

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Estudio de la homodimerización del dominio PH de la quinasa PDK1 por espectroscopía por correlación de la emisión fluorescente (FCS)

Autor/a:
Sandra García Rey
Director/a:
Jose Requejo Isidro

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Motivación y objetivos.....	1
1.2. Proteína PDK1.....	2
1.3. Fluorescencia.....	2
1.4. FCS.....	3
1.5. FCCS.....	5
2. METODOLOGÍA	6
2.1. Uso de FCS.....	6
2.2. Diseño del experimento.....	6
2.3. Experimentos.....	7
3. RESULTADOS	8
3.1. Calibración del volumen.....	8
3.2. Régimen de potencias y efectos fotofísicos.....	9
3.3. Comparación de GFP y GFP-PH.....	9
3.4. Controles.....	10
3.4.1. Control positivo: Cherry-L-GFP.....	10
3.4.2. Control negativo: GFP + RFP-PH.....	10
3.5. Interacción GFP-PH + RFP-PH.....	11
3.6. Incertidumbre en las medidas.....	12
4. DISCUSIÓN	12
5. CONCLUSIONES	13
6. BIBLIOGRAFÍA	14

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1) es la segunda proteína de la vía de señalización PI3K (phosphoinositide-3-kinase) y se encuentra desregulada en un porcentaje muy elevado de cánceres (Bayascas, 2010). El objetivo de este trabajo es comprobar la homodimerización del dominio PH de la PDK1 *in vitro*. Se ha podido observar *in situ* mediante FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) en células eucariotas humanas que se produce una interacción del 30% entre los dominios PH (Pleckstrin Homology) de la proteína PDK1 (PDK1_{PH}) en la membrana celular (Figura 1).

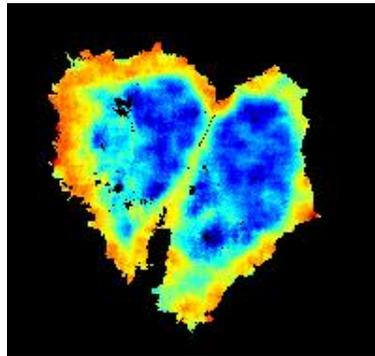


Figura 1. Experimento de FRET realizado en células eucariotas humanas de cáncer de mama SKRB-3 en el que se ha estudiado la homodimerización del dominio PH de la quinasa PDK1. El rojo indica FRET máximo mientras que el azul indica FRET mínimo, por lo que observamos interacción de PDK1_{PH} en membrana.

Conocemos la estructura de la PDK1 y del dominio PH por separado (Requejo-Isidro et al. 2014), por lo que se puede intentar comprender la regulación de PDK1 por homodimerización de dichos dominios. Sabemos que el dominio PH tiene afinidad específica por PtdIns(3,4,5)P₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) y PtdSer (phosphatidylserine) (Lemmon, 2008). Esperamos que se produzca una interacción molecular entre dichos dominios aunque la interacción observada también puede deberse a la proximidad entre ellos, ya que tras la estimulación se genera PtdIns(3,4,5)P₃ en una concentración localmente elevada y atrae a PDK1_{PH}.

Con el objetivo de comprobar la interacción PDK1_{PH}- PDK1_{PH}, se va a estimar su K_d. Para ello utilizamos una técnica basada en fluorescencia conocida como espectroscopía de correlación por fluorescencia (FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy) y su derivada la espectroscopía de correlación cruzada por fluorescencia (FCCS, Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy) que nos va a permitir determinar si, entre los dominios PH de la PDK1, se produce una interacción molecular o si la interacción que se ha observado por FRET se debe únicamente a la proximidad de los mismos. Este trabajo se enmarca en una investigación más amplia sobre el cáncer y las dianas moleculares que se pueden usar para hacerle frente.

1.2. PROTEÍNA PDK1

La PDK1 es un enzima perteneciente a la familia AGC de proteínas quinasas. Este tipo de proteínas son enzimas reguladores importantes que modifican las propiedades de diversos sustratos actuando sobre sus grupos fosfato de los aminoácidos Ser, Thr o Tyr (Komander y Alessi, 2010).

Debido a la gran variedad de procesos celulares que controlan estas quinasas, es inevitable que su desregulación tenga serias consecuencias, como es el cáncer. Diversas mutaciones en oncogenes o supresores de tumores conllevan la sobreactivación de la ruta PI3K y/o ERK (extracellular signal-regulated kinase), estimulando por tanto la activación de quinasas como la PKB (protein kinase B) o S6K (S6 kinase), entre otras. Estas, a su vez, promueven la tumorigénesis fosforilando sustratos involucrados en rutas apoptóticas y en el ciclo celular o factores de transcripción FOXO, que previenen la transcripción de genes que inhiben la apoptosis así como genes que inducen la detención del ciclo celular (Komander y Alessi 2010).

La PDK1 fosforila residuos de Ser/Thr en el segmento de activación de 23 quinasas AGC (Komander y Alessi 2010). Es una proteína activa constitutivamente que se encuentra repartida por toda la célula. La localización genética del gen que la codifica es 16p13.3 y produce una proteína citosólica de 556 aminoácidos constituida por un dominio N-terminal con actividad Ser/Thr kinasa y un dominio PH C-terminal que interacciona de forma específica con $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ (phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate) y PtdSer en la membrana. La activación de PDK1 se produce mediante la fosforilación de dos residuos localizados en el T-loop o loop de activación en el dominio catalítico y en el motivo hidrofóbico en el extremo C-terminal del dominio quinasa, respectivamente. Es necesario que se produzca la fosforilación de ambos motivos para que la actividad catalítica sea máxima (Bayascas, 2010).

Los dominios PH interaccionan con $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ y $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ presentes en la membrana celular. Los dominios PH que, tras la estimulación de la PDK1, no pueden unirse a estas moléculas, se localizan en el citosol mayormente; pero sufren una relocalización a la membrana plasmática tras la activación dependiente de señal de la PI3K (Lemmon, 2008).

1.3. FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso fotofísico que se produce entre diferentes niveles moleculares de energía. Consiste en la emisión de un fotón tras la relajación de las moléculas desde un estado elevado de energía hasta uno de menor energía. La emisión fluorescente se caracteriza por tener menos energía que la longitud de onda con la que se ha excitado la molécula, por lo que la emisión es de una longitud de onda mayor (Jameson, Croney y Moens, 2003).

En la Figura 2 se muestran los espectros de emisión y absorción de los fluoróforos utilizados en este trabajo.

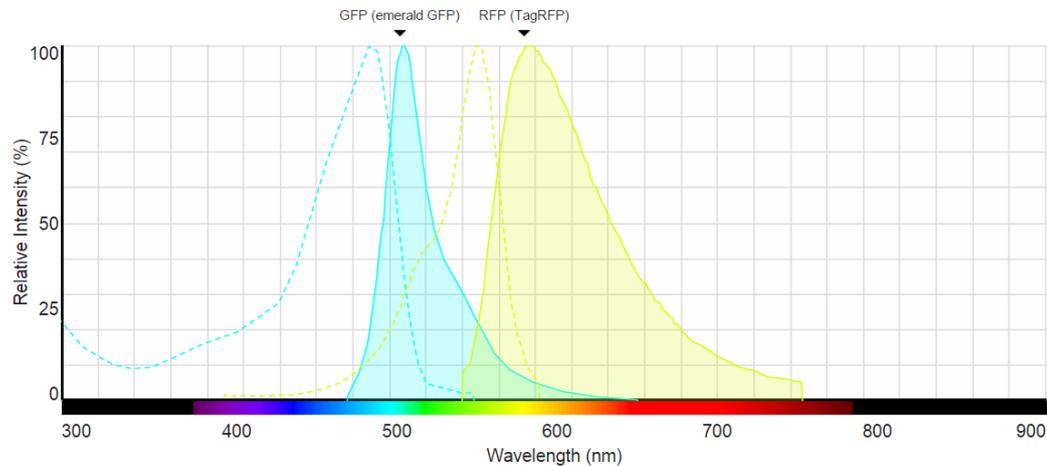


Figura 2. Espectros de emisión y excitación de los fluoróforos GFP y RFP. La línea discontinua hace referencia al espectro de emisión mientras que la raya continua lo hace al de excitación. Se puede observar que la longitud de onda de emisión de cada fluoróforo es mayor que la de excitación, lo cual es indicativo de una menor energía.

1.4. FCS

Para determinar si los dominios PH interactúan estudiaremos su difusión. Hay que tener en cuenta que la difusión de las partículas varía en función de su radio hidrodinámico (r), viscosidad del medio (η) y temperatura (T) según la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

FCS es una técnica experimental con sensibilidad de molécula única con la que se estudian fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en un volumen de detección determinado. La señal de fluorescencia varía debido a cambios en el número o intensidad de los fluoróforos en el volumen de detección y por el movimiento de las partículas dentro del volumen focal además de procesos fotofísicos. Esta técnica se puede usar para medir coeficientes de difusión, concentración de fluoróforos, tamaño de partículas, reacciones químicas, cambios conformacionales y procesos de unión. Todo esto hace que FCS sea una técnica apropiada para estudiar procesos dinámicos.

FCS se basa en el análisis de correlación temporal de la intensidad de fluorescencia detectada en el volumen focal, herramienta matemática que permite comparar la señal obtenida y medida en diferentes tiempos. A partir de la fluorescencia detectada, se puede inferir la curva de correlación ($G(\tau)$) (Ries y Schwille, 2008):

$$G(\tau) = \frac{[\delta F(t)\delta F(t + \tau)]}{[F(t)]^2} \quad (2)$$

donde $F(t)$ es la intensidad de la fluorescencia $\delta F(t) = F(t) - [F(t)]$, τ es el tiempo en el que se calcula la correlación. Posteriormente, dicha curva se ajusta a un modelo matemático que tenga en cuenta las características del sistema, como la forma y tamaño del volumen de detección, el brillo de las moléculas del fluoróforo y su concentración en función de la posición y tiempo (García-Sáez y Schwille, 2008). En este caso, se ha usado un modelo 3D de difusión browniana:

$$G_{3D}(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \omega_0^2 \cdot \tau/\tau_0}} \quad (3)$$

La amplitud de la curva de correlación viene dada por $G(0)$, un parámetro que proporciona información acerca de la concentración e intensidad de brillo las moléculas de fluoróforos del sistema. Tal y como se muestra en la Ecuación (4), $G(0)$ es inversamente proporcional al número de moléculas del volumen de detección (N) y, sabiendo el volumen de la región de observación (V_{eff}), se puede medir la concentración (C) de la muestra (Elson, 2011). Un aumento en la cantidad de moléculas conlleva un aumento de la fluorescencia, lo cual se ve reflejado en un $G(0)$ menor (Haustein y Schwille, 2004).

$$G(0) = \frac{1}{N} = \frac{1}{V_{eff} \cdot C} \quad (4)$$

Se utiliza la microscopia confocal (Figura 3) para realizar los experimentos de FCS. La radiación de excitación proveniente de un láser incide directamente sobre la muestra tras atravesar un espejo dicróico. Tras ser excitadas, los fotones emitidos por las moléculas de la muestra son recogidos por el mismo objetivo y, a través del espejo dicróico y diversos filtros que delimitan la longitud de onda que se va a recoger, llegan al detector, que tienen sensibilidad para registrar fotones individuales. Todo el proceso se controla desde un ordenador. Una de las características de este tipo de microscopios es la presencia del pinhole, que bloquea toda radiación fluorescente que no proviene de la muestra y que es, por tanto, ruido (Petrov y Schwille, 2008).

En FCS el número de moléculas que pasan por el volumen focal tiene que ser lo suficientemente pequeño como para que cada una de ellas contribuya de forma substancial a la señal medida. Es importante destacar que el volumen de detección es de fL, lo cual hace que las concentraciones óptimas de muestra sean del orden de nM.

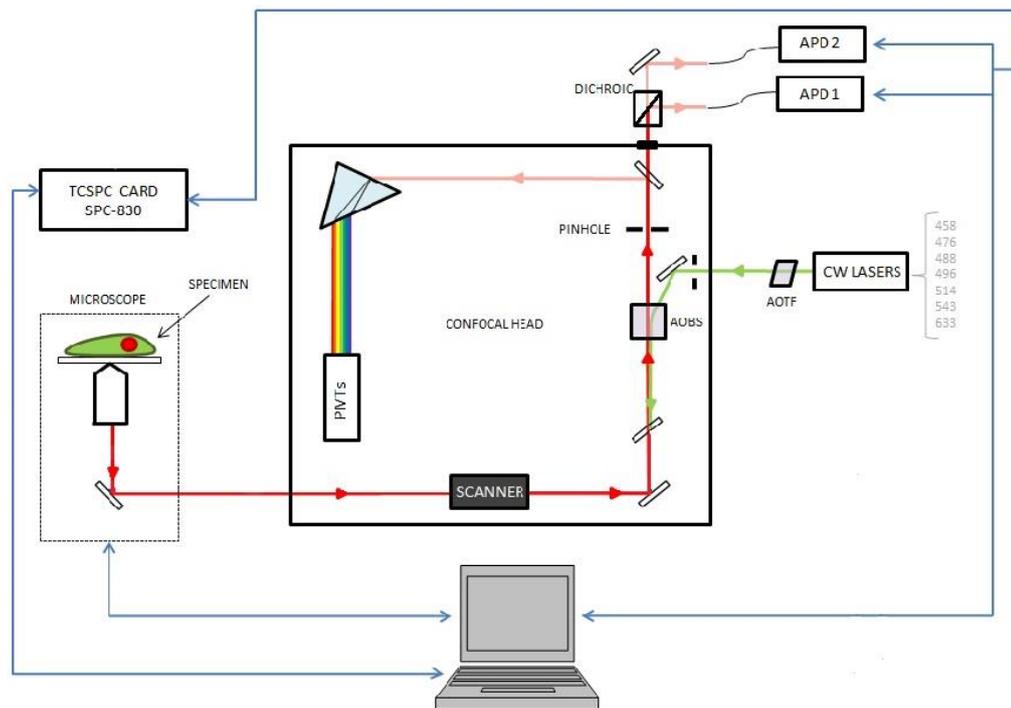


Figura 3. Esquema del microscopio confocal de FCS que se ha utilizado. Tras seleccionar el láser con el que se va a excitar la muestra, la radiación incide en la misma a través del objetivo. La luz fluorescente emitida por la muestra es recogida por el mismo objetivo y se dirige hacia los detectores PMT (Photo MultiPlyer) o APD (Avalanche Photo Diode) a través de un espejo dichroico, que dirige la luz hacia uno u otro detector en función de su posición.

Para conseguir que el láser incida de forma específica en la muestra y recoger la máxima cantidad de luz fluorescente posible, se requiere un objetivo que tenga una amplia apertura numérica (Petrov y Schwille, 2008). Cabe destacar que, según aumenta la masa de las partículas, el tiempo de residencia de las moléculas en el volumen focal aumenta y, por tanto, también su tiempo de difusión. Esto se ve reflejado en la curva de autocorrelación por un desplazamiento de la curva hacia la derecha.

1.5. FCCS

Una variante de FCS es FCCS que permite medir de forma simultánea una señal proveniente de dos fluoróforos. Dos moléculas fluorescentes diferentes son excitadas con láseres independientes y la luz emitida por las moléculas presentes en el volumen focal es dividida en dos haces que son dirigidas cada una a un detector, cada uno de los cuales detecta la emisión de un fluoróforo. Únicamente si las dos especies interactúan y difunden juntas por el volumen de detección, se produce una correlación entre las dos señales dando lugar a una correlación cruzada (Ries y Schwille, 2008). En este caso, lo que se obtiene es una curva de correlación cruzada a partir de la cual es posible determinar la fracción de fluoróforos de cada tipo que están interaccionando.

2. METODOLOGÍA

2.1. USO DE FCS

Existen diversas técnicas para estudiar la interacción entre proteínas, como RMN (Resonancia Magnética Nuclear), difracción de rayos X, FRET, FCS, coimmunoprecipitación o cocrystalización (Sujini et al, 2014). Sin embargo, la coimmunoprecipitación solo es efectiva cuando la interacción entre las proteínas es fuerte; además, pueden surgir falsos positivos. Otra posibilidad es cocrystalizar las proteínas de interés, pero no se puede asegurar que ambas proteínas se cristalicen en su configuración óptima. Ocurre lo mismo con la difracción de rayos X, que además es una técnica muy compleja y requiere mucho tiempo de estudio. El uso de RMN es una alternativa para estudiar interacciones proteicas, aunque supone un elevado coste y precisa mucho tiempo de estudio y, además, se requieren grandes cantidades de proteína. También podemos usar FRET, pero requiere que los fluoróforos tengan una orientación y distancia (10-100 Å) adecuada para que se pueda producir la transferencia de energía entre ambos, de forma que si las proteínas a considerar son grandes e interaccionan, no se observa señal positiva.

El uso de FCS junto con la microscopía confocal permite realizar medidas de difusión, dinámica molecular, interacción y agregación tanto en membrana como en disolución. El parámetro que se mide es la fluctuación de la fluorescencia, lo que permite realizar estudios físicos, biológicos y químicos. Además, FCS tiene una alta resolución espacial y temporal, tiempos de análisis cortos, requiere poca cantidad de proteína y tiene una señal de ruido baja (Martinez y Pappas, Tian, 2011). Sin embargo, los fluoróforos pueden blanquear si el láser es demasiado potente o permanecen excitados durante demasiado tiempo y es necesario enfocar bien el volumen de detección para evitar que las medidas generen una señal mayor de la que realmente es (Ries y Schwille, 2008). Una vez consideradas las técnicas disponibles, hemos decidido que FCS (y FCCS) es la técnica más adecuada para realizar los experimentos detallados en este trabajo.

2.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Asumimos que las proteínas que vamos a usar son esféricas, por lo que su radio hidrodinámico varía con la masa al cubo. Por tanto, se puede hablar de forma indistinta de tamaño y peso.

Inicialmente, es necesario calibrar el volumen focal que se está midiendo ya que éste varía en función del grosor del cubre, que se corrige ópticamente. De esta forma, los experimentos realizados en diferentes días son comparables porque las medidas se están realizando en el mismo volumen focal en todos los casos. Usamos un objetivo x63 que tiene una apertura numérica de 1,2. Trabajamos con dos longitudes de onda, 488 nm y 543 nm, para recoger la luz fluorescente verde y roja, respectivamente, emitida por las muestras. Para calibrar el volumen de detección, usamos dos sondas cuyo coeficiente de difusión es conocido; la sonda Alexa488 para 488 nm y la sonda Alexa543 para 543

nm. La fluorescencia de emisión se ha recogido en filtros de 500-530 nm en el caso de 488 nm de 607-683 en el caso de 543 nm.

Una vez calibrado el volumen, se analizan las muestras proteicas. Para ello, realizamos un estudio del efecto de la potencia para determinar cuál es la que produce menos efectos fotofísicos. Además, fijamos un control negativo y otro positivo para poder compararlos con el resultado del experimento de interés y poder llegar a una conclusión.

Las proteínas se almacenan a -80°C y, una vez descongeladas, se guardan en el frigorífico a $+4^{\circ}\text{C}$. Las sondas Alexa, por el contrario, se mantienen a -20°C . Además, es necesario tener las proteínas y las sondas Alexa en hielo y tapadas mientras no se esté realizando FCS sobre ellas para evitar que les incida la luz y que no se dañen ni estropeen por cambios de temperatura. Las diluciones de las sondas Alexa se realizan en agua miliQ mientras que las diluciones de las proteínas fluorescentes se realizan en buffer Superdex. Para analizar los datos y obtener las curvas de correlación y los parámetros de difusión, ω y z_0 (distancias del centro del volumen de detección en la dirección radial y perpendicular, respectivamente) utilizamos el programa informático OriginPro 8.1.

2.3. EXPERIMENTOS

Trabajamos con las proteínas recombinantes GFP, GFP-PH, RFP-PH y Cherry-L-GFP. Conociendo la concentración y el peso de cada especie (Cherry-L-GFP 54 kDa, GFP-PH 100 kDa, RFP-PH 100 kDa, GFP 17 kDa) realizamos varias disoluciones entre 40-320 nM y conseguimos así, al igual que en la calibración del volumen, detectar la difusión de una sola molécula. En el caso de GFP-PH + RFP-PH, se mezcla el mismo volumen de las diluciones 160 nM de cada una de las especies hasta conseguir una mezcla en la que cada dominio PH unido a su fluoróforo esté a 80 nM. Se realizan medidas de FCS de 5 minutos cada una para registrar suficientes fotones utilizando el láser de 488 nm o el de 543 nm y medidas de FCCS utilizando los dos láseres de forma simultánea y los dos canales para recoger los datos.

El primer experimento que realizamos es un estudio de potencias en el que se excita la muestra de GFP y RFP con potencias del 20%, 40%, 60% y 80% de los dos láseres para determinar cuál es la más apropiada para trabajar con ella en el resto de experimentos. Posteriormente, determinamos el porcentaje de la luz verde fluorescente emitida por la GFP que es recogida por el segundo canal para poder determinar cómo influye la luz verde en las medidas del láser rojo. Para ello, se excita la proteína con una radiación de 543 nm y recogemos los datos en el segundo canal. Por último, determinamos la difusión de cada una de las proteínas recombinantes y de GFP-PH + RFP-PH y se observa si se produce FCCS.

Una vez realizados los experimentos, analizamos los resultados fijando los parámetros ω y z_0 determinados previamente para cada láser que definen el volumen focal para

cada longitud de onda y, mediante la ecuación (3), se obtiene el coeficiente de difusión de cada especie.

3. RESULTADOS

3.1. CALIBRACIÓN DEL VOLUMEN

Para determinar coeficientes de difusión (D), se requiere conocer el volumen de detección en el que se mide dicha difusión. Uno de los métodos más habituales para calibrar el volumen es realizar medidas relativas utilizando moléculas fluorescentes de las que se conoce su D . Utilizamos las sondas Alexa488 y Alexa594 cuyos coeficientes de difusión son $430 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $370 \mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente (Petrov y Schwille, 2008). Recogemos la luz fluorescente en dos canales; el primero detecta la luz verde emitida mientras que el segundo detecta la roja. En este caso, los datos se recogen en un solo canal: se utiliza el primero para Alexa488 y el segundo para Alexa594.

Es necesario ajustar el anillo del objetivo del microscopio para 543 nm con el fin de minimizar aberraciones ópticas. Posteriormente, con el objetivo de detectar la difusión de una única molécula en el volumen focal por cada medida, preparamos tres diluciones entre $40\text{-}150 \text{ nM}$ y realizamos medidas de 3 minutos para cada sonda (Figura 4). Analizamos los datos fijando la difusión y, ajustando los datos al modelo de la Ecuación (3), se obtienen para cada día los parámetros ω_0 y z_0 .

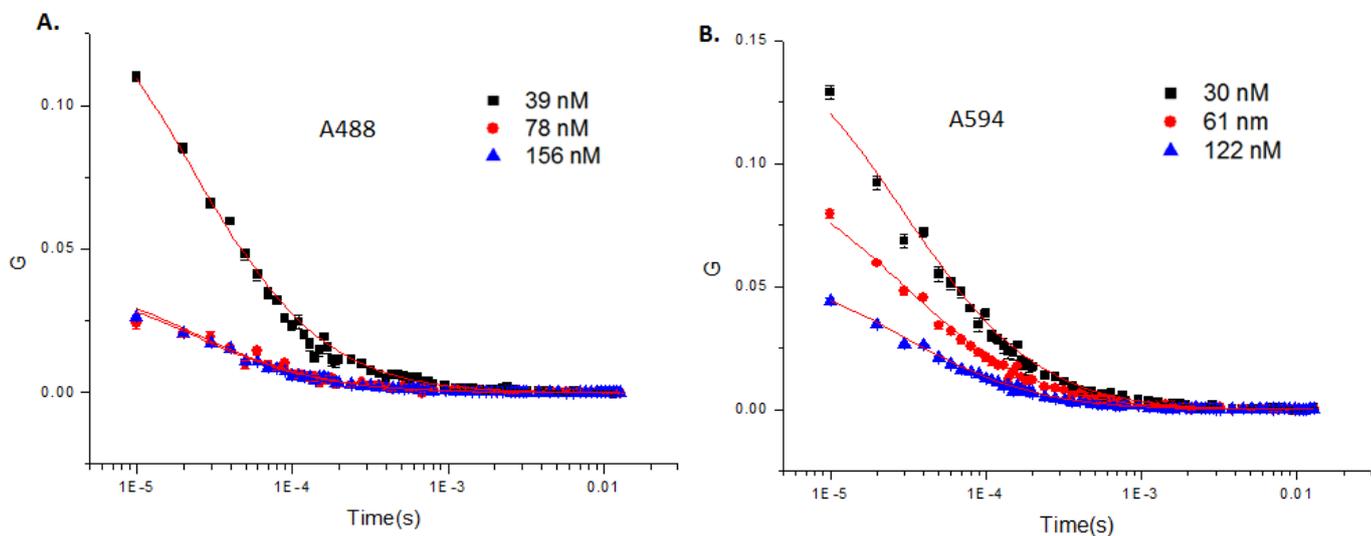


Figura 4. Calibración del volumen para las sondas Alexa488 y Alexa594. Ambos experimentos se han llevado a cabo en disolución acuosa y utilizando el láser de 488 nm y 543 nm , respectivamente, con una potencia del 40% . **A.** Calibración del volumen para la sonda A488. **B.** Calibración del volumen para A594.

3.2. RÉGIMEN DE POTENCIAS Y EFECTOS FOTOFÍSICOS

Para realizar el resto de experimentos, es necesario establecer la potencia con la que vamos a usar los láseres. Para ello, observamos el efecto que tienen en la GFP las potencias del 20%, 40%, 60% y 80% del láser de 488 nm. Tal y como se puede observar en la Figura 5A, al excitar la muestra con una potencia del 20%, se genera una curva que presenta mucho ruido pero pocos fotones; por lo que esta curva no es concluyente. Cuanto mayor sea la potencia que usemos, mayor será la intensidad de luz que recibe la muestra y mayor probabilidad de que se produzcan efectos fotofísicos. Por tanto, la potencia más adecuada para trabajar es la del 40% ya que va a ser la que menos efectos fotofísicos genere.

Además, estudiamos los efectos fotofísicos en la muestra. En su ausencia, esperaríamos que las curvas fueran iguales para diferentes potencias; sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 5B, a los 10^{-5} segundos las curvas de difusión cambian con la potencia de excitación, lo cual es indicativo de efectos fotofísicos. Estos efectos ocurren muy rápidamente desde que se excita la muestra, por lo es necesario medir la difusión una vez que éstos se han producido. Es por ello que la difusión la vamos a estudiar a partir de los 10 μ segundos.

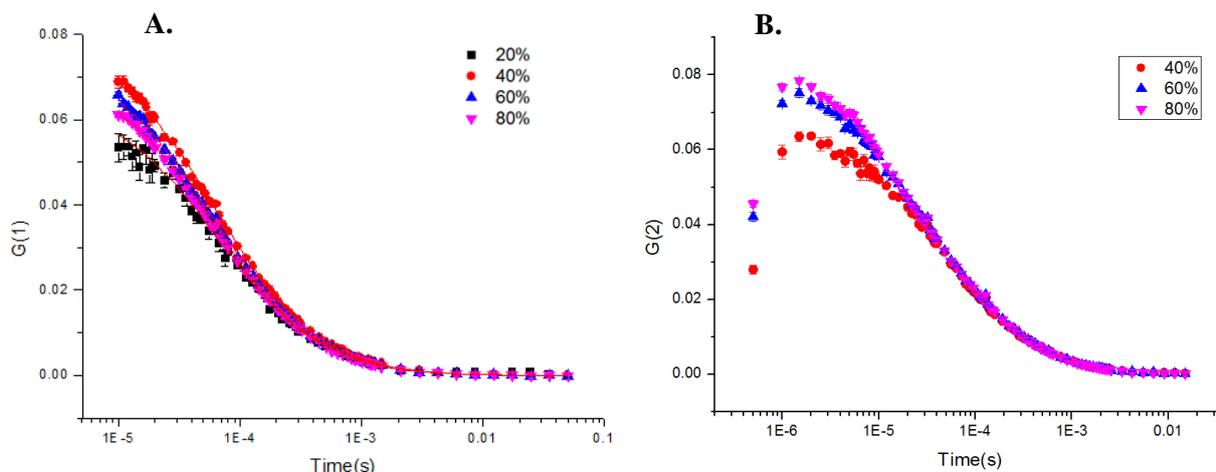


Figura 5. Estudio del efecto de las diferentes potencias y efectos fotofísicos. A. Utilizamos la proteína GFP a una concentración de 320 nM y la excitamos con el láser de 488 nm a diferentes potencias. B. Este estudio se ha realizado con RFP-PH a una concentración de 160 nM excitando la muestra con el mismo láser de 543 nm pero a diferentes potencias.

3.3. COMPARACIÓN DE GFP Y GFP-PH

La difusión de las moléculas depende de la masa de las mismas (Ecuación 1), por lo que vamos a comparar la difusión de GFP y GFP-PH con el objetivo de ver cómo afecta el dominio PH a dicho parámetro. Además, hay que tener en cuenta que la emisión de los fluoróforos depende de su entorno.

Tras realizar los experimentos de FCS con la proteína GFP y GFP-PH y analizarlos mediante OriginPro 8.1., determinamos que su difusión es de $154,58 \pm 4,94 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $129,5 \pm 17,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente. Esta diferencia es razonable porque GFP, al no tener el dominio PH unido, es más pequeña (17 kDa) y difunde más rápidamente que GFP-PH (100 kDa). La difusión depende de la raíz cúbica de la masa, por lo que la difusión de masas similares es difícil de distinguir.

Cabe destacar que la luz verde emitida por la GFP es detectada en su mayoría a través del canal 1; pero un 3% de la misma también es detectada por el segundo canal porque el rango de longitudes de onda en la que recogen luz ambos detectores se solapa. Sin embargo, debido a su valor, estimamos que apenas va a influir en las medidas.

3.4. CONTROLES

3.4.1. Control positivo: **tándem Cherry-L-GFP**

Un tándem es una construcción de dos o más moléculas unidas entre ellas. En este caso analizamos el tándem Cherry-L-GFP, que consiste en los fluoróforos Cherry y GFP unidos por un linker flexible de 6 residuos de glicina. Consideramos que Cherry-L-GFP es el control positivo de FCCS porque, al estar unidas las proteínas fluorescentes, esperamos que haya correlación cruzada.

Observando la curva de FCCS (Figura 6A), determinamos que sí hay una correlación cruzada, lo cual indica que los fluoróforos pasan juntos por el volumen focal. Al ser un tándem, la concentración de cada fluoróforo es la misma, por lo que su $G(0)$ debería ser igual. Sin embargo, esto no es así ya que el $G(0)$ para la GFP (primer canal) es de 0.075 mientras que para Cherry (segundo canal) es de 0.033; se discutirá más adelante.

Cabe destacar que en este caso no estamos trabajando con RFP sino con el fluoróforo Cherry. Aunque ambos emiten en el mismo rango de longitudes de onda, debido a que son fluoróforos diferentes, puede haber alguna variación en los resultados.

3.4.2. Control negativo: **GFP + RFP-PH**

Como control negativo de FCCS utilizamos GFP + RFP-PH ya que, al no tener el fluoróforo verde unido el dominio PH, no esperamos una correlación cruzada. Como podemos observar en la Figura 6B, el $G(0)$ de la curva de FCCS es el mismo que en el caso del estudio realizado de la intensidad verde detectada por el canal 2, $G(0)=0.027$. Esto indica que la ligera intensidad detectada en la correlación cruzada proviene exclusivamente de la proteína verde, por lo que no hay correlación cruzada, tal y como se esperaba. En caso de que estuviera contribuyendo la RFP y, por tanto, estuvieran interaccionando los dos dominios PH, la amplitud de la curva de FCCS debería ser mayor, y por tanto, el $G(0)$ también sería mayor.

3.5. INTERACCIÓN GFP-PH + RFP-PH

Para determinar si los dominios PH interactúan o no, medimos FCCS sobre la mezcla GFP-PH + RFP-PH y determinamos si los dominios PH unidos a los diferentes fluoróforos pasan juntos por el volumen focal o no. Observamos una curva de correlación cruzada (Figura 7) igual que la del control negativo, por lo que no hay una interacción entre los dominios.

Además, hemos determinado la difusión de GFP-PH y RFP-PH. Aunque esperábamos que fuera igual para ambas construcciones, hemos obtenido $D=129.5 \pm 17.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $D=158.41 \pm 10.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente. Este resultado lo discutiremos más adelante.

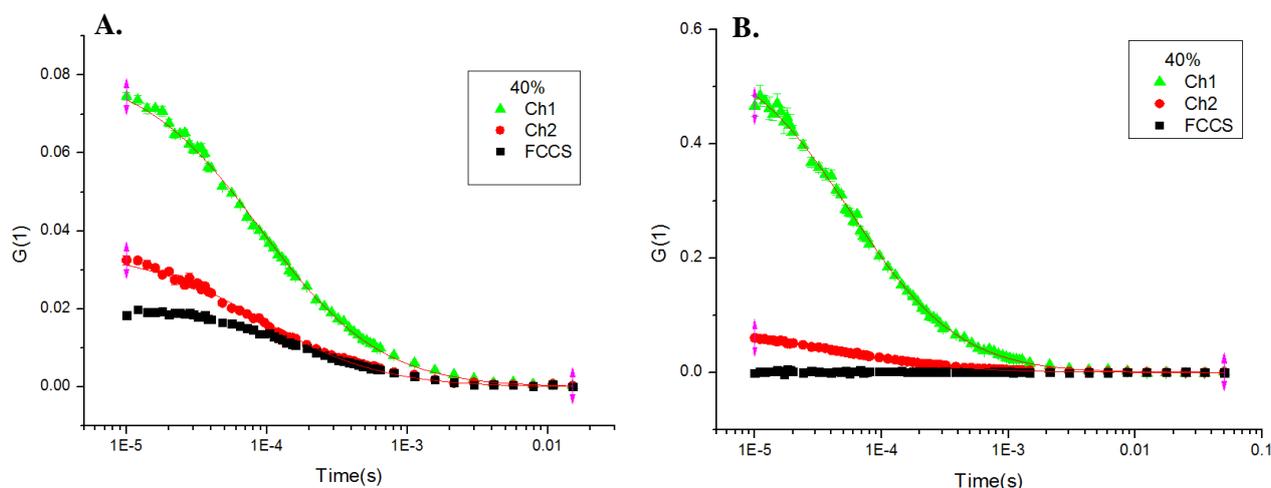


Figura 6. Curvas de correlación de FCS y FCCS del tándem Cherry-L-GFP (A) y de GFP + RFP-PH (B). A. Utilizamos el tándem Cherry-L-GFP a una concentración de 160 nM usando los láseres con una potencia del 40%. Se puede observar la curva correspondiente a la excitación a 488 nm (verde), a 543 nm (rojo) y la correlación cruzada (negra). B. Se utiliza la mezcla de GFP + RFP-PH, ambos a una concentración de 80 nM, usando los láseres con una potencia del 40%. Se puede observar la curva correspondiente a la excitación a 488 nm (verde), a 543 nm (rojo) y la correlación cruzada (negra).

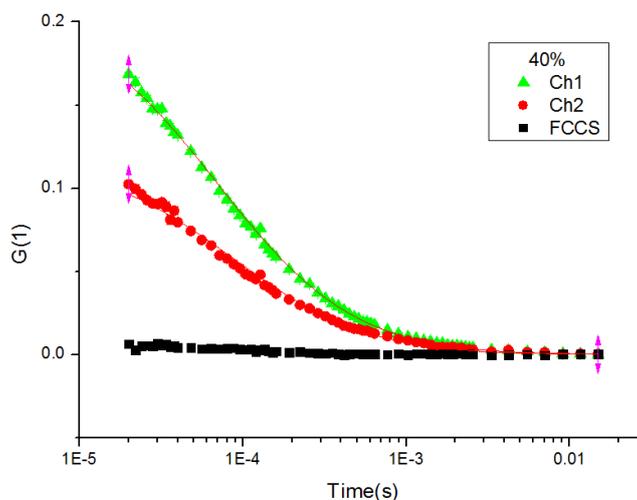


Figura 7. Curvas de correlación de FCS y FCCS de GFP-PH + RFP-PH. Se utiliza la mezcla de GFP-PH + RFP-PH, ambos a una concentración de 80 nM, usando los láseres con una potencia del 40%. Se puede observar la curva correspondiente a la excitación a 488 nm (verde), a 543 nm (rojo) y la correlación cruzada (negra).

3.6. INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS

El origen de la incertidumbre en las medidas es doble; por un lado, tiene que pasar una única molécula por el volumen focal. Al pasar pocas moléculas, la incertidumbre es menor, pero esto supone un número reducido de cuentas por segundo; es decir, pocos fotones, lo que aumenta la incertidumbre. Por tanto, lo que interesa es tener un elevado número de cuentas por unidad de tiempo con una sola molécula en el volumen focal. Estadísticamente, esto equivale a realizar medidas durante más tiempo.

Hemos determinado el error de cada dato medido así como el del mismo experimento medido 30 veces. Los errores independientes siguen una distribución normal que está centrada en la media. Para estimarla, se requiere una población mínima de 30. Sin embargo, en este caso, los valores para la difusión de GFP-PH y RFP-PH no llegan a 15, por lo que no se puede asegurar que incertidumbre con respecto a los coeficientes de difusión siga una distribución normal. Tal y como podemos observar en la Figura 8 la distribución está sesgada hacia valores mayores, lo cual indica que no son errores independientes. Observamos que la RFP tiene valores de difusión mayores que la GFP; esto se debe a que la GFP es más fotoestable, por lo que los efectos fotofísicos de la RFP son mayores.

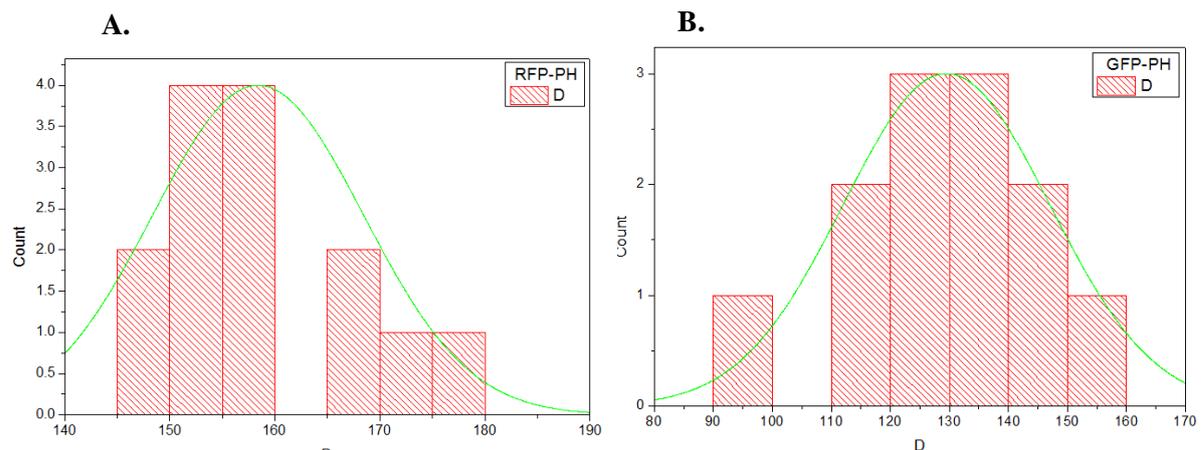


Figura 8. Estudio de la incertidumbre en las medidas del coeficiente de difusión de la GFP-PH y RFP-PH. A. Incertidumbre de la RFP-PH. B. Incertidumbre de la GFP-PH.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo es comprobar la homodimerización del dominio PH de la PDK1 *in vitro*. Para ello vamos a estimar la k_D de la interacción PDK1_{PH}- PDK1_{PH}.

Como control negativo utilizamos GFP + RFP-PH; debido a que la GFP no tiene unido el dominio PH, no esperamos observar una correlación cruzada. Como control positivo, usamos el tándem Cherry-L-GFP ya que, al estar ambos fluoróforos en la misma construcción esperamos que haya correlación cruzada. Sin embargo, como hemos comentado en el apartado 3.4.1., el $G(0)$ para la GFP es mayor que el de la RFP; debido

a la relación inversa que existe entre $G(0)$ y el número de moléculas, podemos apreciar que la proteína roja está presente en mayor concentración que la verde, lo cual sugiere que algunas de las proteínas verdes están apagadas. Esta diferencia también puede deberse a que los volúmenes focales del láser rojo y verde no son el mismo, sino que están solapados solo en parte.

Una vez que hemos hecho el estudio de los dos controles, estudiamos la curva FCCS de GFP-PH + RFP-PH en las mismas condiciones. Observamos que es igual que la del control negativo, por lo que los dominios PH unidos no presentan una correlación cruzada. Esto indica que ambos dominios no interaccionan o que, de hacerlo, no es con una afinidad del orden de nM, lo cual se debe a una limitación de la propia técnica de FCS; que no se pueden determinar afinidades cuya K_d es de diferente orden de magnitud que la concentración de las muestras con las que se realizan los experimentos.

Además, hemos determinado la difusión de las construcciones GFP-PH y RFP-PH de forma individual. Esperamos que la difusión de RFP-PH sea similar a la de GFP-PH porque ambos fluorocromos tienen una masa molecular de 17 kDa. Sin embargo, en estos experimentos se obtiene que la difusión del fluoróforo rojo es de $158.1 \pm 10.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mientras que la del fluoróforo verde es de $129.5 \pm 17.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Esto se debe a que una pequeña proporción de moléculas de RFP están blanqueando a una potencia del 40%, tal y como podemos observar en el estudio del régimen de potencias, ya que RFP es menos fotoestable que GFP.

5. CONCLUSIONES

Tras calibrar el volumen focal para los láseres 488 nm y 543 nm y realizar medidas de FCS y FCCS sobre las muestras, hemos decidido trabajar con una potencia del 40% y estudiar la difusión a partir de 10^{-5} segundos. Posteriormente, hemos realizado FCCS sobre el tándem Cherry-L-GFP y GFP + RFP-PH, y los hemos usado como control positivo y control negativo, respectivamente. Finalmente, tras estudiar la interacción de GFP-PH + RFP-PH hemos observado que no hay correlación cruzada.

Esto puede implicar que los dominios PH están próximos en la célula pero que no interaccionan ya que FRET solamente da un resultado positivo si los espectros de emisión del donador y de excitación del aceptor se solapan y ambas moléculas considerando están a una distancia adecuada. Por otro lado, puede ser que sí haya interacción pero que sea demasiado débil como para poder medirla por esta técnica porque una de las limitaciones de FCS es que no puede detectar afinidades cuya K_d sea de un orden diferente al de la concentración de la muestra. Por tanto, la afinidad de los dominios PH tendría que ser, al menos, del orden de μM .

Por tanto, mediante este experimento realizado en disolución no podemos concretar que los dominios PH de la PDK1 no interaccionan en membrana, tal y como se había observado mediante FRET (Figura 1) previamente a la realización de este trabajo; pero

sí podemos concluir que no lo hacen con una alta afinidad (K_d del orden de nM). Con el objetivo de profundizar en el tema y obtener información más precisa, las futuras investigaciones se tendrían que centrar en comprobar la afinidad PDK1_{PH} mediante técnicas que permitan medir afinidades diferentes, como FLIM (Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy). Además, habría que estudiar la homodimerización de los dominios PH en presencia de lípidos así como de la proteína completa.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bayascas JR, 2010. *PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions* en Rommel C., Vanhaesebroeck B, VogtCurrent PK (Eds) *Topics in Microbiology and Immunology*, Springer Berlin Heidelberg Vol. 346. Vol.1; 346 9-29.

Elson EL, 2011. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: past, present and future*. Biophysical Journal, Vol.11, 2855-2870

García-Sáez AJ, Schwille P, 2008. *Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions*. Methods, 46, 116-122.

Haustein E, Schwille P, 2004. *Single-molecule spectroscopic methods*. Current Opinion in Structural Biology, 14, 531-540.

Jameson DM, Croney JC, Moens PD, 2003. *Fluorescence: basic concepts, practical aspects and some anecdotes*. Methods in Enzymology, 360, 1-43.

Komander D, Alessi DR, Pearce LR, 2010. *The nuts and volts of AGC protein kinases*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Vol.11, 9-22.

Lemmon MA, 2008. *Membrane recognition by phospholipid-binding domains*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Vol.2, 99-111.

Martinez MM, Pappas D, Tian Y, 2011. *Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications*. Applied Spectroscopy 65: 115-124

Petrov EP, Schwille P, 2008. *State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy* en Resch-Genger Ute (Eds) *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*. Springer Berlin Heidelberg, 145-197.

Requejo-Isidro J, Larijani B, Calleja V, Laguerre M, de Las Heras-Martinez G, Parker PJ, 2014. *Acute regulation of PDK1 by a complex interplay of molecular switches*. Biochemical Society Transactions 42, 1435-1440.

Ries J, Schwille P, 2008. *New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes*. Physical Chemistry Chemical Physics 10, 3487-3497.

Sujini GN, Kumar GN, Rao VS, Srinivas K, 2014. *Protein-protein interaction detection: methods and analysis*. International Journal of Proteomics, Vol.2