



Study of binding dynamics of focal adhesion proteins using Fluorescence Microscopy and AFM techniques

Catalina von Bilderling^{1,2,3}, Martín Masip^{2,3}, Esteban Hoijman¹,
Andrea Bragas^{2,3} and Lía Pietrasanta^{1,2,3}

¹Centro de Microscopías Avanzadas, ²Departamento de Física-Instituto de Física de Buenos Aires (IFIBA-CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, y ³CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Centro de Microscopías Avanzadas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA
Pabellón I, piso 1, Ciudad Universitaria
C1428HEA- Buenos Aires
Argentina
lia@df.uba.ar



MECANOTRANSDUCCIÓN: INTEGRANDO RESPUESTA CELULAR AL ESTÍMULO MECÁNICO CON ALTA RESOLUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL

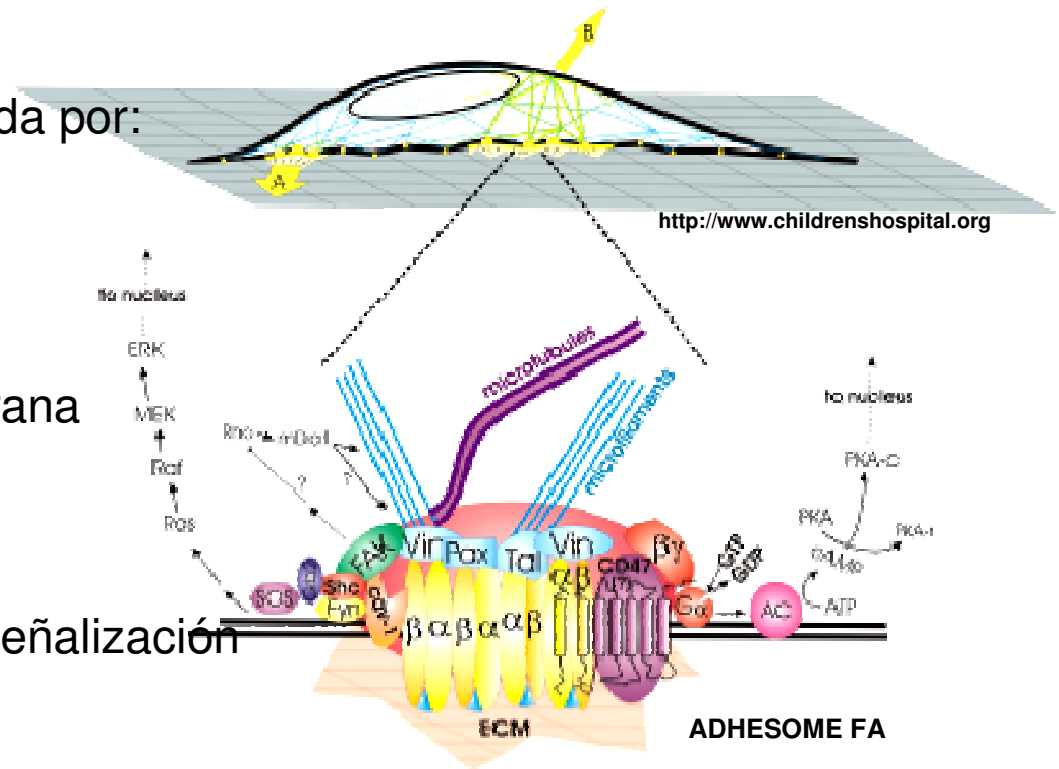
- **qué es la Mecanotransducción celular?**
- **quiénes intervienen?**
- **por qué es relevante el problema?**
- **cuáles con los objetivos específicos y la hipótesis de trabajo?**
- **cuál es la metodología de trabajo?**
- **cuáles son nuestros antecedentes?, cómo empezamos con los experimentos?, qué tenemos y qué necesitamos desarrollar?**
- **algunos resultados y perspectivas**

➤ qué es la Mecanotransducción celular?

La mecanotransducción se define como la *conversión* de un estímulo mecánico en una respuesta bioquímica.

La mecanotransducción está mediada por:

- ✓ estructuras del citoesqueleto
- ✓ receptores integrales de membrana
- ✓ matriz extracelular (ECM)
- ✓ moléculas de las cascadas de señalización



➤ por qué es relevante el problema?

insuficiencia cardíaca
hipertensión arterial
cáncer
asma
sordera congénita
disfunción sexual
incontinencia urinaria

qué tienen en común?

proceso de mecanotransducción anormal

- ✓ diseño de nuevas drogas terapéuticas
- ✓ desarrollo de instrumental médico para diagnóstico en la escala de los nm
- ✓ en la ingeniería de tejidos
- ✓ diseño de nuevos biomateriales inspirados en la biología para la reparación y reconstrucción de tejidos.

➤ **cuáles con los objetivos específicos y la hipótesis de trabajo?**

*En este proyecto nos proponemos estudiar la **estructura, respuesta mecánica y dinámica de las adhesiones focales** en células vivas mediante una combinación de microscopías y espectroscopias de alta resolución.*

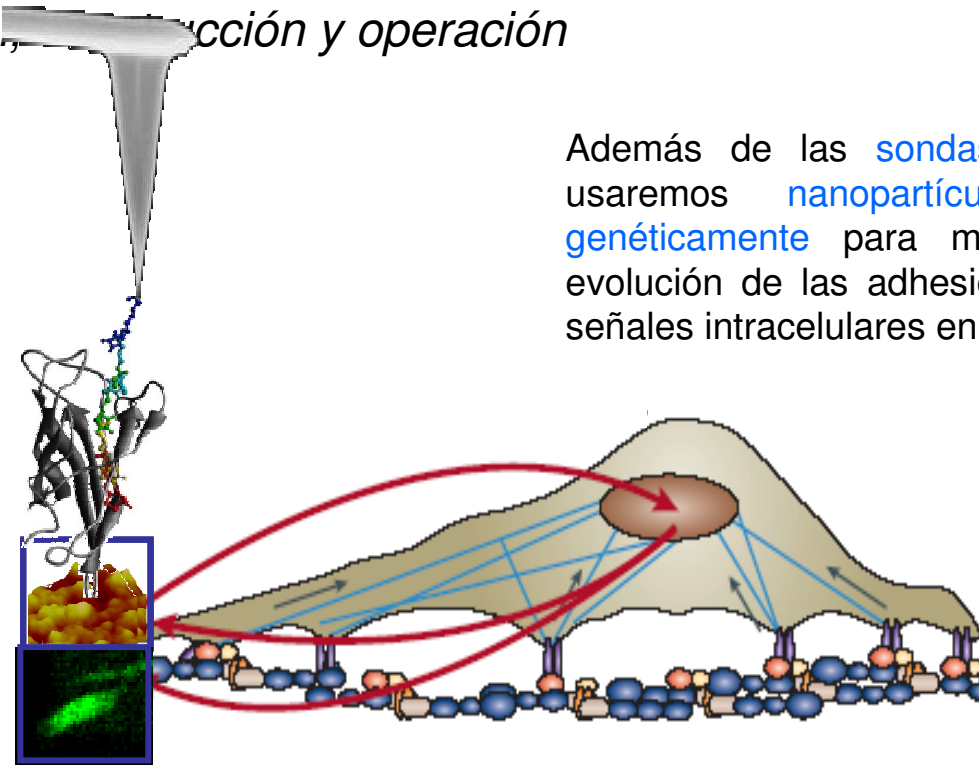
- 1. Interacción ligando-receptor: *formación y dinámica* de las interacciones fibronectina-integrina a nivel de **moléculas únicas** mediante microscopía y espectroscopía de fuerza atómica.
- 2. Interacción proteínas adaptadoras/receptor/citoesqueleto: *formación y dinámica* de las interacciones entre proteínas citoplasmáticas de la adhesión focal en **respuesta al estímulo mecánico** mediante técnicas de microscopía de fluorescencia/AFM.
- 3. Estudio de las **fuerzas generadas por la célula** y su relación con el ensamblado y dinámica de las adhesiones focales.

➤ cuál es la metodología de trabajo?

Microscopía de fuerza atómica y espectroscopía de fuerza avanzadas: detección y localización de eventos singulares de reconocimiento molecular

Microscopía de fluorescencia multidimensional: visualización, análisis de colocalización y deconvolución de imágenes

Microscopía multi-análisis: AFM/microscopía multifotónica. Diseño experimental, construcción y operación



Además de las sondas fluorescentes convencionales, usaremos nanopartículas, y sondas codificadas genéticamente para monitorear el ensamblado y la evolución de las adhesiones focales y la generación de señales intracelulares en respuesta al estímulo mecánico.

➤ **cuáles son nuestros antecedentes?, cómo empezamos con los experimentos?, qué tenemos y qué necesitamos desarrollar?**

Microscopía de fuerza atómica y FS

Microscopía confocal: FRET, colocalización, deconvolución de imágenes, time lapse

Cultivo de células, construcciones con VFPs, expresión, caracterización de las quimeras

Modificación de sustratos, química básica

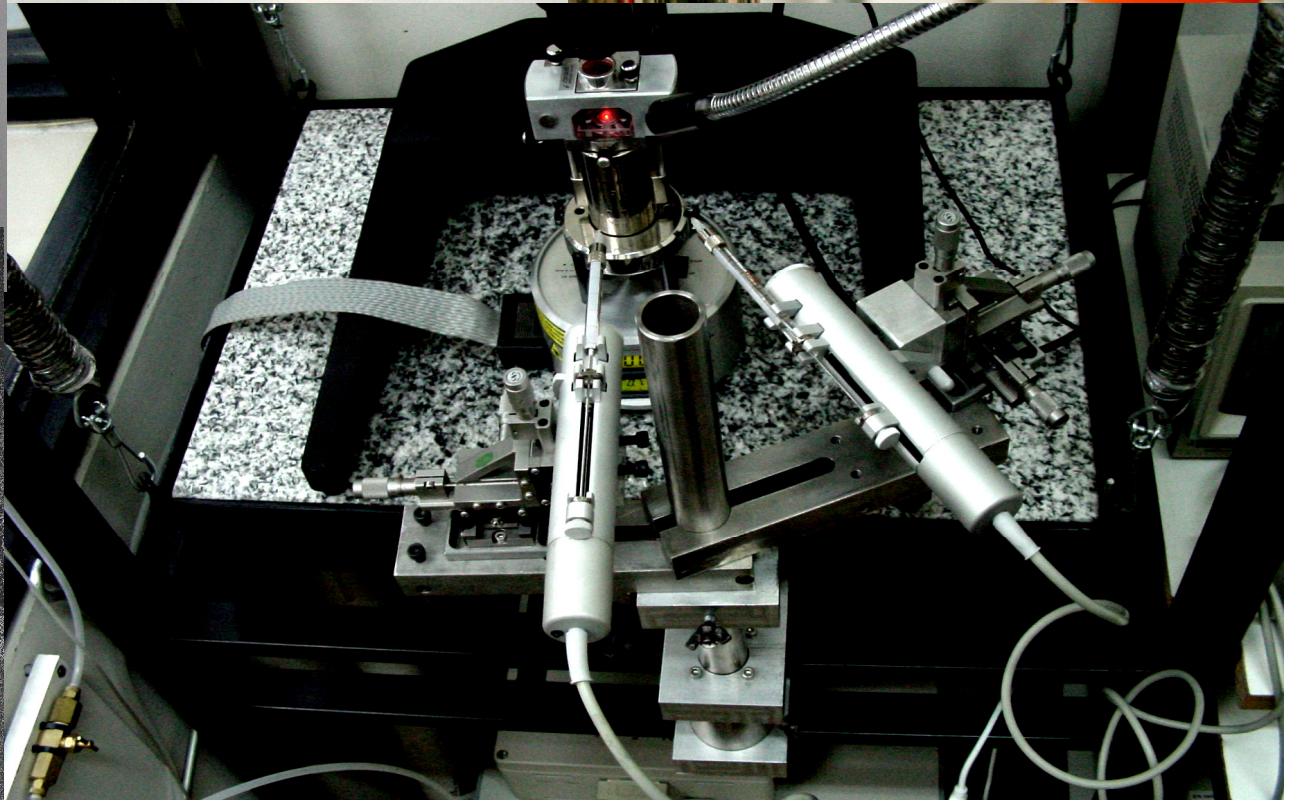
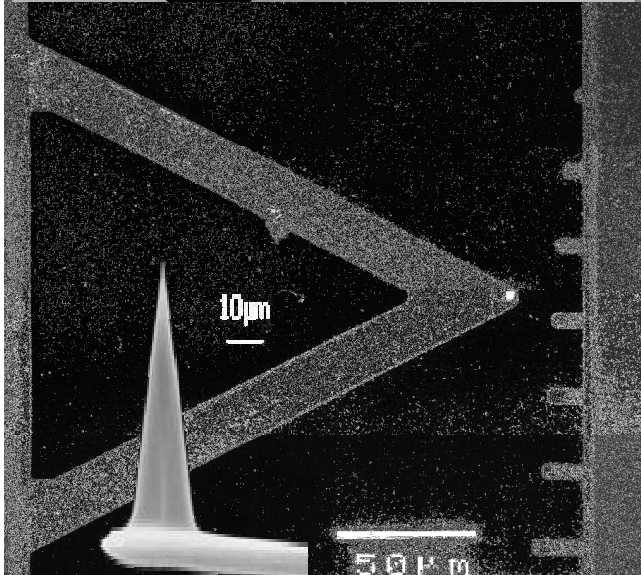
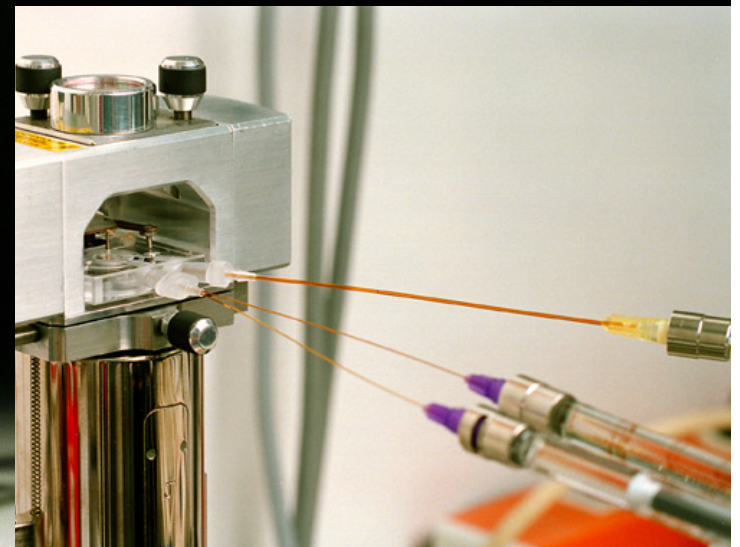
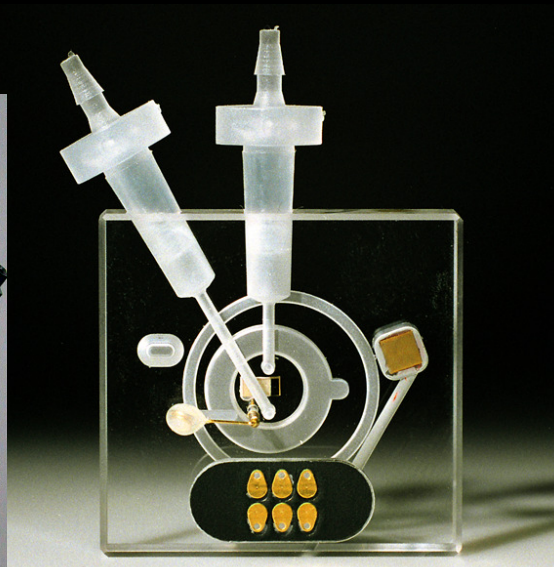


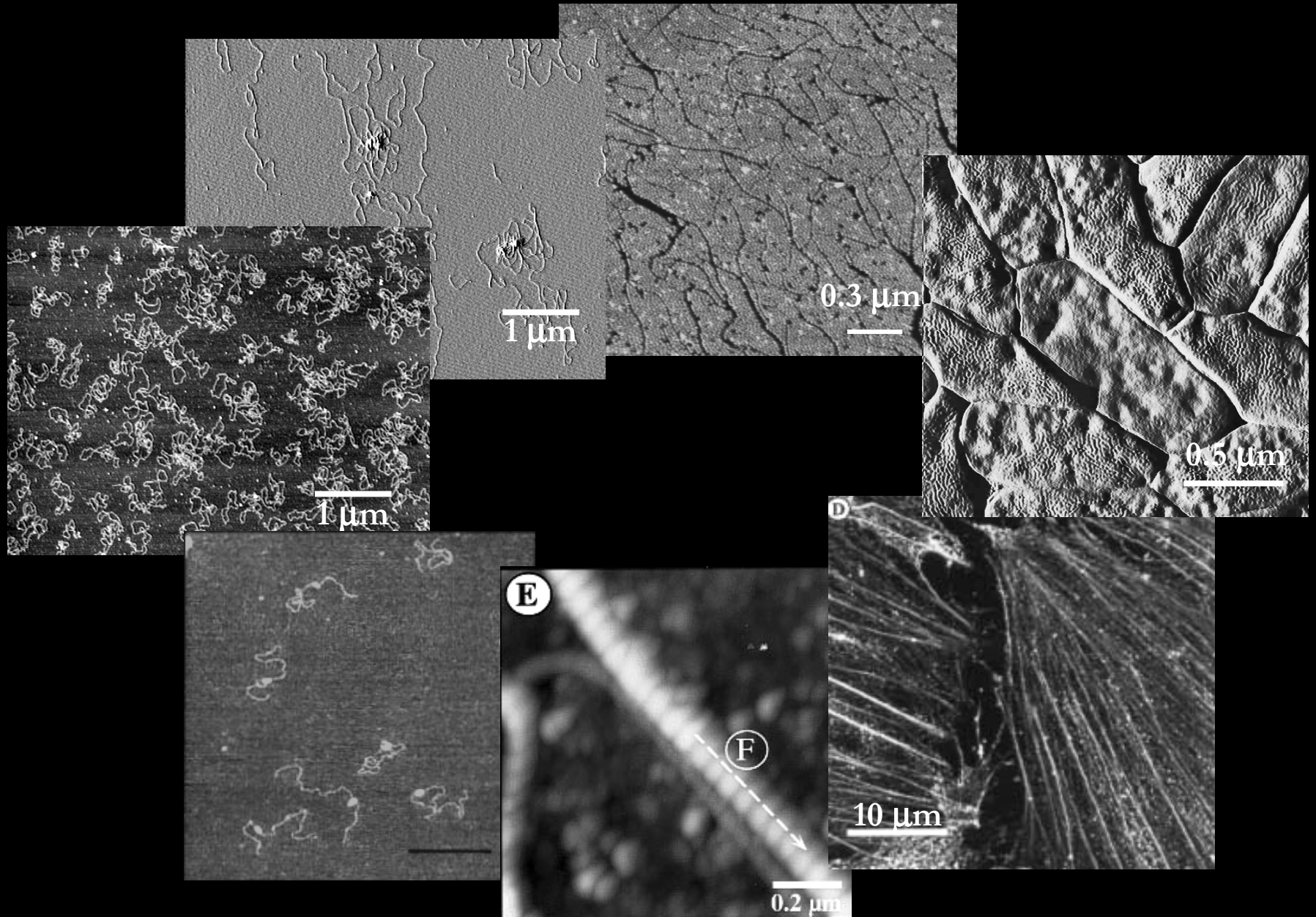
**CFM y MRAFM
FRAP, TIRFM
EBL/ μ CP**



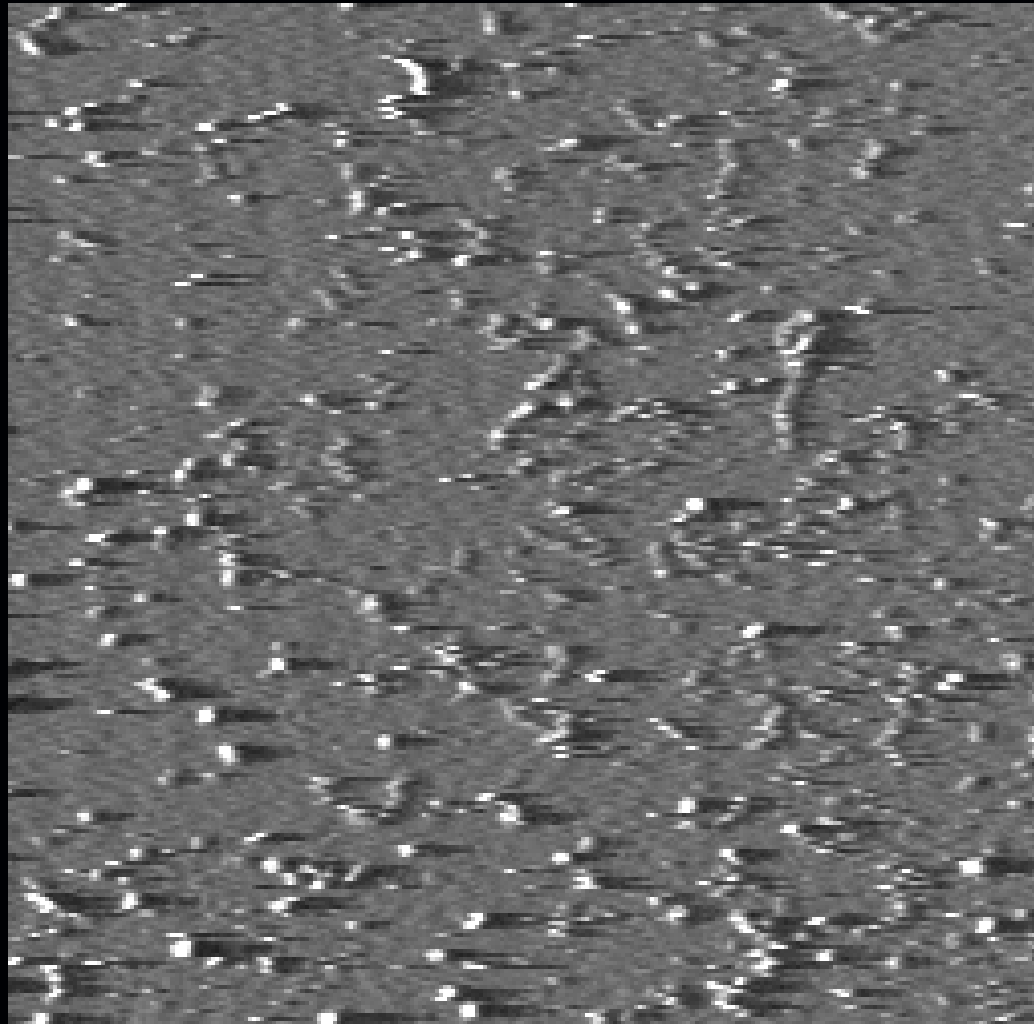
AFM/MPM

AFM y FS

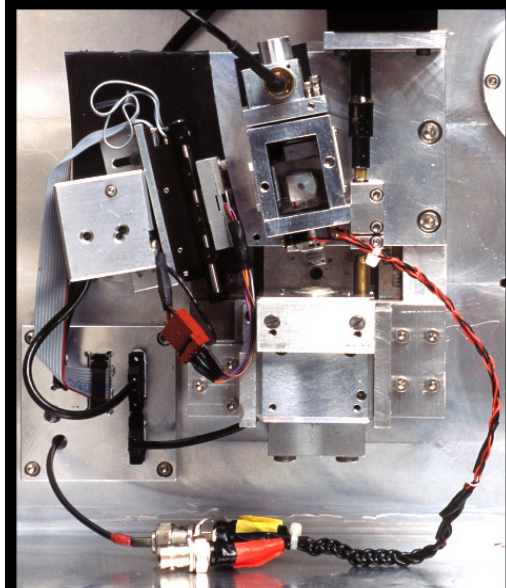
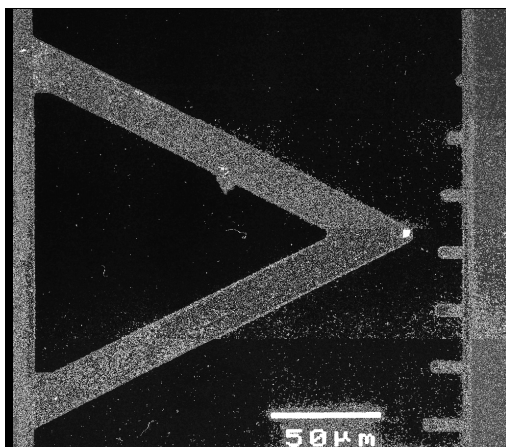




Dynamics and enzymatic degradation of single DNA molecules

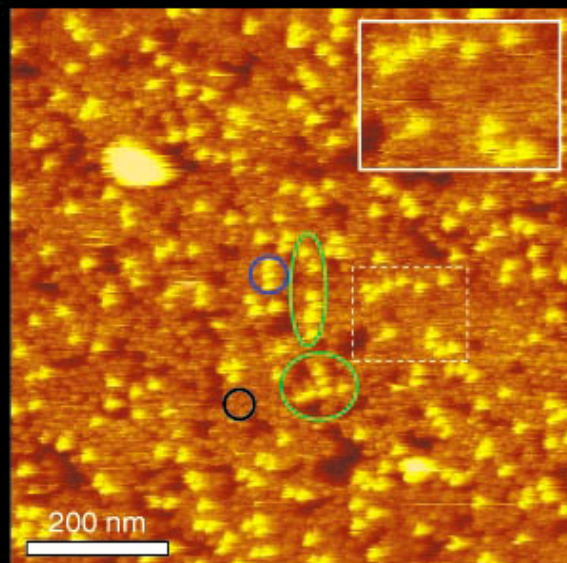


Probing protein-protein interactions in real time

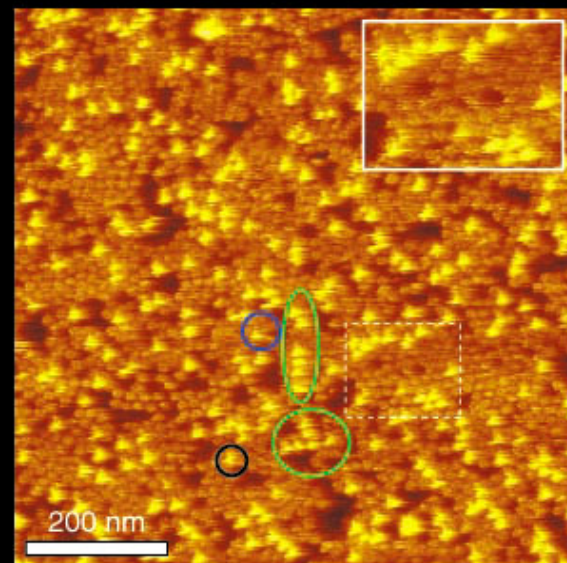


M. B. Viani, T. E. Schäffer, G. T. Palocz, L. I. Pietrasanta, B. L. Smith, J. B. Thompson, M. Richter, M. Rief, H. E. Gaub, K. W. Plaxco, N. Cleland, H. G. Hansma, and P. K. Hansma
Review of Scientific Instruments **70**: 4300-4303, 1999.

Escherichia coli GROE



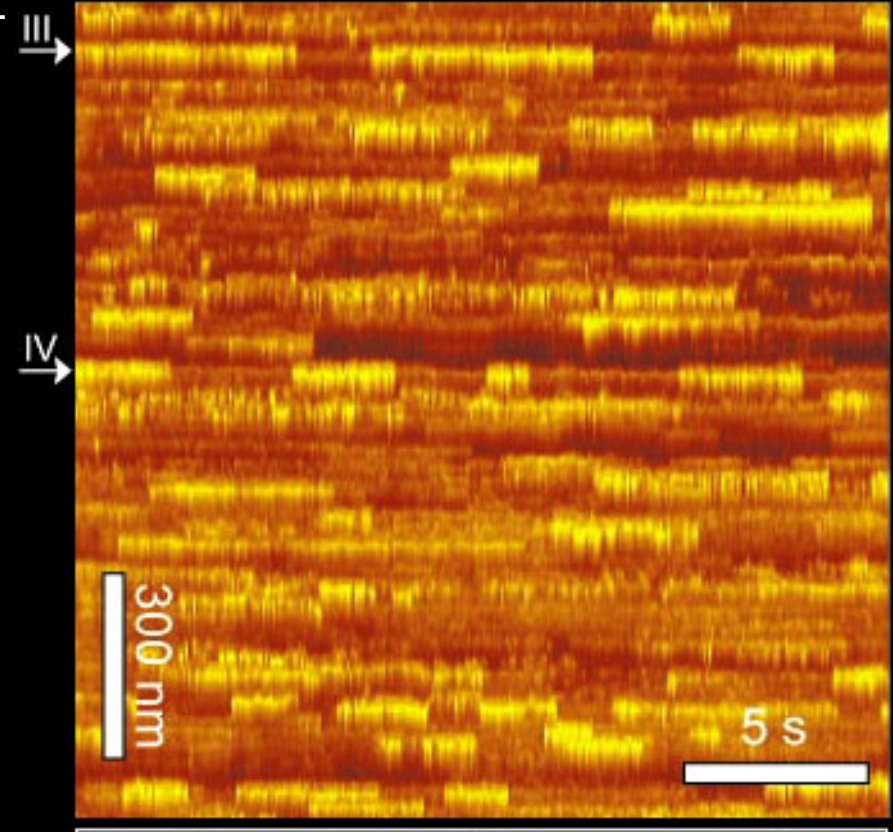
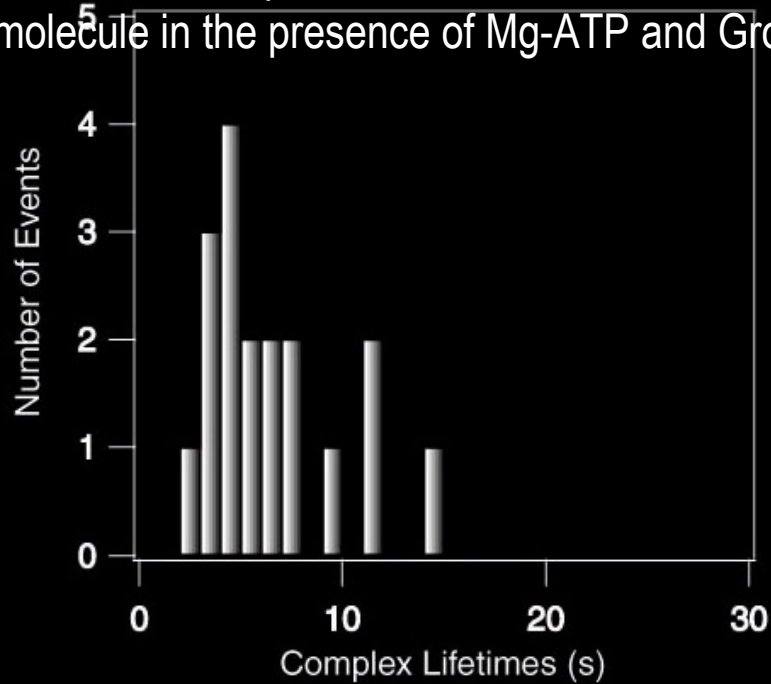
First Image



Seventh Image

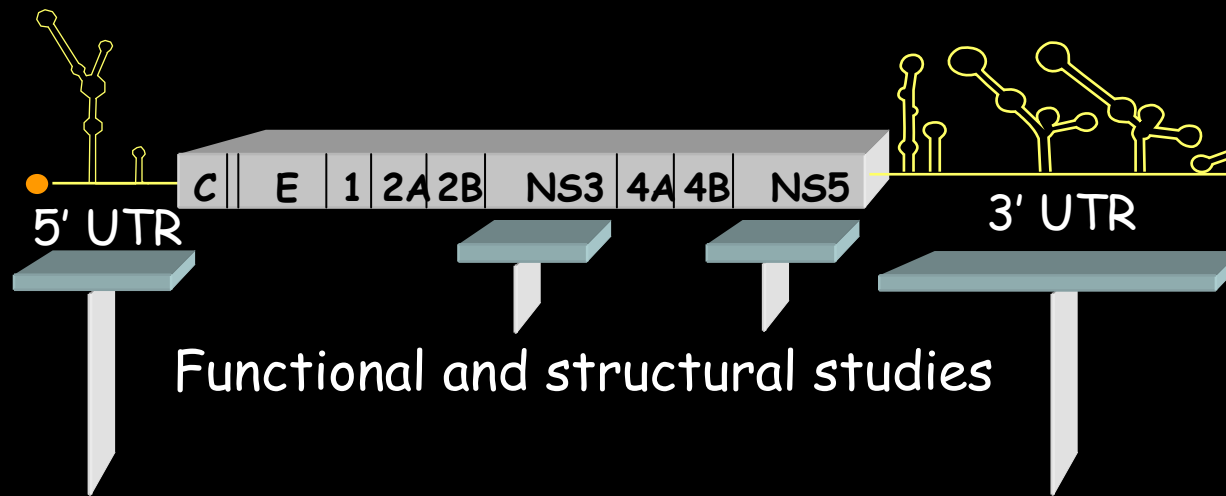
M. B. Viani, L. I. Pietrasanta, J. B. Thompson, A. Chand, I. C. Gebeshuber, J. H. Kindt, M. Richter, H. G. Hansma and P. K. Hansma. *Nature Structural Biology* 2000, Vol. 7: 644-647

Measured complex lifetime of an individual GroEL molecule in the presence of Mg-ATP and GroES.



- Our experiments demonstrate the possibility of using small cantilever AFM as a tool for studying the dynamics of single proteins.
- This technique will augment other single molecule methods that use optical techniques, by allowing real time measurements of length changes associated with protein activity.

Visualization of Long-Range order RNA-RNA Interactions in Dengue Virus Genome



Dissect the role of the UTRs during each step of viral replication



Genetic approach

Recombinant viruses
Replicon systems -reporters-



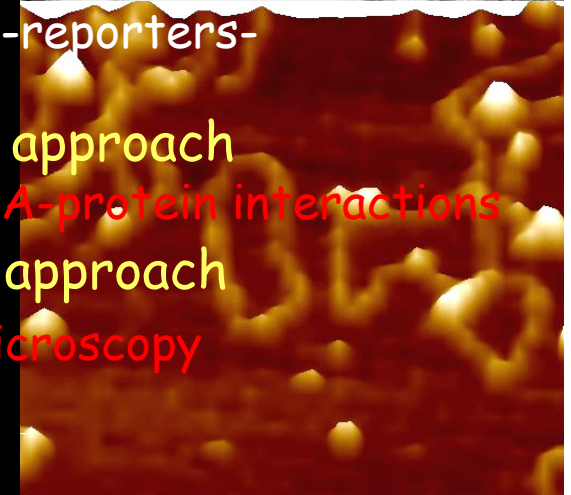
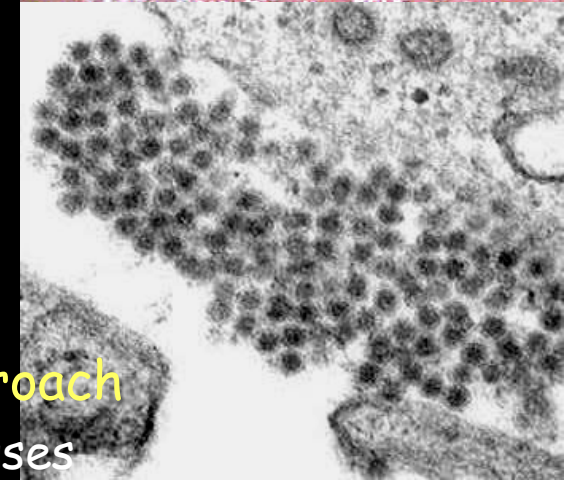
Biochemical approach

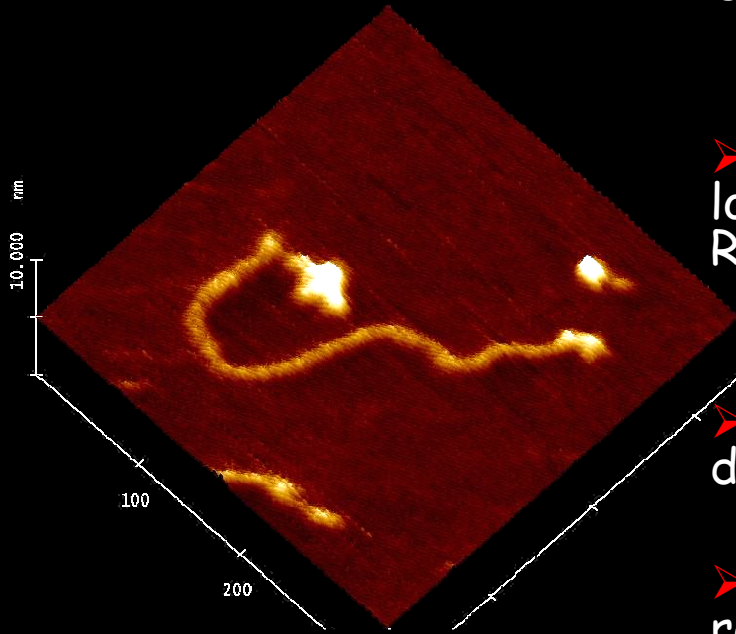
RNA-RNA and RNA-protein interactions



Biophysical approach

Atomic Force Microscopy





➤ Using RNA binding assays we showed direct RNA-RNA interaction between the 5' and 3' end sequences of dengue virus.

➤ Two pairs of complementary sequences (CS and UAR) are required for RNA-RNA interaction.

➤ Atomic force microscopy can be used to analyze long range RNA-RNA interactions in individual RNA molecules.

➤ RNA-RNA interactions are able to circularize dengue genome in the absence of proteins.

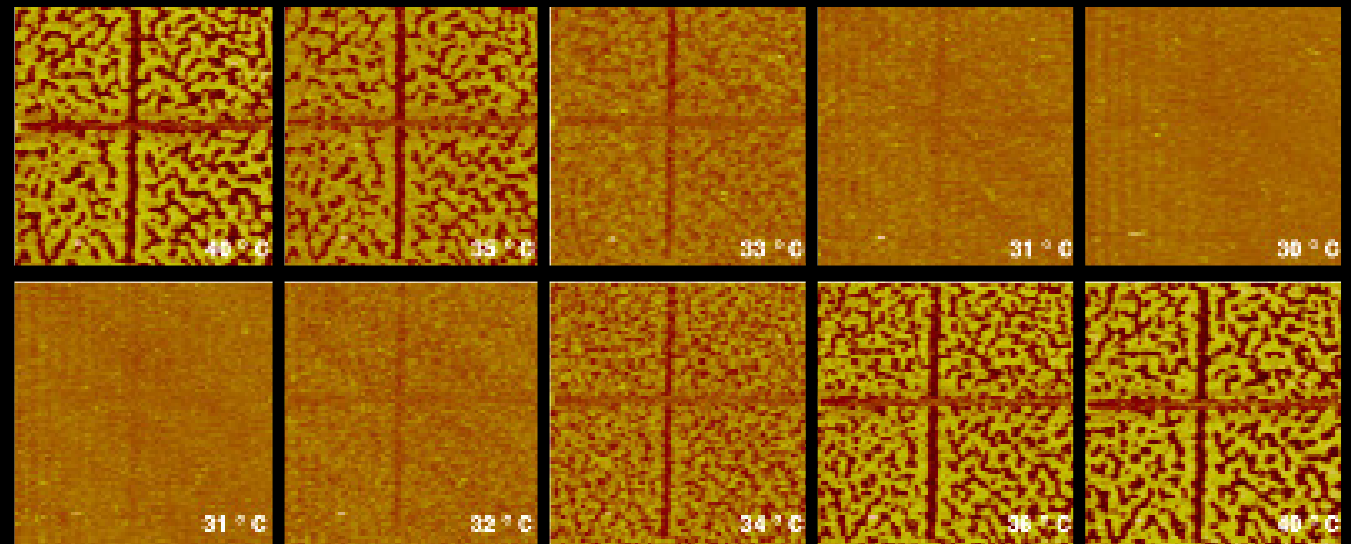
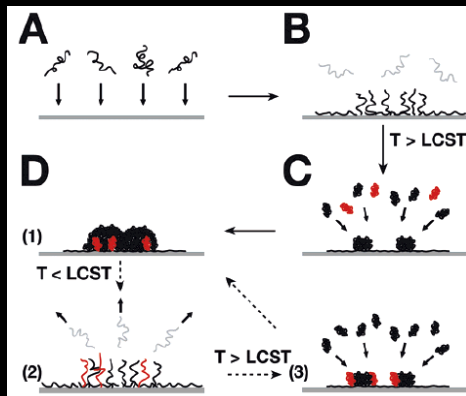
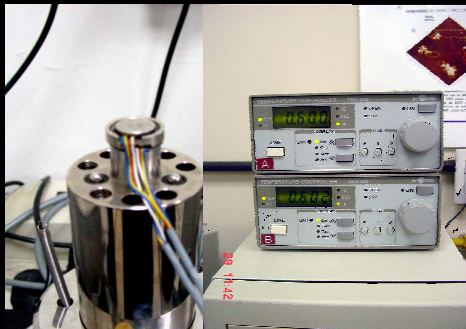
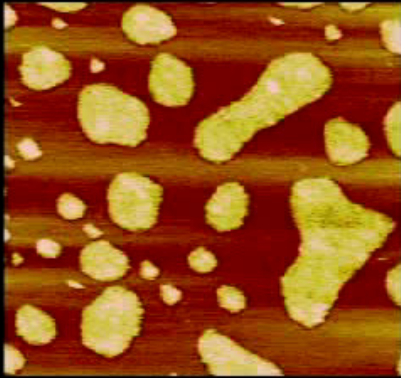
➤ Sequence complementarity is essential for viral replication

➤ Mechanism of RNA synthesis

D. E. Alvarez, M. F. Lodeiro, S. J. Ludueña, L. I. Pietrasanta, and A. V. Gamarnik. *Journal of Virology*, Vol. 79, pp. 6631-6643, 2005.

Claudia V. Filomatori¹, Maria F. Lodeiro¹, Diego E. Alvarez¹, Marcelo M. Samsa¹, Lía Pietrasanta^{2,3} and Andrea V. Gamarnik *GENES & DEVELOPMENT* Vol. 20, pp. 2238-2249, 2006

Temperature-controlled AFM demonstrates positional memory of thermoreversible N-isopropylacrylamide based polymer aggregates on mica

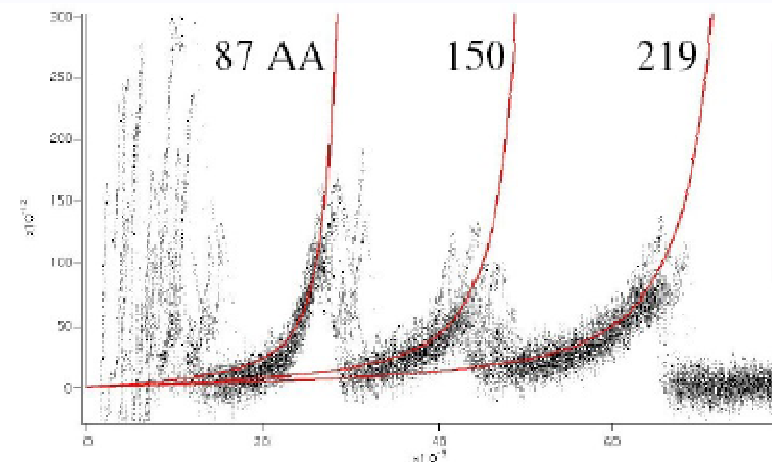
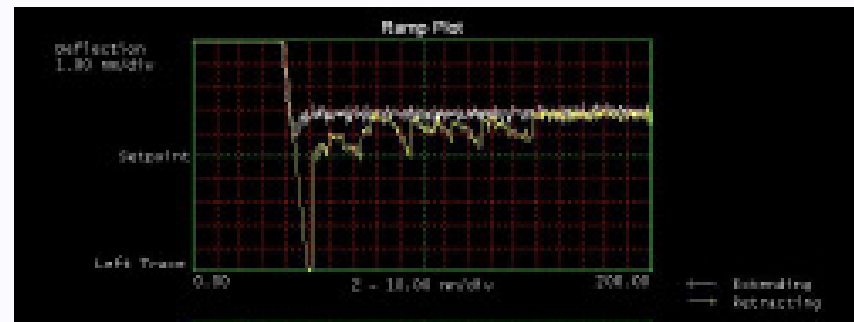
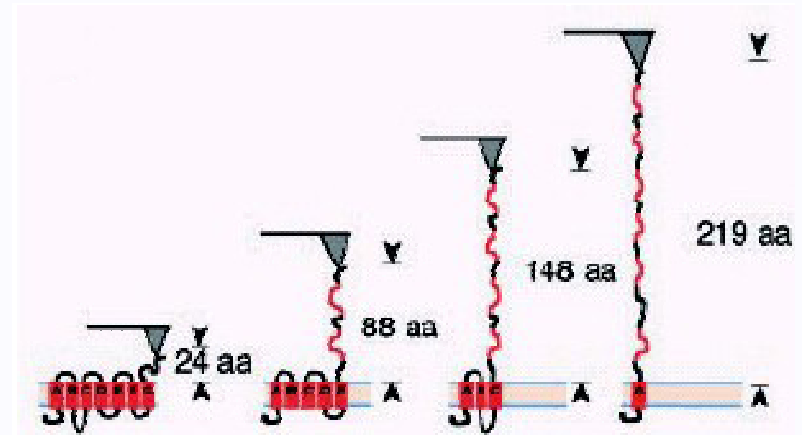
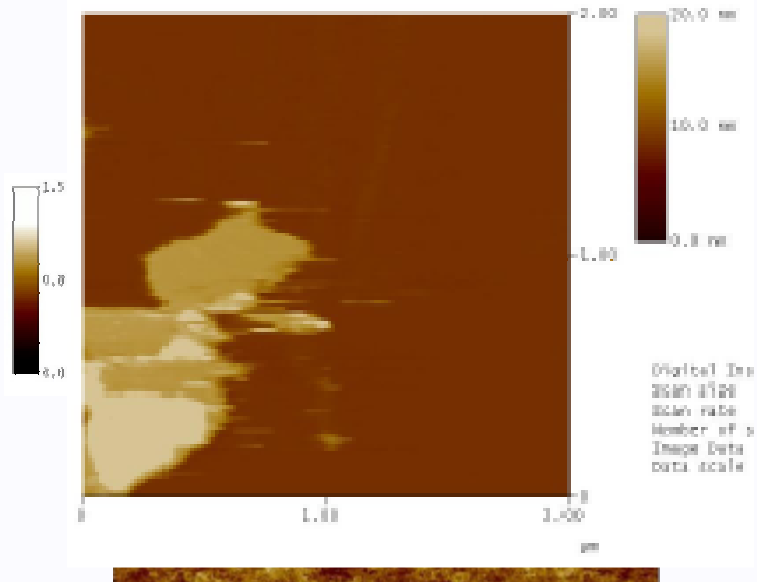
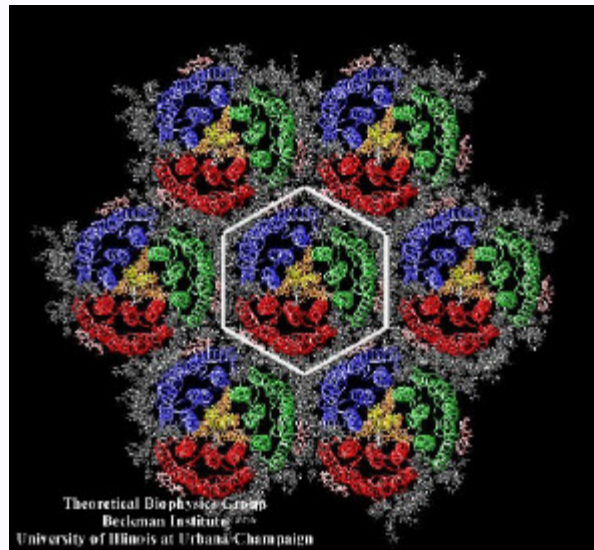


0 15 nm

~32°C (LCST)

Avishay Pelah, Silvio J. Ludueña, Elizabeth A. Jares-Erijman, Igal Szleifer, Lia I. Pietrasanta, and Thomas M. Jovin. *Langmuir* (2006) **22**: 9682-9686

BACTERIORODOPSIN



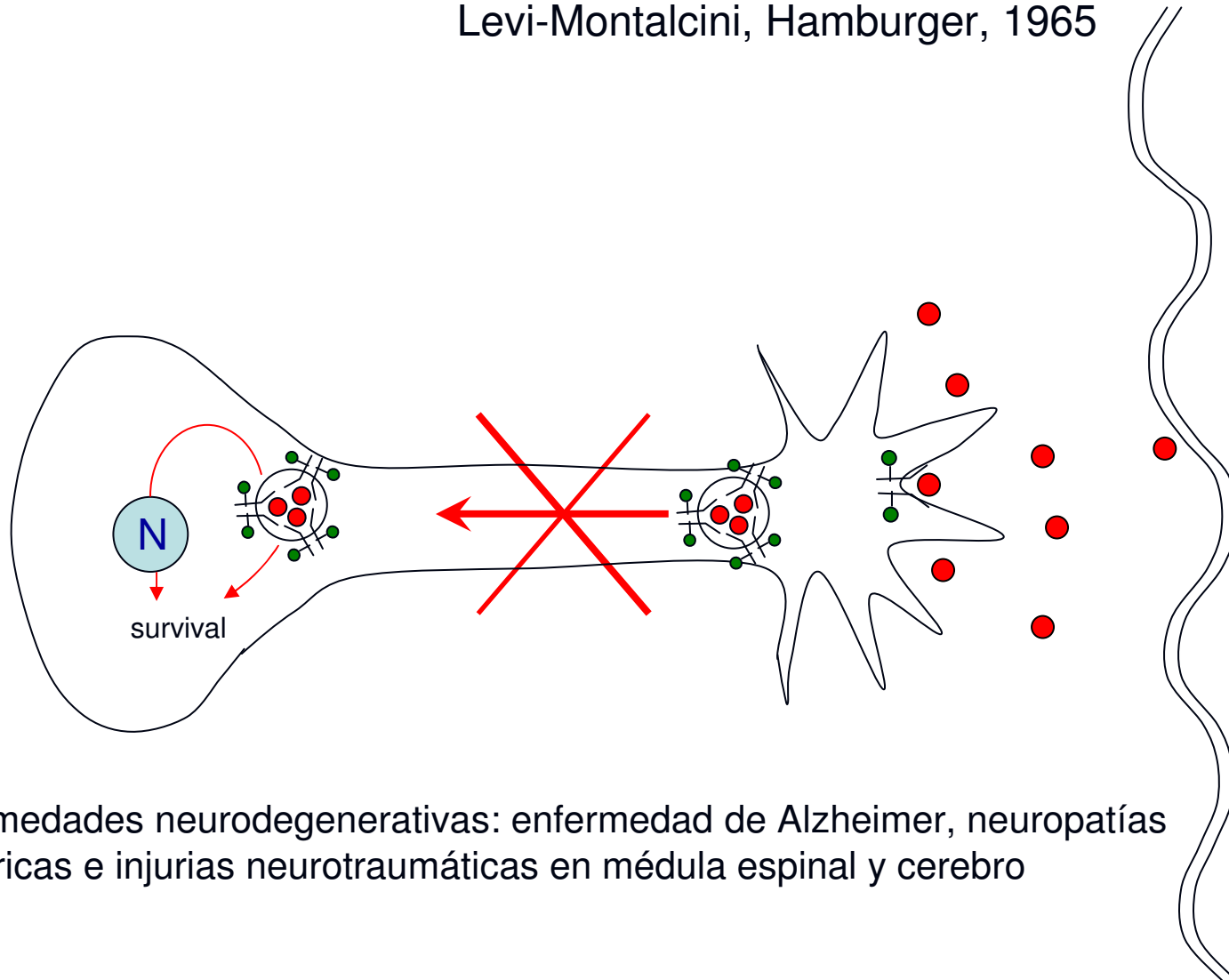
Microscopía confocal: visualización, análisis de colocación y deconvolución de imágenes

Mecanismos del transporte
retrógrado de NGF

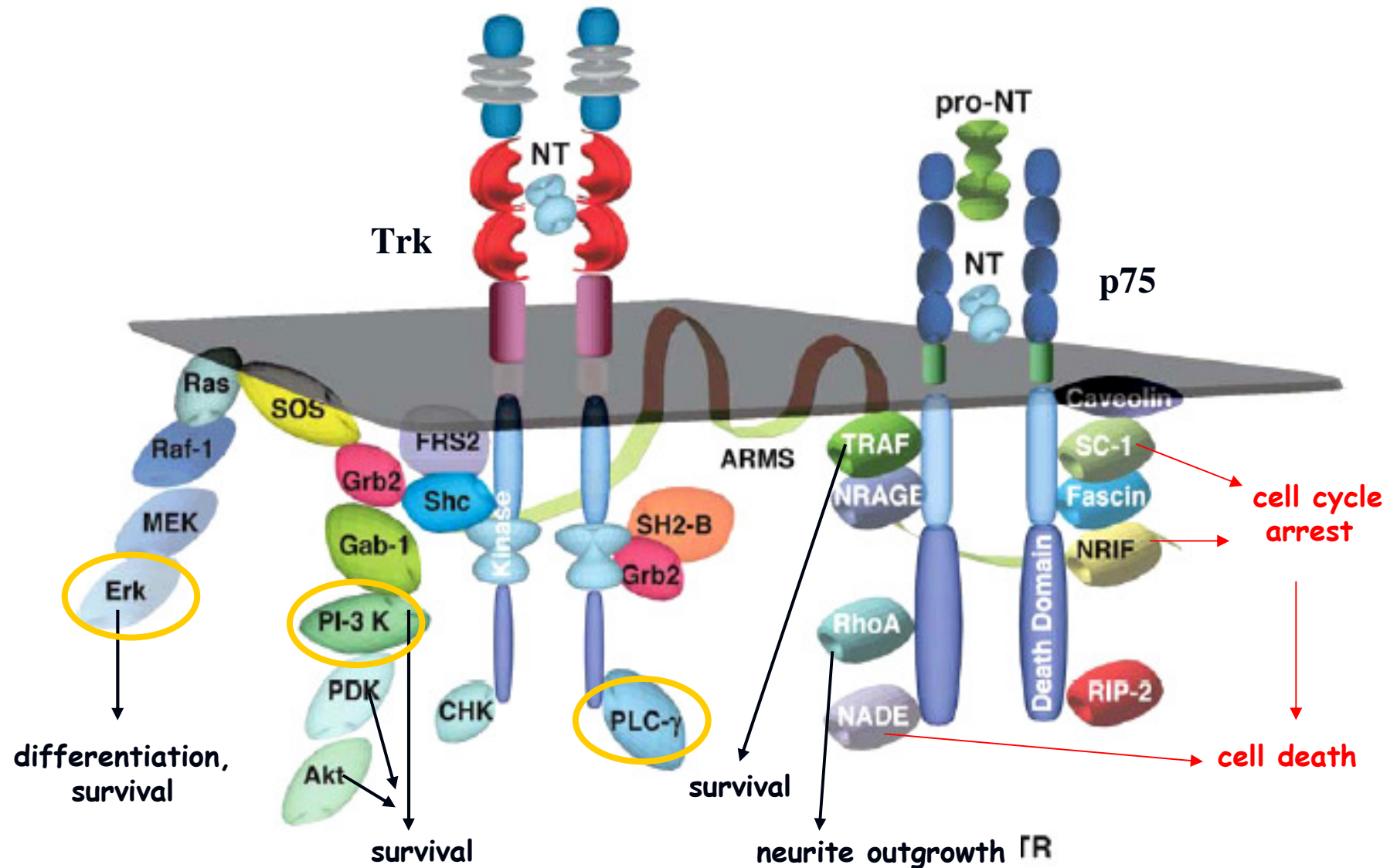


“Target-derived survival factors are produced in limiting amounts, and those neurons that successfully compete for these factors survive, whereas less competitive neurons die.”

Levi-Montalcini, Hamburger, 1965



✗ Enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer, neuropatías periféricas e injurias neurotraumáticas en médula espinal y cerebro

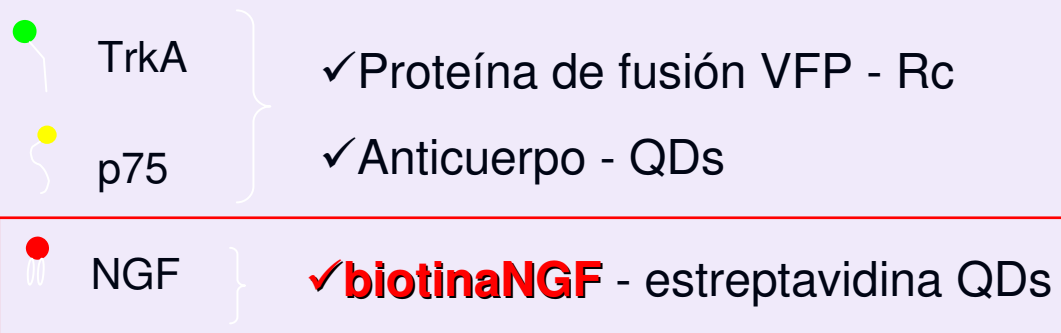
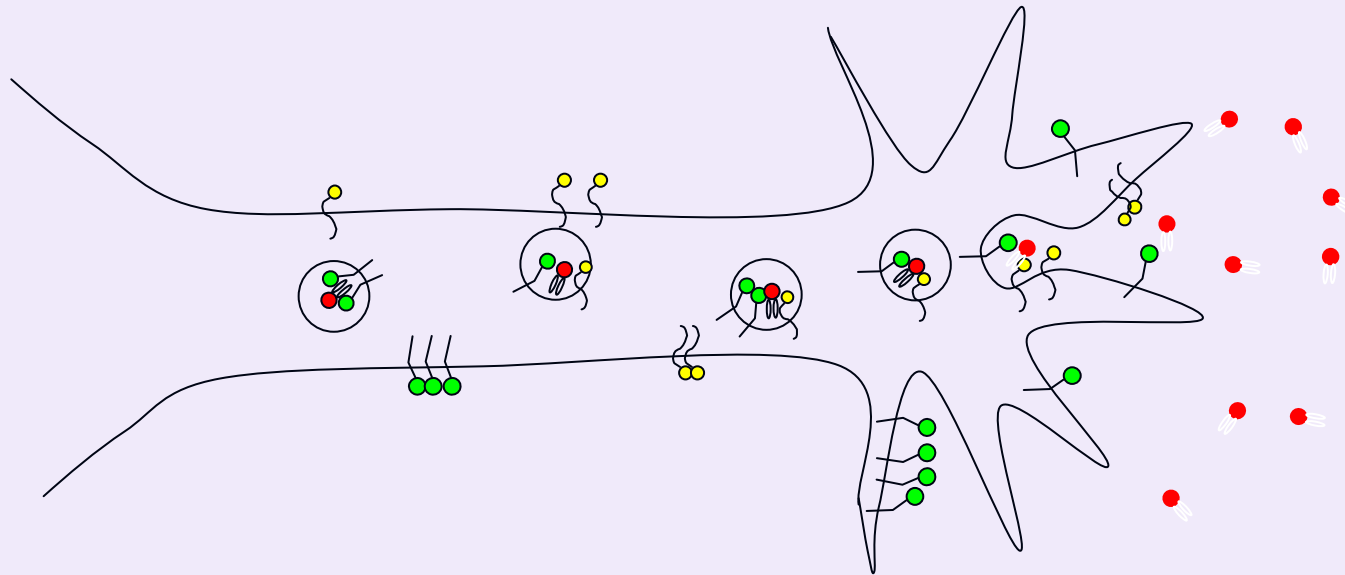


- ❖ trk A: NGF
- ❖ trk B: BDNF, NT-4/5
- ❖ trk C: NT-3

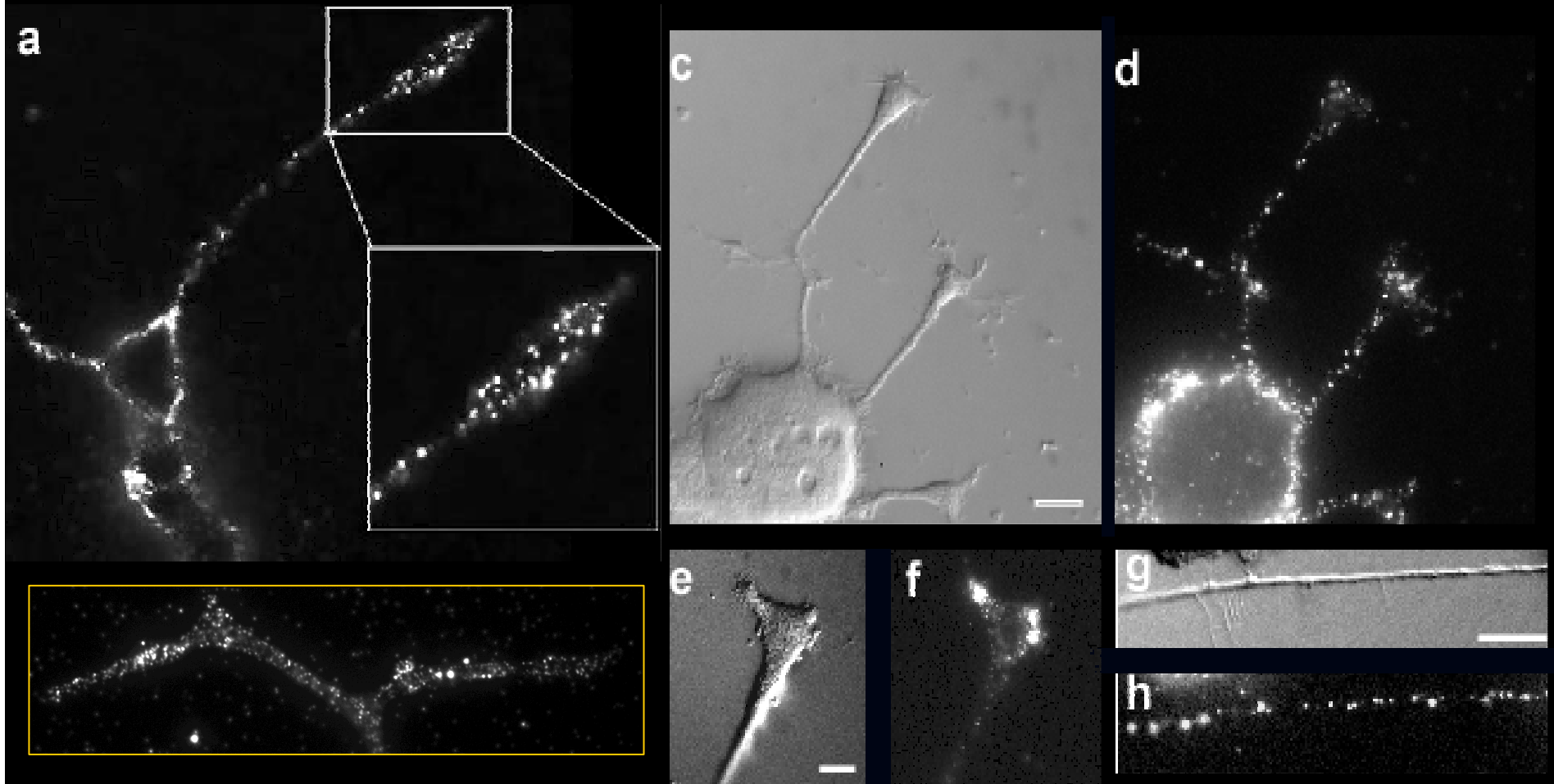
- ❖ p75: NGF, BDNF, NT-3, NT-4
 β -amyloid, pro-NT, PrP, RV

Estrategia general

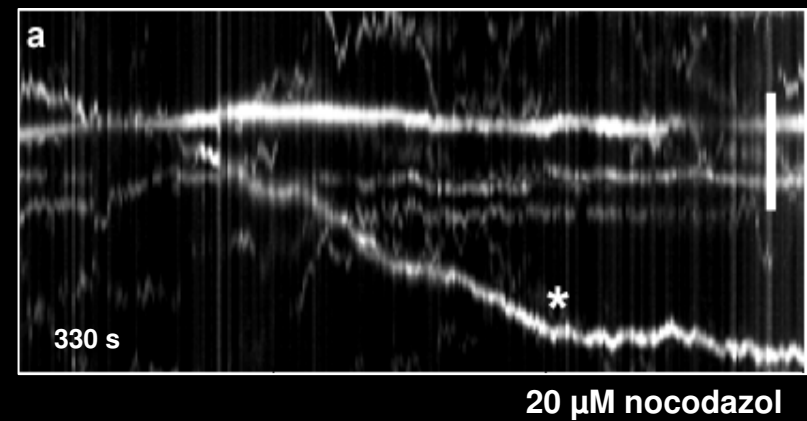
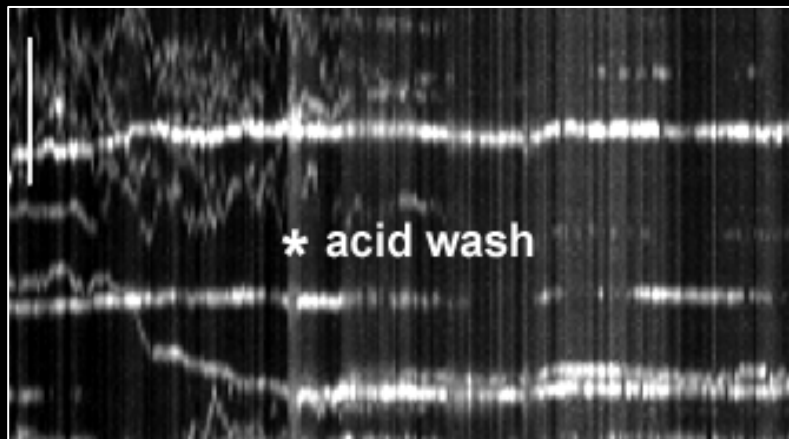
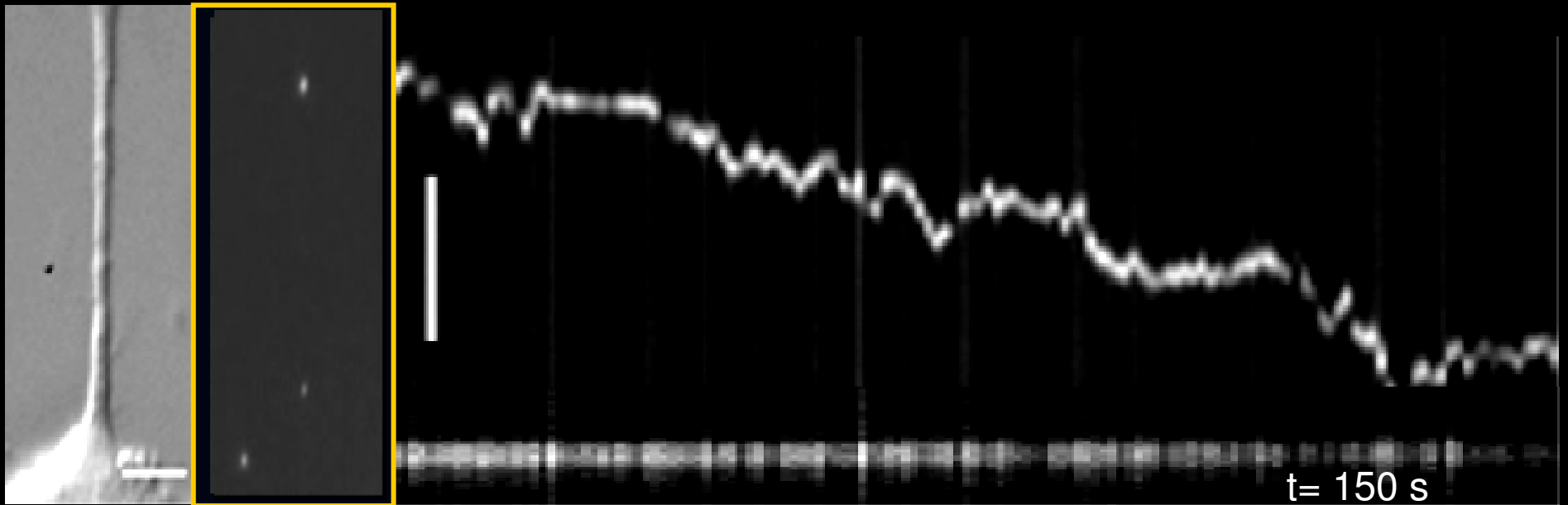
Localización y seguimiento molecular en células vivas usando microscopía de fluorescencia



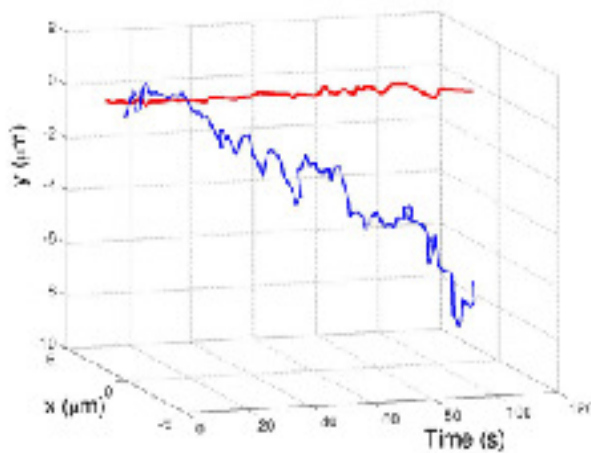
El complejo bNGF-Qdots se une específicamente a células PC12 diferenciadas y se internalizan



Tracking de los complejos bNGF-Qdots

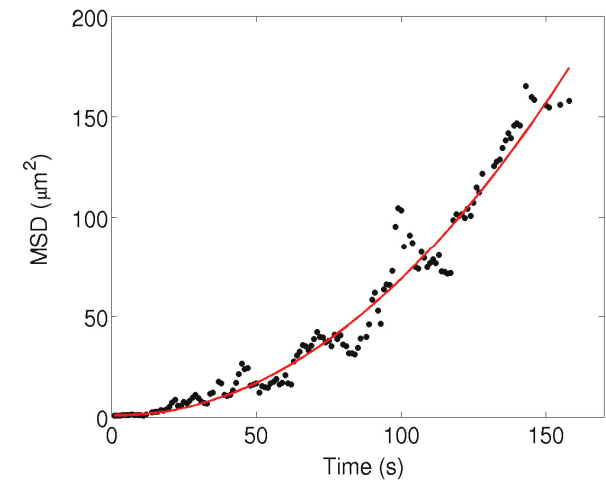
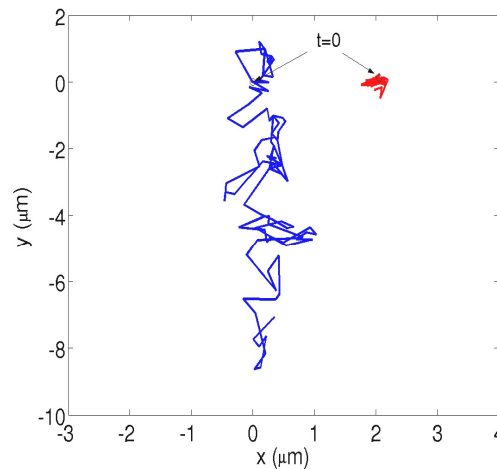


Cinética del transporte de los complejos bNGF-QDs



$$V \sim 0.058 \mu\text{m}/\text{seg}$$

Proceso de transporte facilitado

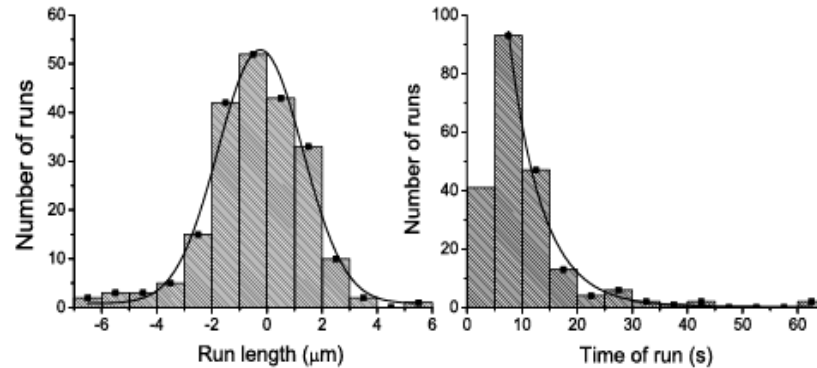
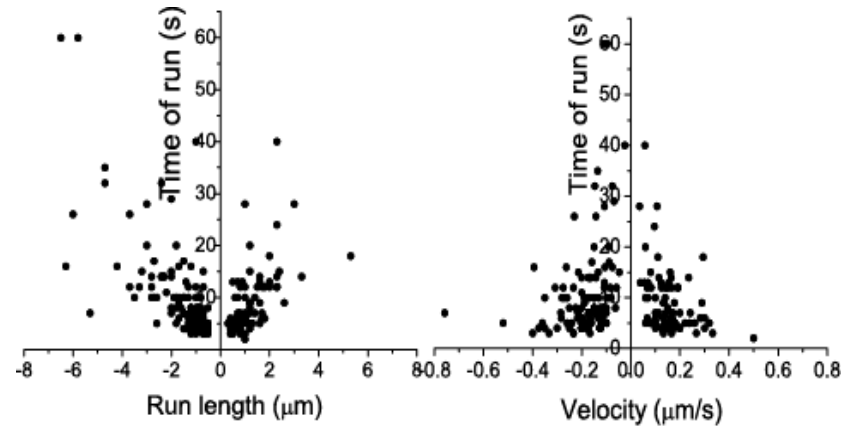


$$V \sim 0.054 \mu\text{m}/\text{seg}$$

$$V \sim 0.060 \mu\text{m}/\text{seg}$$

Cy3-NGF en DRG

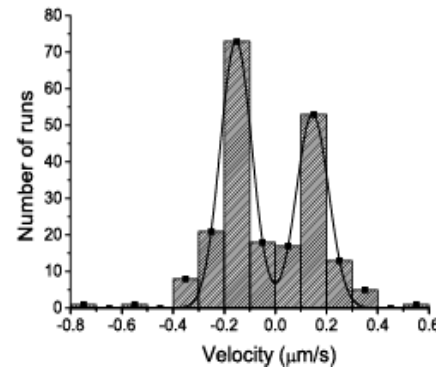
Análisis del movimiento



$$d \sim 1 \mu\text{m}$$

$$d \sim 1.4 \mu\text{m}, \text{ in vitro}$$

$$d \sim 1.3 \mu\text{m}, \text{ in vivo}$$



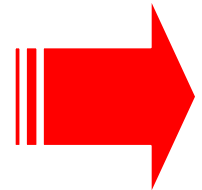
$$V \sim 0.15 \mu\text{m/seg}$$

$$V \sim 0.2-2 \mu\text{m/seg}$$

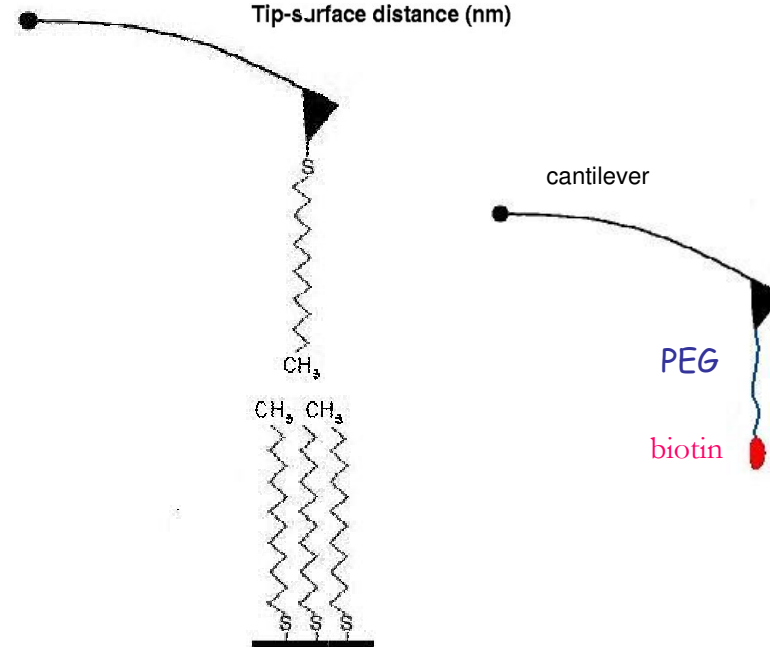
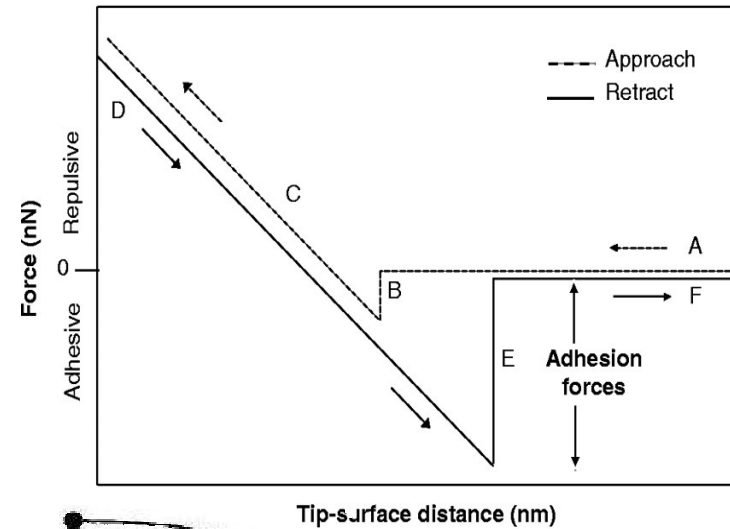
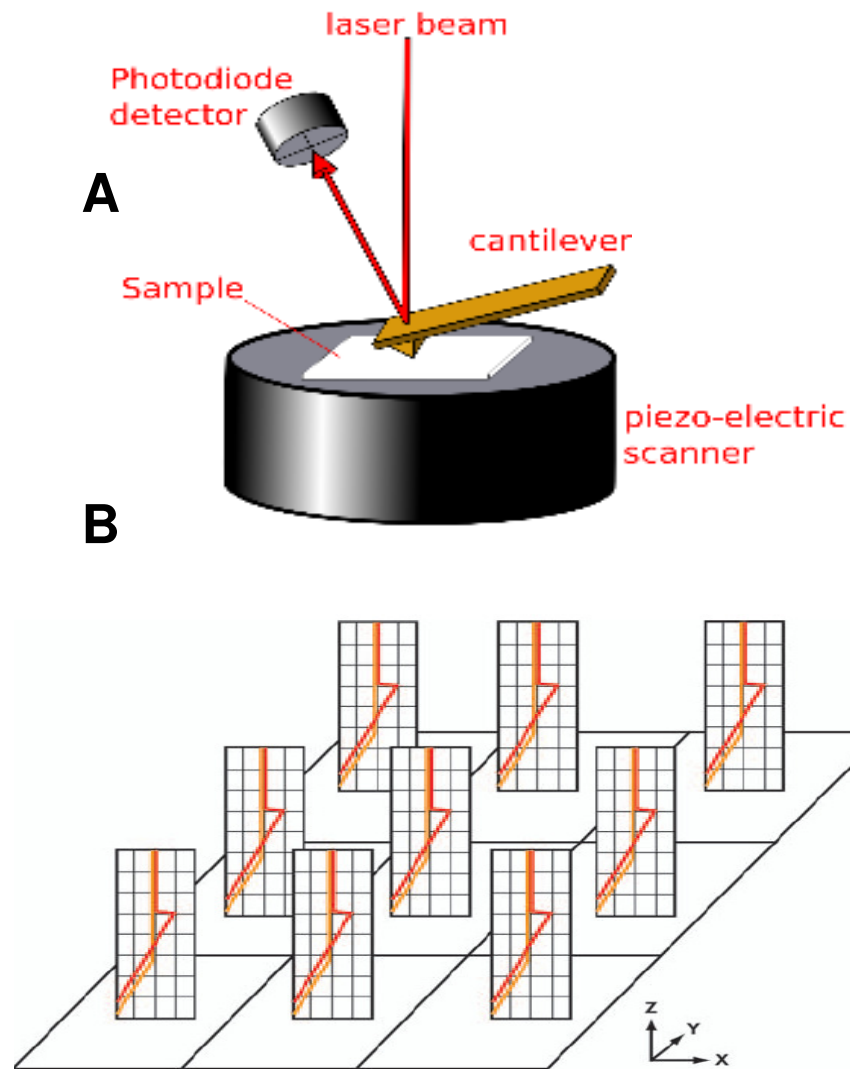
I¹²⁵-NGF

CONCLUSIONES

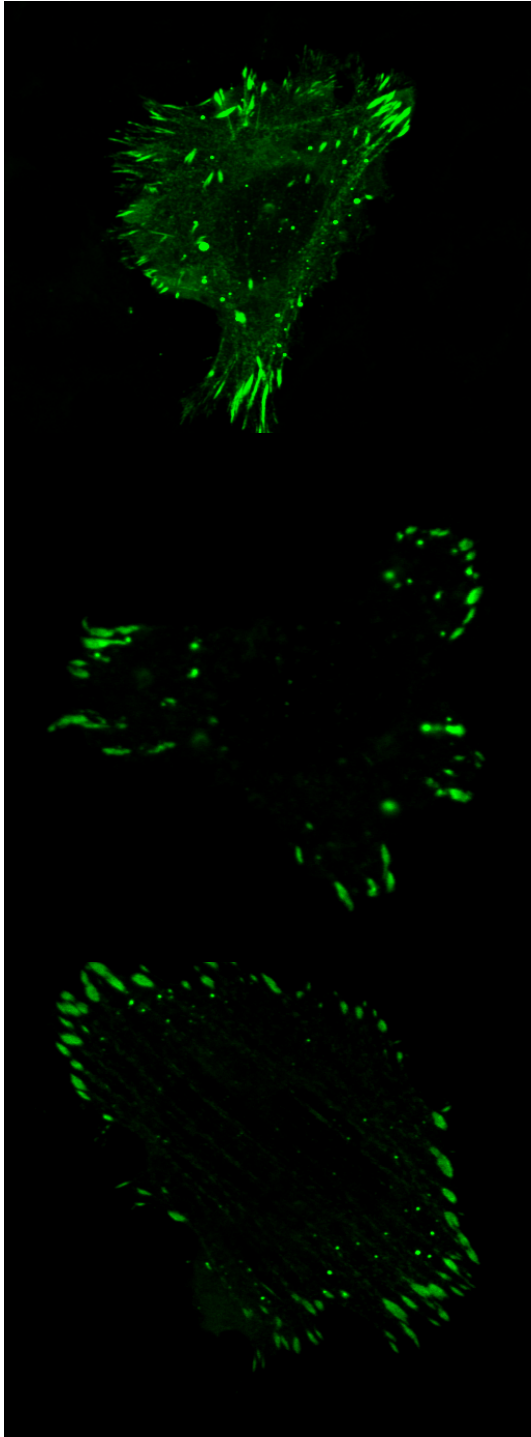
- ❖ QD-bNGF se une específicamente a células PC12 diferenciadas
- ❖ QD-bNGF es internalizado
- ❖ 10 al 30 % de los complejos QD-bNGF se mueven en forma retrógrada
- ❖ Las características del movimiento observado son compatibles con el transporte facilitado a través de microtúbulos mediado por dineína. Es la primera evidencia del carácter bidireccional de dineína *in vivo*.
- ❖ La fotoestabilidad y el tamaño de los QDs permitió, por primera vez, la visualización en tiempo real y el análisis cuantitativo de los complejos individuales QD-bNGF transportados en células vivas.



• Chemical Force Microscopy



Molecular Recognition Microscopy: Detection and localization of single molecular recognition events.



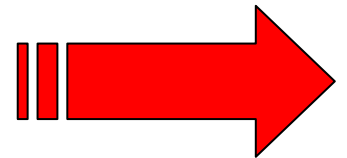
Confocal Microscopy: Expression of fusion proteins EGFP-Zyxin, -Paxillin and -FAK in HC11 cells

FRAP analysis of GFP-tagged FA proteins in living cells

Focal adhesion proteins dynamics analysis

Molecular kinetic parameters for FA proteins measured using FRAP.

The k_{OFF} values obtained for the adhesion proteins studied in HC11 cells indicate that zyxin has a slower unbinding rate compared to paxillin and FAK, which is correlated with a higher residence time of the protein in the FA.





CONCLUSIONS

We have expressed in epithelial mammalian living cells zyxin, paxillin and FAK proteins tagged with green fluorescent protein (GFP) and measured the dissociation kinetics of these proteins inside FAs by fluorescence recovery after photobleaching.

The k_{OFF} values obtained for the adhesion proteins studied in HC11 cells indicate that zyxin has a slower unbinding rate compared to paxillin and FAK, which is correlated with a higher residence time of the protein in the FA. This value is consistent with published results in the literature and could be related to the involvement of this protein in mature FA.

We have established a variant technique of AFM imaging in its contact mode, Chemical Force and Molecular Recognition Microscopy, and used it for the quantitative characterization of molecular forces.

*In order to explore the dynamic regulation of adhesive contacts and of the cytoskeleton architecture of cells, as well as its resultant influence on cellular activities, we will focus on the relationship between local force applied to the cell and the assembly, mechanics and dynamics of focal adhesions. In this context, a novel approach will be employed for real-time, high-resolution imaging and measurements of forces at single adhesion sites. These converge in a **new designed atomic force/multi-photon microscope (AFM/MPM)** with single molecule force spectroscopy.*