



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**Facultad de Ciencias**

**UNIDAD DE APRENDIZAJE.**

**Actividades de Investigación de Maestría IV:** Efecto de la temperatura sobre la anisotropía de fluorescencia de la GFP.

1

Autor: Dr. Jorge Mulia Rodríguez

Coautora: Karla Stephany Beltrán Villegas

Junio de 2016

## GUÍA EXPLICATIVA DE USO GENERAL PARA LA UNIDAD DE APRENDIZAJE DE ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN DE MAESTRÍA IV (Maestría)

2

Trayectoria Académica	4
Unidad de Aprendizaje	5
I. Efecto de la temperatura sobre la anisotropía de fluorescencia de la GFP	7
II. Quantification of MAP kinase protein complexes	8
III. Goal project	9
IV. Mapk-Erk Pathway	10
V. Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCcS)	11
VI. FCCS Advantages and disadvantages	15
VII. Cell culturing and transfection	17
VIII. FCCS measurements of dim cell	20
IX. Correlation analysis	21
X. Triplet state fitting model	23
XI. MEK ERK FCCS data analysis	24



# TRAYECTORIA ACADÉMICA

## MAESTRÍA EN CIENCIAS

Área	Primer periodo lectivo	Segundo periodo lectivo	Tercer periodo lectivo	Cuarto periodo lectivo
Investigación	Seminario interdisciplinario I HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario interdisciplinario II HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario interdisciplinario III HT: 0 HP: 2 Créditos: 2	Seminario interdisciplinario IV HT: 0 HP: 2 Créditos: 2
	Actividades de investigación de Maestría I HT: 1 HP: 4 Créditos: 6	Actividades de investigación de Maestría II HT: 1 HP: 4 Créditos: 6	Actividades de investigación de Maestría III HT: 1 HP: 4 Créditos: 6	Actividades de investigación de Maestría IV HT: 1 HP: 4 Créditos: 6
Básica	Básica A HT: 3 HP: 2 Créditos: 8			
	Básica B HT: 3 HP: 2 Créditos: 8			
Complementaria		Curso en Ciencias A HT: 3 HP: 2 Créditos: 8	Curso en Ciencias C HT: 3 HP: 2 Créditos: 8	
		Curso en Ciencias B HT: 3 HP: 2 Créditos: 8	Curso en Ciencias D HT: 3 HP: 2 Créditos: 8	

Unidad de Aprendizaje:		Actividades de Investigación de Maestría IV		
Periodo lectivo	Horas totales	Horas Teóricas	Horas Prácticas	Créditos
Cuarto	5	1	4	6
<b>Unidades de Aprendizaje Antecedentes</b>		<b>Unidades de Aprendizaje Consecuentes</b>		
Actividades de Investigación de Maestría IV		Ninguna		
<b>Fecha de elaboración:</b> Mayo 2014		<b>Elaboró:</b> Comité curricular y colaboradores		
<b>Objetivo general:</b> Desarrollar un proyecto de investigación, presentar avances periódicos del mismo (de manera oral y escrita) incluyendo la presentación en el Coloquio de maestrantes con la presencia de su Comité de Tutores.				
<b>Contenido temático:</b> Exposiciones individuales del protocolo y avances en investigación por parte del estudiante de acuerdo a las actividades establecidas en su protocolo de proyecto de tesis de investigación. Asesoría personalizada sobre temas relacionados con su protocolo de proyecto de tesis de investigación. Exposiciones de metodologías de: investigación, revisión y escritura de artículos científicos de acuerdo al avance y resultados obtenidos del trabajo de tesis de investigación de posgrado.				
<b>Actividades de aprendizaje:</b> Realizar actividades conforme al cronograma del protocolo de investigación, incluyendo desarrollar investigación (teórica y/o experimental), revisiones hemerobibliográficas, así como la escritura de un artículo científico y la tesis. Realizar actividades complementarias que cubran las recomendaciones derivadas de la presentación y evaluación del Coloquio semestral de maestrantes. <b>Las Actividades de Investigación de Maestría se guiarán por estos contenidos generales: el/los tutor(es) académico(s) darán seguimiento y evaluarán los avances de los alumnos conforme al protocolo de investigación aprobado por la Comisión Académica.</b> <b>En Actividades de investigación de Maestría IV los estudiantes inscritos en el plan de estudios de maestría deberán entregar su solicitud de revisión de tesis.</b> Es importante mencionar que para el caso de los alumnos de doctorado en plan de estudios con antecedentes de licenciatura estos seminarios se utilizarán para las primeras etapas de investigación, cambiando a una carga mayor a partir de las siguientes Actividades de Investigación.				
<b>Procedimiento de evaluación:</b> El 70% de la calificación corresponde al cumplimiento del avance semestral programado. El 20% restante corresponde a la entrega y presentación en tiempo y forma del informe semestral correspondiente. El 10% corresponde a la calificación obtenida en el Coloquio Semestral de maestrantes por parte de su Comité de Tutores.				
<b>Bibliografía</b>				

Revistas y textos especializados acorde con las LGAC del Posgrado y el protocolo de investigación de cada alumno.

Artículos especializados seleccionados por el titular de la Unidad de Aprendizaje.

Bases de datos.

# **I. Efecto de la temperatura sobre la anisotropía de fluorescencia de la GFP.**



UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM



## II. Quantification of MAP kinase protein complexes

8

Supervisor:

Dr. Ir. Mark Hink

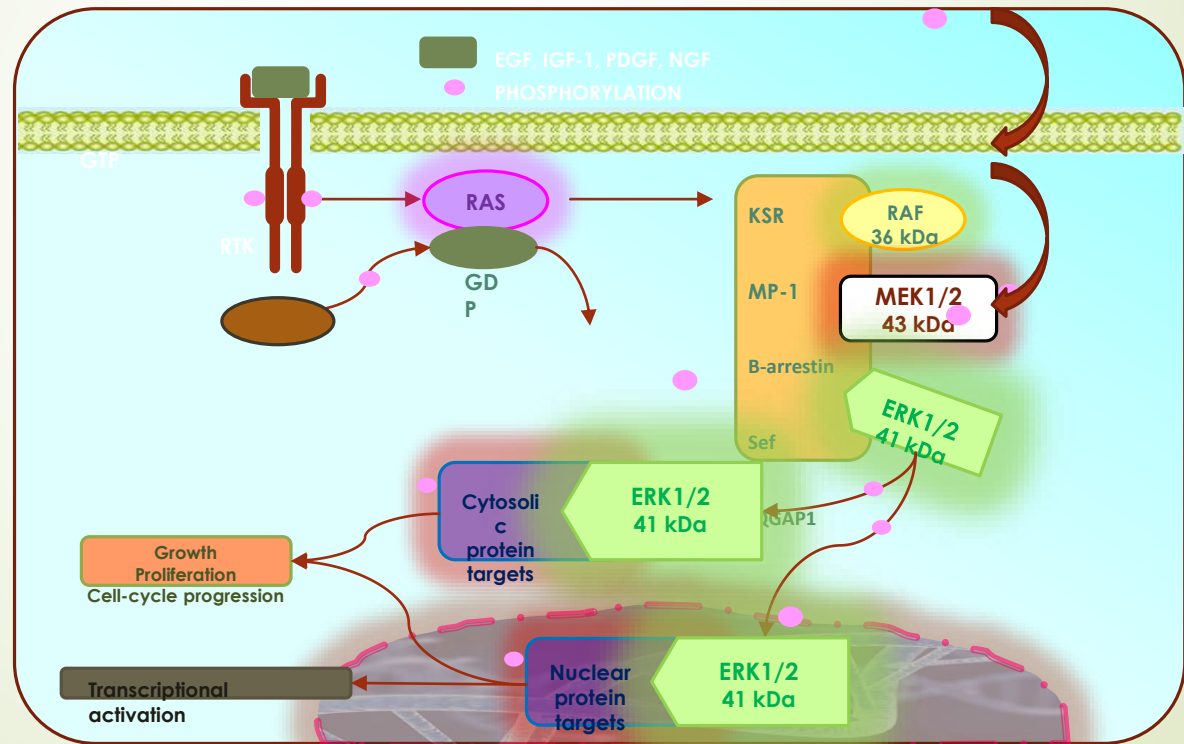


### III. Goal project

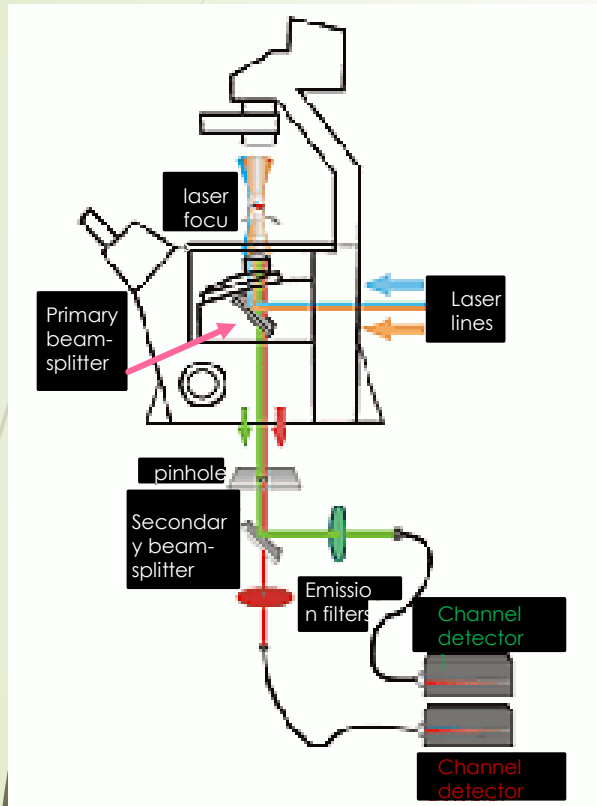
**Quantify the molecular interactions between mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway proteins MAPK/ERK kinase (MEK1/2) and extracellular signal-regulated kinase (ERK2)**

**In order to estimate concentrations and dissociation constant ( $K_D$ ) values in living cells we used fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS).**

# IV. MAPK – ERK PATHWAY



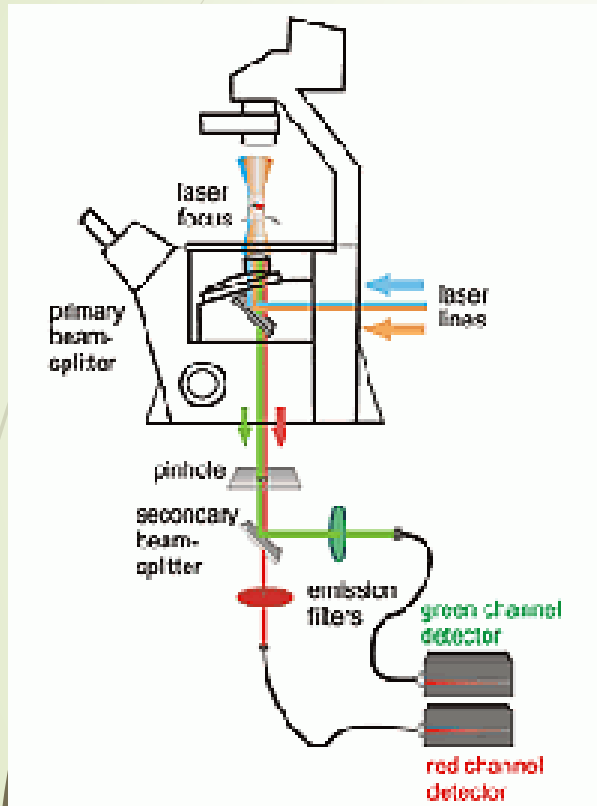
# V. Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCcS)



Bacia, et al., Nat. Methods 2006

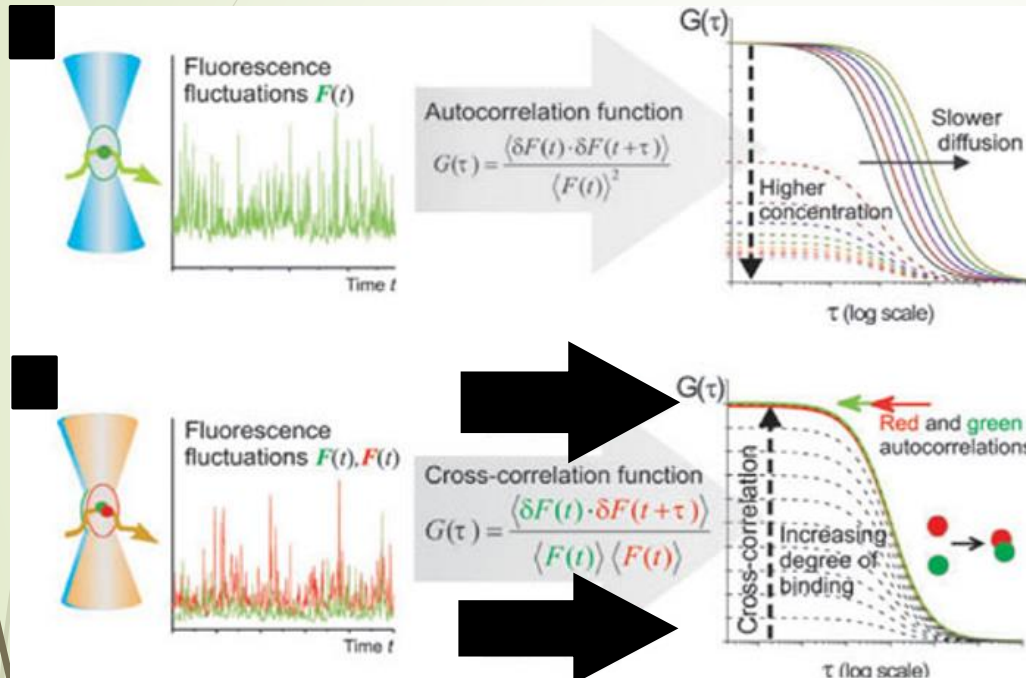
- Confocal microscopy
- Two spectrally different fluorophores
- Pinhole delimits detection volume

## V. Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCcS).



- Fluorescence intensity recorded by avalanche photo diodes (APDs)
- Detection volume  $\sim 1$  fl
- Autocorrelation curves + cross-correlation curve

Diffusional mobility of the particles  
Amplitude inversely related to the concentration:



Bacia, et al., Nat. Methods 2006

$$G(0) = \frac{1}{N}$$

$$G_x(0) = \frac{N_{\text{complex}}}{N_{\text{red}T} \cdot N_{\text{green}T}}$$

G(0): amplitude  
N: particle number

$$K_D = \frac{[free R][free G]}{[RG]}$$

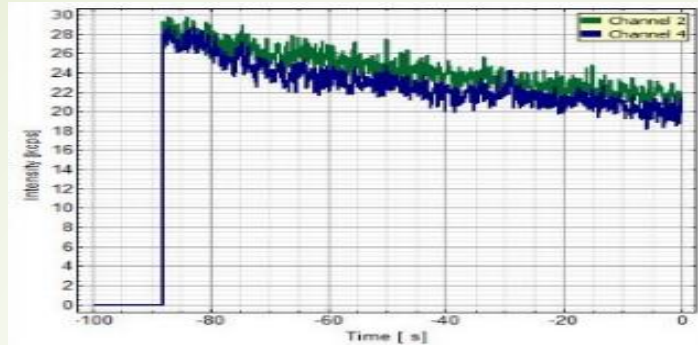
$K_D$ : dissociation constant (nM)  
[free R], [free G] and [RG]:  
concentrations of unbound R  
and G and protein  
complexes respectively.

# VI. FCCS Advantages and disadvantages



- Allows the measurement of protein mobility, protein concentrations, PPI
- High spatial resolution
- High temporal resolution
- Specificity
- Close to physiological conditions
- Quantitative
  - Receptor – ligand interactions
  - Diffusion times
  - Concentrations
  - Aggregation states
  - Photo physical characteristics

- Photobleaching.



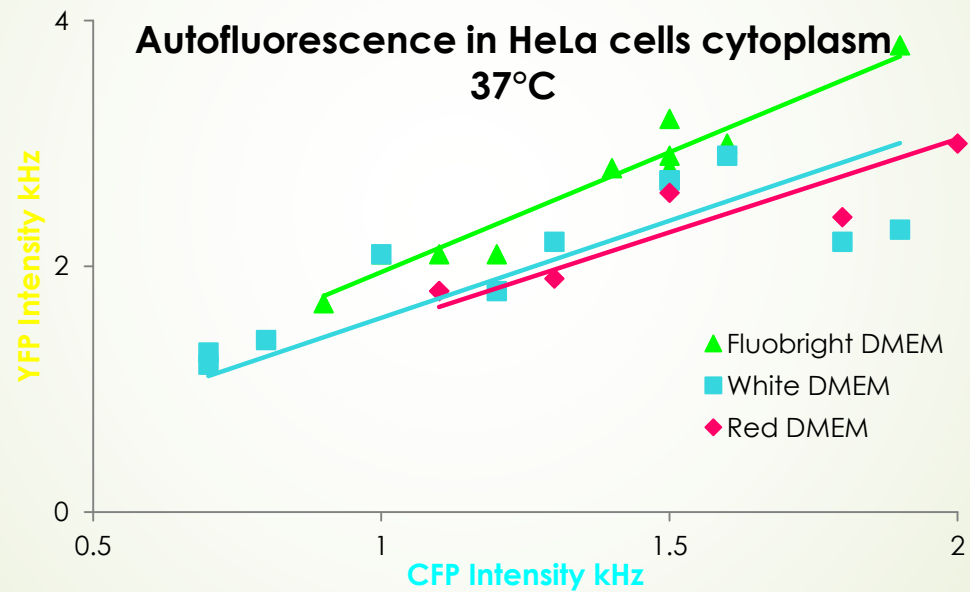
- Its accuracy is influenced by the size and overlapping of emission volumes, photophysics of the fluorescent labels and the presence of endogenous proteins.



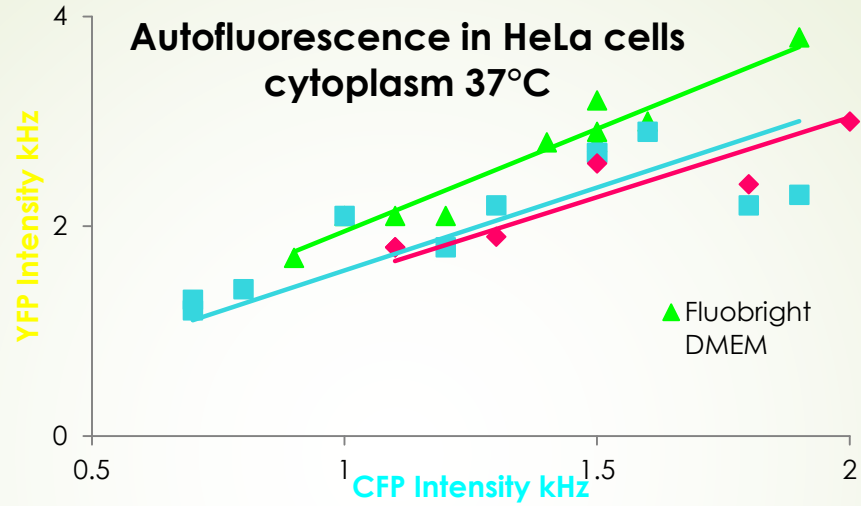
- Only single spot can be taken at a time



# VII. CELL CULTURING AND TRANSFECTION



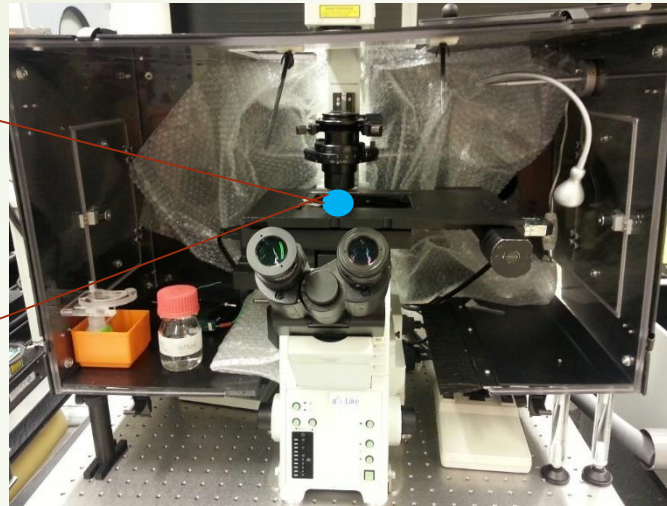
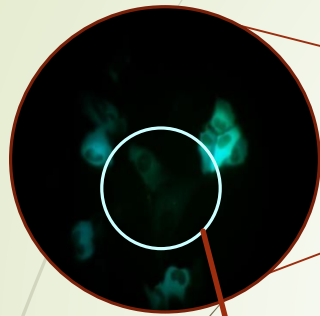
- Cells grown in white Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
  - 10 % Fetal bovine serum
  - 1x Penicillin/Streptomycin
  - 1x Glutamine
- 70 – 90 % confluence
- Transfected with Lipofectamine 3000



Constructs	mTq2-MEK1	mTq2-MEK2	sYFP2-MEK1	sYFP2-MEK2
mTq2-ERK2			MEK <sub>1</sub> → ERK <sub>2</sub>	MEK <sub>2</sub> → ERK <sub>2</sub>
sYFP2-ERK2	MEK <sub>1</sub> ← ERK <sub>2</sub>	MEK <sub>2</sub> ← ERK <sub>2</sub>		

# VIII. FCCS measurements of dim cells

20



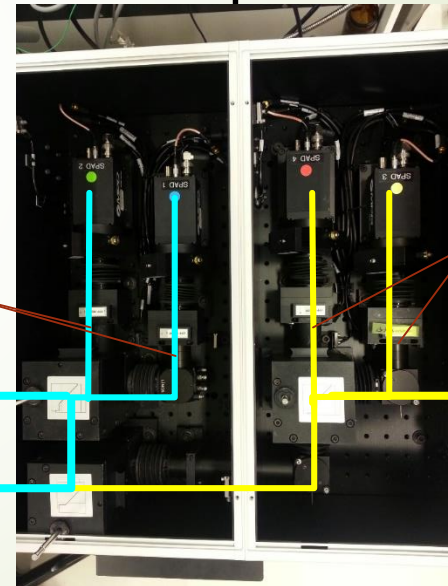
Warmed it up @ 37°C



EF  
480df40

50/5  
0

510  
DM



EF  
537df25

50/50

Detector  
unity

# IX. Correlation analysis

21



Autocorrelation curves:

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Where:

**G(0)**: amplitude at t=0

**F(t)**: average fluorescence intensity

**δF(t)**: variation of the average intensity at any given point

**δF(t+τ)**: intensity of a later time point



$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Where:

**G(0)**: amplitude at t=0

**F(t)**: average  
fluorescence intensity

**$\delta F(t)$** : variation of the  
average intensity at  
any given point

**$\delta F(t+\tau)$** : intensity of a  
later time point

## X. Triplet state fitting model:

$$G_0(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left( \frac{1-T+Te^{-\tau/\tau T}}{1-T} \right) \cdot \frac{1}{\left(1+\frac{\tau}{\tau_{diff}}\right) \cdot \sqrt{1+\frac{\tau}{k^2-\tau_{diff}}}} + G_\infty$$

$G_0(\tau)$ :

T: fraction of dark state molecules

$\tau$  T: relaxation state

$\tau_{diff}$ : diffusion time

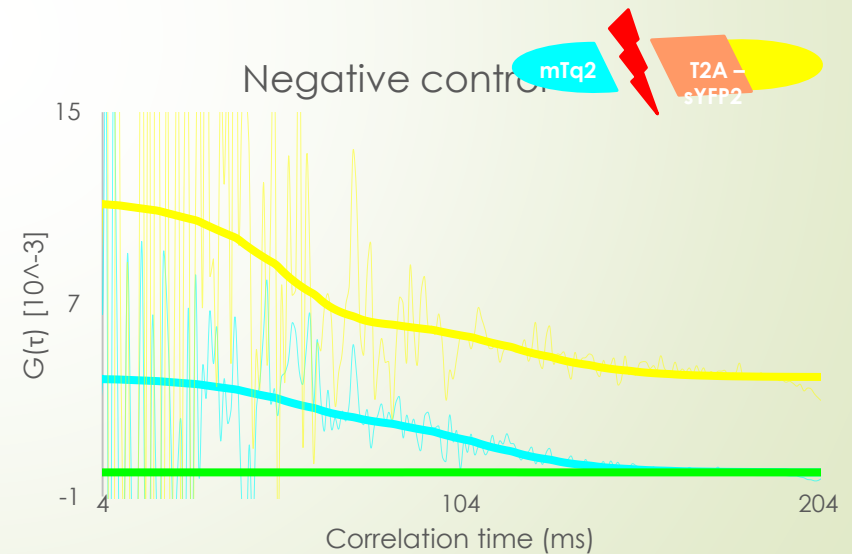
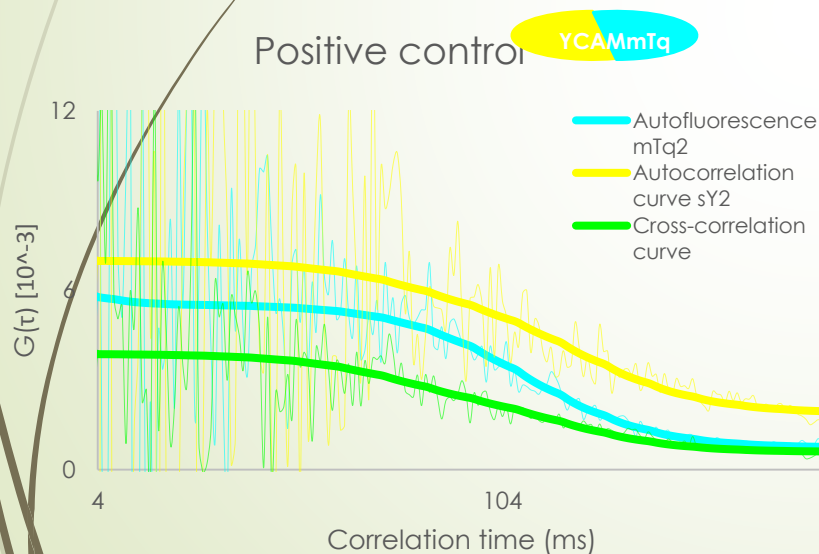
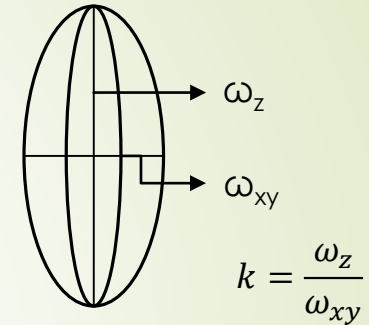
k: structural parameter

$G_\infty$ : offset

# XI. MEK ERK FCCS data analysis



					Calculated Parameters from fit			
440	mTq2	4.9	200	100	1371	282	0.69	0.6
514	sY2	4.9	220	100	1450	296	0.80	0.7
X-corr	YCAMTq	4.5	300	100	1558	346	1.17	1





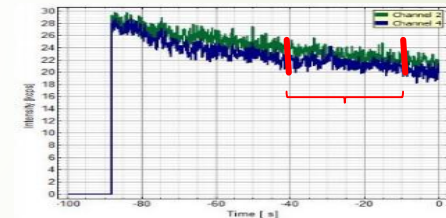
## XII. Corrected data

- Background (autofluorescence)  $N_{bg} = N_{analysis} \cdot \left(1 - \frac{I_{autofluorescence}}{I_{sample}}\right)^2$

- Maturation: for mTq2 and sYFP2, fast maturation  $N_{mat} = N_{bg} \cdot 1$

- Bleaching  $N_{bleach} = N_{mat} \cdot \frac{I_{start}}{I_{analysis}}$

- Volume  $N_V = \frac{N_{bleach}}{V}$



$$N_{VO} = \frac{N_{Vx}}{V_O}$$



- Volume overlapping:  
 $V_O$  from positive control
- Concentration  $[Protein] = \frac{N_{VO}}{N_{Avogadro}}$
- $K_D$ : three different fitting methods were used

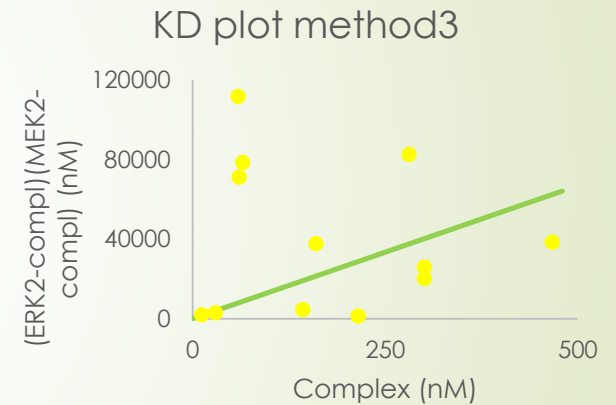
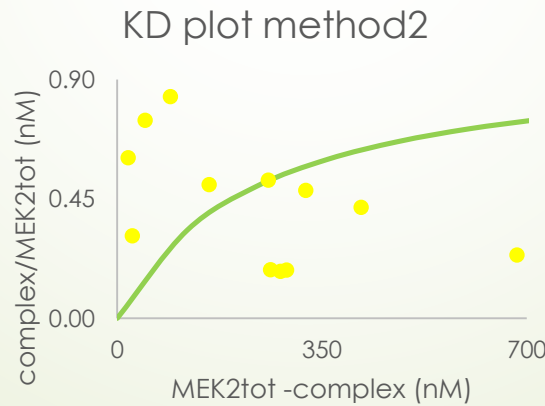
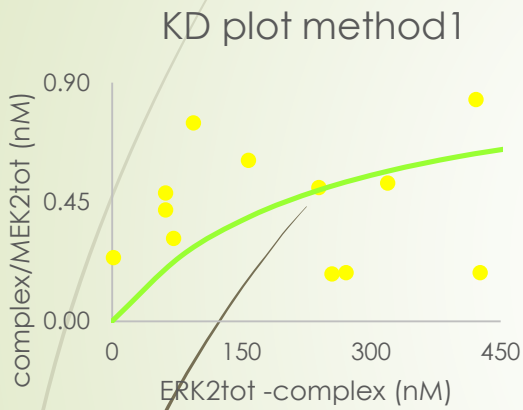
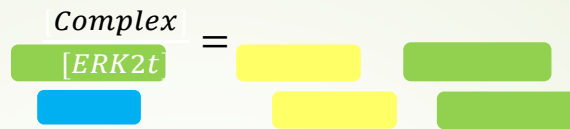
# XIII. Comparison for in vivo $K_d$ fitting methods

27

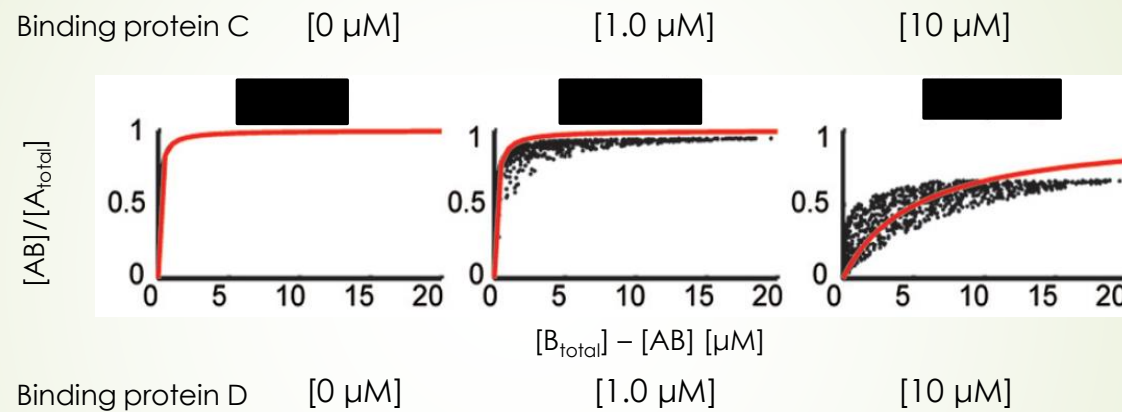


$$\frac{[Complex]}{[MEK2t]} = \frac{[ERK2t] - [Complex]}{K_d + [ERK2t] - [Complex]}$$

$$\frac{[MEK2t] - [Complex]}{K_d + [MEK2t] - [Complex]}$$



# Comparison for in vivo $K_D$ fitting methods



$$K_D = \frac{[\text{ERK2t} - \text{Complex}][\text{MEK2t} - \text{Complex}]}{[\text{Complex}]}$$

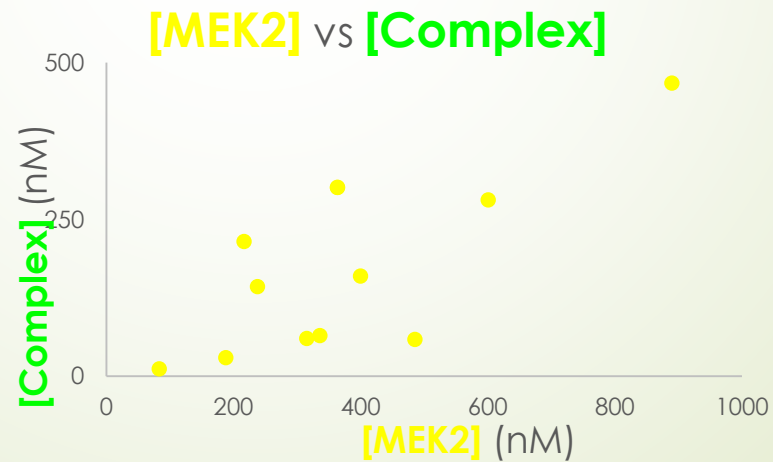
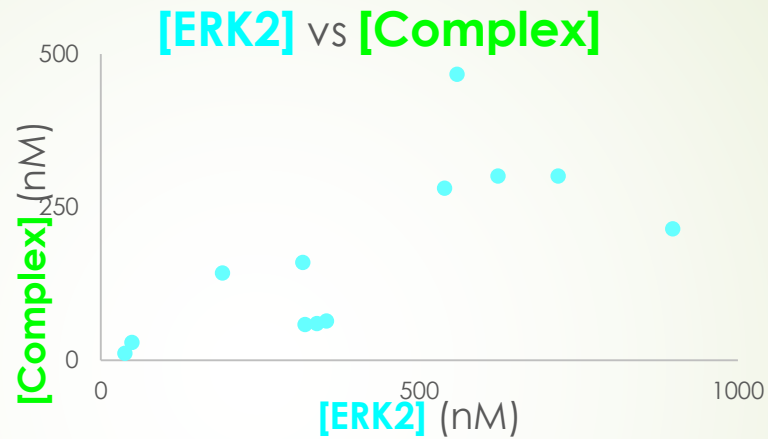
## XIV. RESULTS

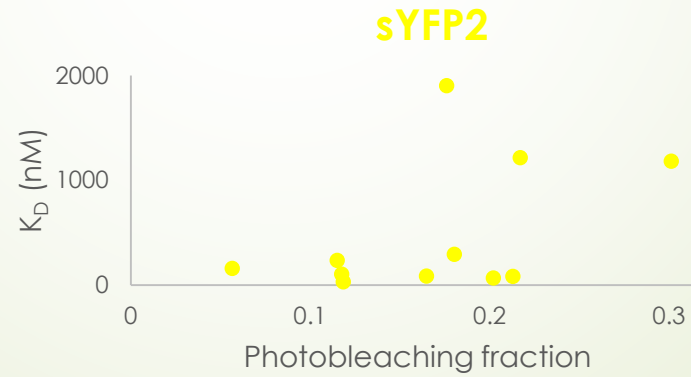
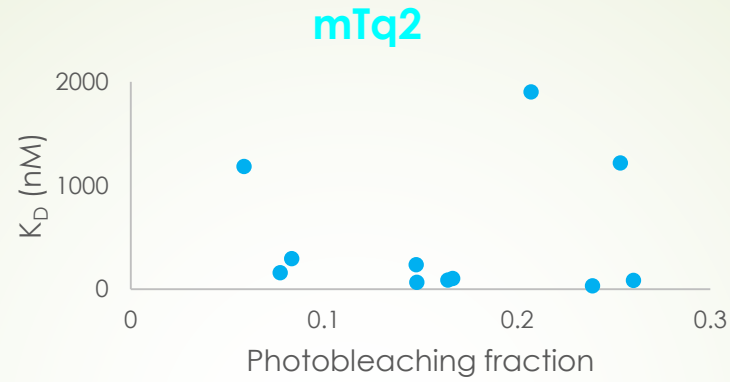


Sample	$K_{D1}(\mu\text{M})$	$K_{D2}(\mu\text{M})$	$K_{D3}(\mu\text{M})$	95% CI	n
ERK2 MEK1	2.1	2.0	1.7	$\pm 0.94$	13
ERK2	0.16	0.17	0.24	$\pm 0.12$	12
MEK1	0.25	0.24	0.13	$\pm 0.34$	12
MEK2	2.1	2.5	2.0	$\pm 1.6$	6

Protein	$K_D (\mu\text{M})$	Cell line	Reference
ERK2-MEK1	11	HeLa	Sadaie <i>et al.</i> , 2014
	0.36	MEF	Hink <i>et al.</i>
	1.7, 0.24	U2OS	This study
ERK2-MEK2	5.6	HeLa	Sadaie <i>et al.</i> , 2014
	2.0, 0.13	U2OS	This study

# XV. CONCENTRATION Dependency of COMPLEX and $K_D$ dependency of photobleaching





# XVI. Conclusions and prospects



- We obtained  $K_D$  values using FCCS in order to estimate the binding affinity of MEK isoforms to ERK2 in living cells.
- The discrepancies between  $K_D$  values for the same combinations are not dependent on the photobleaching of the sample or the concentration of MEK1/2 or ERK.
- The differences in the comparison data could be due to the cell line that we used for this study.
- Acceptance of the article “Using green fluorescent protein to correlate temperature and fluorescence intensity into bacterial systems”
- FCCS technique in combination with SPIM allows the measurements of many spots in parallel within the entire cell.
- The use of single SW-FCCS will overcome the corrections in volumes



## XVII. bibliography

- [1] Shimomura, O. (2006). Bioluminescence: Chemical principles and methods.
- [2] Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102(3): 759-781.
- [3] Shimomura, O. (1979). Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters.* 104(2): 220-222. doi:10.1016/0014-5793(79)80818-2
- [4] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Pendergast, F. G. & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-H](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-H)
- [5] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science.* 263(5148): 802-805. <http://dx.doi.org/10.1126/science.8303295>
- [6] Shimomura, O. (2008). Nobel lecture. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/shimomura\\_lecture.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/shimomura_lecture.pdf)
- [7] Baker, M. (2011). Microscopy: Bright light, better labels. Technology feature. *Nature.* 478: 137-142. <http://dx.doi.org/10.1038/478137a>