Delta t_{\text{max}} = 1,5$ μs . Datorita complexitatii sistemului, timpul optim de integrare numerica este de cca. 12 ore pentru simularea dinamicii de eliberare pe durata unui interval de 100 ms. In functie de durata efectiva de eliberare (pana la 200 ms) si cinetica de revenire la starea stationara (care depinde de proprietatile indicatorului fluorescent), o simulare poate dura intre cca. 10 ore si 3 zile. Am testat algoritmul folosind parametri similari altor modele si am obtinut un bun acord cu acestea in ceea ce priveste difuzia ionilor Ca^{2+} si caracteristicile spatio-temporale ale puffului (Izu et al., 1998; Smith et al., 1998; Swillens et al., 1999; Thul and Falcke, 2004). Un alt test necesar este verificarea revenirii sistemului la valorile initiale dupa un timp suficient de mare de la incetarea procesului de eliberare de calciu. In toate simularile acest criteriu a fost de asemenea satisfacut.

1.2. Efectuarea de simulari si calcule numerice pentru un numar mare de evenimente de eliberare de calciu. Deducerea proprietatilor semnalelor de calciu pentru indicatori fluorescenti diferiti. Comparare cu datele experimentale existente

Imaginile generate de semnalele fluorescente asociate cu evenimentele locale de calciu pot fi descrise in termeni de cinetica si extindere spatiala, fiind caracterizate prin: timpul de injumatatire ($t_{1/2}$, timpul in care fluorescena scade de la valoarea maxima la 50% din aceasta), fluorescena maxima (F_{max}), durata totala ($T =$ timpul in care $\Delta F/F_0$ este \geq decat 1/2 din valoarea sa maxima) si largimea ($w =$ distanta, masurata la momentul de maxim al fluorescetei, intre cele doua puncte de pe linia de baleiaj in care $\Delta F/F_0$ este 1/2 din valoarea sa maxima), F_0 fiind fluorescena in stare stationara, iar $\Delta F = F - F_0$. Deoarece in experimente linia de baleiaj poate avea orice orientare fata de tubului ER, unghiul α poate avea orice valoare cuprinsa intre 0 si 180°. Am efectuat un numar mare de simulari numerice in care am variat unghiul α intre 0 si 180°, durata de eliberare (τ) pana la 400 ms, largimea clusterului (L) pana la 1,1 μm , si proprietatile fluoroforului: constanta de disociere, K_{dye} intre 0.14 μM si 0.7 μM , precum si constanta ratei de legare a Ca^{2+} la fluorofor, k_{dye}^{on} , intre 10 si 500 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Am calculat cantitatea totala de Ca^{2+} eliberata de cluster prin integrala $\int_0^\tau i dt$, unde i este curentul ionic total per cluster. O marime importanta care se determina din datele experimentale este masa semnalului (σ_F , signal mass), obtinuta prin insumarea semnalelor $\Delta F/F_0$ inregistrate in fiecare pixel de-a lungul liniei de baleiaj, inmultite cu volumul paturii sferice care include pixelul respectiv (Sun et al., 1998). Conform acestui algoritm, centrul puffului este considerat ca fiind centrul unei sfere intr-un mediu omogen, astfel incat fiecarui pixel al imaginii ii este asociata o patura sferica de izofluorescena. Numeric, am calculat valoarea integralei $\sigma_F = \int (\Delta F / F_0) 4\pi s^2 ds$, unde s este distanta de la pixelul respectiv la centrul puffului. Din simulari am obtinut ca datele experimentale obtinute in ovocite de *Xenopus* pot fi reproduse cu acuratete considerand un indicator cu afinitate mare pentru Ca^{2+} ($K_{dye} = 0.14 \mu\text{M}$) dar cu legare lenta a ionului Ca^{2+} ($k_{dye}^{on} = 15 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Pentru un astfel de indicator am obtinut o relatie liniara intre valoarea maxima σ_F si cantitatea eliberata de calciu:

$$\sigma_F = k \times Q$$

unde valoarea $k = 0.436$ s.m.u./fC a fost obtinuta din simulari numerice. Acest rezultat este in foarte bun acord cu unele date experimentale obtinute recent in celule musculare (Zou et al., 2004).

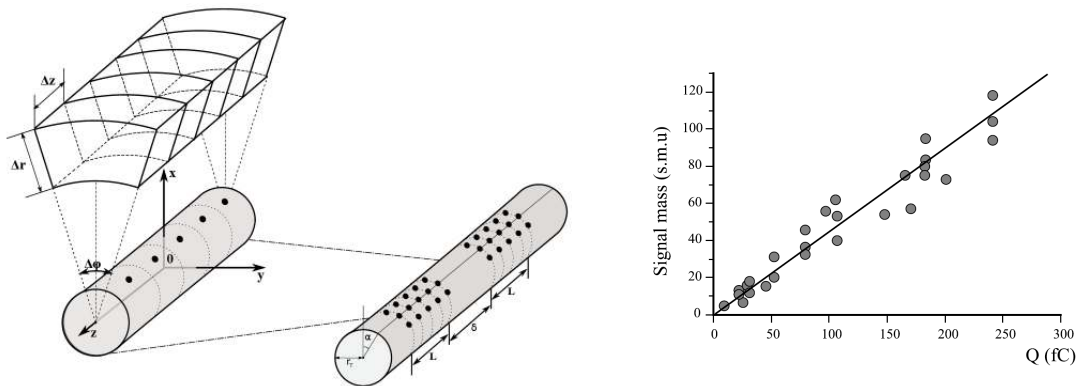


Fig. 1. Geometria modelului si dependenta semnalului fluorescent de cantitatea eliberata de Ca^{2+} , obtinuta din simularile numerice.

1.4. Comunicarea rezultatelor

Formalismul de modelare si rezultatele obtinute au fost prezentate in cadrul unui seminar stiintific la Catedra de Biofizica, UMF Carol Davila, Bucuresti si au fost publicate in Proceedings-ul unei conferinte nationale:

1. A. Popescu et al., Drug delivery in a patch-clamp setup: Computational models of concentration distribution on the cell membrane, Proceedings of the 7th Workshop on Mathematical Modeling of Environmental and Life Sciences, Ed. Acad. 2008.

O alta parte a rezultatelor pe care le-am obtinut au fost publicate intr-un **articol stiintific ISI**, in care au fost mentionate proiectul si sursa de finantare:

2. Irina Baran, Constanta Ganea, Virgil Baran: „Numerical studies on the activity of the muscle calcium channel”, **Romanian Reports in Physics** vol. 61(3): 547-554, sept. 2009 (factor de impact 0,3)

OBIECTIVUL 2

Elaborarea si optimizarea metodelor si protocoalelor experimentale

2.1. Documentare asupra datelor si observatiilor experimentale din literatura

Stressul oxidativ este implicat in numeroase conditii patologice: cancer, boli neurodegenerative, boli cardiovasculare, imbatranire. Una dintre cele mai importante specii reactive de oxigen, peroxidul de hidrogen (H_2O_2), joaca un rol esential in stressul oxidativ datorita timpului de viata relativ mare, precum si datorita solubilitatii atat in medii apoase cat si in medii lipidice, ceea ce ii permite sa difuzeze liber si sa traverseze cu usurinta diversele compartimente si membrane celulare. Studii recente au aratat ca in sistemul celular Jurkat agentul oxidant H_2O_2 induce apoptoza cu un caracter bifazic: la concentratii mici si intermediare ($<100-500 \mu M$), H_2O_2 induce moartea celulara preponderent prin apoptoza, in timp ce la concentratii mai mari mecanismul dominant este necroza (Saito et al., 2006; Barbouti et al., 2007). Se cunoaste faptul ca H_2O_2 produce radicali liberi intracelular, predominant OH^\cdot , iar cantitatea de radicali liberi produși crește odata cu doza de H_2O_2 aplicata (Wu et al., 2009). In limfoblasti Jurkat, cantitatea de radicali liberi produși intracelular imediat dupa incubare cu H_2O_2 (in primele 15 min.) devine semnificativa la concentratii $>50 \mu M H_2O_2$ (Wu et al., 2009). Efectul celular depinde atat de doza de agent oxidant, cat si de timpul de expunere. Citotoxicitatea crește cu doza de H_2O_2 ; pentru tratamente cu durata de 24 h, viabilitatea celulara a limfoblastilor Jurkat scade la 50% si 32% pentru 30 μM si respectiv 50 $\mu M H_2O_2$, iar efectul citotoxic apare fara ca H_2O_2 sa produca peroxizi lipidici in cantitate semnificativa (Chen et al., 2008). Un stress oxidativ cu nivel mediu de severitate induce deschiderea porilor mitocondriali, care determina cresterea permeabilitatii membranei mitocondriale si eliberarea citocromului c din mitocondrii (Barbouti et al., 2007), dar lantul respirator mitocondrial nu este afectat decat tranzitoriu, in primele ore dupa tratament, astfel incat productia de ATP nu este alterata semnificativ (Saito et al., 2006). In schimb, un stress oxidativ sever scade substantial productia de ATP, conducand la necroza ca forma dominanta de moarte celulara (Saito et al., 2006). Citocromul c eliberat in citosol formeaza un complex cu Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) si procaspaza-9, numit apoptozom. Oxidarea Apaf-1 de catre OH^\cdot este necesara pentru formarea apoptozomilor si deci pentru progresia apoptozei (Sato et al., 2004). In plus, formarea apoptozomilor necesita ATP. Ca urmare, apoptoza necesita cantitati mici/intermediare de radicali OH^\cdot , in timp ce cantitati mari de OH^\cdot inhiba apoptoza, deoarece altereaza productia de ATP fie prin inhibarea lantului respirator mitocondrial fie prin degradarea ADP-ului intracelular (Tirosh et al., 2003). De asemenea, H_2O_2 promoveaza oxidarea procaspazei-9, intr-un proces in care sunt implicati ionii Fe^{2+} , inhiband astfel activarea caspazei-9 si progresia apoptozei pe calea caspazei-3 (Barbouti et al., 2007). Mai mult, s-a determinat ca timpul de consum metabolic al H_2O_2 de catre limfoblastii Jurkat (in special prin actiunea catalazei si glutatation-peroxidazei) este scurt, de ordinul a 20 min. (Antunes si Cadenas, 2000; Nakagawa et al., 2004; Saito et al., 2006). Ne asteptam deci ca un tratament cu 100 $\mu M H_2O_2$ timp de 20 min. sa blocheze proliferarea celulara (Baty et al., 2005), sa induca apoptoza intr-o fractie de cca. 30% din numarul total de limfoblasti Jurkat (Dumont et al., 1999; Saito et al., 2006; Barbouti et al., 2007) la 24 de ore dupa tratament, iar fractia de celule necrotice sa aiba o valoare redusa (Baty et al., 2005).

2.2. Realizarea unor masuratori preliminare de proliferare, viabilitate in celule Jurkat

Am folosit limfoblasti Jurkat mentinuti in cultura in suspensie, in mediu Mega-Cell RPMI 1640 suplimentat cu 5% ser fetal bovin inactivat termic, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina si 100 $\mu g/ml$ streptomycin. Toti reactivii pe care i-am utilizat in experimente au fost furnizati de Sigma-Aldrich, Germania. Culturile au fost mentinute la 37°C in atmosfera umeda, intr-un incubator cu 5% CO_2 . Pentru determinarea viabilitatii, celulele au fost observate la microscopul optic dupa tratarea unei probe de 50 μl , prelevata din cultura, cu 50 μl solutie albastru tripan 0,4%; dupa 3-5 minute, celulele au fost numarate cu ajutorul unui hemocitometru Bürker. Celulele vii exclud colorantul datorita integritatii membranei plasmatiche, in timp ce celulele moarte apar colorate in albastru. Am obtinut ca in faza de crestere exponentiala, care a fost atinsa dupa cca. 7-9 zile de cultura, numarul total de celule din cultura se dubleaza la 24 h (durata ciclului celular). Pentru aplicarea diverselor tratamente chimice si masuratori am folosit intotdeauna culturi celulare aflate in faza de crestere exponentiala si care au prezentat in cultura initiala netratata (controlul) o viabilitate de cel putin 95%. Pentru determinari de citometrie in flux, probele celulare, conservate in etanol 70% la -20°C, au fost spalate cu PBS si celulele au fost marcate apoi cu fluoroforul iodura de propidium, PI (Ex. 490 nm, Em. 535 nm). Pentru masuratori am folosit un citometru Becton Dickinson FACS Calibur. Utilizand software-ul de analiza de date WinMDI 2.8 am determinat ponderile relative ale celulelor in fazele G_0/G_1 , S, G_2/M ale ciclului celular si fractia celulelor apoptotice, care prezinta ADN fragmentat (hipoploid). Pentru inducerea stressului oxidativ, culturi celulare avand un volum de 40 ml au fost tratate cu 100 μM

H₂O₂ timp de 20 min., timp in care au fost mentinute in incubator, la 37°C. Celulele au fost apoi spalate cu tampon fosfat salin (PBS), centrifugate la 1000 rpm timp de 4 min., resuspendate in mediu complet si apoi transferate in incubator. Dupa 9, 24 si 48 ore de la tratament au fost prelevate probe din cultura pentru observatie la microscop si probe pentru analiza de citometru in flux. Am obtinut ca proliferarea celulara a fost blocata complet pe parcursul celor 48 de ore de la indepartarea agentului oxidant, deoarece numarul total de celule din cultura a ramas constant, in acord cu alte rezultate raportate in literatura (Baty et al., 2005). Fractia de celule moarte, determinata prin colorare cu albastru tripan, a fost redusa, de $8.6 \pm 1.7\%$ ($n = 2$) la 30 min. dupa tratament (in acord cu Baty et al., 2005). Analiza de citometrie in flux a aratat ca ciclul celular a fost blocat tranzitoriu in faza G₂/M, fractia de celule aflate in G₂/M crescand de la 20,2% la 41,5% dupa 24 ore de la inducerea stressului oxidativ (Fig. 2). De asemenea, din analiza continutului celular de ADN hipoploid, prin citometrie in flux, am obtinut ca H₂O₂ la o concentratie intermediara (100 μM) induce apoptoza in sistemul celular Jurkat in proportie de 27% si 43% dupa 24 si respectiv 48 de ore de la tratament, in acord cu alte rezultate publicate in literatura (Dumont et al., 1999; Saito et al., 2006).

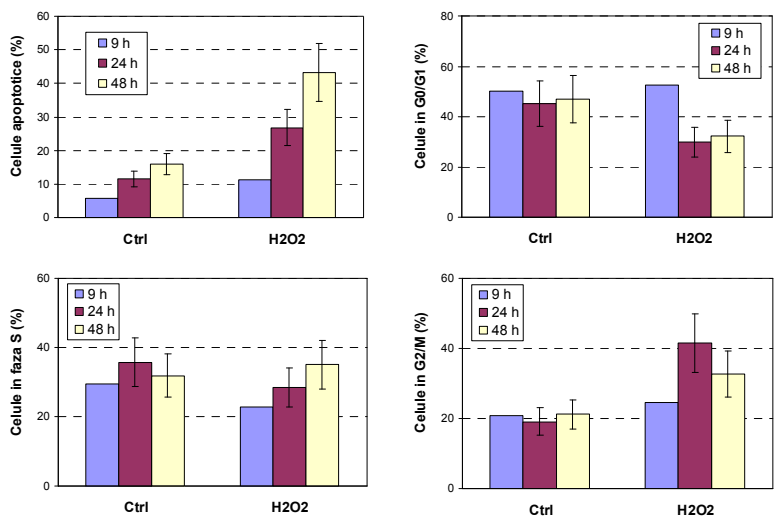


Fig. 2. Inducerea apoptozei si blocarea ciclului celular in urma stressului oxidativ indus de 100 μM H₂O₂. Limfoblastii Jurkat au fost tratati in cultura timp de 20 min. cu agentul oxidant, dupa care au fost resuspendati in mediu complet in absenta H₂O₂. La diverse intervale de timp dupa tratament, s-au determinat, prin citometrie in flux, fractia de celule cu continut de ADN hipoploid (celule apoptotice, % din numarul total de celule) si, respectiv, fractiile celulare in diferitele faze ale ciclului celular (celule apoptotice, % din numarul de celule neapoptotice). Cultura de control a fost supusa acelorasi conditii, cu exceptia adaugarii H₂O₂.

2.3. Realizarea unor masuratori preliminare prin metoda spectrofluorimetrica a concentratiei intracelulare de Ca²⁺

Am folosit celule canceroase de tip PC3, derivate dintr-o metastaza osoasa a unui adenocarcinom de prostata; celulele au fost furnizate de American Tissue Type Culture Collection (Rockville, MD). Culturile celulare au fost mentinute in mediu Dulbecco Eagle modificat, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 2.5 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina si 100 μg/ml streptomcina. Culturile au fost mentinute la 37°C in atmosfera umeda, intr-un incubator cu 5% CO₂. Celulele supuse analizelor au fost intotdeauna in faza de crestere exponentiala. Reactivii au fost furnizati de Sigma-Aldrich, cu exceptia indicatorului fluorescent fura-FF/AM, furnizat de Invitrogen. Pentru determinarea concentratiei de calciu citosolic, celulele aderente au fost spalate cu PBS (tampon fosfat salin) si indepartate mecanic de pe peretele vasului de cultura, intr-o solutie salina standard (SS) cu 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 CaCl₂, 5 mM HEPES, 5 mM glucoza (pH-ul solutiei SS a fost ajustat la valoarea 7,4 prin adaugare de NaOH inainte de a steriliza solutia prin autoclavare). Dupa centrifugarea suspensiei celulare la 1000 rot/min. timp de 10 min. si indepartarea supernatantului, celulele au fost resuspendate in SS la care s-a adaugat 5 μM fura-FF/AM dintr-o solutie de 1 mM fura-FF/AM dizolvat in DMSO, si apoi incubate la intuneric pentru 60 min. la temperatura camerei (23 ± 1°C). Dupa o serie de trei spalari cu solutie salina standard, celulele au fost resuspendate in 12 ml SS si mentinute 50 min. la intuneric, la temperatura camerei, inaintea determinarilor de fluorescanta. Pentru masurarea fluorescentei indicatorului de calciu fura-FF am folosit un spectrofluorimetru Jasco FP-777, adaptat pentru emisie la lungime de unda 510 nm. Probe (1.5 ml) prelevate din suspensia celulara au fost transferate in cuvete de plexiglas de capacitate 2 ml. Fiecare proba, plasata in spectrofluorimetru, a fost excitata in UV-vizibil, in domeniul lungimilor de unda $\lambda_{excitatie} = 325-410$ nm, iar spectrele de fluorescanta au fost obtinute prin determinarea fluorescentei indicatorului fura-FF la 510 nm-emisie ca functie de $\lambda_{excitatie}$. Pentru fiecare masuratoare de fluorescanta a unei probe celulare incubate cu indicatorul fura-FF am facut o determinare paralela a fluorescentei intr-o proba celulara preparata in conditii identice, cu exceptia

adaugarii indicatorului fluorescent. Semnalul de fluorescena a fost calibrat prin permeabilizarea celulelor cu 25 $\mu\text{g/ml}$ digitonina pentru 10 min., urmata de adaugarea a 10 mM EGTA (calibrare in solutie fara Ca^{2+}) sau 11 mM CaCl_2 (calibrare cu saturatie de calciu - toate situsurile de legare a ionului Ca^{2+} la moleculele indicatorului fura-FF sunt ocupate). Toate masuratorile au fost realizate la temperatura camerei.

Concentratia intracelulara a ionilor de calciu, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, este calculata conform ecuatiei (Grynkiewicz s.a., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \beta K_D (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \quad (5)$$

unde $R = F_{350}/F_{380}$ reprezinta raportul valorilor fluorescetei probei obtinute pentru $\lambda_{\text{excitatie}} = 350 \text{ nm}$ si respectiv $\lambda_{\text{excitatie}} = 380 \text{ nm}$; R_{\min} este F_{350}/F_{380} obtinut in solutia fara calciu; R_{\max} este F_{350}/F_{380} obtinut la saturare; β este raportul dintre F_{380} in solutie fara calciu si F_{380} in solutie cu calciu in exces; iar $K_D = 5.5 \mu\text{M}$ (constanta de disociere a indicatorului la temperatura camerei, conform manualului producatorului, Invitrogen). Pentru fiecare proba, din valoarea inregistrata a fluorescetei s-a sczut valoarea semnalului de fond, obtinuta prin medierea fluorescetei a trei probe de 1,5 ml cultura celulara fara indicator fluorescent, masurata in conditii identice cu cele pentru probele incubate cu fura-FF.

In Figura 3 este prezentat un exemplu tipic de spectre pe care le-am obtinut in suspensii de celule in stare fiziologica (inainte de permeabilizare) sau permeabilizate in cele doua solutii de calibrare. In functie de concentratia ionilor de calciu legati la moleculele indicatorului fluorescent, maximul fluorescetei se deplaseaza spre lungimi de unda mai mici odata cu cresterea concentratiei de Ca^{2+} .

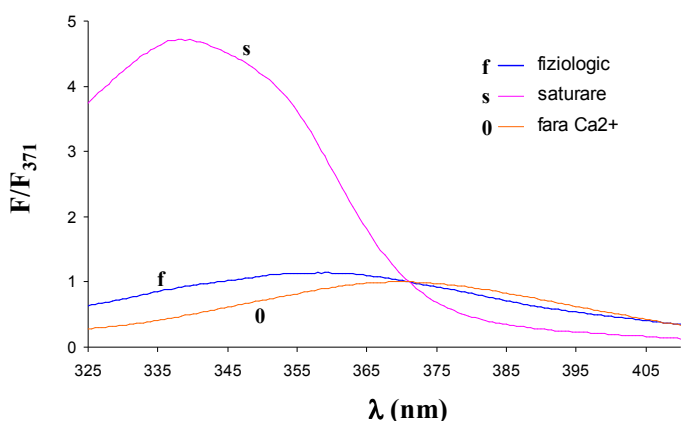


Fig. 3. Fluorescenta indicatorului Fura-FF in suspensii de celule PC3 depinde de concentratia ionilor Ca^{2+} care se leaga de moleculele indicatorului. Valoarea fluorescetei F a fost normalizata la valoarea F_{371} (obtinuta pentru $\lambda_{\text{excitatie}} = 371 \text{ nm}$), care nu depinde de concentratia ionilor de calciu.

2.4. Prelucrarea datelor experimentale si interpretarea rezultatelor. Optimizarea protocoalelor experimentale

Pentru fiecare procedeu experimental am testat diverse concentratii de reactivi si timpi de expunere, astfel incat sa optimizam atat timpii de lucru in diverse etape, cat si raspunsul celular la tratamentul respectiv. Pentru limfoblasti Jurkat, am folosit un mediu de cultura care necesita un supliment redus de ser fetal bovin. Conform informatiilor furnizate de producator, acest mediu asigura un nivel mai ridicat de viabilitate celulara fata de mediul RPMI 1640 standard. Am optimizat concentratia de FBS in mediul de cultura, obtinand rezultate optime cu 5% FBS (fata de 10% in mediu standard). Analiza datelor de citometrie in flux s-a realizat comparativ cu doua programe software disponibile diferite; am ales prelucrarile de date care sa fie in concordanta cu observatiile microscopice de viabilitate celulara si care sa minimizeze in acelasi timp deviatia standard a masuratorilor. Rezultatele obtinute sunt in bun acord cu valorile raportate in literatura. Din analiza masuratorilor de Ca^{2+} intracelular pe care le-am efectuat a rezultat ca spectrofluorimetrul pe care l-am utilizat a prezentat o deplasare sistematica $\Delta\lambda = 9 \text{ nm}$ pentru lungimea de unda, valoare care a fost intotdeauna adaugata la valoarea afisata de aparat. Am testat mai multe metode de determinare a parametrilor din Ec. 5, folosind medierea pe intregul set de determinari experimentale sau, alternativ, valorile obtinute pe probe individuale, astfel incat sa obtinem rezultate consistente si sa minimizam deviatia standard. Dintr-un set de 7 masuratori independente am obtinut valoarea medie a concentratiei intracelulare de calciu $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 255 \pm 32 \text{ nM}$.

2.5. Comunicarea rezultatelor

Rezultatele pe care le-am obtinut au fost prezentate in **2 lucrari stiintifice publicate intr-o carte la o editura din strainatate, cu ISSN**, cu mentionarea proiectului si a sursei de finantare:

1. I. Baran, C. Ganea, A. Scordino, F. Musumeci, S. Tudisco, S. Privitera, R. Grasso, V. Barresi, D.F. Condorelli, V. Baran, E. Katona, M.-M. Mocanu, M. Gulino, M. Surcel, C. Ursaciuc. *Effects of menadione and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukaemia Jurkat T-cells*. Activity Report Istituto Nazionale di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali del Sud, pp. 241-244, Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561, nov. 2009.
2. V. Barresi, I. Baran, C. Ganea, E. Katona, N. Musso, C. Capizzi, M.-M. Mocanu, I. Ursu, V. Baran, G. Cuttone, G.A.P. Cirrone, S. Tudisco, D.F. Condorelli. *High resolution genome-wide analysis of genetic markers and retrospective biological dosimetry of absorbed radiation*. Activity Report Istituto Nazionale di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali del Sud, pp. 236-240, Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561, nov. 2009.

Etapa finala (2009)

OBIECTIVUL 1

Estimarea parametrilor impliciti ai semnalelor de calciu observate in celule neexcitabile

1.1. Extragerea valorilor parametrilor observabili pentru toate semnalele de calciu simulate

Pentru valorile fixate ale parametrilor standard ai modelului (geometrie, cinetica de legare, difuzie), am efectuat simulari individuale pentru evenimente caracterizate de 4 variabile: Q , i , α si L . Am obtinut astfel diferite seturi de date pentru marimile observabile F/F_0 , w si T , pe care apoi le-am fitat pentru a obtine functiile de dependenta descrise mai jos (volumul de date fiind prea mare, nu le vom prezenta in acest raport).

1.2. Obtinerea functiilor de dependenta a parametrilor observabili de parametrii impliciti ai semnalului.

Din fitarea unui numar mare de date obtinute prin simulari numerice pentru o sursa singulara de Ca^{2+} , am obtinut functiile care descriu dependenta amplitudinii fluorescentei si a largimii puffului de variabilele implicite, si anume:

$$F/F_0(Q, i, \alpha) = 1 + R_m(i, \alpha) \times Q^{H(i, \alpha)} / [Q^{H(i, \alpha)} + Q_{50}(i, \alpha)^{H(i, \alpha)}]$$

$$\text{unde } R_m(i, \alpha) = R_{\max} \times i / [i + i_F \exp(f_i \alpha)] \quad (6)$$

$$H(i, \alpha) = H_0 \exp[f_H \alpha i^2 / (i^2 + i_H^2)]$$

$$Q_{50}(i, \alpha) = Q_{50, \max} \times i / (i + i_{Q1}) \times \exp[f_Q \alpha i / (i + i_{Q2})]$$

$$w(Q, i, \alpha, L) = \begin{cases} 0, & Q \leq Q_0(i, \alpha) \\ L + \Delta r + \beta_w(i, \alpha) \times [Q - Q_0(i, \alpha)]^{u(i, \alpha)}, & Q > Q_0(i, \alpha) \end{cases} \quad (7)$$

unde Q_0 defineste cantitatea minima de Ca^{2+} eliberat necesara pentru a genera un eveniment observabil, deci un semnal cu $\Delta F/F_0 = 2\Delta F_n/F_0$. Din Ec. 6 obtinem:

$$Q_0(i, \alpha) = Q_{50}(i, \alpha) \left[\frac{R_m(i, \alpha)}{2(\Delta F_n/F_0)} - 1 \right]^{-1/H(i, \alpha)}, \quad i > i_s(\alpha)$$

$$\text{unde} \quad (8)$$

$$i_s(\alpha) = i_F \exp(f_i \alpha) / [R_{\max} / 2 / (\Delta F_n/F_0) - 1]$$

Celelalte variabile din Ec. 7 sunt descrise de functiile:

$$\beta_w(i, \alpha) = \beta_{w, \max}(i, \alpha) - [\beta_{w, \max}(i, \alpha) - \beta_{w, \min}] \times i / (i + i_w)$$

$$\text{unde } \beta_{w, \max}(i, \alpha) = \beta_{w, \max 0} \times [1 + f_{w1} i^6 / (i^6 + i_{w1}^6)] \times \exp[f_{w2} \alpha i_{w2}^8 / (i^8 + i_{w2}^8)] \quad (9)$$

$$u(i, \alpha) = u_0 \times [1 + f_{u1} i_{u1}^2 / (i^2 + i_{u1}^2)] \times \exp\{f_{u2} i^4 / (i^4 + i_{u2}^4) - f_{u3}\} \alpha\}$$

Folosind relatia $Q = i\tau$ si rearanjand Ec. 6, obtinem pentru evenimente frontale ($\alpha = 0^\circ$) ecuatiile cu necunoscuta i :

$$\left(1 + \frac{i_F}{i}\right) \left(1 + \frac{Q_{50, \max} / \tau}{i + i_{Q1}}\right)^{H_0} - \frac{R_{\max}}{\Delta F / F_0} = 0 \quad (10)$$

Solutia pozitiva a Ec. 10 reprezinta astfel o estimare a curentului ionic de eliberare realizat intr-un interval de timp τ , care produce un eveniment de amplitudine F/F_0 atunci cand este detectat in fata situsului de eliberare.

Toate valorile numerice ale coeficientilor din Ec. 6-10 au fost obtinute din fitarea datelor numerice. Pentru surse multiple (2 sau 3 clusteri cuplati de canale IP_3R) am obtinut de asemenea functii similare, care au fost folosite ulterior pentru deducerea distributiilor marimilor caracteristice.

1.3. Calculul teoretic al distributiilor marimilor observabile asociate cu un numar mare de evenimente

Am calculat distributiile marimilor i , F/F_0 si w discretizand intervale suficient de largi pentru Q , τ , α , L si δ in pasi de 0.25 fC, 0.2 ms, 5° , 0.05 μm si respectiv 0.025 μm . Pentru fiecare din aceste variabile discretizate am construit o distributie independenta, in care numarul de evenimente corespunde unei distributii Gaussiene pentru Q , τ , L si δ , si unei distributii uniforme pentru α (α poate lua orice valoare intre 0 si 180° , cu un numar constant de observatii pentru toate intervalele discrete ale unghiului). Apoi, pentru fiecare set de valori astfel precizate (Q , τ , α , L , δ), calculam curentul de eliberare $i = Q/\tau$, amplitudinea F/F_0 (Ec. 6) si extinderea spatiala w a puffului (Ec. 7). In programul de calcul numeric al distributiilor (scris in limbaj FORTRAN), derularea celor 5 distributii se desfasoara progresiv in cicluri DO concatenate si la fiecare iteratie se numara evenimentele caracterizate de o anumita valoare a fiecarei marimi i , F/F_0 si w regasita in intervale discrete de 20 fA, 0.05 sau respectiv 0.05 μm .

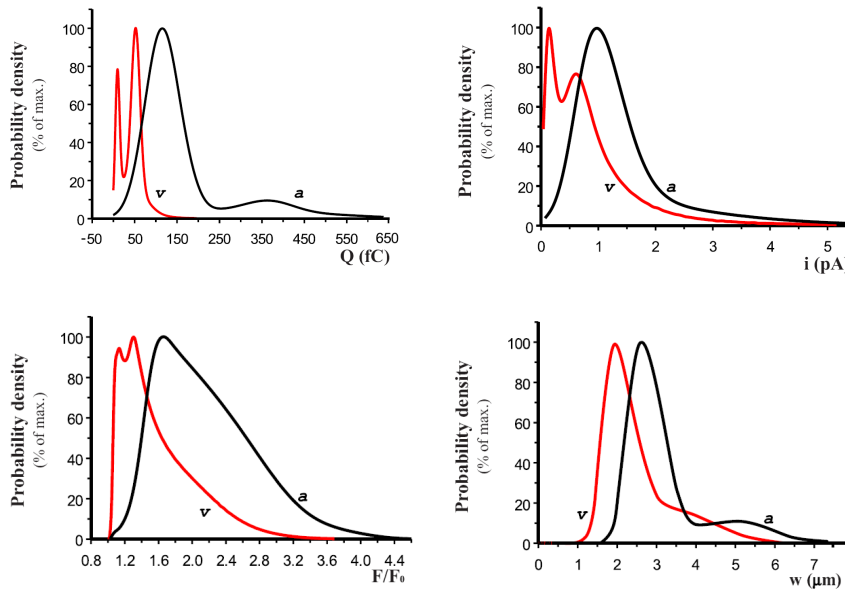
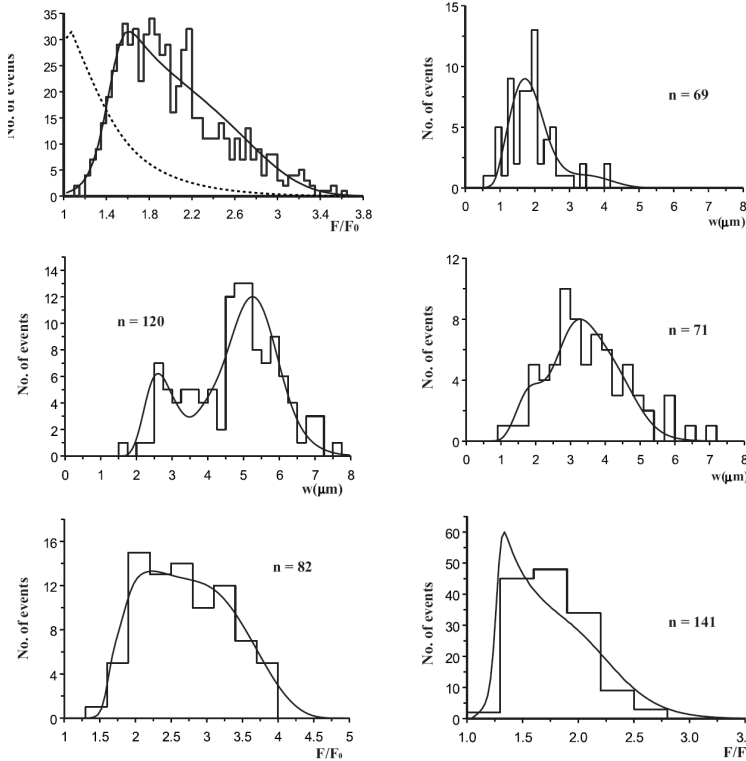


Fig. 4. Distributiile teoretice ale cantitatii eliberate de Ca^{2+} (Q), ale curentului ionic de eliberare (i), ale amplitudinii fluorescenței (F/F_0) si ale extinderii spatiale (w) a evenimentelor de eliberare de Ca^{2+} in emisfera animala („a”) si in cea vegetala („v”) a ovocitului.

Comparand distributiile teoretice cu o serie de date experimentale (descrise mai jos) am obtinut in final, prin calculul unei combinatii ponderate a distributiilor corespunzatoare acestor seturi de date, distributiile totale ale fluxurilor si cantitatilor de Ca^{2+} eliberat in ambele emisfere ale ovocitului (Fig. 4). Distributiile sunt reprezentative pentru un numar de 857 si respectiv 281 de evenimente inregistrate experimental in emisfera animala si respectiv vegetala. Cantitatea medie de Ca^{2+} eliberat si curentul mediu sunt de cca. 46 fC si 0.87 pA in emisfera vegetala, si de 166 fC si 1.40 pA in emisfera animala. Amplitudinea semnalului fluorescent prezinta o valoare medie de 2.2 in emisfera animala si 1.6 in emisfera vegetala. Distributia extinderii spatiale a ionilor eliberati prezinta forme similare in ambele emisfere, dar cu o deplasare de cca. 1 μm spre dreapta pentru emisfera animala, unde largimea spatiala a evenimentelor de eliberare de calciu este mai mare (media 3.2 μm comparativ cu 2.3 μm).

Activitatea 1.4. Compararea distributiilor teoretice cu cele observate experimental. Estimarea valorilor caracteristice eliberarii in vivo (curent ionic mediu, durata medie de eliberare etc.)

Am obtinut un acord foarte bun cu datele experimentale (Fig. 5) considerand o distributie Gaussiana a duratei eliberare:



$$dn/d\tau \sim \exp[-(\tau - \bar{\tau})^2 / 2 / \sigma_{\tau}^2] / \sigma_{\tau}$$

avand valoarea medie $\bar{\tau} = 120$ ms si deviatia standard $\sigma_{\tau} = 21.2$ ms in emisfera animala a ovocitului, si $\bar{\tau} = 65$ ms si deviatia standard $\sigma_{\tau} = 24.8$ ms in emisfera vegetala. Distributia cantitatii eliberate de calciu este de asemenea Gaussiana:

$$dn/dQ \sim \exp[-(Q - \bar{Q})^2 / 2 / \sigma_Q^2] / \sigma_Q$$

Pentru fiecare set de date am obtinut din fitare valoarea medie \bar{Q} si deviatia standard σ_Q , deducand apoi curentul mediu de eliberare $i = \bar{Q} / \bar{\tau}$. Am dedus astfel ca cca. 80% din evenimentele observate in emisfera animala a ovocitului se produc cu eliberarea a 120 fC Ca^{2+} si curent ionic de 1 pA, iar cca. 70% din evenimentele observate in emisfera vegetala se produc cu eliberarea a 55 fC Ca^{2+} si curent ionic de 0.85 pA.

Fig. 5. Distributiile teoretice ale amplitudinii semnalului fluorescent (F/F_0) si ale extinderii spatiale (w) comparate cu diferite seturi de date experimentale (Sun et al., 1998; Callamaras si Parker, 1999; Callamaras s.a., 1998;), $n = nr.$ de observatii experimentale.

Din fitarea datelor experimentale am determinat largimea clusterilor $L = 1.0 \pm 0.24 \mu m$ si distanta intre clusteri $\delta = 0.39 \pm 0.13 \mu m$ in emisfera animala, si $L = 0.5 \pm 0.24 \mu m$ si distanta intre clusteri $\delta = 0.40 \pm 0.27 \mu m$ in emisfera vegetala. Conform estimarilor noastre, clusterii de canale IP_3R sunt mai largi in emisfera animala fata de cea vegetala ($L \sim 1.0 \mu m$ vs. $L \sim 0.5 \mu m$), dar distanta dintre clusteri este similara ($\delta \sim 0.4 \mu m$) in cele doua emisfere. Spatierea medie intre centrele a doi clusteri invecinati, $L + \delta$, este $\sim 1.4 \mu m$ in emisfera animala si $\sim 0.9 \mu m$ in cea vegetala, rezultate care sunt in acord cu observatiile experimentale (Callamaras si Parker, 1999; Demuro si Parker, 2008).

Activitatea 1.5. Elaborarea metodei de estimare a parametrilor impliciti din datele imaginilor de fluorescena

Am analizat doua evenimente observate experimental (un blip si un puff, Fig. 3-4 in Sun et al., 1998). Estimarea originala a autorilor pentru fluxul de calciu era de 0.4 pA pentru blip si 2.5 pA pentru puff. Pe baza rezultatelor modelului nostru, am ajuns la doua metode posibile de estimare a fluxului ionic si a celorlalti parametri impliciti si anume: pentru Predictia 1 am folosit valoarea experimentală F/F_0 , am fixat τ la valoarea observata a fazei ascendente a curbei cinetice a masei σ_F si apoi am rezolvat grafic Ec. 10 pentru a determina curentul i , iar Q a fost calculat ca $i\tau$. Pentru Predictia 2 am efectuat simulari numerice de difuzie cu τ si α variabile, cu conditia ca amplitudinea F/F_0 si timpul de ascendentă pentru σ_F sa fie egale cu valorile observate experimental. Valorile obtinute arata ca prima metoda nu reproduce scala de timp a evenimentelor, in timp ce a doua metoda ofera o descriere corecta a ambelor evenimente. Pentru blip am obtinut cel mai bun acord al metodei 2 cu datele experimentale si am dedus astfel ca unghiul de scanare a fost de 72° , iar clusterul, avand o largime de 400 nm, a eliberat Ca^{2+} la o rata de 0.83 pA pentru 30 ms. Daca evenimentul ar fi fost detectat frontal, amplitudinea observata F/F_0 ar fi fost 2.1 (vs. 1.57) iar extinderea spatiala $1.3 \mu m$ (vs. $1.5 \mu m$).

In mod similar, Predictia 1 pentru puff nu reproduce scala spatio-temporala a evenimentului. Predictia 2 ofera o descriere corecta a caracteristicilor, obtinand din cel mai bun fit valorile: diametrul clusterului - 1.1 μm , flux ionic 2.69 pA, cantitate eliberata de calciu 274 fC, unghi de scanare 153°. Daca evenimentul ar fi fost detectat frontal, amplitudinea observata F/F_0 ar fi fost 3.9 (vs. 2.1) iar extinderea spatiala 2.4 μm (vs. 4.1 μm).

Parametru	Blip			Puff		
	Valoare observata/asteptata	Predictia 1 ($\alpha = 0^\circ$)	Predictia 2 ($\alpha = 72^\circ$)	Valoare observata/asteptata	Predictia 1 ($\alpha = 0^\circ$)	Predictia 2 ($\alpha = 153^\circ$)
Q, fC	18 ^a	14.4	25	363 ^a	76	274
τ , ms	45 ^{a, b, c}	45 ^c	30 ^d	145 ^{a, b, c}	145 ^c	102 ^d
i , pA	0.4 ^a	0.32 ^e	0.83	2.5 ^a	0.52 ^e	2.69
F/F_0	1.57 ^b	1.57 ^f	1.57 ^f	2.1 ^b	2.1 ^f	2.1 ^f
$t_{1/2}$, ms	50 ^b	23 ^g	46 ^g	125 ^b	28 ^g	92 ^g
T, ms	75 ^b	45 ^g	79 ^g	208 ^b	132 ^g	217 ^g
w, μm	1.5 ^b	0.9 + L	1.1 + L	4.1 ^b	1.3 + L	3.0 + L
L, μm	-	0.6	0.4	-	2.8	1.1

^a Valori observate sau estimate din datele experimentale cu metoda lui Sun et al. (1998)

^b Valori estimate din curbele experimentale (Sun et al., 1998)

^c Determinat ca durata fazei ascendente a semnalului (Sun et al., 1998)

^d In timpul fitarii atat τ cat si α au fost variate

^e Calculat din Ec. 10

^f Fixat la valoarea experimentală

^g Obținut prin simulare numerică. De specificat ca atat Q cat si i sunt unic determinate odata ce τ , α si F/F_0 au fost specificate (conform Ec. 6-10)

Activitatea 1.6. Diseminarea rezultatelor. Publicare web. Articol stiintific

Rezultatele pe care le-am obtinut au fost publicate intr-un **articol stiintific ISI**:
Irina Baran, Anca Popescu: „A model-based method for estimating Ca^{2+} release fluxes from linescan images in *Xenopus* oocytes”, **Chaos** vol. 19(3): 037106, pp.1-15, sept. 2009 (factor de impact 2,152)

Bibliografie

Antunes F., Cadenas E., *FEBS Lett.*, 2000, 475: 121-126; Barbouti A. et al., *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43: 1377-1387; Baty J.W. et al., *Biochem. J.*, 2005, 389: 785-795; Chen Z.-H. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008, 72: 1491-1497; Dumont A. et al., *Oncogene*, 1999, 18: 747-757; Gryniewicz, G. et al., *J. Biol. Chem.*, 1985, 260: 3440-3450; Nakagawa H. et al., *Carcinogenesis*, 2004, 25: 1567-1574; Saito Y. et al., *Free Radical Research*, 2006, 40: 619-630; Sato T. et al., *J. Immunol.*, 2004, 173: 285-296; Tirosh O. et al., *Biochem. Pharmacol.*, 2003, 66: 1331-1334; Wu H. et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2999, 483: 99-105; Baran, I., *Biophys. J.* 84, 1470-1485 (2003); Baran, I., *Biophys. J.* 89, 979-998 (2005); Baran, I., *Cell Calcium* 42, 245-260 (2007); Baran, I., *BioSystems* 92, 259-269 (2008); Baran, I., Ganea, C., Baran, V., *Eur. Biophys. J.* 37, 793-806 (2008); Berridge, M.J. et al., *Nature* 395, 645-648 (1998); Bezprozvanny, I., Erlich, B.E., *J. Gen. Physiol.* 104, 821-856 (1994); Bootman, M.D. et al., *J. Physiol.* 499, 307-314 (1997); Callamaras, N. et al., *J. Physiol. (Lond.)* 511, 395-405 (1998); Callamaras, N., Parker, I., *J. Gen. Physiol.* 113, 199-213 (1999); Clapham, D.E., *Cell* 80, 259-268 (1995); Demuro, A., Parker, I., *Cell Calcium* 43, 367-374 (2008); Foskett, J.K. et al., *Physiol. Rev.* 87, 593-658 (2007); Hille, B., “*Ionic Channels of Excitable Membranes*”, Sunderland, MA, Sinauer Associates (1992); Izu, L.T., Wier, W.G., Balke, C.W., *Biophys. J.* 75, 1144-1162 (1998); Mak, D.O., Foskett, J.K., *J. Gen. Physiol.* 109, 571-587 (1997); Marchant, J.S., Ramos, V., Parker, I., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, 1374-1386 (2002); Rose, H.J. et al., *Biophys. J.* 91, 4024-4032 (2006); Shuai, J. et al., *Biophys. J.* 91, 4033-4044 (2006); Smith, G.D. et al., *Biophys. J.* 75, 15-32 (1998); Smith, I.F., Parker, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6404-6409 (2009); Soeller, C., Cannell, M.B., *Biophys. J.* 82, 2396-2414 (2002); Sun, X.-P. et al., *J. Physiol.* 509, 67-80 (1998); Swillens, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13750-13755 (1999); Thomas, D. et al., *J. Biol. Chem.* 273, 27130-27136 (1998); Thul, R., Falcke, M., *Biophys. J.* 86, 2660-2673 (2004); Zou, H., et al., *J. Gen. Physiol.* 124, 259-272 (2004)