

RAPORT DE FAZA – Sinteza lucrării
Proiect PNII ID 1138/2009
Etapa unica /2010

OBIECTIVUL 1

Studiul relației între semnalizarea prin calciu și proliferare/viabilitate/apoptoza în condiții de stress oxidativ

Activitatea 1.1

Realizarea măsurătorilor de proliferare, viabilitate, apoptoza în celule Jurkat incubate cu agenți oxidanți

Metoda de lucru a fost descrisă în detaliu în raportul științific al proiectului din anul 2009. Pe scurt, am efectuat măsurători de viabilitate celulară prin colorare cu albastru tripan, iar apoptoza și ciclul celular au fost determinate prin evaluare la citofluorimetru în flux prin marcarea probei celulare cu iodura de propidiu. Am efectuat aceste măsurători pe culturi celulare de limfoblasti umani Jurkat menținute în cultură în suspensie, în mediu Mega-Cell RPMI 1640 suplimentat cu 5% ser fetal bovin inactivat termic, 100 U/ml penicilină și 100 μg/ml streptomicină.

Ca agenți oxidanți am folosit peroxidul de hidrogen (H₂O₂) și menadionă (MD), la diferite doze de tratament. Am investigat de asemenea efectele flavonoidului natural quercetina (QC), care poate manifesta un caracter dual, pro- sau anti-oxidant, în funcție de doză aplicată și timpul de tratament. Apoptoza și ciclul celular au fost evaluate la 24 și respectiv 48 h după tratament. Toate datele au fost obținute din serii de 3-6 experimente efectuate pentru fiecare tratament.

Tratamentul cu QC timp de 1 h sau cu 0.5 μM pentru 24 h nu au exercitat efecte citotoxice (Fig. 1). Tratamentul cu 5 μM QC timp de 24 h a crescut semnificativ rata apoptotică de la 9.2 ± 3.1% în celulele netratate la 14.5 ± 2.3% în celulele tratate, în timp ce o doză de 50 μM QC aplicată timp de 24 h a indus apoptoza în 74.1 ± 3.4% din celulele tratate și a blocat complet proliferarea celulară. Ca urmare, quercetina prezintă acțiune puternic anti-proliferantă și pro-apoptotică în sistemul celular Jurkat.

Tratamentul cu 25 μM MD timp de 20 min. a crescut fracția de celule apoptotice la 14.7 ± 4.1%, în timp ce tratamentul de 4 h a crescut substanțial rata apoptotică la 36.7 ± 3.6% (Fig. 1). În ultimul caz s-a observat un blocaj parțial în fază G₂/M phase of the cell cycle (fracția G₂/M a fost 25.2 ± 2.3% la celulele tratate față de 16.8 ± 3.3% la celulele netratate, *p* < 0.01), indicând prezența leziunilor în ADN și activarea punctului de control din G₂/M (Fig. 1).

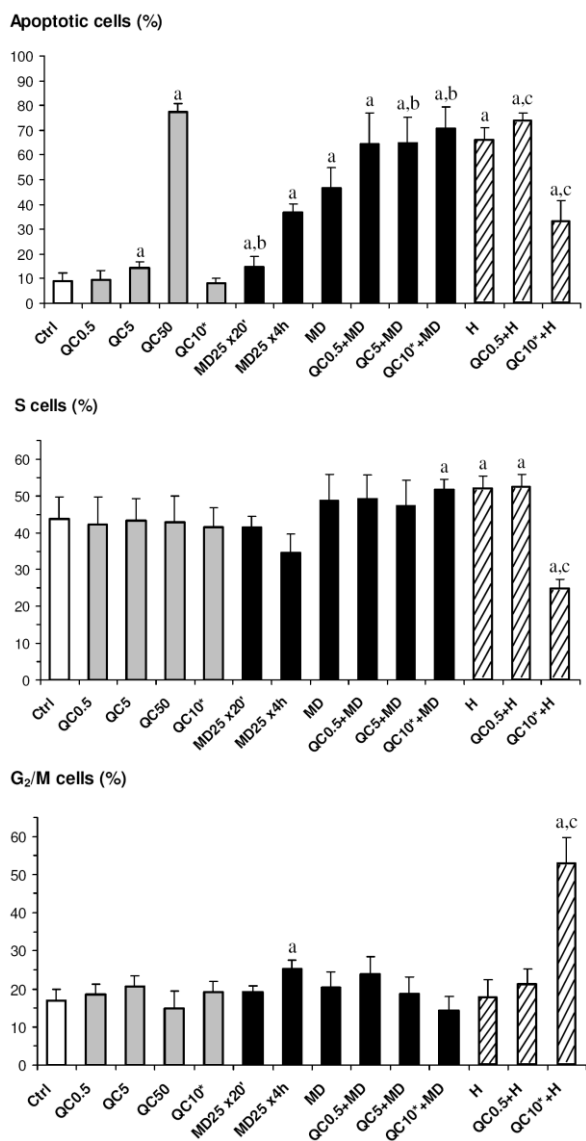


Figura 1: Distribuțiile fracțiilor apoptotice și ale fazelor ciclului celular în urma tratamentelor celulelor Jurkat cu 0.5, 5 sau 50 μM quercetina timp de 24 h (QC0.5, QC5, QC50), 10 μM quercetina timp de 1 h (QC10*), menadionă (MD25: 25 μM timp de 20 min. sau 4 h după cum este indicat, MD: 250 μM timp de 20 min.), 500 μM H₂O₂ pentru 20 min. (H), sau în urma unor tratamente combinate (pre-tratament cu quercetina urmat de adăugarea de 250 μM menadionă sau 500 μM H₂O₂ timp de 20 min.). "a": diferență semnificativă față de celulele netratate (Ctrl), "b": diferență semnificativă față de tratamentul MD (prezentată pentru grupul tratamentelor cu menadionă, coloanele negre), "c": diferență semnificativă față de tratamentul H (prezentată pentru grupul tratamentelor cu H₂O₂, coloanele hasurate).

La doze mari (250 μM for 20 min.), menadiona a indus o rata apoptotica de $46.4 \pm 8.6\%$, dar nu a modificat distributia ciclul celular. Pre-incubarea cu 5 μM QC pentru 24 h sau cu 10 μM QC pentru 1 h a crescut semnificativ apoptoza indusa de 250 μM MD (fractii apoptotice: $64.7 \pm 10.4\%$ si respectiv $70.6 \pm 8.6\%$), sugerand o crestere a productiei de specii reactive de oxigen (ROS) in cazul tratamentului combinat quercetina-menadiona comparativ cu tratamentul singular cu menadiona.

Tratamentul cu 500 μM H_2O_2 timp de 20 min. a indus apoptoza in $66.0 \pm 4.9\%$ cells (Fig. 1). Pre-incubarea cu 0.5 μM QC timp de 24 h a crescut rata apoptica la $73.7 \pm 3.1\%$, in timp ce pre-tratamentul cu 10 μM QC timp de 1 h a protejat celulele fata de efectul pro-apoptotic al H_2O_2 , scazand fractia apoptotica la $33.4 \pm 8.3\%$. Acest efect este asociat cu activarea punctului de control din G_2/M (Fig. 1). Mai multe detalii sunt prezentate in raportul in extenso. **Mentionam ca aceste rezultate reprezinta o noutate in domeniu.**

Activitatea 1.2

Realizarea masuratorilor de Ca^{2+} , ROS in celule Jurkat incubate cu agenti oxidanti, mobilitati Catania

Metoda de lucru pentru masuratorile de Ca^{2+} a fost descrisa in detaliu in raportul stiintific al proiectului din anul 2009. Pe scurt, 5×10^6 celule au fost spalate de 2 ori cu solutie salina SS (continand 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glucoza, pH 7.2/NaOH), incubate cu indicatorul fluorescent fura-FF (5 μM , 30 min. la temperatura camerei) in solutie salina SS, dupa care au fost spalate de 2 ori in SS si resuspendate in 2 ml SS la o concentratie de 10^6 celule/ml. Proba celulara a fost plasata in cuveta de quartz si intensitatea fluorescetei a fost masurata cu un spectrofluorimetru Horiba Jobin-Yvon, cu emisie la 510 nm si excitatie dubla, la 340 nm si respectiv 380 nm, la intervale de timp de 17 s. Constanta de disociere a fluoroforului fura-FF a fost considerata 5.5 μM (conform producatorului, Invitrogen). Calibrarea semnalului s-a facut prin permabilizarea celulelor cu 80 μM timp de 15-20 min., urmata de adaugare de EGTA pana la o concentratie finala de 10 mM. Punerea la punct a protocolului de lucru si masuratorile preliminare s-au realizat in colaborare cu LNS-INFN Catania, Italia, in timpul stagiului de cercetare al directorului de proiect la institutia partenera italiana.

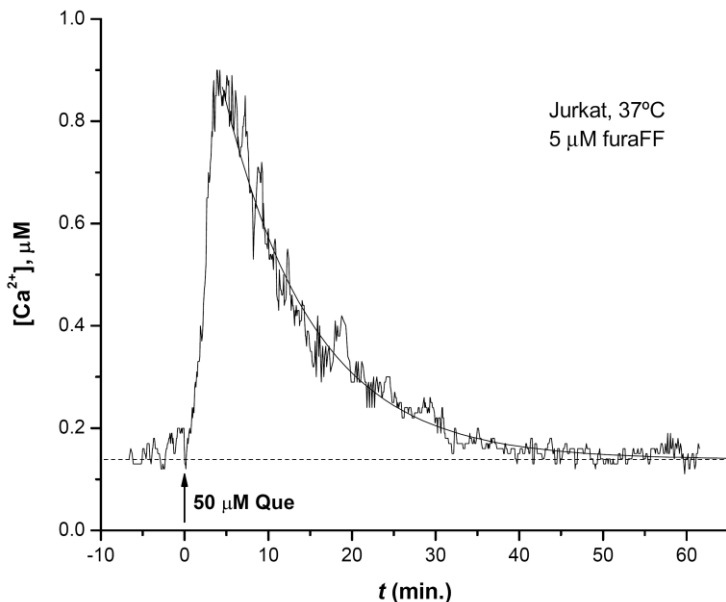
Pentru masuratori de ROS am utilizat indicatorul fluorescent MitoSOX Red, care se acumuleaza specific in mitocondrii, iar in prezenta radicalului liber superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) fluoroforul este oxidat si emite fluorescent in domeniul lungimilor de unda de 580-600 nm, cu excitatie la 380-400 nm. Protocolul de lucru este similar celui pentru determinarea concentratiei de Ca^{2+} .

Toate masuratorile spectrofluorimetrice au fost efectuate la 37°C .

Activitatea 1.3

Prelucrarea datelor experimentale si interpretarea rezultatelor, achizitii consumabile

Nivelul stationar de Ca^{2+} intracelular obtinut a fost de 138.5 nM (media pe o cinetica a semnalului inregistrat timp de 15-20 min. inainte de stimularea, intr-o serie de 4 experimente). Am determinat de asemenea cinetica eliberarii de Ca^{2+} din reticulul sarcoplasmatic in urma aplicarii unei doze de 50 μM quercetina, care a



fost adaugata direct in proba celulara din cuveta in timpul inregistrarilor la spectrofluorimetru. Am obtinut un semnal de calciu bifazic, cu o faza rapida de crestere urmata de o faza de scadere exponentiala cu constanta de timp de 10.6 min. In primele 4 min. nivelul de calciu intracelular a atins valoarea maxima de 867 nM, iar in cca. 30 min. a revenit la nivelul stationar (Fig. 2). **Mentionam ca aceste rezultate reprezinta o noutate in domeniu.**

Figura 2. Cinetica semnalului de calciu indus prin tratarea celulelor Jurkat cu 50 μM quercetina.

Am determinat de asemenea cinetica producerii de superoxid in urma tratamentului cu 75 μM rotenon (ROT), un inhibitor al complexului I al lantului respirator mitocondrial. In general, inhibarea respiratiei mitocondriale conduce la devierea electronilor spre oxigenul molecular aflat in imediata vecinatate a membranei mitocondriale interioare, astfel incat este indusa o crestere pronuntata a concentratiei de superoxid in compartimentul mitocondrial. Dupa aplicarea ROT in proba celulara, nivelul de superoxid mitocondrial a crescut progresiv, atingand o faza de saturare dupa cca. 40 min. (Fig. 3). Permeabilizarea celulelor cu 80 μM digitonina a condus la o dublare a nivelului de superoxid (Fig. 3), probabil datorita cresterii concentratiei de oxigen molecular disponibil in apropierea mitocondriilor. In final, la adaugarea a 10 mM EGTA nu s-a observat nici o modificare a nivelului de superoxid, ceea ce confirma specificitatea semnalului pentru superoxid. **Mentionam ca aceste rezultate reprezinta o noutate in domeniu.**

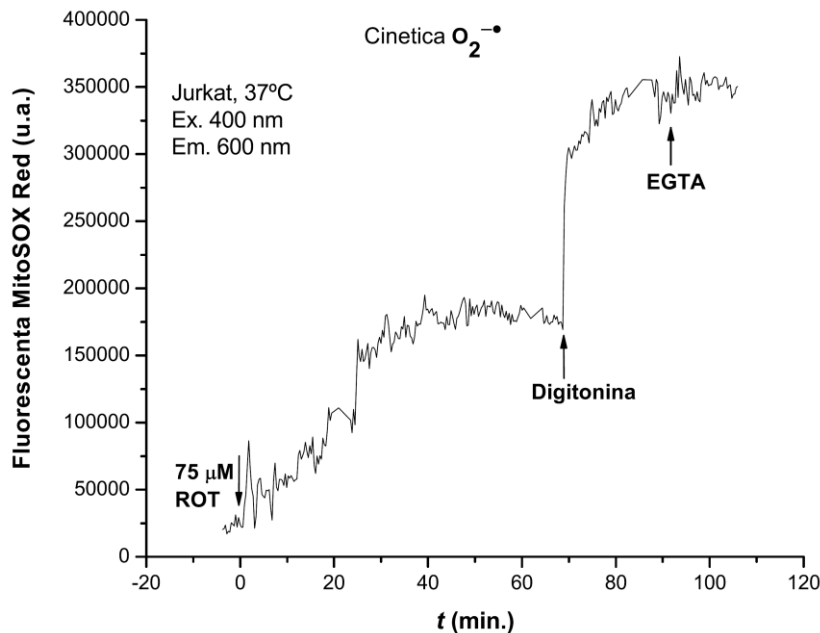


Figura 3. Cinetica nivelului de superoxid mitocondrial in celule Jurkat in timpul expunerii la 75 μM rotenon.

Am masurat variatia nivelului de superoxid in compartimentul mitocondrial precum si a nivelului de NADH intracelular in timpul expunerii celulelor Jurkat la 50 μM quercetina. Am observat ca in cca. 15 min. de la stimulare s-a produs neutralizarea totala a anionului superoxid, ceea ce demonstreaza ca in tratamente scurte (~1 h) se manifesta predominant caracterul antioxidant al quercetinei (Fig. 4). Nivelul de NADH a scazut considerabil, de cca. 5 ori fata de nivelul stationar, in cca. 5 min. de la expunere (rezultate prezentate in raportul in extenso). Aceste rezultate sugereaza stimularea respiratiei mitocondriale intr-o prima etapa (~60 min.) dupa expunerea la flavonoid. **Mentionam ca aceste rezultate reprezinta o noutate in domeniu.**

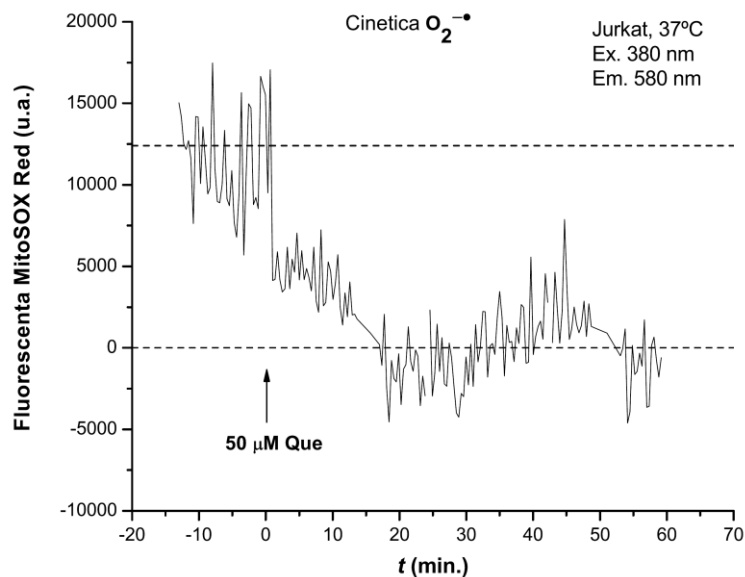


Figura 4. Cinetica nivelului de superoxid mitocondrial in celule Jurkat in timpul expunerii la 50 μM quercetinei.

Activitatea 1.4

Publicare web, seminar comun colaborare Catania, articol stiintific

Rezultatele obtinute in cadrul proiectului si lista publicatiilor sunt publicate pe site-ul web al proiectului. O parte din rezultate au fost prezentate de directorul de proiect in cadrul unor seminarii stiintifice sustinute atat in strainatate (LNS-INFN Catania, Italia) cat si in tara (Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucuresti).

Rezultatele obtinute au fost publicate intr-un articol ISI (*Cell Biochem. Biophys.* 58:169-179, 2010, factor de impact 3.337) si 3 lucrari BDI (2 in Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud, 2010; ISSN: 1827-1561; 1 in Romanian Journal of Biophysics, 2010, 20(4)).

OBIECTIVUL 2

Studiul relatiei intre luminescenta intarziata si proliferare/viabilitate/apoptoza in conditii de stress oxidativ

Activitatea 2.1

Realizarea masuratorilor de luminescenta intarziata si proliferare, viabilitate, apoptoza in celule Jurkat incubate cu agenti oxidanti (deplasari la LNS-INFN Catania, Italia)

Masuratorile de luminescenta intarziata s-au efectuat la LNS-INFN Catania, Italia. Pentru a masura luminescenta intarziata a culturilor celulare a fost utilizat sistemul de mare sensibilitate ARETUSA "Advanced Research Equipment for fast Ultraweak luminescence Analysis" (Tudisco s.a., 2003, 2004). Cu acest sistem se pot detecta fotoni singulari si, in plus, nivelul zgomotului este foarte redus. De asemenea, eficienta colectarii luminii emise de culturile celulare este foarte buna, iar inregistrarea semnalului incepe cu o intarziere mica fata de sfarsitul pulsului de iluminare. Ca sursa de lumina este folosita o sursa de laser pe baza de azot (Laser Photonics LN 230C), avand lungimea de unda de 337 nm, si o largime a pulsului de 5 ns, cu o energie de $100 \pm 5 \mu\text{J/puls}$. Puterea laserului a fost redusa in anumite cazuri, pentru a evita supraincercarea fotomultiplicatorului. Pentru a asigura o iluminare uniforma a probei, laserul a fost conectat la o fibra optica avand terminalul tripartit, cu cele trei ramificatii orientate in jurul probei la unghiuri egale, de 120° , intre directiile lor. Detectorul utilizat este un tub fotomultiplicator multialcalin (Hamamatsu R-7602-1/Q), selectat pentru numarare de fotoni singulari. Pentru a obtine o reducere semnificativa a curentului intrinsec de intuneric, tubul fotomultiplicator este racit la -30°C , folosind un sistem de circulatie cu lichid rece in contact direct cu suprafata sa. In timpul pulsurilor de laser un numar mare de fotoni (de ordinul a 10^{12}) imprastiati de proba pot ajunge la fotocatod intr-un timp de 1 ns, distrugand ireversibil fotomultiplicatorul. Pentru a preveni acest efect si pentru a garanta un start rapid al achizitiei de semnal, s-a utilizat un sistem electronic de reducere, capabil sa modifice tensiunea electrica aplicata pe primele doua dinode ale fotomultiplicatorului (Tudisco s.a., 2003). Acest dispozitiv electronic permite ca achizitia de semnal sa inceapa la $10 \mu\text{s}$ dupa pulsul de iluminare. Semnalele detectate sunt inregistrate cu un dispozitiv multicanal (Ortec MCS PCI), capabil sa colecteze semnale analogice sau logice ca functie de timp, cu un pas minim de timp de 200 ns. Luminescenta intarziata depinde de intensitatea luminii cu care este excitat sistemul. Este necesar deci un control constant al intensitatii laserului in timpul masurarii. In acest scop, o extremitate a fibrei optice este conectata la un dispozitiv (Power meter PD10, Ophir) de masurare a acestei intensitati. Toate masuratorile de luminescenta intarziata au fost efectuate la temperatura camerei ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). Au fost inregistrati fotonii emisi de proba celulara in domeniul vizibil. Pentru fiecare proba celulara au fost efectuate cate 3-6 masuratori pe volume de $15-25 \mu\text{l}$ prelevate din proba respectiva. Fotoemisii au fost inregistrate intre $11 \mu\text{s}$ si 10ms dupa excitarea laser a probei. Intensitatea emisiei (I) a fost obtinuta ca raportul dintre numarul total de fotoni inregistrati si intervalul de timp corespunzator, raportul fiind apoi normalizat la concentratia de celule vii din proba. Luminescenta PBS-ului a fost scazuta din toate datele. Produsul cuantic („quantum yield”) a fost calculat in trei domenii ale emisiei: $11-100 \mu\text{s}$ (DL-I), $100 \mu\text{s} - 1 \text{ms}$ (DL-II) si $1-10 \text{ms}$ (DL-III), impartind integrala intensitatii emisiei la energia laserului. Dupa fiecare tratament cu agenti oxidanti, celulele au fost spalate de 2 ori in PBS si resuspendate in PBS la o concentratie $\sim 40 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ pentru proba DL, sau in mediu RPMI1640 complet la $\sim 0.2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ pentru evaluarea apoptozei si ciclului celular. Probele DL au fost masurate imediat prin spectroscopie de luminescenta intarziata. Restul probelor au fost incubate 24 h sau 48 h, apoi au fost preparate probe in etanol 70% pentru masuratori de citofluorimetrie in flux. Densitatea, viabilitatea si morfologia celulara au fost examinate cu o camera video CCD Logitech QuickCam Pro 4000 conectata la un microscop cu contrast de faza Olympus CK30 phase contrast microscope. Volume de $25 \mu\text{l}$ din proba celulara au fost diluate in PBS, colorate cu albastru tripan 0.4%. Cca. 2000 celule au fost vizualizate si numarate cu ajutorul unui hemocitometru Burkert la momentul masuratorilor DL. Fotografiiile inregistrate au fost analizate ulterior cu software-ul ImageJ.

Activitatea 2.2

Prelucrarea datelor experimentale si interpretarea rezultatelor; caracterizarea relatiei investigate

Din masuratorile efectuate am obtinut ca fotoemisii DL-I este relativ insensibila la quercetina dar este redusa considerabil de menadiona (Fig. 5). Menadiona la concentratii $\geq 25 \mu\text{M}$ a produs o reducere relativ uniforma ($\sim 60\%$) a produsului cuantic DL-I, indiferent de durata tratamentului sau de pre-tratamentul cu flavonoid. $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ a produs o scadere moderata ($\sim 35\%$) a produsului cuantic DL-I.

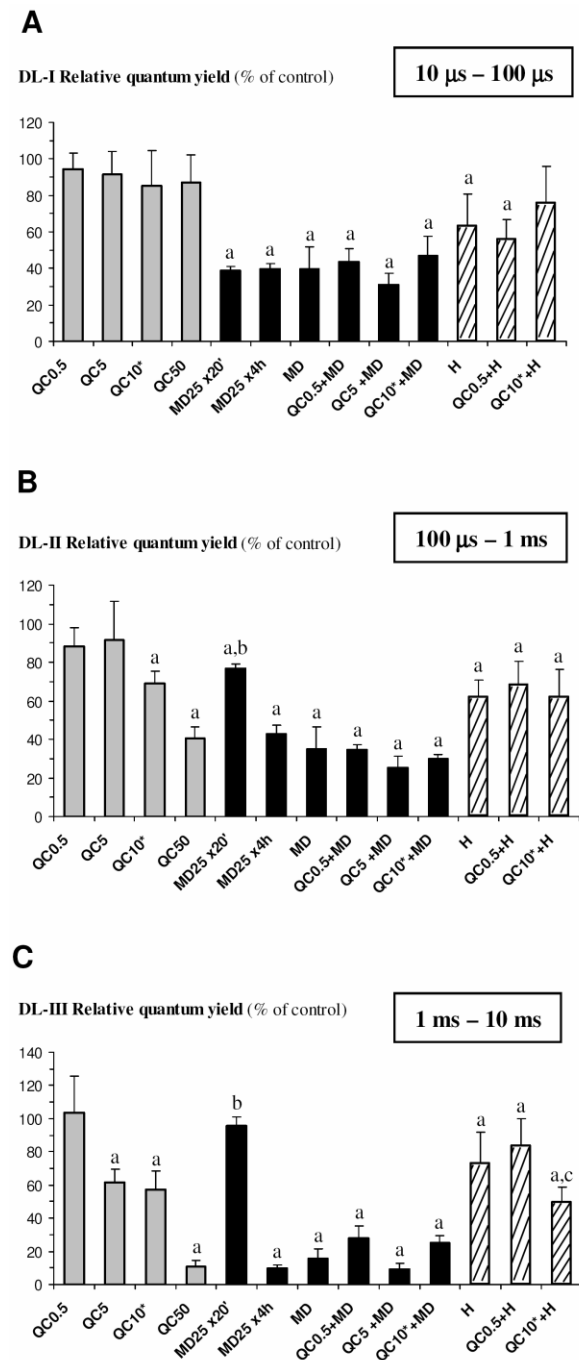
Rezultatele noastre sustin ipoteza ca fotoemisia DL-I este legata de activitatea respiratorie mitocondriala si ca reducerea emisiei DL-I de catre menadiona si H_2O_2 se datoreaza cel mai probabil inhibarii temporare a transferului direct de electroni in Complexul I al lantului respirator. Datele obtinute in culturile celulare tratate cu menadiona sugereaza o contributie de ~60% a transferului direct de electroni la fotoemisii DL-I (Fig. 5A).

Regiunile DL-II si DL-III au fost afectate atat de quercetina cat si de menadiona, in mod dependent de doza (Fig. 5). Pentru toate tratamentele am obtinut o anti-corelatie puternica intre produsul cuantic DL-II si fractia de celule apoptotice, cu un coeficient de corelatie Pearson $r = -0.79$, sugerand faptul ca toti cei trei agenti chimici (MD, H_2O_2 si QC) afecteaza emisii DL-II prin acelasi mecanism. Rezultatele noastre indica de asemenea faptul ca inhibarea transferului direct de electroni in lantul respirator mitocondrial sau depolarizarea mitocondriala participa la acest efect numai intr-o masura redusa. Este posibil ca o cauza plauzibila sa fie contributia speciilor reactive de oxigen OH^\bullet , H_2O_2 and $O_2^{\bullet-}$, care pot fi produse intracelular de cei trei agenti chimici. Totusi, pretratatamentul cu $10 \mu M$ QC, care a oferit o protectie considerabila fata de efectele nocive ale H_2O_2 , nu a reusit sa restaureze emisii DL-II/III, sugerand astfel ca DL-II si DL-III sunt corelate cu nivelul de superoxid $O_2^{\bullet-}$ si nu cu nivelul de OH^\bullet/H_2O_2 .

Datele obtinute indica de asemenea ca luminescenta intarziata a celulelor Jurkat nu este corelata cu procesele de peroxidari lipidice si nici cu nivelul de oxigen singlet care se formeaza in aceste procese. In Complexul I al lantului respirator mitocondrial cei doi electroni furnizati de NADH catre flavin-mononucleotida (FMN) sunt transferati individual intre opt clusteri de Fe/S consecutivi si sunt transferati in final ubiquinonei. Rezultatele noastre sunt in acord cu faptul ca FMN poate absorbi radiatie UV producand stari singlet excitate care pot fie sa revina pe starea fundamentala prin fluorescenta imediata (Foster et al. 2006) sau pot sa treaca in stari triplet cu timp de viata lung, care in continuare se pot relaxa trecand in stari intermediare metastabile (Swartz et al. 2001). Timpul de viata lung al speciilor moleculare cu stari de tip triplet sau metastabile permite desfasurarea unor reactii fotochimice in Complexul I al lantului respirator mitocondrial si permite astfel producerea unor excitari secundare, ceea ce genereaza luminescenta intarziata. Reducerea emisiei DL-II si DL-III prin tratamentele cu menadiona, quercetina si H_2O_2 sugereaza inhibitia de catre radicalul liber superoxid a transferului invers de electroni la cei doi clusteri Fe/S periferici N1a and N2 (pentru DL-II, constanta de timp ~100 μs (Verkhovskaya et al. 2008)), sau la clusterii intermediari (pentru DL-II, constanta de timp ~1 ms (Verkhovskaya et al. 2008)). Mai multe detalii sunt prezentate in raportul in extenso.

Rezultatele acestor studii reprezinta o nouate absoluta in domeniu si aduc argumente suplimentare pentru utilizarea spectroscopiei de luminescenta intarziata in aplicatii clinice de diagnostic sau in studii prospective pentru terapii ale cancerului care sa vizeze cresterea nivelului de moarte apoptotica prin stress oxidativ. Aceasta tehnica de investigare este de mare sensibilitate si furnizeaza avantajul acuratetei si rapiditatii testului.

Figura 5. Produsul cuantic relativ pe diferite scale de timp obtinut prin masuratori de spectroscopie de luminescenta intarziata efectuta pe probe celulare Jurkat supuse tratamentelor cu agenti oxidanti indicate in Fig. 1. Diferentele semnificative intre tratamente sunt prezentate la fel ca in Fig. 1.



Activitatea 2.3.

Diseminare: comunicarea rezultatelor, publicare web

Rezultatele obtinute au fost publicate si prezentate in cadrul unui seminar stiintific sustinut de directorul de proiect la LNS-INFN Catania, Italia. Sunt de asemenea publicate pe site-ul web al proiectului.

OBIECTIVUL 3

Modelarea procesului de eliberare a ionilor de calciu in cardiomiocite

Activitatea 3.1

Adaptarea modelului la conditiile cardiomiocitelor; implementarea programului de simulare

Procedura de simulare a unui eveniment de eliberare de calciu din reticulul endoplasmatic (RE) se bazeaza pe discretizarea spatiala in geometrie cilindrica si rezolvarea numerica a ecuatiilor de reactie-difuzie in lumenul RE si respectiv in citosol, similar metodei de simulare prezentata in raportul proiectului din anul 2009. Am implementat un model propriu pentru a descrie schimbul ionic Ca^{2+}/K^+ , care are loc in lumenul RE, model in care Ca^{2+} si K^+ se leaga competitiv la un domeniu comun M al matricei glicoproteice a RE. Valorile constantelor de legare (constantele de disociere, concentratia de situri de legare ale matricei, concentratia stationara de Ca^{2+} si coeficientul Hill) au fost obtinute din fitarea unui set de date experimentale raportate din literatura:

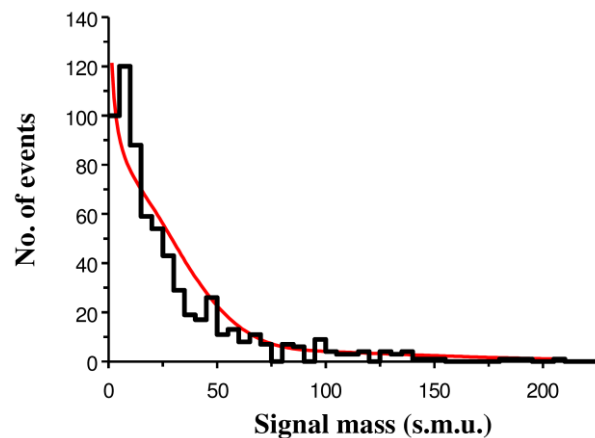
$K_{Ca}^{ER} = 567.24 \mu M$, $K_K^{ER} = 96.21 mM$, $M_{max} = 3.88 M$, $[Ca]_{ER}^{rest} = 362 mM$ si $h_K = 6.28$. Coeficientul de difuzie al ionilor Ca^{2+} si K^+ in RE a fost considerat ca fiind 1/10 din valoarea coeficientului de difuzie in citosol. In citosol s-a considerat ca este prezent un tampon de Ca^{2+} endogen fix (FB) corespunzator troponinei C, un tampon de Ca^{2+} endogen mobil (MB) si indicatorul fluorescent (OG) utilizat in experimentele de microscopie confocala de fluorescanta raportate in literatura.

Activitatea 3.2

Efectuarea de simulari si calcule numerice pentru un numar mare de evenimente de calciu; Comparare cu datele experimentale existente

Am efectuat un numar mare de simulari numerice in care am variat numarul de canale de calciu din situl de eliberare intre 5 si 50, durata de deschidere a canalelor intre 10 si 350 ms, curentul ionic de eliberare prin clusterul de canale intre 0.05 si 5 pA. Pentru fiecare eveniment de calciu simulat am inregistrat cinetica nivelului de Ca^{2+} liber sau legat la FB, MB si respectiv OG, precum si cinetica fluorescetei fluoroforului in forma Ca^{2+} -legata, in care am inclus efectul estomparii optice printr-o integrala tri-dimensionala de convolutie a semnalului. Din analiza datelor experimentale (Sun et al. 1998) am obtinut dependentele cantitative ale masei semnalului fluorescent de curentul ionic de eliberare, de durata de eliberare si de unghiul sub care este orientata linia de scanare laser fata de segmentul RE.

Am investigat efectele zgomotului semnalului de fluorescena și ale discretizarii spatiale asupra acurateții calculării masei semnalului obținut din înregistrările de tip linescan. Simulările numerice au indicat că estimarea cantității eliberate de Ca^{2+} (în special pentru evenimentele de amplitudine mică) poate fi însoțită de variații mari datorate unor incertitudini intrinseci legate de: 1) medierea valorilor semnalelor de fluorescena rezultate din volumele discrete ale unor voxelii de dimensiuni relativ mari, 2) evaluarea centrului evenimentului de eliberare de calciu și poziționarea acestuia în voxelul corespunzător, 3) fluctuațiile intrinseci ale zgomotului din



semnalele de fluorescena, asociate atât cu difuzia datorată neomogenității mediului intracelular cât și cu estomparea optica a microscopului și 4) utilizarea unei estimări de ordinul puterii a treia a distanței până la centrul evenimentului de calciu. Simularile numerice au indicat faptul că in absenta fluoroforului majoritatea Ca^{2+} eliberat (83% din total) se leagă de tamponul endogen fix (troponina C) în timp ce o mică parte (14% din total) se leagă de tamponul endogen difuzibil. Ca urmare, modificari patologice care afecteaza capacitatea de legare a Ca^{2+} la troponina pot conduce la aritmii sau la scaderea capacitatii de contractie a cordului.

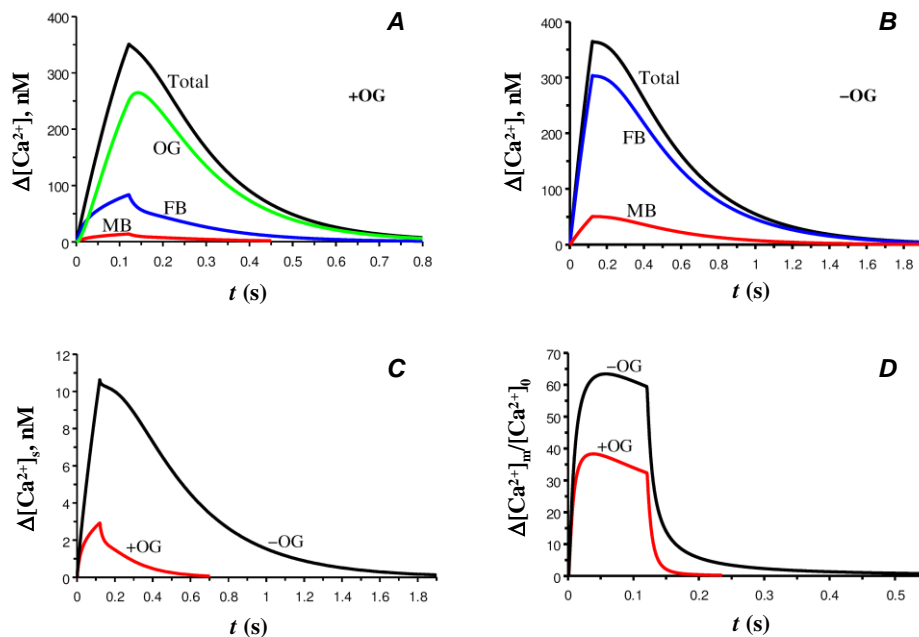
Figura 6. Distributia semnalului de masa. Comparatia modelului cu datele experimentale.

Activitatea 3.3

Estimarea valorilor caracteristice eliberării in vivo (curent ionic mediu, durata medie de eliberare etc.).

Simularile numerice au indicat ca valori frecvente ale curentului de eliberare sunt in jur de 1 pA iar durata de eliberare este in jur de 100 ms, in acord cu alte studii anterioare (Izu s.a. 1998; Smith s.a., 1998; Soeller 2002). Este de interes cunoasterea amplitudinii semnalului local de Ca^{2+} în timpul evenimentelor locale de calciu. Pentru aceasta, am calculat concentrațiile maxime de Ca^{2+} liber ($[Ca^{2+}]_m$) care sunt atinse în fața cluster-ului de canale de calciu ($\alpha = 0^\circ$), la o distanță de 250-450 nm față de centrul cluster-ului. Am determinat de asemenea și creșterea $[Ca^{2+}]_s$ a nivelului de Ca^{2+} în domeniul de simulare adiacent segmentului de reticul endoplasmic pe o scală spațială de 5-10 μm (volum $V_s = 783.74$ fl). Prin analiza datelor numerice obtinute din simulări am obtinut funcțiile care descriu dependenta $[Ca^{2+}]_m$ și $[Ca^{2+}]_s$ de curentul ionic și durata de eliberare. Acestea ne-au permis sa estimam distribuțiilor acestor doua măsuri cantitative ale semnalelor Ca^{2+} . Conform acestor calcule, cele mai frecvente evenimente de calciu produc o creștere de cca. 63 de ori a $[Ca^{2+}]_m$ deasupra nivelului bazal $[Ca^{2+}]_0$, atingandu-se un nivel maxim de 8.8 μM Ca^{2+} in apropierea sitului de eliberare. Conform estimărilor noastre, propagarea ionilor de Ca^{2+} de la situl de eliberare la clusterii vecini în timpul unui eveniment de eliberare care are loc în prezența unui fluorofor poate duce la o creștere de cca. ~150-300 nM a concentrației de ioni liberi de Ca^{2+} in ~30 ms la situri aflate la 0.5-1 μm distanță de situl original de eliberare a calciului. Concentrația corespunzătoare de Ca^{2+} care ar fi stabilită în situația reala fara perturbatie externa (in absența fluoroforului indicator) este de ~250-500 nM, concentrație aflata în domeniul de activare a canalelor de calciu, ceea ce reflecta capacitatea de producere rapida a eliberării de calciu in tot volumul cardiomiocitei și asigurarea unei contractii musculare unitare.

Un rezultat de interes al studiilor noastre este faptul ca în timpul unui eveniment tipic de eliberare de calciu cu o durată de 120 ms numai 40% din ionii de Ca^{2+} eliberați rămân in domeniul citoplasmatic de ~800 fl din jurul sitului de eliberare, indiferent de prezența sau absența indicatorului fluorescent, ceea ce indica faptul că în



timpul celor 120 ms mai mult de 50% din calciul eliberat este transferat prin tamponare sau difuzie libera până la distanțe >5 μm față de punctul de eliberare. Aceasta caracteristica poate avea consecințe importante în generarea semnalelor globale de calciu și implicat în frecvența de contractie a cordului prin modularea nivelului prag de stimulare a cardiomiocitei. Mai multe detalii sunt prezentate în raportul in extenso.

Figura 6. Distribuția creșterii nivelului de calciu in imediata vecinătate a unui cluster de canale de calciu in prezența (+OG) sau in absența (-OG) fluoroforului.

Activitatea 3.4

Publicare web, seminar stiintific. Articol stiintific

Rezultatele obtinute au fost publicate intr-un articol ISI (*BioSystems* 102:134-147; factor de impact 1.267) și prezentate in cadrul unui seminar stiintific sustinut de directorul de proiect la Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucuresti. Vor fi de asemenea prezentate la Conferinta de Biofizica din 27 noiembrie 2010 din Bucuresti. Un alt articol este trimis la revista cotate ISI *Journal of Molecular Modeling* (factor de impact 2.3).

Bibliografie: Foster KA et al. 2006. *Prog Neurobiol.* 79: 136-171; Izu LT et al., *Biophys. J.* 75, 1144-1162 (1998); Smith GD et al., *Biophys. J.* 75, 15-32 (1998); Soeller, C., Cannell, M.B., *Biophys. J.* 82, 2396-2414 (2002); Sun, X.-P. et al., *J. Physiol.* 509, 67-80 (1998); Swartz TE et al. 2001. *J Biol Chem.* 276: 36493-36500; Tudisco et al. 2003. *Rev. Sci. Inst.* 74: 4485-4490; Tudisco et al. 2004. *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. A* 518: 463-464; Verkhovskaya ML et al. 2008. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 3763-3767