



Proteínas quimera de los dominios SH3  
de la c-Src y Fyn tirosina quinasa: un  
estudio de las bases moleculares del  
entrecruzamiento tridimensional de  
dominios

Tesis doctoral

Departamento de Química y Física

Área de Química-física

Universidad de Almería

Marina Plaza Garrido

Almería, julio 2021





**Departamento de Química y Física**

**Área de Química-física**

**Universidad de Almería**

**Proteínas quimera de los dominios SH3 de la c-Src y Fyn tirosina quinasa: un estudio de las bases moleculares del entrecruzamiento tridimensional de dominios**

Tesis doctoral

**Chimeric proteins from the SH3 domains of the c-Src and Fyn tyrosine kinase: a study of the molecular bases of 3D-domain swapping**

Ph. D. Thesis

Memoria para optar al título de Doctor en Química

Autora: Marina Plaza Garrido

Directora: Ana María Cámara Artigas

Doctorado en Química Avanzada. Investigación en Química-física

Almería, julio 2021



**Ana María Cámara Artigas**, Profesora Titular de la Universidad de Almería,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada “**Proteínas quimera de los dominios SH3 de la c-Src y Fyn tirosina quinasa: un estudio de las bases moleculares del entrecruzamiento tridimensional de dominios**” ha sido realizada en el Departamento de Química y Física de la Universidad de Almería y bajo su dirección, por la Graduada en Química **Marina Plaza Garrido**, autorizando su presentación para su calificación como Tesis Doctoral.

Almería, julio 2021

Fdo: Marina Plaza Garrido

Fdo: Ana María Cámara Artigas



## Agradecimientos

En primer lugar, he de agradecer a mi directora Ana Cámara Artigas, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por todo su esfuerzo y dedicación por hacer este trabajo posible y por su interés por enseñarme a investigar. Gracias por tu humildad y por ser una gran persona y todo un referente profesional.

A mi compañera y amiga Mari Carmen, porque sin ella nada de esto hubiese sido lo mismo. Una gran persona en la que confío plenamente y que nunca me ha dejado de sorprender por su perseverancia y por su capacidad de esfuerzo incluso en los momentos más complicados. Gracias por todo tu apoyo, por todas las experiencias que hemos vivido juntas estos últimos años y por todas las horas que hemos pasado trabajando en el laboratorio.

A Gavi y Sergio, por toda su ayuda, dedicación y enseñanzas de forma totalmente desinteresada. Gracias por todos los viajes, por las noches de café en el sincrotrón y por todas las risas que hemos vivido juntos.

A todos los del departamento que estuvieron conmigo y me acompañaron durante mis dos semanas en Granada, a José por ayudarme con los experimentos y por supuesto a mis tíos y mis primos granadinos por recibirme siempre con tanto cariño e ilusión.

A Emilia y Montse por estar siempre dispuestas a echar una mano y por toda la ayuda que me han dado siempre que la he necesitado.

A todas las personas del área que han contribuido con su granito de arena al trabajo diario, especialmente gracias a Marina y a Mari Carmen y Jose por entrar todos los días al laboratorio con una sonrisa. También agradezco a todas las personas que han pasado por el laboratorio y con las que he compartido desayunos y meses de trabajo.

A mi familia y amigos. A mis padres y mi hermana, que me han apoyado en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida y que me han hecho ser la persona que soy hoy día, porque sin ellos este camino no hubiese sido posible. Gracias por vuestro amor incondicional.

Mi más sincero agradecimiento a mi compañero de vida, Álex, porque es el que me ha acompañado durante toda esta etapa de crecimiento personal, llena de experiencias positivas,

pero también de momentos duros. Gracias por quererme tanto, por cuidarme todos los días y por vivir todas mis ilusiones como si fueran tuyas.

Por último, al Ministerio de Economía y Competitividad (España) por financiar el proyecto de investigación “Estudios cristalográficos de plegamientos anómalos de proteínas” (BIO2016-78020-R, 2016-2020) y el contrato asociado con el cual se ha podido desarrollar esta Tesis doctoral.



## Resumen

El objetivo de esta Tesis doctoral es estudiar las bases moleculares de los plegamientos alternativos que sufren algunas proteínas. Aunque hipotéticamente el plegamiento de las proteínas esté encriptado en su secuencia primaria, alcanzando un único plegamiento con el cual son funcionales, hay numerosas proteínas donde se han descrito plegamientos alternativos como el entrecruzamiento tridimensional de dominios o la formación de fibras amiloides. En esta Tesis abordamos este estudio a través de pequeños dominios modulares como el dominio SH3 de la c-Src y la Fyn tirosina quinasas. El primero de estos dominios SH3 posee ciertas características que lo hacen adecuado para ser utilizado como modelo para llevar a cabo estudios de este tipo, ya que sufre ambos procesos de plegamiento alternativo. Por otra parte, estos pequeños dominios modulares son perfectos modelos para los estudios de plegamiento ya que son relativamente sencillos de purificar mediante técnicas convencionales, carecen de puentes disulfuro, están formados por unos 60 aminoácidos y han sido ampliamente estudiados desde el punto de vista de plegamiento. El segundo dominio SH3 elegido para este estudio presenta una muy alta similitud secuencial con el dominio c-Src, aproximadamente el 80 %, pero al contrario de este no forma ni dímeros entrecruzados ni fibras amiloides, al menos hasta la fecha. Por este motivo, se ha trabajado tanto con las proteínas nativas como con distintas quimeras de los dominios SH3 c-Src y Fyn, de manera que los lazos n-Src, RT y ambos de la c-Src han sido intercambiados por los de la Fyn-SH3 y viceversa. También se ha estudiado el efecto que producen ciertas mutaciones puntuales en el sitio de nucleación de ambos dominios SH3 y su influencia en su estructura y estabilidad. Tras exponer una introducción de los antecedentes bibliográficos y las metodologías y materiales usados, esta Tesis se compone de cuatro capítulos, en los cuales se describen tanto los resultados como la discusión de los mismos.

De esta forma el primer capítulo que recoge los estudios de esta Tesis, el capítulo 3, está centrado en el estudio y análisis de la influencia del motivo ATCUN situado en el extremo amino terminal de la proteína c-Src-SH3. Los primeros experimentos de nuestro grupo de investigación *BIO-328: Estructura de Proteínas* con el dominio c-Src-SH3 se realizaron con proteínas clonadas por el grupo de investigación *FQM171: Biofísica y biotecnología molecular* de la Universidad de Granada. Esta proteína contenía un sitio de corte para la proteasa trombina con el fin de eliminar la cola de seis histidinas situada en el extremo amino terminal de la misma. Como resultado del corte, en dicho extremo quedaba la secuencia de aminoácidos

Gly81-Ser82-His83 capaz de interactuar con metales divalentes como el níquel. Esto se puso en evidencia en algunas de las estructuras del dominio en las cuales tanto níquel como cobre aparecían unidos al extremo amino terminal del dominio SH3 de la c-Src. Por lo tanto, el estudio que se describe en este capítulo pretendía analizar la influencia del motivo ATCUN en los resultados de caracterización biofísica y estructural de la proteína. Para ello, se clonó de nuevo la proteína c-Src-SH3 con un sitio de escisión para la cola de histidinas específica para la proteasa TEV, que permite obtener la proteína sin aminoácidos adicionales en la secuencia. Se ha comprobado que el motivo ATCUN aumenta la solubilidad y que, además, la unión de metales al motivo incrementa la estabilidad del dominio c-Src-SH3.

En los capítulos 4 y 5 se describen las proteínas diseñadas para abordar los estudios de la Tesis, centrándose el capítulo 4 en la c-Src-SH3 y sus quimeras/mutantes: SF-Src, SF-Src-Q128E, SF-Src-EAR, SF-RT, SF-2X, Src-L100I, Src-E106D, Src-S123T, Src-T125S, Src-T126S y Src-Q128E. El capítulo 5 se centra en cambio en la Fyn-SH3, en su mutante Fyn-E129Q y en las quimeras: FS-Src, FS-Src-LAH, FS-Src-E129Q, FS-RT y FS-2X. En ambos capítulos se muestra la caracterización biofísica de las proteínas objeto de estudio para determinar tanto su estabilidad química frente al pH y al agente caotrópico cloruro de guanidinio como su estabilidad térmica, realizada mediante las técnicas de fluorescencia y dicroísmo circular. Además, se describen en detalle las estructuras cristalográficas obtenidas mediante difracción de rayos X. En la discusión de estos capítulos se analizan los posibles factores que afectan en el proceso del entrecruzamiento tridimensional de dominios, así como las interacciones más características que influyen en la estabilidad de las proteínas.

Por último, en el capítulo 6 se aborda la formación de las fibras amiloides en los dominios SH3 de la c-Src y la Fyn utilizando como agente inductor el cosolvente 2,2,2-trifluoroetanol. También se ha analizado el comportamiento y las transiciones conformacionales de la c-Src-SH3, tanto con el motivo ATCUN como sin él, en presencia del 2,2,2-trifluoroetanol utilizando dicroísmo circular y fluorescencia.

## Abstract

This doctoral Thesis aims to study the molecular principles of the misfolding suffered by some proteins. Although hypothetically the folding of the proteins is encrypted in their primary sequence and they reach a single fold with which they are functional, there are numerous proteins where misfolding processes have been described. Such misfolding processes are 3D domain-swapping and amyloid formation. In this Thesis we approach this study through small modular domains such as the SH3 domain of c-Src and Fyn tyrosine kinases. The first of these SH3 domains have specific characteristics that make it suitable to be used as a model to carry out our studies since it undergoes both misfolding processes. On the other hand, these small modular domains are perfect models for folding studies since they are relatively easy to purify using conventional techniques. Besides, they lack disulfide bridges, are made up of about 60 amino acids and have been widely studied from the folding point of view. The second SH3 domain chosen for this study, the Fyn SH3 domain, shows very high sequence similarity with the c-Src domain, approximately 80%, but on the contrary, it does not form intertwined dimers or amyloid fibres, at least to date. For this reason, we have worked both proteins in its native form and with different chimeras. In these chimeras, the loops n-Src or RT of c-Src have been exchanged for those present in the Fyn-SH3 domain, and vice-versa. Also, we have interchanged both loops at the same time. We have also studied in both SH3 domains the effect in their structure and stability of point mutations in the nucleation site. After presenting an introduction of the bibliographic background and the methodologies and materials used, this Thesis is composed of four chapters, in which the results and the discussion are described.

Chapter 3 is focused on the study and analysis of the influence of the ATCUN motif located at the amino terminal end of the c-Src-SH3. The first experiments of our research group *BIO-328: Protein structure* with the c-Src-SH3 domain were carried out with proteins cloned by the research group *FQM171: Biophysics and molecular biotechnology* of the University of Granada. This protein contained a thrombin protease cleavage site to remove the six N-terminal histidine tag. As a result of the cleavage, the amino acid sequence Gly81-Ser82-His83 was left at this end, able to interact with divalent metals like nickel. For this reason, the c-Src-SH3 protein was cloned again, but with a specific cleavage site for TEV protease, which makes it possible to obtain the protein without additional amino acids in the sequence. It has been found that the ATCUN motif alters the solubility of proteins. In addition, the binding of the metal to the motif modifies the stability of c-Src-SH3 domain.

Chapters 4 and 5 describe the new proteins designed to address the Thesis studies. Chapter 4 is focused on c-Src-SH3 and its chimeras/mutants: SF-Src, SF-Src-Q128E, SF-Src-EAR, SF-RT, SF-2X, Src-L100I, Src-E106D, Src-S123T, Src-T125S, Src-T126S and Src-Q128E. Instead, chapter 5 is focused on Fyn-SH3, in its mutant Fyn-E129Q and its chimeras: FS-Src, FS-Src-LAH, FS-Src-E129Q, FS-RT and FS-2X. Both chapters show the biophysical characterization of the proteins under study to determine their chemical and thermal stability, carried out using fluorescence and circular dichroism. In addition, the crystallographic structures obtained by X-ray diffraction are analysed in detail. Possible factors that affect the three-dimensional domain swapping process are also discussed, including the most characteristic interactions that influence the stability of the proteins.

Finally, in chapter 6, the issue of the formation of amyloid fibers in the SH3 domains of c-Src and Fyn is addressed using the cosolvent 2,2,2-trifluoroethanol as an inducing agent. The behaviour of the protein c-Src-SH3 with and without the ATCUN motif in presence of 2,2,2-trifluoroethanol has also been analysed. The study of conformational transitions has been carried out using circular dichroism and fluorescence.

# Índice

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción .....	21
1.2 Entrecruzamiento tridimensional de dominios.....	23
1.2.1 Características estructurales .....	33
1.2.2 Papel funcional del entrecruzamiento de dominios .....	34
1.3 Fibras amiloides .....	37
1.4 Dominios SH3.....	41
1.4.1 Importancia biológica de los dominios SH3 .....	42
1.4.2 Estructura, plegamiento y estabilidad de los dominios SH3 .....	43
1.5 Entrecruzamiento de dominios en los dominios SH3 .....	45
1.6 Fibras amiloides en los dominios SH3.....	47
1.7 El dominio c-Src-SH3 como modelo del entrecruzamiento de dominios y de la formación de las fibras amiloides.....	49
1.8 Objetivos.....	53

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales.....	57
2.2 Métodos.....	59
2.2.1 Clonado, expresión y purificación de las quimeras del dominio SH3 .....	59
2.2.2 Clonado, expresión y purificación de la proteasa TEV .....	61
2.2.3 Preparación de las disoluciones .....	62
2.2.4 Liofilización de las proteínas y determinación del límite de solubilidad .....	64
2.2.5 Determinación del estado de oligomerización mediante dispersión dinámica de la luz .....	64
2.2.6 Espectroscopía de fluorescencia.....	65
2.2.7 Dicroísmo circular .....	68
2.2.8 Cristalización de proteínas .....	70
2.2.9 Difracción de rayos X de cristales macromoleculares, resolución estructural, refinado y análisis .....	73
2.2.10 Métodos para la detección de fibras amiloides .....	74
2.2.11 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	76

## CAPÍTULO 3: EFECTO DEL MOTIVO ATCUN EN LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LA C-SRC-SH3 TIROSINA QUINASA

3.1 Expresión y purificación de la c-Src tirosina quinasa.....	80
3.2 Solubilidad de las proteínas .....	81
3.3 Unión del níquel al motivo ATCUN de la c-Src-SH3 .....	82
3.4 Determinación de la geometría del complejo de níquel mediante dicroísmo circular .....	83
3.5 Estabilidad con el pH del dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa con y sin el motivo ATCUN .....	84

3.6	Desnaturalización química con cloruro de guanidinio.....	86
3.7	Estabilidad térmica de la c-Src-SH3 tirosina quinasa con y sin el motivo ATCUN.....	86
3.8	Caracterización del estado de oligomerización de la c-Src-SH3 .....	87
3.9	Cristalización y determinación estructural del dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa .....	88
3.10	Discusión.....	92
<b>CAPÍTULO 4: PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y ESTRUCTURALES DE LAS QUIMERAS Y MUTANTES DE LA C-SRC-SH3 TIROSINA QUINASA</b>		
4.1	Expresión y purificación de las quimeras y mutantes de la c-Src.....	99
4.2	Solubilidad de las proteínas .....	101
4.3	Estabilidad con el pH de los mutantes del dominio SH3 de la c-Src .....	102
4.4	Desnaturalización química con cloruro de guanidinio.....	103
4.5	Desnaturalización térmica de los mutantes de la c-Src-SH3 .....	103
4.6	Caracterización del estado de oligomerización de los mutantes de la c-Src-SH3.....	107
4.7	Cristalización y determinación estructural de los mutantes de la c-Src-SH3 .....	108
4.7.1	<i>Estructura de la quimera SF-Src</i> .....	110
4.7.2	<i>Estructura de la quimera SF-Src-Q128E</i> .....	115
4.7.3	<i>Estructura de la quimera SF-2X</i> .....	120
4.7.4	<i>Estructura del mutante Src-Q128E</i> .....	126
4.7.5	<i>Estructura del mutante Src-T125S</i> .....	129
4.7.6	<i>Estructura del mutante Src-L100I</i> .....	133
4.7.7	<i>Estructura del mutante Src-E106D</i> .....	135
4.7.8	<i>Estructura del mutante Src-T126S</i> .....	138
4.8	Discusión.....	140
<b>CAPÍTULO 5: PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y ESTRUCTURALES DE LAS QUIMERAS Y MUTANTES DE LA FYN-SH3 TIROSINA QUINASA</b>		
5.1	Expresión y purificación de las quimeras y mutantes de la Fyn-SH3.....	153
5.2	Solubilidad de las proteínas .....	154
5.3	Estabilidad con el pH de los mutantes del dominio SH3 de la Fyn .....	155
5.4	Desnaturalización química con cloruro de guanidinio.....	157
5.5	Desnaturalización térmica de los mutantes de la Fyn-SH3 WT .....	158
5.6	Caracterización del estado de oligomerización de los mutantes de la Fyn-SH3.....	159
5.7	Cristalización y determinación estructural de los mutantes de la Fyn-SH3.....	160
5.7.1	<i>Estructura de la Fyn-SH3 WT</i> .....	161
5.7.2	<i>Estructura del mutante Fyn-E129Q</i> .....	165
5.7.3	<i>Estructura de las quimeras FS-Src y FS-Src-E129Q</i> .....	167
5.7.4	<i>Estructura de la quimera FS-Src-LAH</i> .....	170
5.7.5	<i>Estructura de la quimera FS-RT</i> .....	179
5.8	Discusión.....	183

## CAPÍTULO 6: ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES EN LOS DOMINIOS C-SRC Y FYN SH3 Y SUS MUTANTES

6.1 Cribado de las condiciones de formación de las fibras amiloides .....	193
6.2 El 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) como agente inductor de las fibras amiloides en la c-Src-SH3	198
6.2.1 Caracterización de los equilibrios conformacionales del dominio c-Src-SH3 en presencia de TFE.....	199
6.2.2 Caracterización de los estados de oligomerización de la c-Src-SH3 en presencia de TFE .....	201
6.2.3 Formación y cinética de las fibras amiloides en presencia de TFE .....	202
6.3 Discusión.....	206
CONCLUSIONES .....	209
BIBLIOGRAFÍA .....	215
APÉNDICES.....	237
Apéndice 1: reactivos e instrumentación .....	239
Apéndice 2: disoluciones para el cribado de condiciones de cristalización.....	242
Apéndice 3: estadísticas de refinado de las estructuras obtenidas .....	247
Apéndice 4: publicaciones y otras publicaciones.....	264





# **Abreviaturas**



<b>[D]</b>	Concentración de agente desnaturalizante
<b>[GdnHCl]</b>	Concentración de cloruro de guanidinio
<b>[L]</b>	Concentración de ligando libre
$\Delta C_p$	Cambio de capacidad calorífica de desnaturalización a presión constante
$\Delta G_w$	Cambio de energía libre de Gibbs de desplegamiento
$\Delta H_m$	Cambio de entalpía a la temperatura $T_m$
$\Delta n$	Diferencia entre el índice de refracción del agente caotrópico y el índice de refracción de la disolución tamponante en la que está disuelto
<b>3D-DS</b>	Entrecruzamiento tridimensional de dominios
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANS</b>	Ácido 8-Anilinaftalén-sulfónico
<b>ASA</b>	Área superficial accesible
<b>ATCUN</b>	Amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding, motivo ATCUN
<b>CD</b>	Dicroísmo circular
$C_p$	Capacidad calorífica molar parcial de una proteína
<b>CR</b>	Rojo congo
$D_0$	Coefficiente de difusión traslacional
<b>Da</b>	Dalton
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>F(0)</b>	Intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia de ligando
<b>F(<math>\infty</math>)</b>	Intensidad de fluorescencia de la proteína saturada por el ligando
<b>F(L)</b>	Intensidad de fluorescencia de la proteína a una determinada concentración de ligando
<b>FT</b>	Fración de sobrenadante saliente de la columna de afinidad
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
$K_B$	Constante de Boltzmann
$K_d$	Constante de equilibrio de disociación
<b>LB</b>	Medio de cultivo Lysogeny Broth
$m_{1/2}$	Concentración media de desnaturalización
$m_N$	Pendiente de la región desplegada
$m_N$	Pendiente de la región plegada
<b>MPD</b>	Metilpentanodiol
<b>PAGE-SDS</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PDZ</b>	Post synaptic density protein – Discs Large-4 – Zonula Occludens1

<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>Pell</b>	Pellet, restos celulares
<b>pK<sub>a</sub></b>	Menos logaritmo de la constante de acidez
<b>PM</b>	Peso molecular de la proteína
<b>RC</b>	Rojo congo
<b>R<sub>h</sub></b>	Radio hidrodinámico
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RMSD</b>	Desviación cuadrática media
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SH3</b>	Src Homology-3
<b>Sn</b>	Sonicado
<b>SRP</b>	Secuencias ricas en prolina
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tiempo
<b>TEC</b>	Tampón de equilibrado de columna
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TEV</b>	Proteasa Tobacco Etch Virus
<b>TFE</b>	2,2,2-Trifluoroetanol
<b>ThT</b>	Tioflavina T
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de la transición a la que $\Delta G=0$
<b>TQ</b>	Tirosina quinasa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>W</b>	Lavado
<b>WT</b>	Proteína nativa
<b>Y</b>	Energía espectral media de emisión y fracción de saturación
<b>Y<sub>a</sub></b>	Energía espectral media de emisión de la parte ácida
<b>Y<sub>b</sub></b>	Energía espectral media de emisión de la parte básica
<b>Y<sub>d</sub></b>	Energía espectral media de emisión de la proteína desnaturalizada
<b>Y<sub>n</sub></b>	Energía espectral media de emisión de la proteína nativa
<b>ζ</b>	Coficiente de fricción
<b>η</b>	Viscosidad
<b>θ</b>	Elipticidad
<b>θ<sub>N</sub></b>	Elipticidad de la proteína plegada
<b>θ<sub>U</sub></b>	Elipticidad de la proteína desplegada

# **Capítulo 1**

## **Introducción y objetivos**



## 1.1 Introducción

Las proteínas se caracterizan por desarrollar funciones que están asociadas a su estructura tridimensional. A partir de los primeros trabajos de Afinsen en los años 1960 (Afinsen *et al.*, 1961) en los cuales demostraba que el plegamiento tridimensional de las proteínas estaba dictado en su secuencia primaria, se atribuyó un plegamiento único y funcional a las proteínas. Sin embargo, la experiencia nos demuestra que muchas proteínas, además de su conformación correcta para desarrollar la función a la que está destinada, puede presentar plegamientos alternativos. Uno de estos plegamientos alternativos que despierta gran interés es la formación de fibras amiloides.

Hasta la fecha, los amiloides se han relacionado con más de 50 patologías distintas (Chiti *et al.*, 2006; Chiti *et al.*, 2017; Qiang *et al.*, 2017; Dobson *et al.*, 2017; Gertz *et al.*, 2017; Bart *et al.*, 2018; Benson *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020) que pueden ser o no hereditarias. Entre estas enfermedades, las más destacadas son las de tipo neurodegenerativo como por ejemplo el Parkinson, la enfermedad del Alzheimer o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, pero también se han relacionado con otro tipo de enfermedades como la diabetes tipo 2, la hemodiálisis crónica y la artritis reumatoide. En general, los depósitos de fibras amiloides aparecen en el medio extracelular de los tejidos, formando agregados que actúan como agentes patógenos en el organismo (Pepys, 2001). Dado que en los últimos años la esperanza de vida ha aumentado sensiblemente en los países desarrollados, estas enfermedades provocadas por depósitos de fibras amiloides, especialmente las neurodegenerativas, se han convertido en un gran problema de salud con importantes implicaciones sociales (Figura 1).

El estudio de los amiloides desde un punto de vista molecular es bastante complicado debido a las dificultades que existen a la hora de obtener tanto información biofísica como estructural de los mismos. Sin embargo, muchas de las proteínas que forman fibras amiloides también presentan otro tipo de plegamiento anómalo en el cual se produce una agregación controlada formando dímeros u otro tipo de oligómeros. Este tipo de agregados son más fáciles de estudiar desde el punto de vista biofísico, y lo que es más importante, son susceptibles de ser cristalizados y por tanto de obtener una valiosa información estructural a nivel atómico. Este proceso de oligomerización se conoce con el nombre de entrecruzamiento tridimensional de dominios (3D domain-swapping, 3D-DS) y se produce mediante el intercambio de elementos de la estructura secundaria entre cadenas polipeptídicas (protómeros) adyacentes. Este

intercambio puede dar lugar a la formación de dímeros, trímeros, etc donde, en el caso de los dímeros, los elementos de la estructura secundaria de un protómero A son intercambiados por los del protómero B en la estructura terciaria (Cámara-Artigas, 2016). Intentar comprender dicho fenómeno es importante ya que el mecanismo por el cual la proteína se abre para formar estos oligómeros puede ser común al que sufren las fibras amiloides en los primeros estadios de formación.

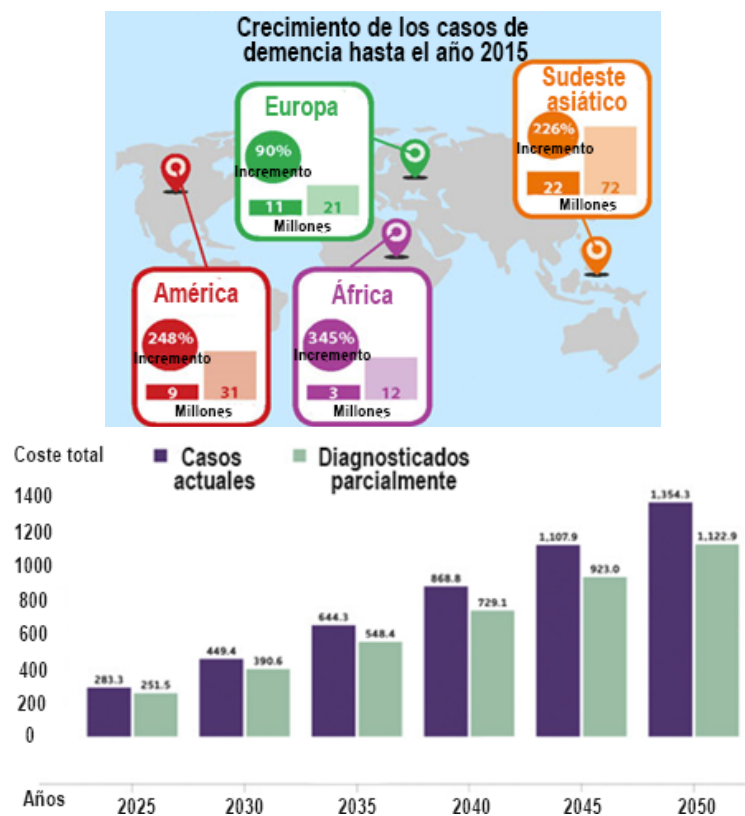


Figura 1. En el mapa se muestra el aumento de los casos de demencia hasta el 2050 en los distintos continentes (Dementia: A global epidemic infographic Alzheimer disease's International). En el gráfico se puede observar una estimación tanto del número de afectados por la enfermedad del Alzheimer como de los diagnosticados parcialmente hasta el año 2050 y el coste total en billones en el tratamiento (Alzheimer's association, 2018).

Para comprender mejor como se produce este fenómeno, es imprescindible realizar estudios con sistemas que podamos considerar modelo. El dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa (c-Src-SH3), el cual puede formar tanto el dímero entrecruzado como las fibras amiloides, cumple estas condiciones (Bacarizo *et al.*, 2014). Además, se trata de uno de los dominios mejor estudiados desde el punto de vista de plegamiento tanto experimentalmente (Grantcharova *et al.*, 1997; Grantcharova *et al.*, 1998) como computacionalmente (Shea *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2012; Bonjack-Shterengartz *et al.*, 2017; Lafita *et al.*, 2019; Demakis *et al.*, 2020; Grohe *et al.*, 2020). Esto es en gran medida debido a que presenta numerosas ventajas para abordar este tipo



de estudios: se trata de un dominio modular de pequeño tamaño, sin puentes disulfuro, que se puede purificar en grandes cantidades y, en principio, presenta facilidad para obtener información estructural mediante técnicas en solución (RMN) o cristalográficas. Su estructura y plegamiento ha sido caracterizado y se puede observar en la Figura 2.

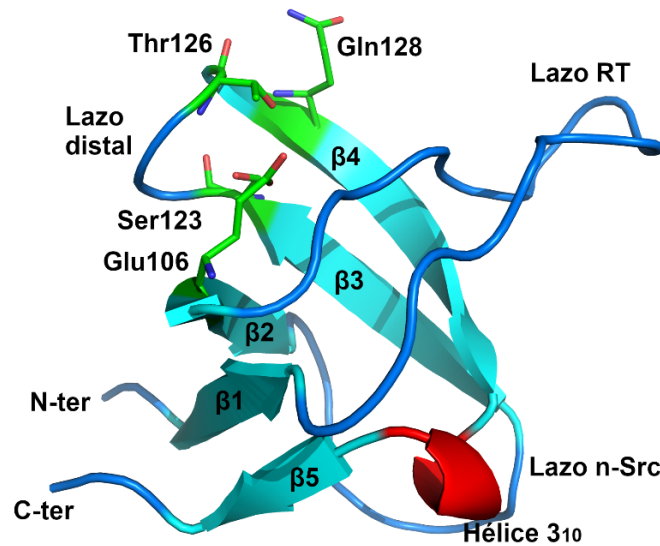


Figura 2. Estructura y plegamiento característico de los dominios SH3. Las cinco láminas beta se indican cian y la hélice 3<sub>10</sub> que conecta las hebras β4 y β5 aparece en color rojo. Los lazos n-Src, distal y RT se muestran en color azul. También se muestran en color verde los aminoácidos presentes en el núcleo de plegamiento.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que en el dominio c-Src-SH3, la formación de los dímeros entrecruzados y fibras amiloides es dependiente del pH y que, además, este comportamiento es sensible a algunas mutaciones puntuales cerca del sitio de nucleación de esta proteína (Bacarizo *et al.*, 2014).

## 1.2 Entrecruzamiento tridimensional de dominios

El entrecruzamiento tridimensional de dominios (3D-DS) es un fenómeno que ocurre cuando dos o más moléculas de un protómero parcialmente desplegado forma homodímeros u oligómeros de mayor orden mediante el intercambio de elementos de sus estructuras secundarias. Estos pueden ser segmentos pequeños de la secuencia, como una única hélice-α o cadena-β, o más grandes tales como varios elementos de estructura secundaria o un dominio completo.

La primera evidencia experimental de este tipo de estructuras es relativamente reciente ya que fue observada por primera vez en 1994 por Eisenberg y sus colaboradores mediante

cristalografía de rayos X con el dímero de la toxina de la difteria (Bennett *et al.*, 1994). Pero su existencia ya se había propuesto en los años 1960 para la ribonucleasa A (Crestfield *et al.*, 1962), curiosamente la proteína en la que más tipos de estructuras entrecruzadas se han descrito hasta la fecha (Mazzarella *et al.*, 1993; Vitagliano *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Canals *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Merlino *et al.*, 2004; Picone *et al.*, 2005; Merlino *et al.*, 2009; Merlino *et al.*, 2012; Fagagnini *et al.*, 2017; Esposito *et al.*, 2019).

Los trabajos de Eisenberg y colaboradores abrieron las puertas a numerosos estudios sobre este tipo de oligómeros, ya que podrían ser los responsables de otorgar características y propiedades no conocidas a las proteínas. Un ejemplo de ello es la proteína de fijación de olores de la mucosa nasal bovina, la cual presenta un sitio de unión en una cavidad central que se crea a partir del 3D-DS (Tegoni *et al.*, 1996; Mazzini *et al.*, 2002). Estos estudios revelaron además que en una proteína capaz de sufrir el 3D-DS debe existir una región flexible o “bisagra” cuyo cambio conformacional permita a la proteína desplegarse parcialmente para plegarse y enterrar su interior hidrofóbico intercambiando elementos de la estructura secundaria con otro monómero abierto similar, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 3 (Jaskólski *et al.*, 2001).

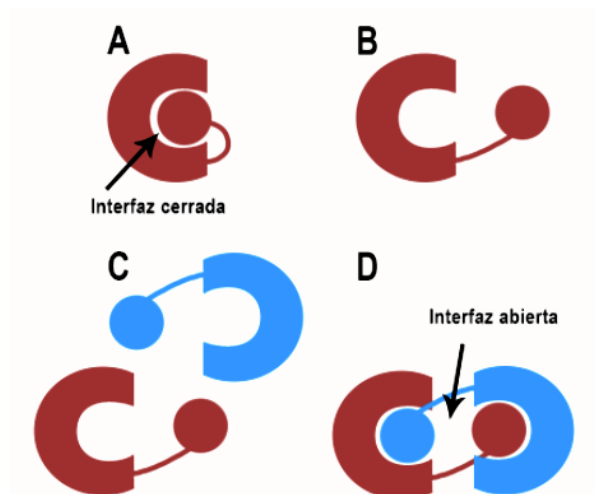


Figura 3. Representación esquemática de la formación de un dímero mediante el 3D-DS. Como se puede observar el lazo bisagra se abre para permitir la formación del dímero mediante la unión con otro monómero abierto.

En la actualidad, existe un número notable de proteínas capaces de sufrir el 3D-DS. En la Tabla 1 recogemos algunas de las proteínas entrecruzadas hasta el año 2020 de las cuales hay estructura depositada en el PDB.

Tabla 1. Estructuras de oligómeros entrecruzados depositadas en el PDB desde 1994 hasta 2020

Proteína	Código PDB	Año	Referencia
Toxina de la difteria	1DDT 1TOX 1SGK	1994 1996 1997	Bennett et al., 1994 Bell et al., 1996 Bell et al., 1997
Proteína OBP	1OBP	1996	Tegoni et al., 1996
Glioxalasa humana	1FRO	1997	Cameron et al., 1997
Ribonucleasa seminal bovina	11BA 1R5C, 1R5D 1Y92, 1Y94	1998 2004 2005	Vitagliano et al., 1998 Merlino et al., 2004 Picone et al., 2005
Ribonucleasa pancreática bovina	1A2W 1H8X 3F8G	1998 2001 2009	Liu et al., 1998 Canals et al., 2001 Merlino et al., 2009
Anticuerpos Cd2 de rata	1A64, 1A6P, 1A7B	1998	Murray et al., 1998
Nitrito reductasa	1BL9	1998	Nurizzo et al., 1998
Epóxido hidrolasa	1CQZ 1DF1, 1QOM 1VJ5	1999 1999 2004	Argidiadi et al., 1999 Crane et al., 1999 Gómez et al., 2004
Endonucleasa VII del fago T4	1EN7	1999	Raaijmakers et al., 1999
Barnasa	1YVS	1999	Zegers et al., 1999
Cianovirina-N	3EZM 1L5B, 1L5E 2RP3 3LHC 4J4C, 4J4D, 4J4E, 4J4F, 4J4G	1999 2002 2008 2010 2013	Yang et al., 1999 Barrientos et al., 2002 Matei et al., 2008 Matei et al., 2010 Leonardus et al., 2013
Spo0A	1DZ3	2000	Lewis et al., 2000
GRB2-SH2	1FYR 2AOA, 2AOB 2H46 6ICH	2000 2005 2007 2019	Schiering et al., 2000 Phan et al., 2005 Benfield et al., 2007 Hosoe et al., 2019
CKS1	1QB3	2000	Bourne et al., 2000
Ribonucleasa A	1A2W 1F0V 1JS0	1998 2001 2002	Liu et al., 1998 Liu et al., 2001 Liu et al., 2002
DSD (sintetizada)	1G6U	2001	Ogihara et al., 2001
Cistatina C humana	1G96 1R4C 1TIJ 3NXO 3SVA	2001 2004 2005 2011 2013	Janowski et al., 2001 Janowski et al., 2004 Janowski et al., 2005 Orlikowska et al., 2011 Orlikowska et al., 2013
PrP	1I4M 3HAF, 3HJ5	2001 2010	Knaus et al., 2001 Seungjoo et al., 2010
Dominio B1 de la proteína G	1K50, 1K51	2001	O'Neill et al., 2001

Tabla 1 (cont.). Estructuras de oligómeros entrecruzados depositadas en el PDB desde 1994 hasta 2020

Proteína	Código PDB	Año	Referencia
Estefina A	1N9J	2001	Staniforth et al., 2001
Nk1	1GP9	2002	Watanabe et al., 2002
L-histidinol deshidrogenasa	1K75	2002	João et al., 2002
GDP-manosa deshidrogenasa	1MFZ, 1MUU, 1MV8	2003	Snook et al., 2003
Chaperona TorD	1NIC	2003	Tranier et al., 2003
EMS16	1UKM	2003	Horii et al., 2003
Aporrepresor Trp	1MI7	2004	Lawson et al., 2004
Rubreritrina	1NNQ	2004	Tempel et al., 2004
NrdH-redoxina	1R7H	2004	Stehr et al., 2004
Guanina desaminasa	1WKQ	2004	Liaw et al., 2004
MukF	1T98	2005	Fennel-Fezzie et al., 2005
NeuB	1XUU, 1XUZ	2005	Gunawan et al., 2005
Hpr	1Y50 3LE5	2005 2015	Sridharan et al., 2005 Fu et al, 2015
P-Ser-Crh	2AK7	2006	Chaptal et al., 2006
Bcl-XL	2B48 4PPI	2006 2015	O'Neill et al., 2006 Rajan et al, 2015
Ciclofilina	2C3B	2006	Limacher et al., 2006
Grifitsina	2GTY, 2GUC, 2GUD, 2GUE, 2GUX	2006	Ziółkowska et al., 2006
HI0395	2HJ1	2006	Ramagopal et al., 2006
CryBb2	1YTQ	2007	Smith et al., 2007
HasA	2CN4	2007	Czjzek et al, 2007
Glicerofosfodiesterasa	2DXL, 2DXN	2007	Jackson et al., 2007
GTPasa Rab27b	2IEY	2007	Chavas et al., 2007
Dominio PDZ	2JWE	2007	Ji et al., 2007
Dominio C-ter cápsida HIV1	2ONT	2007	Ivanov et al., 2007
Regulador RegX3	2OQR	2007	King-Scott et al., 2007
Dominio PDZ de la ZO-2	2OSG 3E17	2007 2009	Wu et al., 2007 Chen et al., 2009

Tabla 1 (cont.). Estructuras de oligómeros entrecruzados depositadas en el PDB desde 1994 hasta 2020

Proteína	Código PDB	Año	Referencia
Dominio PDZ de la ZO-1	2RZC 3CYY	2007 2008	Fanning et al., 2007 Chen et al., 2008
nlpE de <i>E.coli</i>	2Z4H, 2Z4I	2007	Hirano et al., 2007
Immunoglobulin-Like Transcript 1	2OTP	2007	Gao et al., 2007
Dominio CAP-Gly	2Z0W	2007	Saito et al., 2007
SurE	2V4N, 2V4O 4RYT	2008 2015	Pappachan et al., 2008 Mathiharan et al., 2015
NCAM2 Ig1	2VAJ	2008	Rasmussen et al., 2008
Bcl-2	2VTY	2008	Kvansakul et al., 2008
Serpina	2ZNH	2008	Yamasaki et al., 2008
STE20 OSR1 quinasa	3DAK	2008	Seung-Jae et al., 2008
HypA	3A44	2009	Watanabe et al., 2009
Proteína PBP de la abeja	3CYZ, 3CZ0, 3CZ1, 3CZ2, 3D78	2009	Pesenti et al., 2009
Tiorredoxina de <i>Staphylococcus Aureus</i>	3DIE	2009	García-Pino et al., 2009
SARS-CoV	3EBN 3IWM	2009 2010	Zhong et al., 2009 Zhang et al., 2010
Nitrolina	3ENT	2009	Aravind et al., 2009
Dominio N-terminal EMMPRIN	3I84	2009	Luo et al., 2009
CopA	3FRY	2010	Agarwal et al., 2010
Sec3	3HIE	2010	Baek et al., 2010
MAM	3KPH	2010	Liu et al., 2010
Ipah9.8	3L3P	2010	Seyedarabi et al., 2010
Cristalina alfaA	3N3E	2010	Laganowski et al., 2010
Citocromo C de corazón de caballo	3NBS, 3NBT 3WUI	2010 2014	Hirota et al., 2010 Segel et al., 2014
Nucleasa estafilocócica	3OWF	2010	Schlessman et al., 2010
Motivo cistatina (QVVAG) de la estefina B	6IWJ	2019	Nandwani et al., 2019
Microglobulina beta2	2X89 3LOW	2011 2011	Domanska et al., 2011 Liu et al., 2011
Bcl-w	2Y6W	2011	Lee et al., 2011
BamE	2YH9	2011	Albrecht et al., 2011

Tabla 1 (cont.). Estructuras de oligómeros entrecruzados depositadas en el PDB desde 1994 hasta 2020

Proteína	Código PDB	Año	Referencia
FOXP3	3QRF	2011	Bandukwala et al., 2011
alfa-1-antitripsina	3T1P	2011	Yamasaki et al., 2011
EcpA	3QS2	2012	Garnett et al., 2012
Dominio Itk SH2	3S9K	2012	Joseph et al., 2012
Fam96A	3UX2, 3UX3	2012	Chen et al., 2012
Dominio NOD1	4E9M	2012	Berry et al., 2012
Dominio KIX de la RECQL5 humana	4BK0	2013	Kassube et al., 2013
STAU1 humana	4DKK	2013	Gleghorn et al., 2013
Proteasa romboide de <i>E.coli</i>	4HDD	2013	Lazareno-Saez et al., 2013
Mioglobina	3WYO	2014	Lin et al., 2014
Dominio PDZ de la periaxina y la AHNAK2	4CMZ, 4CN0	2014	Han et al., 2014
Dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa	4JZ3, 4OML, 4OMN, 4OMP 4OMM, 4OMQ 4Y92, 5I11 6XVO	2014 2015 2016 2020	Bacarizo et al., 2014 Cámara-Artigas et al., 2015 Cámara-Artigas et al., 2015 Plaza-Garrido et al., 2020
Proteasa GlpG	2MJA	2014	Ghasriani et al., 2014
Lectina de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	4OIT, 4OIZ, 4OKC	2014	Patra et al., 2014
Adenilil ciclasa de <i>Mycobacterium Adenylyl</i>	4P2M, 4P2X	2014	Barathy et al., 2014
Dominio WW	2MDW	2014	Kier et al., 2014
Dominio Bak	4U2U	2014	Brouwer et al., 2014
Citocromo c551 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3X39	2015	Nagao et al., 2015
Citocromo cb562	4AWI	2015	Miyamoto et al., 2015
spaK histidina quinasa	5D9H	2015	Clinton et al., 2015
Dominio SH2 de la Fyn tirosina quinasa	4U17	2015	Huculeci et al., 2015
Citocromo c555	3X15	2015	Yamanaka et al., 2015
ICP27 del virus-1 del herpes	4YXP	2015	Tunnicliffe et al., 2015
DUF1537	4XFM, 4XFR, 4XG0, 4XGJ	2016	Zhang et al., 2016
iso-1-citocromo c de levadura	5KKE, 5KLU	2016	Bowler et al, 2016
RBP4 humana	4ZH6, 4ZH9, 4ZR2	2016	Assar et al., 2016

Tabla 1 (cont.). Estructuras de oligómeros entrecruzados depositadas en el PDB desde 1994 hasta 2020

Proteína	Código PDB	Año	Referencia
Krt10 de PsrP	5JUI	2016	Schulte et al., 2016
Dominio dsh2	5SUZ, 5SUY, 5LNP	2016	Renko et al., 2016
UBR6	5VMD	2017	Muñoz-Escobar et al., 2017
Mutante Q108K:K40D proteína de unión a retinol	5U6G 4ZH6, 4ZH9, 4ZR2	2017 2016	Assar et al., 2017 Assar et al., 2016
SidK de <i>Legionella pneumophila</i>	5UF5	2017	Beyrakhova et al., 2017
Gelsolina	5O2Z	2018	Boni et al., 2018
Dominio StARkin de la Lam2	5YQQ	2018	Tong et al., 2018
CARD	6E27, 6E28	2018	Holliday et al., 2018
Cistatina E	6FK0	2018	Dall et al., 2018
COMT	6AW8	2018	Lovell et al., 2018
YbeA de <i>E.coli</i>	5ZYO	2019	Ko et al., 2019
Dominio HPK1 quinasa	6CQE	2019	Wu et al., 2019
Dominio PX SNX15	6ECM	2019	Chandra et al., 2019
CHEY de <i>Pyrococcus horikoshii</i>	6ER7	2019	Paithankar et al., 2019
Dominio luminal SARAF	6O2W	2019	Kimberlin et al., 2019
Triptófano sintetasa de <i>Streptococcus</i>	6QKY	2019	Michalska et al., 2019
HtaA de <i>Corynebacterium</i>	5JSD	2019	Muraki et al., 2019
Proteína RBP II	6E50, 6E51, 6E5E, 6E5Q	2019	Wu et al., 2019
Arc 2 de la <i>Drosophila</i>	6SIB	2019	Hallin et al., 2019
hCRBP II	6ON5, 6ON8	2019	Ghanbarpour et al., 2019
Monelina	5YCW, 5YCU 5YCW 5XFU	2019 2019 2017	Nandwani et al., 2019 Surana et al., 2019 Surana et al., 2017
M6903 en complejo con la Tim3	6TXZ	2020	Musil et al., 2020
TrpA	6QKY	2020	Michalska et al., 2020
Azurina de <i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	6L1V	2020	Cahyono et al., 2020

Como se puede ver en las más de 100 estructuras de la Tabla 1, todas ellas presentan secuencias diversas, con elementos de estructura secundaria muy variada: hay proteínas cuya estructura secundaria está compuesta solo de hélices- $\alpha$ , como por ejemplo la mioglobina; o solo láminas- $\beta$ , como el dominio SH3; o mezcla de hélice- $\alpha$  y cadena- $\beta$ , como la ribonucleasa. Sin embargo, todas ellas muestran una característica común: la presencia del lazo que tiene la

longitud y flexibilidad suficiente como para actuar de “bisagra” permitiendo la apertura del monómero. De esta manera, el oligómero entrecruzado surge como consecuencia de una ruta alternativa del plegamiento normal de la proteína, debido probablemente a la disminución de la energía que existe entre la nueva especie entrecruzada en comparación con el monómero plegado. En todas estas estructuras entrecruzadas, al superponer la estructura del monómero con su respectivo dímico se observa que las diferencias conformacionales más significativas se encuentran en los lazos bisagra mientras que el resto de los elementos de la estructura secundaria y las interacciones del núcleo hidrofóbico suelen mantenerse (Yang *et al.*, 2005). Un ejemplo de ello es la ribonucleasa A, que puede formar dímeros mediante el intercambio de la primera hélice- $\alpha$  o de la cadena- $\beta$  terminal tal y como se muestra en la Figura 4. Como se puede ver en la Figura 5, la superposición del monómero no presenta apreciables diferencias a excepción de los lazos bisagra (Liu *et al.*, 2001).

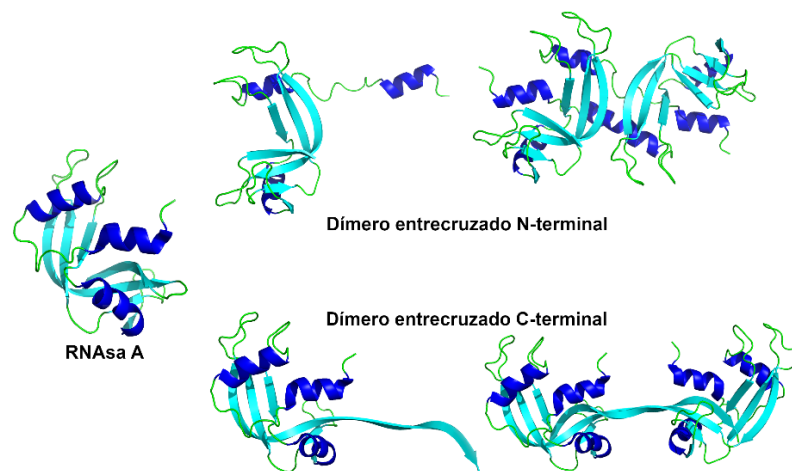


Figura 4. Dímeros entrecruzados de la ribonucleasa A (monómero, PDB: 2E3W; dímero entrecruzado amino terminal, PDB: 1A2W; dímero entrecruzado carboxilo terminal, PDB: 1F0V). En la imagen se pueden observar tanto los monómeros abiertos como las especies entrecruzadas.

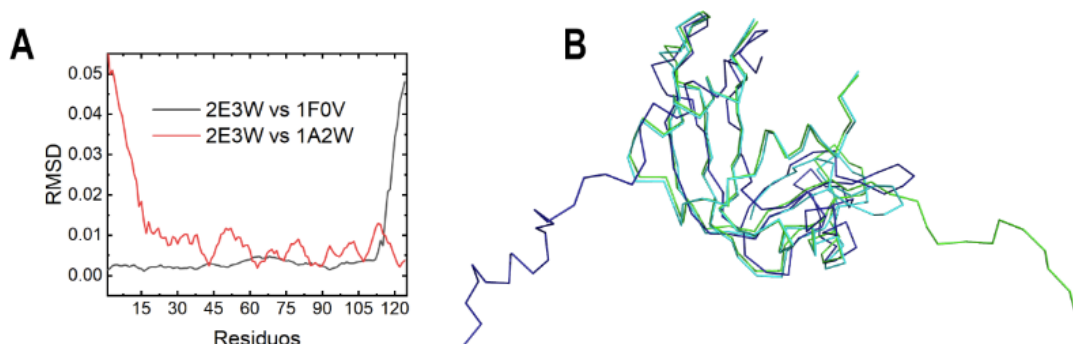


Figura 5. (A) Gráfico de la superposición entre la cadena del monómero de la ribonucleasa A (PDB: 2E3W) con los dímeros entrecruzados (PDB: 1F0V y 1A2W). Como se puede observar, las diferencias más significativas se observan en los extremos amino y carboxilo terminal que se abren para formar el oligómero entrecruzado. (B) Superposición del monómero (cian) con el dímero N-terminal (azul) y C-terminal (verde).



También puede apreciarse que el sitio activo de la ribonucleasa A no se modifica y es por ello por lo que su función no se ve afectada por la formación de las estructuras entrecruzadas, ya que el sitio activo sigue conservado. Otro ejemplo, es la proteína de transporte mioglobina, cuyo dímero entrecruzado mantiene la capacidad de unir oxígeno (Savino *et al.*, 2009; Nagao *et al.*, 2015; Hirota, 2019). En la c-Src-SH3, también se encuentra conservado el núcleo hidrofóbico de la proteína, mientras que las diferencias más significativas se encuentran en el lazo n-Src que actúa como bisagra (Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Bacarizo *et al.*, 2014).

Un estudio computacional realizado para analizar el porqué de la desviación ideal de la simetría de algunos oligómeros entrecruzados mostró que el segmento correspondiente al lazo bisagra era el mayor distorsionador de la simetría en este tipo de estructuras, debido principalmente a que esta región es la única que cambia de forma drástica su estructura secundaria y que, además, suele ser una de las zonas más flexibles de la proteína (Bonjack-Shterengartz *et al.*, 2017). Por ello, es de esperar que cualquier tipo de modificación en la longitud y composición que se produzca sobre este lazo pueda alterar la estabilidad de la proteína y afectar tanto a la formación como a la conformación del dímero entrecruzado (Rousseau *et al.*, 2001). Estudios realizados acortando el lazo bisagra de proteínas como la suc1 (Rousseau *et al.*, 2001), la ckshs1 (Seeliger *et al.*, 2002) o la CD2 (Parker *et al.*, 1998) indican que la longitud de este puede favorecer el 3D-DS (Rousseau *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2007; Nandwani *et al.*, 2017). Esto parece ser debido a que la disminución de la longitud conlleva cambios en la geometría del lazo que impiden que la proteína pueda plegarse correctamente ya que la conformación extendida adoptada en el dímero entrecruzado es energéticamente más favorable. Otro factor que se ha estudiado es la flexibilidad de los lazos bisagra mediante la modificación de ciertos residuos en las secuencias correspondientes a los mismos (Orlikowska *et al.*, 2011; Perumal *et al.*, 2015; Boni *et al.*, 2018; Hosoe *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha estudiado mediante mutagénesis dirigida y dinámicas moleculares el efecto de la introducción de restos prolina en los lazos bisagra de varias proteínas, entre las que se encuentran la ribonucleasa A o la p13<sup>suc1</sup> (Bergdoll *et al.*, 1997; Rousseau *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017). Este residuo fue elegido ya que, además de formar parte de muchos lazos bisagra, su estructura impone cierta rigidez y limitaciones a la geometría de estos, lo que sugiere que la prolina puede promover la formación de oligómeros entrecruzados facilitando la apertura de los lazos y el intercambio de los elementos de estructura secundaria.

De especial interés son los estudios de intercambio de secuencias de lazos bisagras entre proteínas que forman dímeros entrecruzados con otras que no los forman y viceversa. Muchos de los estudios de entrecruzamiento de dominios se han llevado a cabo con la ribonucleasa A, dada su facilidad para formar diferentes tipos de oligómeros entrecruzados. Esta enzima se ha utilizado como modelo para comprobar la importancia de los distintos lazos bisagra que están involucrados en el 3D-DS (Crestfield *et al.*, 1962; Liu *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 2005; Lopez-Alonso *et al.*, 2010). En uno de los estudios más recientes se ha construido una proteína quimera intercambiando el lazo que se encuentra entre las dos hebras- $\beta$  terminales por un segmento equivalente, pero más corto, de la proteína onconasa (Esposito *et al.*, 2019). Esta quimera mantenía la capacidad de formar oligómeros en condiciones desnaturalizantes al igual que la ribonucleasa A, pero, además, podía formar una cantidad significativa de dímeros entrecruzados y agregados superiores en condiciones nativas. Otro ejemplo de construcción de proteínas quimeras es el intercambio del lazo bisagra del dímero entrecruzado de la cistatina B (secuencia: QVVAG) con uno de los giros- $\beta$  de la proteína monelina (Nandwani *et al.*, 2019). La cistatina B es bien conocida por su capacidad para formar fibras amiloides y sufrir 3D-DS (Perlenfein *et al.*, 2017A; Perlenfein *et al.*, 2017B; Chrabąszczewska *et al.*, 2019; Taube *et al.*, 2019; Zalar *et al.*, 2019) mientras que la monelina no forma especies entrecruzadas. El resultado de este experimento fue un dímero entrecruzado tal y como se muestra en la Figura 6.

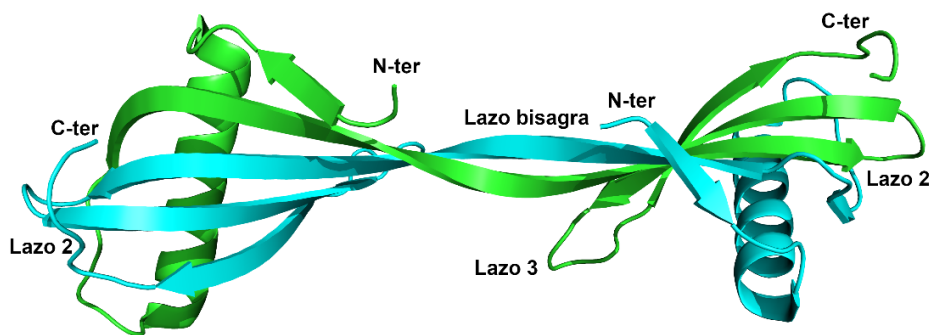


Figura 6. Estructura del dímero entrecruzado de la quimera de la monelina (PDB: 5YCU). El lazo bisagra está formado por la secuencia QVVAG de la cistatina B y los dos protómeros involucrados en el oligómero se muestran en color cian y verde.

A pesar de la información estructural obtenida hasta ahora, no está claro el mecanismo por el cual una proteína plegada en su forma natural se despliega parcialmente dando lugar a la formación de estructuras entrecruzadas. En general, estas estructuras suelen formarse tras un cambio de las propiedades fisicoquímicas que afectan a la estabilidad de la proteína, y que en determinadas condiciones puede provocar un “mal plegamiento” de la misma, bien formando oligómeros entrecruzados u otros agregados como las fibras amiloides (Dobson *et al.*, 1999;

Dobson *et al.*, 2002; Chiti *et al.*, 2006; Knowles *et al.*, 2014; Chiti *et al.*, 2017; Iadanza *et al.*, 2018; Pande *et al.*, 2019).

### 1.2.1 Características estructurales

Las proteínas que presentan 3D-DS suelen formar dímeros entrecruzados, pero también, aunque es menos frecuente, forman trímeros o tetrámeros. También puede darse el intercambio de diferentes elementos de estructura secundaria de la proteína, como es el caso de la ribonucleasa A (Liu *et al.*, 2001; Merlino *et al.*, 2004; Gotte *et al.*, 2004; Koharudin *et al.*, 2013). Por ello, según como se asocien los monómeros, las estructuras entrecruzadas se pueden clasificar en: estructuras diméricas, oligoméricas o poliméricas (Shoshana *et al.*, 2015). En la Figura 7 se muestran varios ejemplos de estos oligómeros. A su vez, según el tipo de segmento intercambiado, los oligómeros entrecruzados se pueden clasificar como tipo S, D y M. En el tipo S se intercambia solo un elemento de estructura secundaria, mientras que en el tipo D se intercambia un dominio completo de la proteína. Por último, en el tipo M se intercambian varios elementos de la estructura secundaria, pero sin constituir un dominio de la proteína.

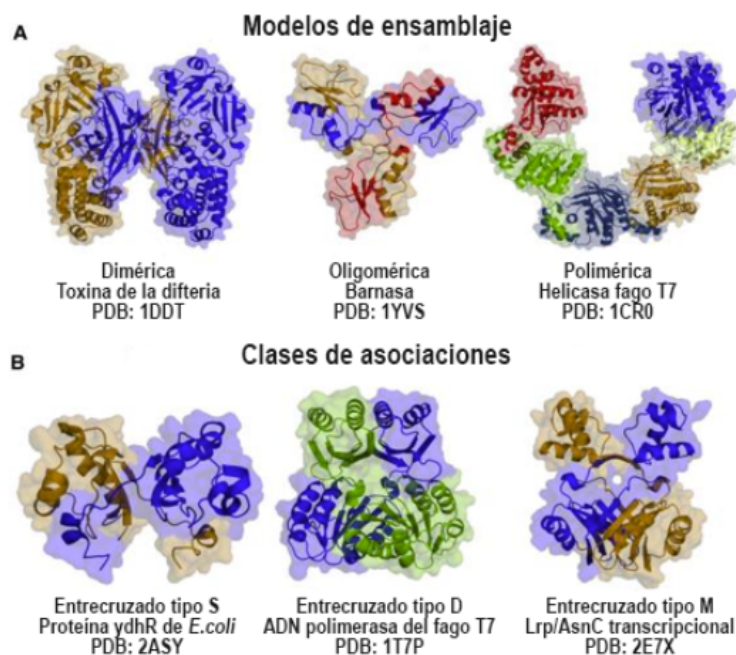


Figura 7. (A) Ejemplos de las distintas estructuras cuaternarias de los oligómeros entrecruzados. (B) Ejemplos de entrecruzados en sus distintos grupos: tipo S, en el que se intercambian segmentos pequeños de polipéptidos que no se corresponden con un dominio modular; Tipo D, en el cual se intercambian dominios estructurales, dando lugar a estructuras multidominio, y tipo M que comprende asociaciones que presentan un patrón entrelazado más complejo, en el que las subunidades pueden intercambiar segmentos pequeños y dominios, o múltiples segmentos no contiguos (Shoshana *et al.*, 2015).

La nomenclatura usada para describir las características conformacionales de estos oligómeros se mantiene de unos a otros a pesar de sus diferencias. De esta manera, la estructura monomérica se define como *monómero cerrado* mientras que el dímero entrecruzado se denomina *monómero abierto* (Figura 8). En ambas conformaciones existe lo que se denomina *interfaz primaria* y *secundaria*: la primera de ellas, también denominada cerrada, se observa en los monómeros mientras que la interfaz secundaria o abierta se encuentra en los monómeros que forman parte del dímero entrecruzado (Bennett *et al.*, 1995).

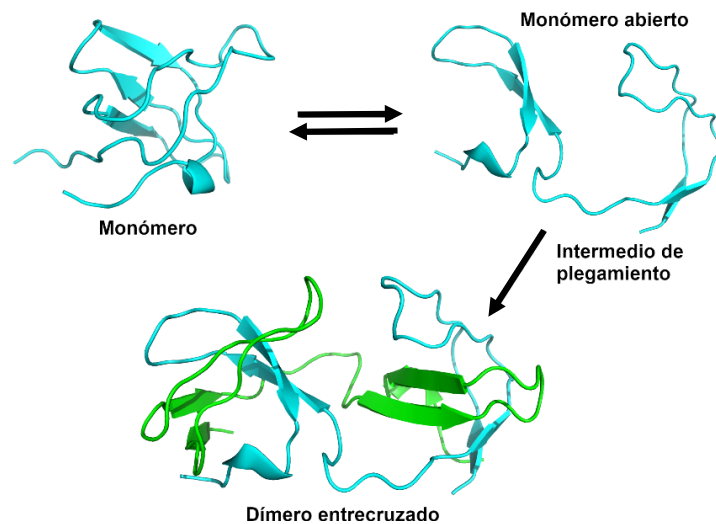


Figura 8. Estructura cerrada (monómero) y monómero abierto del dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa. El monómero abierto se puede asociar con otro monómero del mismo tipo para dar lugar al dímero entrecruzado.

### 1.2.2 Papel funcional del entrecruzamiento de dominios

Que exista un considerable número de proteínas capaces de sufrir 3D-DS indica que dicho proceso puede tener una importancia biológica *in vivo*. De hecho, existen proteínas cuya conformación activa y funcional es la del dímero entrecruzado y, además, es la única que se conoce a nivel estructural, como por ejemplo la P<sub>II</sub>-NAGK, la CutA1 y el dominio PDZ2 de la ZO1 y ZO2 (Llacer *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Fanning *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011; Bagautdinov *et al.*, 2014). Además, es común observar 3D-DS en la interfaz de los extremos amino y carboxilo terminal en proteínas que presentan simetría interna rotacional como en la estructura de barril TIM o en el plegamiento de trébol- $\beta$  (Tenorio *et al.*, 2020).

Una hipótesis para la aparición del 3D-DS en ciertas proteínas monoméricas es su potencial papel en el mecanismo de evolución a proteínas oligoméricas. De esta manera, se pueden

obtener proteínas de mayor tamaño, más estables y que además presentan funciones más complejas si se comparan con algunas de las pequeñas proteínas de las que proceden (Ali *et al.*, 2005; Yadid *et al.*, 2007; Gronenborn, 2009; Yadid *et al.*, 2011; Rousseau *et al.*, 2012; Sziliagy *et al.*, 2012; Fagagnini *et al.*, 2017; Bohl *et al.*, 2018). Además, hay algunas proteínas que utilizan este tipo de estructuras como mecanismo de autoensamblaje (Baker *et al.*, 2016). Existen proteínas para las cuales hay evidencia de que el 3D-DS regula, e incluso mejora, la capacidad funcional de estas, como por ejemplo: la onconasa, cuya capacidad citotóxica dentro de la célula aumenta cuando la proteína se encuentra formando un dímero entrecruzado (Fagagnini *et al.*, 2017; Esposito *et al.*, 2019); el dominio C-terminal de la cápsida del virus VIH-1, en el que se observan agregados supra-moleculares (Ivanov *et al.*, 2005; Sawaya *et al.*, 2007); el dominio de la FOXP2 (Stroud *et al.*, 2006);  $\alpha$ -IPMS de la *Mycobacterium tuberculosis* (Koon *et al.*, 2004); el dominio barril TIM de la TrpA (Michalska *et al.*, 2020); o la ribonucleasa A (Piccoli *et al.*, 1988). También se ha demostrado que el 3D-DS puede rescatar funciones que se han perdido cuando una proteína ha sufrido algún tipo de mutación irreversible, como es el caso del mutante NF- $\kappa$ B p50 (Chirgadze *et al.*, 2004).

Otro papel importante de los oligómeros entrecruzados es la formación de nuevos sitios alostéricos en las enzimas. Existen varios ejemplos que apoyan esta idea: la endonucleasa de restricción de tipo II SgrAI (Park *et al.*, 2010); la ribonucleasa seminal bovina (Vitagliano *et al.*, 1999) o la SurE de la *Salmonella typhimurium* (Mathiharan *et al.*, 2015; Mathiharan *et al.*, 2018). Por ello se podría suponer que el 3D-DS podría intervenir de alguna manera en la modulación de la actividad catalítica de ciertas enzimas.

El 3D-DS se ha relacionado también con proteínas de señalización, movimiento y crecimiento celular (Chen *et al.*, 2018; Bollati *et al.*, 2019), como el dominio luminal SARAF (Kimberlin *et al.*, 2019), y con proteínas relacionadas con la respuesta inmune como las pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Park, 2019; Kumari *et al.*, 2020). Entre estas proteínas se encuentran la Bax, Bak y la Bcl-XL, que son indispensables en la apoptosis celular. Estos reguladores de la apoptosis pueden formar dímeros entrecruzados funcionales mediante 3D-DS.

Pero sin duda, de todos los posibles papeles descritos hasta ahora, el más analizado y estudiado es el desempeñado por el 3D-DS en la formación de fibras amiloides (Lee & Eisenberg, 2003; Nilsson *et al.*, 2004; Stroud *et al.*, 2012; Lenton *et al.*, 2017; Cohen *et al.*,

2018). Es interesante señalar que muchas de las proteínas en las cuales se ha descrito 3D-DS también forman fibras amiloides (Janowski *et al.*, 2001; Jaskolski, 2001; Liu *et al.*, 2001). En teoría esta coincidencia se debe al propio proceso de formación de estos oligómeros, en el que el cual, la proteína monomérica debe abrirse a través del lazo que actúa como bisagra y asociarse con otro u otros monómeros abiertos. En ciertas circunstancias estos podrían formar estructuras entrecruzadas u oligómeros de mayor tamaño como las fibras amiloides. Por ejemplo, en la microglobulina  $\beta$ -2 humana se ha demostrado que el crecimiento de las fibras tiene lugar a partir de la formación de oligómeros intermedios que pueden ser tanto dímeros como hexámeros (Karamanos *et al.*, 2019). Sin embargo, esto no quiere decir que las proteínas capaces de adoptar la estructura de oligómero entrecruzado sufran siempre amiloidogénesis, pero sí que es importante considerar la potencial relación entre la formación de estos y el plegamiento anómalo que se produce a la hora de, por ejemplo, formar las fibras amiloides. En ambos procesos se debe dar un desplegamiento parcial o total de la proteína antes de proceder con el proceso de agregación.

Entender el proceso de formación de estructuras entrecruzadas es importante dado que podría desempeñar algún papel funcional (Bennett *et al.*, 1995). Pero, dadas las dificultades para obtener información estructural a nivel atómico de las fibras amiloides, estudiar las estructuras entrecruzadas es una alternativa para comprender qué circunstancias favorecen el proceso de mal plegamiento, conducente a la formación de oligómeros entrecruzados y/o fibras amiloides. Un ejemplo de esto es un estudio de oligomerización del dominio c-Src-SH3 en presencia de osmolitos protectores (TMAO, sacarosa, sorbitol y sarcosina) y desnaturalizantes (urea y cloruro de guanidinio) (Mondal *et al.*, 2018). El estudio incluía simulaciones de dinámicas moleculares para determinar la energía libre superficial asociada a la etapa de formación del dímero entrecruzado y a la nucleación y crecimiento de las fibras amiloides. Las simulaciones mostraron que el proceso tiene lugar en varias etapas: en la primera etapa, el monómero de la c-Src-SH3 se despliega completamente para que, durante la segunda etapa, el lazo RT de los monómeros se entrecruce dando lugar al dímero entrecruzado a través de la apertura del lazo n-Src. También se observó que los desnaturalizantes disminuían y aumentaban la barrera energética de la primera y segunda etapa, respectivamente, mientras que los osmolitos causaban el efecto contrario. De esta manera, el uso de los desnaturalizantes aumenta la tasa de formación de los oligómeros, aunque los dímeros se encuentran desestabilizados con respecto a los monómeros; mientras que los osmolitos disminuyen la tasa de formación del dímero,

aunque este se ve estabilizado frente a los monómeros, siendo estos resultados aplicables a la etapa de formación, crecimiento y elongación de las fibras amiloides.

### 1.3 Fibras amiloides

Las fibras amiloides son estructuras ordenadas formadas habitualmente por proteínas solubles que forman agregados de fibras insolubles y resistentes a la degradación a partir de un proceso de mal plegamiento (Rambaran *et al.*, 2008). Aunque se les relaciona con numerosas enfermedades, también existen fibras amiloides que cumplen un papel funcional, por ejemplo, algunas bacterias las utilizan como bloques de construcción para proteger su matriz extracelular de agentes químicos o mecánicos externos (Maury, 2009; Bleem *et al.*, 2017; Bleem *et al.*, 2018). Existen además algunos estudios que indican que el amiloide de la proteína Pmel 17 regula la biosíntesis de melanina en mamíferos acelerando la polimerización covalente de las moléculas que la forman (Berson *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2008). Las telas de araña también están formadas por fibras amiloides y por ello son objeto de estudio de numerosos autores (Kenney *et al.*, 2002; Slotta *et al.*, 2007; Hane, 2013; Humenik *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2019; Abelein *et al.*, 2020).

La información estructural a alta resolución de fibras amiloides es muy limitada debido a que se tratan de agregados muy insolubles y heterogéneos y que, por tanto, no se pueden cristalizar. Sin embargo, los avances tecnológicos en técnicas como la microscopía electrónica, la resonancia magnética nuclear en estado sólido y la resonancia paramagnética electrónica han permitido caracterizar algunas de las proteínas capaces de sufrir amiloidogénesis. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, las proteínas prión Sup35, el amiloide  $\beta$  de la enfermedad del Alzheimer, la  $\alpha$ -sinucleína del Parkinson o la microglobulina  $\beta$ -2 (Torok *et al.*, 2002; Toyama *et al.*, 2011; Jadoul *et al.*, 2016). La microscopía de fuerza atómica y electrónica han proporcionado también información acerca de la estructura macromolecular de los amiloides, mostrando que las fibras son largas, rectas y sin ramificaciones (Figuras 9 y 10) (Ghahghaei *et al.*, 2009). Estas además están formadas por unidades individuales denominadas protofilamentos que pueden variar en número pero que se enrollan unos con otros alrededor de un núcleo central formando las fibras maduras (Jiménez *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 2000; Zurdo *et al.*, 2001). La morfología de la fibra puede variar según la manera en la que se agrupan y alineen las moléculas de proteína, pero en todas ellas se observa un patrón que se repite. En

ocasiones, pequeñas fibras pueden actuar como semilla a partir de la cual crecen otras fibras de mayor tamaño y longitud (O’Nuallain *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2017).

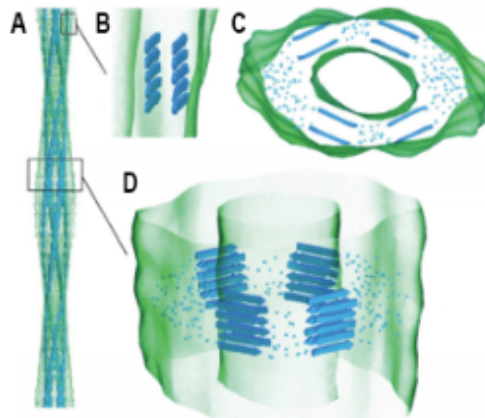


Figura 9. Modelo de la estructura macromolecular de las fibras amiloides (Ghahghaei A. et al, 2009). (A) Vista general de la fibra, se pueden observar los protofilamentos enrollados unos sobre otros alrededor de un núcleo común. (B) Vista lateral del espacio que queda entre las láminas de los protofilamentos. (C) Sección transversal de la fibra. (D) Vista lateral de la fibra alrededor del núcleo.

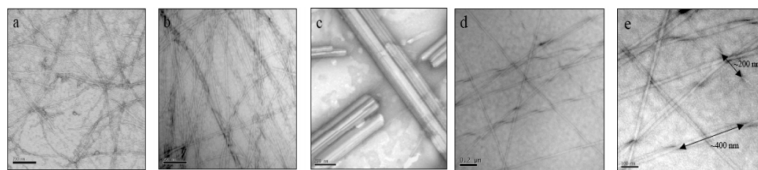


Figura 10. Imágenes de las fibras amiloides tomadas mediante microscopía electrónica (Karen E. *et al.*, 2009). Como se puede observar, estas fibras presentan distinta morfología y tamaño.

Las diferencias morfológicas observadas son de gran importancia, ya que en algunos casos se han encontrado proteínas que presentan polimorfismo en las fibras a pesar de provenir de un precursor común, como en el caso del amiloide  $\beta$  A $\beta$ -40 (Petkova *et al.*, 2005) o la microglobulina  $\beta$ -2 (Iadanza *et al.*, 2018).

En cuanto a su estructura molecular, las fibras amiloides están formadas principalmente por láminas- $\beta$ , que pueden ser paralelas o antiparalelas. Existen distintos modelos estructurales según la distribución de las láminas: lámina- $\beta$  cruzada (Geddes *et al.*, 1968), sándwich- $\beta$ , solenoide- $\beta$  (Eisenberg *et al.*, 2012) o la hélice- $\beta$ . Esta última se ha propuesto como una posible estructura general de las fibras amiloides. En este caso, una o más láminas- $\beta$  extendidas se enrollan de manera helicoidal alrededor de un núcleo hueco, siendo la primera estructura observada en los amiloides de un péptido de secuencia KLKLE-LELELG (Lazo *et al.*, 1997). En la Figura 11 se muestra la estructura de las fibras del amiloide  $\beta$  del Alzheimer.



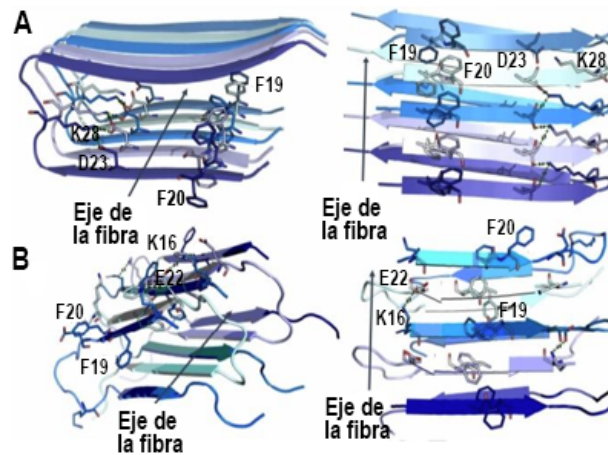


Figura 11. (A) Estructura del amiloide  $\beta$  del Alzheimer (código PDB: 2BEG) (Luhrs *et al.*, 2005) y (B) estructura del mutante D23N del amiloide  $\beta$  del Alzheimer en disposición antiparalela (código PDB: 2LNQ) obtenida mediante RMN (Qiang *et al.*, 2012).

Normalmente, estas láminas- $\beta$  son perpendiculares al eje de la fibra y los hidrógenos de la cadena principal se unen paralelamente a dicho eje. De esta manera, suele quedar un espacio de aproximadamente 4,7 Å que es visible en las imágenes de las fibras obtenidas mediante difracción de rayos X (Dobson *et al.*, 1999; Vernaglia *et al.*, 2004).

La información estructural obtenida mediante cristalografía se ve limitada a pequeños péptidos que pueden cristalizar y formar las fibras al mismo tiempo. El grupo de investigación de Eisenberg en la Universidad de California es el que más estructuras cristalográficas de pequeños péptidos capaces de formar amiloides ha resuelto. Algunos de estos péptidos son derivados de proteínas como: Sup35 (Balbirnie *et al.*, 2001; Sawaya *et al.*, 2007), transtiretina (Saelices *et al.*, 2015), amiloide  $\beta$  (Colletier *et al.*, 2011) e insulina (Ivanova *et al.*, 2009). Cabe destacar que todos estos estudios se han llevado a cabo con amiloides que han sido obtenidos *in vitro* a partir de ciertos péptidos o proteínas recombinantes y bajo unas condiciones determinadas.

Algunos autores afirman que la formación de amiloides ocurre cuando una proteína globular empieza a desplegarse bajo unas condiciones en las cuales las interacciones no covalentes son favorables (Chiti *et al.*, 1999). Estas condiciones deben de ser cercanas a la desnaturalización de la proteína, de manera que la apertura del monómero se vea favorecida, pero sin llegar al punto en el cual la proteína agrega de forma desordenada. Por ello, manipulando ciertos factores experimentales como pH, temperatura, agitación, presión o la concentración de sal, se pueden conseguir fibras amiloides bajo condiciones controladas. También, la adición de cationes metálicos, como el cobre, o de detergentes y disolventes orgánicos puede favorecer la

formación de las fibras como por ejemplo en la microglobulina  $\beta$ -2 humana (Benseny-Cases *et al.*, 2019).

Existen numerosos estudios tanto experimentales como computacionales que han analizado el efecto que producen algunos cosolventes como el cloruro de guanidinio, la urea, ciertos osmolitos o alcoholes fluorados como el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) o el 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) en el plegamiento de proteínas modelo. Entre estas proteínas, se encuentran los dominios SH3 de la c-Src tirosina quinasa (Mondal *et al.*, 2019; Reddy *et al.*, 2020), de la Fyn tirosina quinasa (Hamada *et al.*, 2000), de la  $\alpha$ -espectrina (Viguera *et al.*, 1996) y de la Lck (Schweimer *et al.*, 2002). De los disolventes orgánicos y en comparación con otros alcoholes fluorados, los más utilizados son el TFE y el HFIP (Yamaguchi *et al.*, 2005; Sekhar *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2014; Kamiie *et al.*, 2020). El TFE es capaz de inducir cambios conformacionales en las proteínas dando lugar a intermedios de transición parcialmente desplegados (Viguera *et al.*, 1996; Chiti *et al.*, 1999; Schweimer *et al.*, 2002; Zerovnik *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2010; Sekhar *et al.*, 2011; Chatani *et al.*, 2012; Dammers *et al.*, 2015; Di Carlo *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016; Neira *et al.*, 2017; Kamiie *et al.*, 2020), lo que conduce en ocasiones a la formación de fibras amiloides (Chiti *et al.*, 2000). Afecta a la polaridad del disolvente favoreciendo las interacciones electrostáticas, estabilizando las estructuras secundarias como las hélices- $\alpha$ , los giros- $\beta$  y las horquillas- $\beta$  y desestabilizando la estructura terciaria de las proteínas (Buck *et al.*, 1998). Ello tiene también un efecto en la agregación de las proteínas globulares y la formación de agregados de mayor orden como las fibras amiloides, ya que el TFE es capaz de formar puentes de hidrógeno con las proteínas, reduciendo los enlaces intramoleculares de las mismas y aumentando la tendencia de estas a formar agregados (Sönnichsen *et al.*, 1992). Se han obtenido fibras amiloides en presencia de TFE de proteínas como la SOD1 (Kumar *et al.*, 2018), cristalina  $\alpha$  (Khan *et al.*, 2015; Garvey *et al.*, 2017), quimotripsina  $\alpha$  (Pallares *et al.*, 2004), estefina B (Zerovnik *et al.*, 2009), microglobulina  $\beta$ -2 (Yamamoto *et al.*, 2008; Chatani *et al.*, 2012), sinucleína  $\alpha$  (Di carlo *et al.*, 2016), macroglobulina  $\alpha$ -2 (Rehman *et al.*, 2017) o la PI3K SH3 (Lim *et al.*, 2010). El estudio en distintas proteínas del efecto de diferentes condiciones permite investigar y comprender las bases moleculares de la formación de las fibras amiloides.

Está claro que el mecanismo por el cual se forman los depósitos de amiloides es consecuencia de la amiloidogénesis, pero lo que no se sabe con certeza es si existe algún agente detonador del proceso o si es un evento secundario. El mecanismo de formación de las fibras

amiloides se puede observar en la Figura 12 y presenta, de forma general, una cinética de agregación sigmoideal que consta de una etapa lenta que es dependiente del proceso de nucleación (Jarrett *et al.*, 1993). La nucleación primaria durante la inducción es una etapa clave en el proceso y consiste en la asociación de monómeros parcialmente desplegados de proteína presentes en la disolución. Inicialmente, esta etapa no se encuentra favorecida termodinámicamente hasta que se alcanza un tamaño crítico a partir del cual la adición de monómeros o de oligómeros de mayor tamaño a las fibras es energéticamente favorable (Schmit *et al.*, 2011; Hasecke *et al.*, 2018; Morel *et al.*, 2019). Normalmente, durante este proceso se forman oligómeros de varios tamaños y distintos intermedios de plegamiento debido a procesos secundarios como por ejemplo la fragmentación de las fibras o la nucleación sobre la superficie de las fibras ya formadas (Cohen *et al.*, 2011). Durante la elongación o crecimiento, los monómeros libres presentes en la disolución interactúan con los extremos de las fibras y sufren los cambios conformacionales necesarios para adaptarse a la estructura a través de una etapa rápida y exponencial. Este mecanismo continúa hasta que la fibra amiloide está completamente formada y se alcanza por completo el equilibrio en la disolución durante la fase de saturación.

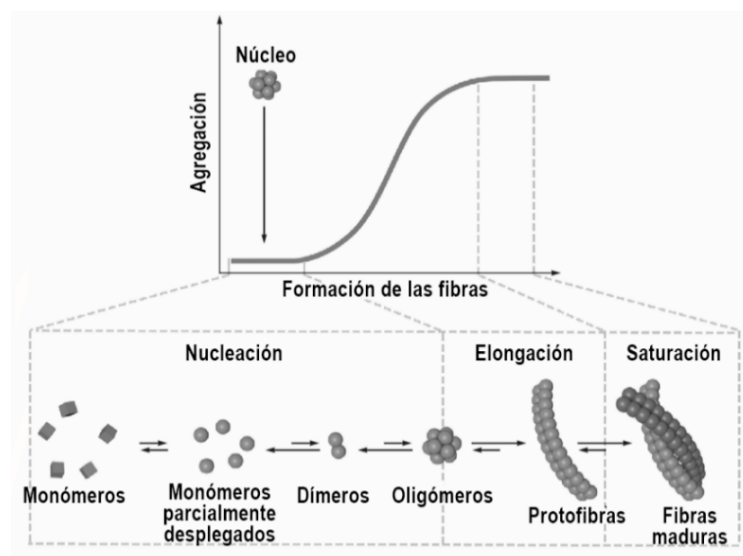


Figura 12. Etapas de la formación de las fibras amiloides. Las fibras siguen una cinética sigmoideal que consta de las fases de nucleación, elongación y saturación (Kulikova *et al.*, 2015).

## 1.4 Dominios SH3

Los dominios modulares son elementos estructurales de entre 30 a 150 aminoácidos que se caracterizan por presentar un núcleo globular estable por sí mismos y que además son capaces

de ejercer su función de forma independiente al conjunto de la proteína de la que proceden. Existen distintas clases de dominios modulares, pero los que tienen una mayor representación en el genoma humano son los módulos de reconocimiento de secuencias ricas en prolina (SRP) (Zarrinpar *et al.*, 2000; Mayer, 2001; Macias *et al.*, 2002; Zarrinpar *et al.*, 2003). Dentro de los SRPs, el dominio SH3 fue el primero en ser caracterizado y además es el más abundante en los distintos proteomas. Estos dominios forman parte de un gran número de proteínas que se encuentran presentes en organismos eucariotas, como por ejemplo la Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like (Eps), miosina, la subunidad reguladora Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), la Auxin-binding protein (Abp1), la Myosin tail region-interacting (MTI1), la Growth factor receptor-bound (Grb2), espectrina, o las tirosinas quinasas: Src, Fyn, oncogén Abelson murine leukemia viral (Abl), Yes, C-terminal Src kinase (Csk), Lyn, Hematopoietic cell kinase (Hck), Leukocyte C-terminal Src kinase (Lck), oncogén Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) (Kay *et al.*, 2000; Zarrinpar *et al.*, 2003).

#### 1.4.1 Importancia biológica de los dominios SH3

Los dominios SH3 desarrollan funciones muy importantes en el organismo. Son capaces de llevar a cabo mecanismos de regulación dentro de la célula, entre ellos los de señalización y los de crecimiento celular. También funcionan como sitios de anclaje para el reclutamiento de sustratos y la formación de nuevos complejos supramoleculares (Figura 13).

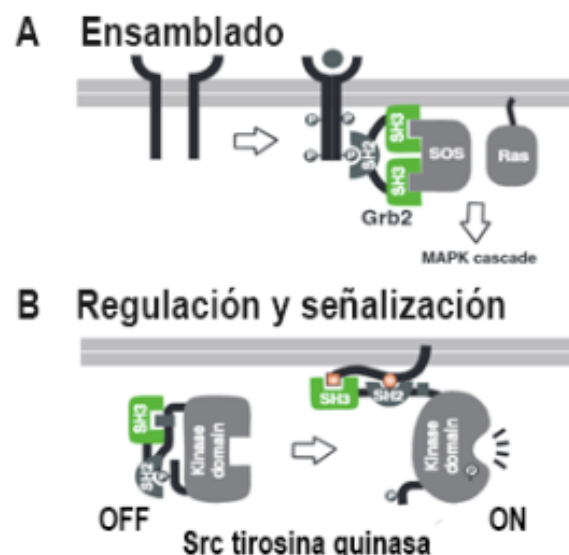


Figura 13. Roles funcionales de los dominios SH3. (A) Papel de anclaje de los dominios SH3. (B) Rol de regulación entre la forma activa e inactiva de las tirosina quinasas (Zarrinpar *et al.*, 2003).

Están relacionados con un gran número de enfermedades como el cáncer (Src, Grb2), el síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (Lyn, Hck), procesos inflamatorios (p47<sup>phox</sup>), osteoporosis (Src) o alergia y asma (Lyn) (Dalgarno *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2016).

Las proteínas Src y Fyn forman parte de la familia de las Src tirosina quinasas (TQ), que está constituida por las proteínas: Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck, Blk, Lyn y Frk (Sicheri *et al.*, 1997; Kay *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2001). Este tipo de quinasas se han estudiado frecuentemente a partir de sus dominios. De hecho, la nomenclatura otorgada a los dominios SH proviene de Src homology, ya que se describieron por primera vez en la Src TQ (Pawson, 1988). Las tirosina quinasas son proteínas de señalización que se encuentran ancladas a la membrana celular, desde donde ayudan a comunicar las señales de varios receptores de proteínas a otras distintas que activan los motores del crecimiento celular y la síntesis de proteínas. Las tirosina quinasas transmiten sus mensajes mediante la adición de grupos fosfato a los aminoácidos tirosina que actúan como receptores en otras proteínas que participan también en el control, comunicación y crecimiento celular, activándolas para realizar sus tareas (Dalgarno *et al.*, 1997). Las proteínas de la familia Src TQ poseen un dominio SH2 y otro SH3 unidos al dominio catalítico, nombrado en ocasiones como SH1 (Pawson, 1988). Las interacciones intramoleculares de estos dominios mantienen la quinasa en una conformación inactiva. Estas interacciones auto-inhedoras pueden ser interrumpidas por otros ligandos externos de los dominios SH2 y SH3, lo que produce la activación de la quinasa. Nuestro grupo de investigación ha contribuido a ampliar notablemente la información estructural disponible de los dominios SH3 de la c-Src y Fyn TQ, ya que previo a nuestros estudios sólo existían unas pocas estructuras de estos dominios (Musacchio *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1996).

#### 1.4.2 Estructura, plegamiento y estabilidad de los dominios SH3

Los dominios SH3 tienen un tamaño pequeño, de unos 60 aminoácidos y generalmente son fáciles de expresar y purificar mediante técnicas convencionales. Otra característica muy importante, es que pueden ser cristalizados de forma individual sin necesidad de que la proteína de la cual forman parte esté presente, por lo que se puede analizar su estructura fácilmente. Además, han sido caracterizados y existen numerosos estudios de plegamiento en bibliografía realizados con el dominio SH3 de la tirosina quinasa Fyn (Plaxco *et al.*, 1998; Northey *et al.*, 2002; Korzhnev *et al.*, 2004; Korzhnev *et al.*, 2006; Matsumura *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017),

c-Src (Grantcharova *et al.*, 1997; Grantcharova *et al.*, 1998; Filimonov *et al.*, 1999; Bacarizo *et al.*, 2014) y Abl (Gosser *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2007). Especialmente en el caso del dominio SH3 de la Fyn, se ha estudiado tanto experimental como computacionalmente el efecto de ciertas mutaciones puntuales tanto en el núcleo hidrofóbico como en residuos cargados superficiales (Maxwell *et al.*, 1998; Mittermaier *et al.*, 2004; Schweiker *et al.*, 2006).

Las primeras estructuras obtenidas de este tipo de dominios se determinaron mediante la técnica de RMN para los dominios de la  $\alpha$ -espectrina y de la PI3K (Musacchio *et al.*, 1992; Koyama *et al.*, 1993). Los dominios SH3 presentan una estructura característica tipo barril- $\beta$ , formada por 5 hebras antiparalelas conectadas mediante tres lazos y una pequeña hélice  $3_{10}$ . Estas hebras se denominan  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  y  $\beta_5$  y están dispuestas en dos láminas- $\beta$  ortogonales entre sí. Una de estas láminas está formada por las hebras  $\beta_2$ - $\beta_1$ - $\beta_5$  y es de menor tamaño, mientras que la otra es más grande y está formada por las hebras  $\beta_2$ - $\beta_3$ - $\beta_4$ . Los tres lazos que unen las dos hebras antiparalelas presentan una longitud variable y se denominan lazo RT, n-Src y distal. De esta manera, el lazo RT une las hebras  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , el n-Src las  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , el distal las  $\beta_3$  y  $\beta_4$  y la hélice  $3_{10}$  conecta las hebras  $\beta_4$  y  $\beta_5$ . El núcleo de plegamiento de los dominios SH3 se encuentra en la horquilla- $\beta$  que forman las hebras  $\beta_3$  y  $\beta_4$  y rodea tanto a la hélice  $3_{10}$  como al lazo distal, por tanto, la formación de esta horquilla es un factor limitante y fundamental del proceso de plegamiento de este tipo de proteínas. Normalmente y en la mayoría de los casos, el núcleo hidrofóbico de estos dominios se encuentra muy conservado de unos a otros, sin embargo, existen diferencias conformacionales significativas en los distintos lazos debido principalmente a la alta flexibilidad de estos.

La estabilidad de estos dominios se ha estudiado mediante técnicas espectroscópicas y calorimétricas (Martínez *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1999; Sadqi *et al.*, 1999; Casares *et al.*, 2004; Casares *et al.*, 2007; Bacarizo *et al.*, 2014). Los dominios SH3, en general, tienen un equilibrio de desplegamiento que se ajusta a un modelo de dos estados simple sin mostrar intermedios de plegamiento y, en la mayoría de los casos, es reversible (Troilo *et al.*, 2018; Stadmiller *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos dominios SH3 presentan intermedios de plegamiento, como por ejemplo el dominio Fyn-SH3. El plegamiento de este dominio se puede describir mediante un modelo de dos estados, pero los mutantes Gly48Met, Gly48Val y Ala39Val/Asn53Pro/Val55Leu presentan al menos un intermedio estable identificado mediante RMN (Korzhev *et al.*, 2004; Ollerenshaw *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2017). También el dominio SH3 de la PI3K en presencia de sales como el sulfato amónico presenta intermedios de

plegamiento, describiéndose el proceso con un modelo de cuatro estados (Dasgupta *et al.*, 2012; Aghera *et al.*, 2017).

La estructura y el estado de oligomerización de los dominios SH3 han sido analizados por numerosos grupos de investigación, incluido el nuestro, que ha determinado más de 50 estructuras de dominios SH3 libres y en presencia de secuencias ricas en prolina (Cámara-Artigas *et al.*, 2007; Casares *et al.*, 2007; Martín-García *et al.*, 2007; Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Palencia *et al.*, 2010; Cámara-Artigas *et al.*, 2011; Martín-García *et al.*, 2012; Bacarizo *et al.*, 2013; Cámara-Artigas *et al.*, 2014; Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2016; Plaza-Garrido *et al.*, 2020). En la Tabla 2 se muestran dichas estructuras y los códigos para acceder a ellas en el PDB.

Tabla 2. Estructuras de los dominios SH3 del grupo de Estructura de proteínas de la UAL

<b>Proteína</b>	<b>Código PDB</b>
<b>c-Src</b>	4JZ4, 3FJ5, 4JZ3, 4RTY, 4QT7, 4RTZ, 4RTW, 4OMQ, 4RTV, 4RTX, 4RTU, 4Y92, 4HVU, 4HVV, 4HVV, 4OMM, 4OMN, 4OMP, 4OML, 4LE9, 6XVM, 6XVN, 6XVO
<b>Fyn</b>	3UA6, 4ZNX, 4EIK, 37UA
<b>c-Src/Abl</b>	4LE9
<b>Spc</b>	4F16, 4F17, 2CDT, 2D2V, 2F2W, 2F2X, 3I9Q, 3M0P, 3M0Q, 3M0R, 3M0S, 3M0T, 3M0U, 3NGP
<b>Abl</b>	4JJB, 4JJC, 2O88, 3EGU, 4JJD, 4J9D, 3EG0, 3EG1, 4J9B, 3J9C, 4J9E, 4J9F, 4J9G, 4J9H
<b>c-Yes</b>	2HDA

## 1.5 Entrecruzamiento de dominios en los dominios SH3

La primera estructura descrita de un dímero entrecruzado de los dominios SH3 fue la de la proteína Eps8 (PDB: 1AOJ), el cual se resolvió en su forma monomérica y a mayor resolución en un trabajo posterior (PDB: 1I07, para la forma dimérica entrecruzada y 1I0C para el monómero) (Kishan *et al.*, 1997; Kishan *et al.*, 2001). La apertura de este monómero se daba a través del lazo n-Src, por lo que se estudió el papel que ejerce dicho lazo como lazo bisagra para facilitar la apertura del monómero y la participación de ciertas interacciones salinas en la estabilización del dímero. En este caso, los residuos Glu22 de las dos cadenas que conforman el dímero entrecruzado son responsables de formar puentes salinos intramoleculares con la Lys42 de cada cadena, capaces de mantener la integridad del oligómero. Además, los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales de los aminoácidos Arg18A/B se encuentran junto a los átomos de oxígeno de la cadena lateral de los Glu22A/B. De esta manera, al disminuir el pH,

es probable que los puentes salinos se rompan y la formación del monómero se vea favorecida. Al superponer las estructuras dimérica y monomérica no se observaron diferencias significativas exceptuando los lazos n-Src, los cuales además presentaban valores altos de factor B, dejando en evidencia su alta flexibilidad. Esta estructura se ha utilizado como modelo en estudios de dinámicas moleculares para establecer la propensión de las proteínas a sufrir 3D-DS según las propiedades fisicoquímicas de los residuos en los lazos bisagra (Upadhyay *et al.*, 2016). De este estudio se deduce que, generalmente, los residuos que forman parte del lazo bisagra suelen ser pequeños, pero no alifáticos o hidrofóbicos y que la apertura del monómero suele ocurrir a partir de las regiones que se encuentran expuestas en la superficie de la proteína en lugar de en el núcleo de esta.

La estructura del dímero entrecruzado del dominio SH3 de la p47<sup>phox</sup> en un tándem de dominios SH3 fue resuelta en primer lugar por el grupo de Groemping *et al.* (Groemping *et al.*, 2003) y un año más tarde por Yuzawa *et al.* (Yuzawa *et al.*, 2004) (PDB: 1NG2, 1UEC). En este caso, el oligómero entrecruzado se forma a través del extremo amino terminal y el lazo que actúa como bisagra es el lazo distal, lo que demostró que este tipo de dominios son susceptibles de sufrir 3D-DS a través de diferentes lazos y que no es siempre el lazo n-Src el que actúa como bisagra en la apertura del monómero. Esto fue más tarde corroborado por el dominio SH3 del extremo carboxilo terminal de la CRKL (PDB: 2BZY) (Harkiolaki *et al.*, 2006). En este dominio es el lazo RT el que permite la apertura del monómero y su posterior entrecruzamiento.

La posibilidad de que varios lazos actúen de bisagra en un mismo dominio SH3 fue más adelante confirmada por el dímero entrecruzado del dominio c-Src-SH3. La primera estructura del oligómero entrecruzado de este dominio fue resuelta por nuestro grupo de investigación (Cámara-Artigas, 2009) (PDB: 3FJ5). Al igual que con el Eps8-SH3, la apertura del monómero se da a través del lazo bisagra n-Src. Esta estructura corroboró experimentalmente lo que previamente Ding *et al.* habían predicho acerca de las especies entrecruzadas mediante dinámicas moleculares (Ding *et al.*, 2002). Posteriormente se demostró que una construcción quimérica del dominio c-Src donde se habían intercambiado los lazos RT y n-Src de la proteína por los presentes en el dominio Abl-SH3 formaba dímeros entrecruzados con la apertura simultánea de ambos lazos (Cámara-Artigas, 2014). La gran información disponible sobre el plegamiento de este dominio y la susceptibilidad de formar oligómeros entrecruzados lo han convertido en un modelo en muchos estudios de dinámicas moleculares para determinar la propensión a formar los oligómeros de diferentes conformómeros (Tian & Best, 2016).



Mediante un procedimiento llamado “Tandem Domain Swap Stability” (TADOSS) aplicado al dominio SH3 y otros dominios y proteínas modelo (SH2, TNfn3, PDZ, Titin I27, ubiquitina y proteína G) se pretende encontrar de forma sistemática dominios de proteína susceptibles de sufrir 3D-DS, identificando aquellas regiones de la estructura más propensas a actuar como lazos bisagra (Mascarenhas *et al.*, 2017; Lafita *et al.*, 2019).

## 1.6 Fibras amiloides en los dominios SH3

Todos los fenómenos de mal plegamiento suelen estar provocados por condiciones en las que la proteína pierde estabilidad. Por ello, diversos estudios intentan correlacionar la dependencia inversa que existe entre la estabilidad termodinámica de las proteínas y la tendencia a formar fibras amiloides (Kim *et al.*, 2000; Chiti *et al.*, 2000; Ramírez-Alvarado *et al.*, 2000). Al ser el dominio SH3 una proteína modelo en estudios de plegamiento se realizaron distintos análisis a diferentes pHs y temperaturas con el dominio SH3 de la proteína PI3K. Estos experimentos mostraron que mientras que la proteína era un monómero estable en disolución a pH neutro, a pH 2,0 formaba fibras amiloides, cuya presencia se confirmó mediante imágenes de TEM (Guijarro *et al.*, 1998A; Guijarro *et al.*, 1998B). En estos trabajos se determinó que los conformómeros parcialmente desplegados presentes en la disolución, debido a las condiciones extremas de pH, eran capaces de actuar como precursores en la formación de las fibras amiloides. Ello llevó a la realización de diversos estudios para determinar los factores estructurales involucrados en el proceso. Mediante experimentos de intercambio H/D en RMN y espectrometría de masas de ionización por electrospray se observó que el lazo RT cumplía un papel fundamental en el proceso de formación de las fibras y que sólo un 40 % de la secuencia de la proteína se encontraba en el núcleo de las láminas- $\beta$  del amiloide (Carulla *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2009). En esta proteína se han estudiado también las secuencias más amiloidogénicas con diferentes mutantes observando la formación de fibras por AFM. Se comprobó que la introducción de residuos voluminosos frente al núcleo interno de la estructura desestabilizaba el plegamiento típico de este amiloide y que, además, el puente salino entre el Glu61 y la Arg9 es necesario para mantener la integridad de este. De esta manera, en el mutante Glu61Lys hay dos cargas positivas muy próximas que provocan repulsiones y la desestabilización de la estructura (Röder *et al.*, 2019; Vettore *et al.*, 2019).

Además del dominio PI3K-SH3, también se ha descrito que otros dominios SH3 son capaces de formar amiloides. Un ejemplo es el mutante Asn47Ala del lazo distal del dominio SH3 de la  $\alpha$ -espectrina (Morel *et al.*, 2006; Castello *et al.*, 2017). Algunos de los estudios realizados con este dominio confirmaron que la proteína debe estar en una conformación parcialmente desplegada para formar las fibras. Se realizó un estudio pormenorizado de las condiciones de formación de las fibras amiloides y se observó que la tendencia a formarlas aumenta a pH 3,0 y a concentraciones altas de sal. Posteriormente se confirmó también la formación de fibras en la proteína WT y varios mutantes de la hélice 3<sub>10</sub> (Ala56Gly, Ala56Glu, Ala56Lys) y se analizó la relación entre la estabilidad termodinámica del dominio y la formación de las fibras (Varela *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes a la hora de correlacionar la estabilidad de la proteína con la tasa de agregación del amiloide. Estos estudios mostraban por otra parte que las fibras se formaban más rápido cuantas más especies intermedias parcialmente desplegadas se observaban en el equilibrio de desplegamiento y que la exposición de ciertas regiones de la cadena polipeptídica influía en la amiloidogénesis. Aunque no se han obtenido estructuras de oligómeros entrecruzados de esta proteína, los estudios realizados en condiciones cercanas a la desnaturalización (pH 3,0) demuestran que las curvas de estabilidad térmica no se ajustan a un modelo de dos estados (Casares *et al.*, 2004). El análisis de estas curvas de desnaturalización se realizó teniendo en cuenta un modelo en el que existía un intermedio dimérico cuya proporción aumentaba a altas concentraciones de proteína.

El dominio c-Yes-SH3 también es capaz de formar fibras, aunque este amiloide no se ha estudiado más allá de caracterizar su formación a pH 3,0 y altas concentraciones de proteína (Martín-García *et al.*, 2007). Este dominio pertenece a la familia de las Src TQ, en la cual también se ha detectado la formación de fibras amiloides en los dominios Fyn-SH3 y c-Src-SH3. En concreto, la Fyn-SH3 forma amiloides en un mutante con el extremo carboxilo terminal truncado (Ala39Val/Asn53Pro/Val55Leu/ $\Delta$ (57-60)) en el cual se ha determinado mediante técnicas de RMN la formación de un intermedio parcialmente desplegado (PDB: 2L2P) que favorece la formación de las fibras amiloides a pH básico y temperatura ambiente (Neudecker *et al.*, 2012). Sin embargo, aparte de este mutante, no se ha detectado la formación de fibras en el dominio Fyn-SH3 WT.

Por último, el dominio c-Src-SH3 es el único descrito hasta la fecha capaz de formar amiloides a pH neutro. Los primeros amiloides de este dominio se obtuvieron a pH 5,0 con la proteína WT a una concentración de 25 mg/mL y 25 °C. A diferencia, en el caso del mutante

Gln128Glu, estos se formaban a pH neutro y 37 °C, incubando la proteína a una concentración de 10 mg/mL durante al menos dos semanas en presencia de sales como el cloruro sódico a 0,1 M. De esta manera quedó en evidencia la importancia de la carga electrostática del residuo en la posición 128 y su influencia en el mecanismo de formación de las fibras amiloides de este dominio SH3. Las imágenes de TEM de las fibras obtenidas se muestran en la Figura 14 (Bacarizo *et al.*, 2014).

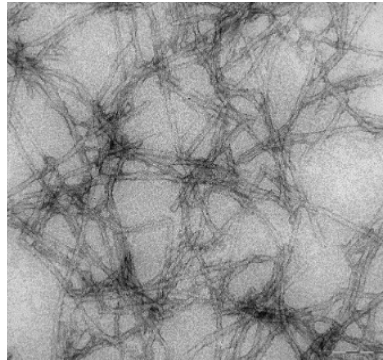


Figura 14. Fibras amiloides del mutante Gln128Glu del dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa obtenidas a pH 7,0. En este caso, la muestra fue incubada durante 2 semanas a 10 mg/mL con 0,1 M de cloruro sódico en 50 mM de Hepes pH 7,0 a 37 °C. Las fibras obtenidas son bastante largas, probablemente debido a que se han formado más lentamente (Bacarizo *et al.*, 2014).

## 1.7 El dominio c-Src-SH3 como modelo del entrecruzamiento de dominios y de la formación de las fibras amiloides

Hasta la fecha, de todos los dominios SH3, el único que presenta simultáneamente formación de dímeros entrecruzados y amiloides es el dominio c-Src-SH3. Por este motivo, es el que se presenta como mejor candidato para realizar estudios de los determinantes estructurales que conducen a la formación de estos mal plegamientos.

La primera estructura de este dominio se obtuvo mediante la técnica de RMN en 1995 (PDB: 1QWE, 1QWF) en forma de complejo con los péptidos sintéticos ricos en prolina APP12 (APPLPPRNRPRL) y VSL12 (VSLARRPLPLP) (Feng *et al.*, 1995). La primera estructura cristalográfica se obtuvo en 2009 por nuestro grupo de investigación (Cámara-Artigas *et al.*, 2009, PDB: 3FJ5). Curiosamente, esta estructura mostraba la formación de un dímero entrecruzado en el cristal, cuya presencia se estabilizaba en disolución por la adición de polietilenglicoles (PEGs) de baja masa molecular (Bacarizo *et al.*, 2014). Mientras que esta estructura se obtenía a pHs menores de 6,0, a pH neutro cristalizaba la forma monomérica

(PDB: 4JZ4). La dependencia del pH en la formación del dímero y del monómero fue demostrada con experimentos mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). A su vez, la presencia de dos restos aspartato (Asp117) enfrentados en la interfaz del dímero entrecruzado hace necesario que este residuo no esté ionizado para mantener la estabilidad de la estructura. Estos resultados se confirmaron para otros mutantes del sitio de nucleación: Gln128Arg, Gln128Glu y Gln128Lys (PDB: 4OML, 4OMN y 4OMP, respectivamente). En la estabilización de estos dímeros entrecruzados juega un papel clave la formación de enlaces de hidrógeno entre los residuos de la interfaz y ciertas moléculas de agua (Cámara-Artigas, 2009). Las mutaciones de la posición 128 se encuentran en un bolsillo cerca del sitio de nucleación y según presente dicho residuo carga positiva, negativa o neutra, se observa una correlación en la estabilización. Este residuo se encuentra en el lazo distal (Ser123-Gly127), donde existe una red de moléculas de agua que conectan residuos de dicho lazo con los del giro  $\beta$ -divergente, donde se encuentra el residuo clave Glu106 cuya cadena lateral forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de la Ser123 y mantiene el monómero cerrado. En el giro  $\beta$ -divergente (Lys103-Glu106) las dos hebras que se conectan con dicho giro no forman puentes de hidrógeno entre sí a pesar de formar parte de la misma lámina. Algunos estudios indican que el giro  $\beta$ -divergente es capaz de plegarse de forma independiente en los primeros estadios del proceso de plegamiento (Grantcharova *et al.*, 1998). Modificaciones en los puentes de hidrógeno entre residuos o mediados por moléculas de agua pueden influir en las etapas tempranas del plegamiento (Grantcharova *et al.*, 1998). En la interacción entre los residuos del lazo distal y el giro  $\beta$ -divergente, actúa como bisagra el lazo n-Src (Asn113-Gly116), que presenta además una alta flexibilidad y en muchas de las estructuras cristalográficas no está modelado en su totalidad debido a la falta de densidad electrónica en los mapas de diferencia.

Los experimentos de DLS también demostraron la rápida formación de amiloides en la proteína WT a concentraciones mayores de 20 mg/mL y 25 °C a pH 5,0. Sin embargo, el mutante Gln128Glu no formaba amiloides a este pH, pero sí a pH neutro, aunque el tiempo de formación era de varias semanas. Por otra parte, no se detectó la formación de fibras amiloides a ningún pH en el caso de la proteína que presenta una mutación que puede adoptar carga positiva en el residuo presente en la posición 128, como en el caso de los mutantes Gln128Arg y Gln128Lys (Bacarizo *et al.*, 2014). Además, los estudios de estabilidad confirmaron una correlación entre la estabilidad del dominio y su propensión a formar las fibras amiloides.

Otra característica interesante del proceso de formación de dímeros entrecruzados en el dominio c-Src-SH3 es la reversibilidad de este en presencia de péptidos ricos en prolina (Bacarizo *et al.*, 2014). La Figura 15 muestra el equilibrio global de la formación de estos dímeros.

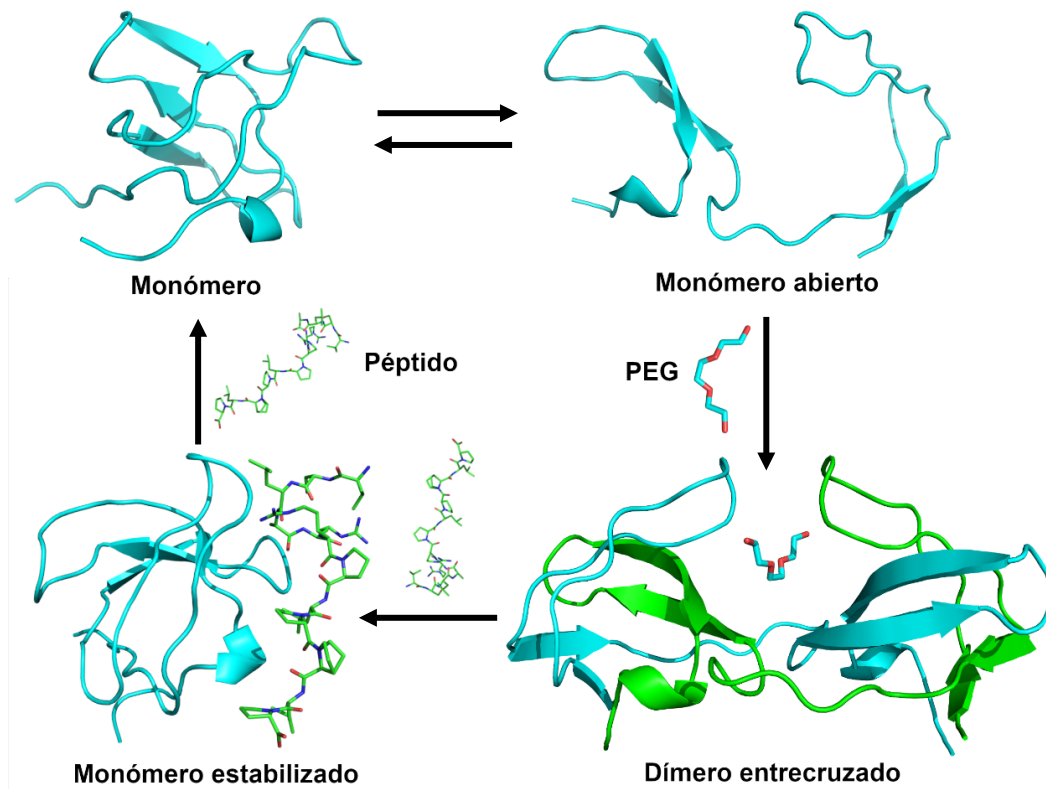


Figura 15. Esquema general de los distintos equilibrios entre ambas especies. El monómero del dominio SH3 se despliega parcialmente en presencia de PEG hasta formar el dímero entrecruzado, siendo el proceso reversible debido a la unión del péptido rico en prolina.

Para caracterizar mejor el plegamiento anómalo del dominio c-Src-SH3, nuestro grupo de investigación ha construido unas proteínas quimeras de los dominios SH3 de las tirosina quinasas c-Src, Fyn y Abl, en las cuales los lazos n-Src y RT han sido intercambiados. Se han seleccionado estos lazos porque son los que presentan mayor variabilidad secuencial ya que son los que infieren especificidad al dominio SH3 (Pisabarro *et al.*, 1996; Zarrinpar *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2005). Además, se ha visto que ambos lazos están implicados en la apertura del dominio c-Src-SH3, el cual puede formar dos tipos de dímeros entrecruzados: uno en el cual ambos lazos, el RT y n-Src se abren para formar el dímero entrecruzado (Cámara-Artigas *et al.*, 2014) y otro con apertura exclusiva del lazo n-Src (Cámara-Artigas *et al.*, 2009) como se muestra en la Figura 16.

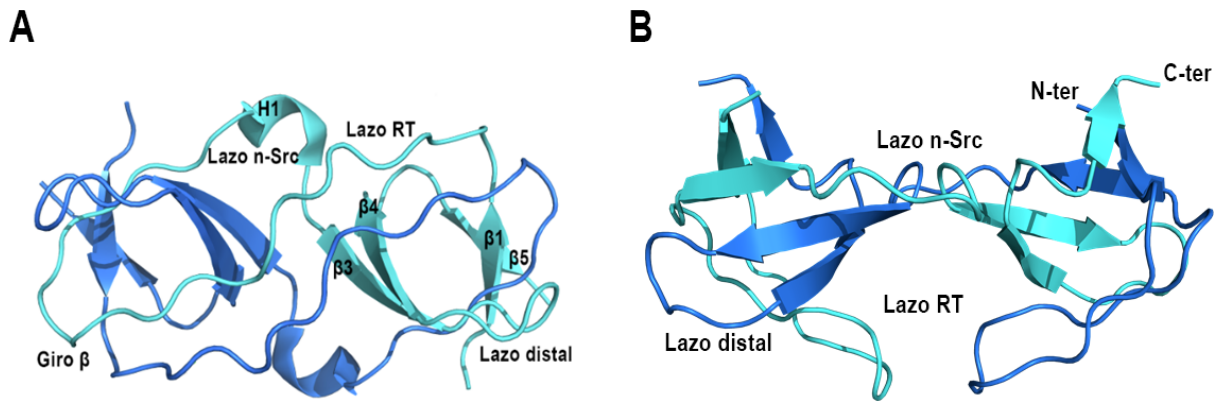


Figura 16. (A) Dímero entrecruzado del dominio SH3 de la SA-2X (PDB: 4LE9). La segunda molécula que forma el dímero entrecruzado se genera por simetría. En este caso el dímero se forma por la apertura de los dos lazos. (B) Estructura del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 (PDB: 3FJ5) que se forma a través de la apertura del lazo n-Src.

La elección de estos dos dominios para intercambiar los lazos se ha realizado teniendo en cuenta dos criterios:

1. Intercambio entre dos dominios de alta homología: tanto la Fyn-SH3 como la c-Src-SH3 TQ pertenecen a la misma familia y presentan una alta homología en su secuencia (80,00 %), aunque hasta la fecha no se ha detectado la presencia de dímeros entrecruzados en el dominio Fyn-SH3.
2. Intercambio entre dos dominios de baja homología: los dominios c-Src y Abl pertenecen a familias de tirosina quinasas distintas y presentan una baja homología secuencial (32,79 %). Igualmente, el dominio Abl-SH3 tampoco forma este tipo de oligómeros.

De esta manera, se pretende analizar los efectos que producen dichos lazos sobre el plegamiento de los dominios de interés. También se pretende estudiar el efecto de ciertos aminoácidos en el sitio de nucleación del dominio c-Src-SH3. Debido a los efectos observados en estudios anteriores del residuo Gln128 en la estabilidad y formación de fibras amiloides (Bacarizo *et al.*, 2014) hemos incluido en este estudio los mutantes Gln128Glu (en el caso de la c-Src) y Glu129Gln (en el caso de la Fyn), que es la mutación más significativa en el sitio de nucleación entre la secuencia de la c-Src-SH3 y la Fyn-SH3. También se han estudiado otros mutantes del sitio de nucleación: Leu100Ile, Glu106Asp, Ser123Thr y Thr126Ser. Además, también se ha analizado el mutante Thr125Ser de la c-Src-SH3, que es la única diferencia que existe entre las secuencias de la proteína Src de pollo y Src humana.

## 1.8 Objetivos

La hipótesis principal de este trabajo, respaldada por estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, fue el utilizar proteínas modelo como son la c-Src, Abl y Fyn del dominio SH3 para estudiar los procesos de mal plegamiento y su relación con la formación de agregados de mayor orden como las fibras amiloides. De esta manera, los objetivos principales de esta Tesis doctoral son:

1. Identificar los determinantes estructurales de la formación de los dímeros entrecruzados mediante 3D-DS a través del uso de proteínas quimeras de los dominios SH3 y de mutantes del núcleo de plegamiento de la c-Src y la Fyn.
2. Cristalizar y determinar la estructura de los monómeros y los dímeros entrecruzados obtenidos mediante difracción de rayos X y analizar las interacciones que estabilizan y desestabilizan a las proteínas y que pueden ser clave en el plegamiento de las mismas.
3. Realizar una caracterización biofísica de las proteínas quimeras y mutantes para determinar la estabilidad de estas y relacionar la conexión que existe entre la estabilidad y la tendencia a sufrir 3D-DS y/o formar agregados superiores.
4. Analizar el efecto y la influencia del motivo ATCUN situado en el extremo amino terminal de la c-Src-SH3 con sitio de corte para trombina sobre la estabilidad y la solubilidad de las proteínas quimera y mutantes del sitio de nucleación.
5. Determinar las condiciones y los factores que afectan a la formación y velocidad de nucleación de los amiloides del dominio c-Src-SH3 y estudiar el efecto de sustancias como el 2,2,2-trifluoroetanol como agente inductor de las fibras.





## **Capítulo 2**

### **Materiales y métodos**



## 2.1 Materiales

Las proteínas utilizadas a lo largo de esta Memoria se han purificado por sobreexpresión en la bacteria *E.coli*. Los genes que codifican los dominios SH3 de las proteínas quimeras y de los mutantes del núcleo de plegamiento, objeto principal de estudio de este trabajo, fueron sintetizados por la empresa Nzytech (Lisboa, Portugal) e insertados en el vector de expresión pHTP1 (Figura 17). Este plásmido consta de 5332 pares de bases y un marcador de selección que confiere a la *E.coli* resistencia al antibiótico kanamicina. Dicho plásmido ofrece la oportunidad de insertar una cola de poli-histidinas (6xHis) en los extremos amino o carboxilo terminal que permiten purificar la proteína por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmobilizados (IMAC).

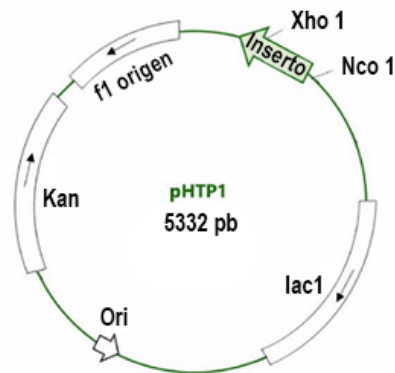


Figura 17. Representación esquemática del vector pHTP1 de la casa Nzytech que codifica las proteínas de estudio. Para regular la correcta expresión en *E.coli* el vector tiene el promotor T7/lac.

La construcción final de las proteínas expresadas en el vector pHTP1 contiene una cola de 6 histidinas en el extremo amino terminal, seguida de la secuencia de aminoácidos que codifica el sitio de reconocimiento del corte para la proteasa TEV (Figura 18).

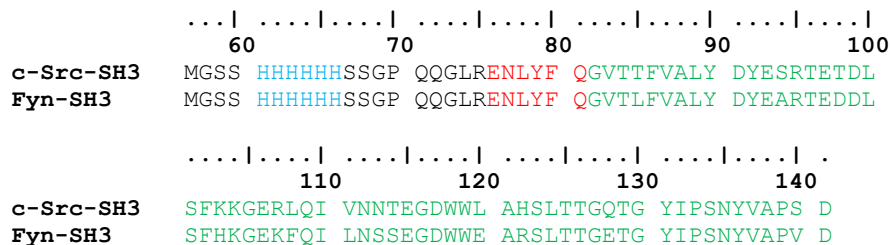


Figura 18. Secuencias del dominio SH3 de la c-Src y la Fyn tirosina quinasa (verde) clonadas con una cola de 6 histidinas (azul) y el sitio de corte para la proteasa TEV (ENLYFQ-G/S) (rojo). El corte se produce entre los residuos Q y G/S. En este caso, se mantuvo en la posición P1' la G puesto que los dominios SH3 de interés tienen en su extremo amino terminal este aminoácido. La numeración mostrada se corresponde con la c-Src-SH3, 58-141, mientras que la Fyn-SH3 presenta la numeración 59-142.

En la Tabla 3 se muestran los acrónimos utilizados para las proteínas estudiadas en esta memoria, así como las mutaciones realizadas.

Tabla 3. Quimeras y mutantes del dominio SH3 estudiados en la Tesis

Acrónimo	Mutación
<b>FS-Src</b>	Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr
<b>FS-Src-LAH</b>	Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr-Glu121Leu-Arg123His
<b>FS-Src-E129Q</b>	Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr-Glu129Gln
<b>FS-RT</b>	Ala95Ser-Asp99Thr
<b>FS-2X</b>	Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr-Ala95Ser-Asp99Thr
<b>SF-Src</b>	Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser
<b>SF-Src-Q128E</b>	Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser-Gln128Glu
<b>SF-Src-EAR</b>	Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser-Leu120Glu-His122Arg
<b>SF-RT</b>	Ser94Ala-Thr98Asp
<b>SF-2X</b>	Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser-Ser94Ala-Thr98Asp
<b>Fyn-E129Q</b>	Glu129Gln
<b>Src-L100I</b>	Leu100Ile
<b>Src-E106D</b>	Glu106Asp
<b>Src-S123T</b>	Ser123Thr
<b>Src-T125S</b>	Thr125Ser
<b>Src-T126S</b>	Thr126Ser
<b>Src-Q128E</b>	Gln128Glu

El dominio c-Src-SH3 que contiene el motivo ATCUN en el extremo amino terminal fue un obsequio del laboratorio de la profesora Irene Luque (Universidad de Granada) y el gen que codifica la proteína se encuentra inserto en el vector de expresión pET15b (Figura 19). La proteína se expresó en *E.coli* con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal y un sitio de corte para la proteasa trombina que elimina la cola después de la purificación, manteniendo los residuos Gly-Ser-His-Met en dicho extremo.

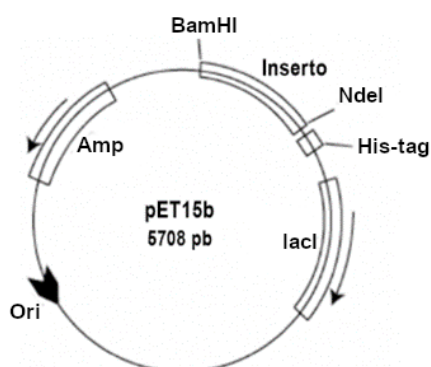


Figura 19. Representación esquemática del vector pET15b con 5708 pares de bases. El plásmido tiene el promotor T7/lac y el sitio que confiere a las bacterias resistencia al antibiótico ampicilina.

El plásmido de la proteasa TEV es el pRK793 (Figura 20), con resistencia a los antibióticos ampicilina y cloranfenicol y fue suministrado por el laboratorio de la profesora Irene Luque (Universidad de Granada). En este caso, el vector codifica el gen del mutante Ser219Val, que evita la autólisis de la proteasa (Parks *et al.*, 1995).

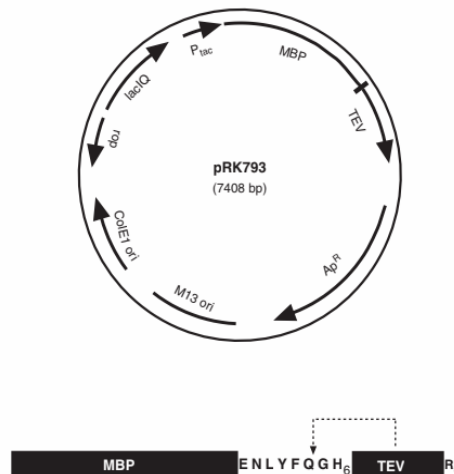


Figura 20. Representación esquemática del vector de expresión de la proteasa TEV pRK793 (Tropea *et al.*, 2009).

El resto de los reactivos e instrumentación utilizados para la realización de los experimentos recogidos en esta Memoria se encuentran detallados en el Apéndice 1.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Clonado, expresión y purificación de las quimeras del dominio SH3

Todas las proteínas fueron expresadas en células *E.coli* BL21-DE3 (Nzytech). El inserto del plásmido en las células se llevó a cabo siguiendo el protocolo ofrecido por la empresa Nzytech (Lisboa, Portugal). Las bacterias se cultivaron en una placa Petri durante 24 horas en una estufa a 37 °C. Para realizar los cultivos se introdujo una colonia de *E.coli* de la placa Petri en un pre-cultivo de 10 mL de medio LB (Lysogeny Broth) con 10 µL del antibiótico kanamicina. Tras un periodo de aproximadamente 2 horas a 37 °C y con agitación constante a 180 rpm para favorecer la aireación del cultivo, se observó la turbidez característica debido al crecimiento celular y se transfirieron los 10 mL de células a 1 L de LB con 1 mL de antibiótico. Estos cultivos se mantuvieron a 37 °C hasta que la densidad óptica de los medios a 600 nm alcanzó los 0,6-0,8 nm, tras lo cual se adicionó IPTG a una concentración final de 0,1 mM para inducir

la sobreexpresión de las proteínas de interés. Según la proteína a expresar fuera susceptible de formar cuerpos de inclusión u otros agregados, la inducción se llevó a cabo durante la noche o solo en un corto periodo de 2-4 horas. Así mismo, también se controló la temperatura que, o bien se mantuvo a 37 °C, o se bajó a 22 °C. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 4500 rpm y 10 °C en una centrífuga Hettich y resuspendidas en tampón de equilibrado de columna (TEC) compuesto por fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 8,0 y cloruro sódico 300 mM. Posteriormente, se lisaron las células con un sonicador (Grepütfe Sicherheit dr.Hielscher) usando una amplitud del 60 % y un tiempo de ciclo de 0,5 segundos manteniendo las células en un baño de hielo para contrarrestar el aumento de temperatura asociado al sonicado. Una vez sonicadas las células, para separar las proteínas solubles de los restos celulares, se centrifugaron a 10000 rpm y 10 °C durante 1 hora en una centrifuga de la casa Eppendorf. Se descartó el precipitado y el sobrenadante clarificado se pasó por una columna de afinidad de Ni<sup>2+</sup>-NTA previamente lavada con agua y equilibrada con 2 volúmenes de TEC. Para ello se utilizó una columna de cromatografía (Bio-rad) de 14 cm de longitud, con una capacidad de 0 a 20 mL de lecho y un filtro poroso de polietileno de 30 µm para retener los 3 mL de resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA utilizados (Clontech). La columna se lavó con concentraciones crecientes de imidazol en el TEC. De esta manera, se realizó un primer lavado con TEC sin imidazol y dos lavados seguidos con TEC e imidazol 20 mM para eliminar las proteínas que puedan quedar adheridas a la columna presentando poca afinidad. Finalmente, la proteína con la cola de histidinas se eluyó a una concentración de imidazol de 250 mM. Una vez obtenida la proteína y con el fin de eliminar el imidazol de la disolución, esta se dializó frente a 5 L de TEC durante toda la noche a 4 °C en una membrana de diálisis (Thermo Scientific) con un tamaño de poro de 3,5 kDa sellada por ambos extremos con pinzas.

Dependiendo del vector de expresión de la proteína, este presentaba el sitio de corte para la proteasa trombina o para la TEV. Por ello, para eliminar la cola de histidinas del extremo amino terminal se llevaron a cabo dos protocolos distintos. Así, para la proteína expresadas con el vector pET15b, se utilizó trombina como proteasa en una proporción aproximada de 50:1 e incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez cortada la cola de histidinas y con el fin de eliminar la trombina, se utilizó la resina Benzadimine Sepharose 4B (GE Life Sciences). Para el resto de las proteínas con el vector de expresión pHTP1, el corte se realizó con la proteasa TEV, incubando durante la noche a 20 °C y añadiendo 1 mg de TEV por cada 100 mg de proteína obtenida. El producto hidrolizado tras el corte con trombina o TEV se

pasó de nuevo por la columna de afinidad de níquel, pero en este caso solo quedan unidas a la columna las colas cortadas de histidina y la fracción de proteína no cortada, de modo que la proteína de interés sin la cola de histidinas se encuentra en el eluido que no se une a la columna y termina de eluirse en el lavado de la columna con TEC. Por último, se realizó un último paso cromatográfico usando un FPLC ÄKTAprime plus (GE-Healthcare) con una columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE-Healthcare) que posee una longitud de 60 cm, un diámetro interno de 26 mm y un tamaño medio de partícula de 34  $\mu\text{m}$ . El volumen del lecho es de 320 mL y el límite de presión de 0,5 MPa. La elución se llevó a cabo utilizando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y un límite de presión de 0,4 MPa.

Una vez purificadas las proteínas, se determinó su concentración midiendo las absorbancias de estas a 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Lambda 25 (Perkin-Elmer). Para cada proteína se usó el coeficiente de extinción molar obtenido por el método de Gill-Von Hippel (Gill & Von Hippel, 1989) utilizando la herramienta web de ProtParam Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger *et al.*, 2005). De esta manera, el coeficiente de extinción molar empleado para todas las proteínas objeto de estudio en esta memoria fue de  $16960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La pureza final de las proteínas se comprobó mediante electroforesis en PAGE-SDS en gel (16 %) en una Protean-Mini Tetra Cell (BioRad). Las muestras se alicuotaron en un volumen de 1 mL a una concentración mínima de 1 mg/mL y se almacenaron a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2.2.2 Clonado, expresión y purificación de la proteasa TEV

La proteasa TEV fue expresada en células *E.coli* BL21-DE3 siguiendo el protocolo estándar y teniendo en cuenta que el antibiótico al que ofrece resistencia el plásmido es ampicilina. Una vez crecidas las colonias en una placa Petri, una de ellas se introdujo en un pre-cultivo con 10 mL de medio LB y 10  $\mu\text{L}$  de ampicilina a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y agitación constante durante 2 horas. Las células crecidas se transfirieron a 1 L de LB con 1 mL de antibiótico hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0,5 aproximadamente. Para llevar a cabo el proceso de inducción, se utilizó IPTG a una concentración final de 0,1 mM durante 4-6 h a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las células fueron recogidas por centrifugación a 4500 rpm y  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y se resuspendieron en tampón fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 8,0, cloruro sódico 300 mM, glicerol al 10 % e imidazol 25 mM. Las células se sonicaron a una amplitud del 60 % y un tiempo de ciclo de 0,5 segundos en un baño de hielo. Al producto resultante de la lisis celular se le añadió

polietilenimina a una concentración final de 0,1 % (una dilución 1:50 de la disolución madre preparada en Tris 50 mM pH 8,0 y al 5%) para eliminar el máximo ADN posible antes de purificar y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm y 10 °C durante 1 hora. Para la purificación, se utilizó una columna para cromatografía de afinidad con 3 mL de resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA, previamente equilibrada con 2 volúmenes del tampón fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 8,0, cloruro sódico 300 mM e imidazol 25 mM, alcanzando una concentración final de 250 mM de imidazol para eluir la TEV. Para eliminar el imidazol tras el paso por columna de cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup>-NTA, la proteína se dializó frente a 5 L de tampón Tris 100 mM pH 8,0, cloruro sódico 250 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM. La proteína resultante contiene habitualmente contaminación por ácidos nucleicos a pesar de la adición de polietilenimina, por lo que para eliminarlos se realizó un último paso por columna de exclusión molecular en un FPLC ÄKTAprime plus con la columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 descrita. Para configurar el aparato, el límite de presión seleccionado fue de 0,4 MPa y la velocidad de flujo fue de 1,5 mL/min.

Al igual que con otras proteínas, se midió la concentración utilizando un espectrofotómetro UV-Visible y un coeficiente de extinción molar de 31970 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Blommel *et al.*, 2007). Su pureza fue comprobada mediante electroforesis PAGE-SDS en gel de poliacrilamida (16 %) como se muestra en la Figura 21. Las muestras se alicuotaron en un volumen de 1 mL en tubos Eppendorf a una concentración de 1 mg/mL con glicerol al 50 % y se almacenaron a -20 °C.

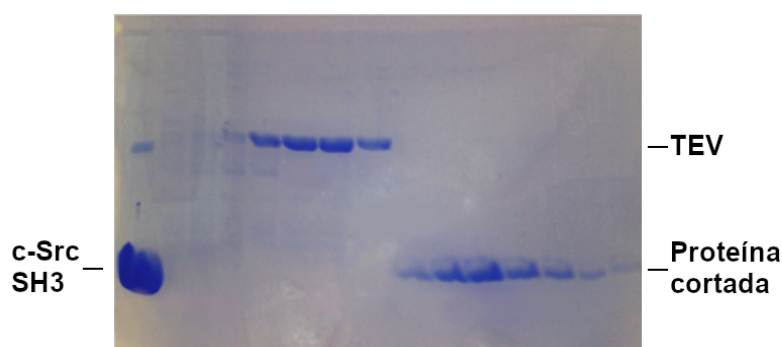


Figura 21. PAGE-SDS tras paso por columna de exclusión molecular. La proteína c-Src-SH3 WT se utilizó como patrón de las eluciones de las quimeras ya cortadas. Se pueden observar las bandas correspondientes a la TEV pura.

### 2.2.3 Preparación de las disoluciones

Las disoluciones tampón utilizadas durante el desarrollo de toda la Tesis fueron preparadas mediante pesada de las formas ácida y básica del sistema tamponante. A continuación, fueron



disueltas aproximadamente en un 70 % del volumen final para comprobar y ajustar el pH sin superar el volumen requerido. Finalmente, se enrasaron hasta el volumen final deseado y se filtraron a vacío través de un filtro Millipore (MERCK) con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Para preparar las disoluciones de proteínas a los diferentes pHs y condiciones experimentales, cada proteína fue dializada en el tampón del experimento frente a un volumen aproximadamente 500 veces mayor que el de la proteína. Dado la baja masa molecular de las proteínas objeto de estudio, se utilizó una membrana de diálisis de tamaño de poro de 3,5 kDa, sellada por ambos extremos con pinzas.

Los tampones utilizados para estudiar la estabilidad frente al pH de las proteínas se prepararon a una concentración final de 50 mM. La composición de las disoluciones a los pHs indicados son: ácido clorhídrico pH 1,0, ácido fosfórico pH 2,0, ácido fosfórico/fosfato monosódico pH 3,0-3,5, acetato sódico/ácido acético pH 4,0-5,5, fosfato monosódico/fosfato disódico pH 6,0-7,0, Tris/HCl pH 7,5-9,0, carbonato de sodio/hidrogenocarbonato de sodio pH 9,5-11,0, fosfato trisódico/hidróxido sódico pH 11,5-13,0 e hidróxido sódico pH 13,9. Una vez añadida la proteína, el pH final se comprobó con un electrodo de pH (HANNA).

Para estudiar la estabilidad de las proteínas frente a agentes desnaturizantes se prepararon disoluciones concentradas de cloruro de guanidinio 8,0 M en tampón acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0. La solubilidad del cloruro de guanidinio a 25 °C es 8,54 M (Pace, 1986) por lo que para preparar estas disoluciones cerca del límite de solubilidad se pesó la cantidad deseada de cloruro de guanidinio y se disolvió adicionando el sólido lentamente sobre la disolución del tampón sin ajustar al volumen final. En la cantidad de tampón utilizada para preparar la disolución se debe tener en cuenta el aumento de volumen que tiene lugar durante la solubilización de la sal. Para facilitar la disolución de la sal se calentó con una placa calefactora a 30 °C con agitación continua. Una vez disuelta la sal, se comprobó y ajustó el pH con el tampón correspondiente antes de enrasar al volumen final. Finalmente, todas las disoluciones se filtraron con un filtro de Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para comprobar la concentración exacta de las disoluciones de cloruro de guanidinio se utilizó un refractómetro manual (ATAGO). La concentración de cloruro de guanidinio se relaciona con la diferencia entre el índice de refracción del cloruro de guanidinio y el índice de refracción de la disolución tampón en la que está disuelto ( $\Delta n = n_{\text{guanidinio}} - n_{\text{tampón}}$ ) mediante la ecuación 1 (Warren & Gordon, 1966):

$$[GdnHCl](M) = 57,144 \cdot (\Delta n) + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 + 91,60 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Ec. 1}$$

#### 2.2.4 Liofilización de las proteínas y determinación del límite de solubilidad

Las proteínas se liofilizaron en un liofilizador LyoQuest (Telstar) con una bomba de vacío de doble etapa (Telstar). Para ello, las proteínas se dializaron en una membrana de 3,5 kDa frente a un volumen de agua destilada 500 veces mayor que el de la muestra durante toda la noche para eliminar todas las sales presentes en los tampones. Posteriormente, las proteínas se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido en tubos Falcon de 50 mL. Dichos tubos se introdujeron en un frasco de vidrio de 1000 mL (Telstar), que se adaptó al liofilizador. La liofilización de las proteínas se realizó a -55 °C y una presión de 0,3 mBar. Finalizado el proceso, estas se almacenaron en viales en la cámara fría.

Para analizar la solubilidad de las proteínas se utilizó el método descrito en Trevino *et al* (Trevino *et al.*, 2007). Las muestras se prepararon pesando cantidades crecientes de proteína liofilizada y disolviéndolas en los tampones acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0 en un tubo Eppendorf, dejándolas equilibrar durante una hora a 25 °C y centrifugándolas a 12000 rpm durante 30 minutos para eliminar cualquier resto de proteína precipitada. De esta manera, llega un momento en el que la disolución se encuentra sobresaturada y se alcanza el límite de solubilidad. Los espectros de UV-Visible del sobrenadante de cada una de las muestras se recogieron en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer) a 25 °C utilizando las disoluciones tampón como blanco. Las medidas se repitieron a las 48 horas para asegurar el equilibrio de las disoluciones.

#### 2.2.5 Determinación del estado de oligomerización mediante dispersión dinámica de la luz

La dispersión dinámica de la luz (Dynamic Light Scattering, DLS) mide las fluctuaciones en la intensidad de la dispersión procedentes de partículas que experimentan un movimiento browniano aleatorio. Del análisis de estas fluctuaciones se puede obtener información del tamaño de la partícula y del coeficiente de difusión de las proteínas en un medio líquido (Arzensek, 2010). Cuando un rayo de luz monocromática es irradiado sobre una disolución que contiene partículas en movimiento browniano se produce un efecto Doppler en el momento en el que la luz golpea a la partícula en movimiento, cambiando la longitud de onda de la luz

incidente. Este cambio está relacionado con el tamaño de la partícula. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión traslacional ( $D_0$ ) (ecuación 2) (Berne, 2000):

$$D_0 = \frac{k_B T}{\zeta} \quad \text{Ec. 2}$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $\zeta$  es la constante de fricción. Para partículas esféricas, se utiliza la aproximación de Stokes  $\zeta = 6\pi\eta R_h$ , en la que  $\eta$  es la viscosidad del disolvente y  $R_h$  es el radio hidrodinámico de la partícula. De esta manera, el tamaño de una partícula se calcula a partir del coeficiente de difusión traslacional mediante la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 3):

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad \text{Ec. 3}$$

Para realizar las medidas, las proteínas se prepararon a diferentes concentraciones y se dializaron frente a los tampones correspondientes, en este caso, acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0. Para las medidas de DLS, ambos tampones fueron preparados en agua miliQ, filtrados con un filtro de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel) y desgasificados mediante ultrasonido. Una vez concentradas y dializadas, las proteínas se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos y se filtraron a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  directamente sobre la cubeta de medida. Todas las medidas se realizaron en una microcubeta para volúmenes pequeños modelo ZEN2112 (Malvern). Para eliminar las posibles burbujas que hayan podido quedar en la cubeta tras introducir la proteína, esta se introdujo en un baño sonicador durante 1 minuto. Todas las medidas de  $R_h$  se realizaron a 25 °C. El tiempo de equilibrado de la muestra en el aparato fue de 120 segundos, tras lo cual se realizaron 10 medidas consecutivas, cada una de ellas resultante del promedio de 10 carreras registradas durante 20 segundos.

### 2.2.6 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica muy sensible que permite realizar estudios con concentraciones muy pequeñas de proteína, de esta manera se pueden evitar problemas asociados con agregación y baja solubilidad. En nuestro caso, se midió la fluorescencia intrínseca de la proteína que es producida por los aminoácidos triptófano y tirosina con un

máximo en el espectro de absorción de 280 y 277 nm, respectivamente, mientras que en el espectro de emisión los máximos se producen a 303 y 350 nm (Lakowicz, 1991). En el dominio SH3 de la c-Src y de la Fyn TQ hay 2 triptófanos y 4 tirosinas. La emisión de fluorescencia es muy sensible al entorno de los fluoróforos y se pueden medir cambios conformacionales en las proteínas o seguir el equilibrio de plegamiento mediante cambios en el espectro de emisión de fluorescencia (Royer, 2004). En el caso de las proteínas estudiadas en esta Memoria, el espectro de emisión se midió en el máximo producido a 350 nm y excitando a 280 nm, observando la disminución de la intensidad de fluorescencia a medida que la proteína se despliega.

### 2.2.6.1 Análisis de la estabilidad química de las proteínas

Todos los experimentos realizados mediante espectroscopía de fluorescencia se realizaron a una concentración de proteína de 2  $\mu$ M. Los espectros de emisión se registraron en un intervalo de 300 a 500 nm, excitando a una longitud de onda de 280 nm y utilizando una apertura de 5 nm tanto para la rendija de excitación como para la de emisión. La cubeta utilizada en todos los casos fue una cubeta de cuarzo para fluorescencia de 3 mm para volúmenes de muestra pequeños (Hellma). La estabilidad de la proteína frente al pH se determinó midiendo los cambios de la intensidad de la emisión de fluorescencia en el intervalo de pHs 1,0-14,0 manteniendo todos los tampones a una concentración de 50 mM e incubando las muestras durante la noche. Las curvas obtenidas representando la variación de la intensidad de fluorescencia frente al pH presentan una forma de campana con un amplio plato. Se obtuvieron los valores de  $pK_a$  de los grupos ionizables en la desnaturalización ácida y básica asumiendo que tanto la especie protonada como desprotonada de la proteína contribuyen igualmente a las propiedades espectrales utilizando la ecuación 4:

$$Y = \frac{Y_a + Y_b 10^{(pH - pK_a)}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \quad \text{Ec. 4}$$

donde Y es la energía espectral media de emisión,  $\langle 1/\lambda \rangle$ ,  $Y_a$  es la energía espectral media de emisión para las especies ácidas e  $Y_b$  es la energía espectral media de emisión observada a altos pHs.

Para determinar la estabilidad química de las proteínas estudiadas frente cloruro de guanidinio, se prepararon diferentes disoluciones de estas con concentraciones crecientes del agente caotrópico (0-7,5 M) tanto en acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 como en

fosfato monosódico/disódico 50 mM pH 7,0. Los experimentos de desnaturalización se llevaron a cabo a 25 °C en un espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer). Una vez preparadas las disoluciones, se dejaron incubando durante la noche a la temperatura deseada para alcanzar el equilibrio. Las curvas de desnaturalización se obtuvieron al representar la intensidad de fluorescencia normalizada en el máximo del espectro de emisión (350 nm) frente a la concentración de cloruro de guanidinio. Los datos experimentales se ajustaron utilizando un modelo de dos estados representado por la ecuación 5:

$$Y = \frac{(Y_n + m_n[D]) + (Y_d + m_d[D]) \exp[-(\Delta G_w - m[D])/RT]}{1 + \exp[-(\Delta G_w - m[D])/RT]} \quad \text{Ec. 5}$$

donde Y es la energía espectral media de emisión,  $\langle 1/\lambda \rangle$ , [D] es la concentración de agente desnaturalizante,  $Y_n$  e  $Y_d$  son energía espectral media de emisión de la proteína nativa y desplegada, respectivamente. Con el valor obtenido de m y  $\Delta G_w^\circ$  se puede determinar  $m_{1/2}$  con la siguiente ecuación 6:

$$\Delta G^\circ = \Delta G_w^\circ - m \cdot m_{1/2} \quad \text{Ec. 6}$$

### 2.2.6.2 Determinación de la constante de unión del níquel al dominio SH3

Las proteínas expresadas con el vector pET15b presentan un sitio de corte con trombina para eliminar la cola de histidinas que produce un sitio de unión de metales como cobre y níquel formado por la secuencia de aminoácidos Gly-Ser-His (motivo ATCUN). Para medir la constante de unión del metal a dicho motivo se realizaron medidas de la amortiguación de la fluorescencia producida por la unión de este a la proteína.

Para realizar las medidas, las disoluciones de las proteínas se prepararon e incubaron durante la noche a 25 °C para alcanzar el equilibrio. La concentración final de proteína en todos los experimentos fue 2  $\mu\text{M}$  y la concentración final del  $\text{NiCl}_2$  en la disolución de proteína varió en el intervalo 0-300  $\mu\text{M}$ . La constante de unión de los metales se determinó a los pHs acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 4,0 y 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 6,0 y 7,0 para comprobar su efecto en la misma y se determinó a partir de la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína frente a la concentración del ligando. La curva de unión se obtuvo representando la fracción de saturación frente a la concentración de

ligando libre. La fracción de saturación se define como la fracción de moléculas de proteína que está saturada con el ligando y se calcula según la ecuación 7:

$$Y = \frac{F(L)-F(0)}{F(\infty)-F(0)} \quad \text{Ec. 7}$$

donde  $F(L)$  es el valor de intensidad de fluorescencia de la proteína a una determinada concentración de ligando,  $F(0)$  es el valor de intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia del ligando y  $F(\infty)$  es el valor de intensidad de fluorescencia de la proteína cuando está saturada por el ligando.

La concentración de ligando libre se calcula de forma sencilla mediante la ecuación 8:

$$[Ligando]_{libre} = [Ligando]_{total} - nY[Proteína]_{total} \quad \text{Ec. 8}$$

donde  $[Ligando]_{total}$  es la concentración total del metal,  $n$  es el número de sitios activos y  $[Proteína]_{total}$  es la concentración total de las proteínas.

Una vez obtenidos todos los parámetros, la ecuación que relaciona la fracción de saturación con la concentración de ligando libre y la que se utilizó para realizar el ajuste fue la ecuación 9:

$$Y = \frac{K[Ligando]_{libre}}{1+K[Ligando]_{libre}} \quad \text{Ec. 9}$$

### 2.2.7 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica de espectroscopía de absorción que cuantifica la diferencia en la absorción de la luz polarizada a la derecha y a la izquierda de una molécula quiral ópticamente activa. Es una técnica ampliamente utilizada para analizar la estructura secundaria de las proteínas, por lo que es bastante útil para observar cambios estructurales puesto que es capaz de detectar las interacciones amida-amida de la estructura secundaria de las mismas (Johnson, 1990). De esta manera, cada tipo de estructura presenta un espectro característico que nos permite obtener información sobre los cambios conformacionales o cambios en la estructura secundaria o plegamiento.

### 2.2.7.1 Dicroísmo circular en el UV-lejano (175-250 nm)

En este intervalo de longitud de onda, el enlace peptídico actúa como cromóforo, por lo que cada elemento principal de la estructura secundaria presenta un espectro propio (Johnson, 1990) tal y como se muestra en la Figura 22.

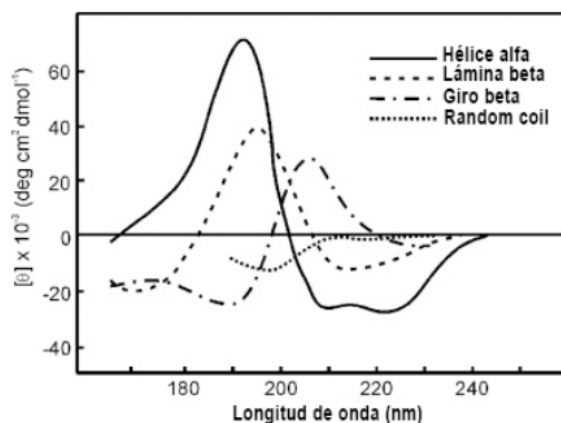


Figura 22. Espectros de los tipos más comunes de estructuras secundarias. Hélices- $\alpha$ : doble mínimo a 222 y a 208-210. Estructuras- $\beta$ : una banda positiva y otra negativa entre 190-200 y 210-225, respectivamente (Gawronski *et al.*, 2006).

Estos experimentos se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco J810, en acetato sódico/ácido acético 10 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 10 mM pH 7,0, manteniendo la concentración de proteína a 20  $\mu$ M. Las muestras se midieron en una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso, con un tiempo de respuesta de 2 s, un paso de luz de 5 nm y una velocidad de barrido de 50 nm/min a 25 °C. El volumen de muestra en todos los casos fue de 100  $\mu$ L. En el caso de las medidas realizadas en presencia de TFE, la concentración de este varió en el intervalo 0-60 %. Todas las muestras fueron preparadas y se dejaron incubando a la temperatura deseada durante la noche para alcanzar el equilibrio.

Para realizar las desnaturalizaciones térmicas la concentración de las proteínas fue de 20  $\mu$ M y el volumen de muestra utilizado en la cubeta de 300  $\mu$ L. La rampa de temperatura se realizó en el intervalo 10-98 °C, aumentando 1 °C por minuto y midiendo la elipticidad a 222 nm. Se selecciono esta longitud de onda porque en el caso de nuestras proteínas es a la que se producen mayores cambios de elipticidad. Las curvas obtenidas al representar los cambios en la elipticidad a 222 nm en función de la temperatura se ajustaron según un modelo de dos estados a la ecuación 10. La reversibilidad de las desnaturalizaciones térmicas se confirmó comparando los espectros de CD adquiridos antes y después de la desnaturalización térmica.

$$\theta = \frac{(\theta_N + m_N \cdot T) + (\theta_U + m_U \cdot T) \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)} \quad \text{Ec. 10}$$

donde  $\theta_N$  es la elipticidad de la proteína plegada completamente,  $\theta_U$  es la elipticidad de la proteína desplegada y  $m_N$  y  $m_U$  son las pendientes de las regiones plegadas y desplegadas, respectivamente. La energía libre del desplegamiento  $\Delta G$  viene dada por la ecuación 11:

$$\Delta G = \Delta H_m \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot \left((T_m - T) + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right) \quad \text{Ec. 11}$$

$T_m$  es la temperatura del punto medio de la transición entre la forma plegada y la desplegada,  $\Delta C_p$  es la capacidad calorífica y  $\Delta H_m$  es la entalpía en la transición de desplegamiento.

### 2.2.7.2 Dicroísmo circular en el UV-cercano y visible (>250 nm)

Los espectros de las proteínas obtenidos en el UV-cercano proporcionan información acerca de su estructura terciaria. En este caso, los espectros no se pueden asignar a ninguna estructura tridimensional concreta, pero sí que son útiles para estudiar interacciones entre metal y proteína. Esto se debe a que sólo se obtienen espectros en el visible cuando el ion metálico se encuentra en un entorno quiral, por lo que los metales libres en disolución no se detectan. También se utiliza para comprobar la geometría de los compuestos analizando sus bandas características. De esta manera, en el caso de los complejos de níquel, la geometría octaédrica presenta 3 bandas d-d características a 880, 555 y 348 nm; las estructuras con geometría de bipirámide trigonal tienen una banda d-d a 544 nm y en los complejos plano-cuadrados se observa una banda positiva a 420 nm y una negativa a 480 nm.

En nuestro caso, para comprobar la geometría del motivo ATCUN unido al metal del dominio c-Src-SH3 se recogió el espectro en el visible en presencia de níquel. El espectro se midió en fosfato monosódico/fosfato disódico 10 mM a pH 7,0 a una concentración saturante de  $\text{NiCl}_2$  de 1 mM y una concentración de proteína de 20  $\mu\text{M}$ .

### 2.2.8 Cristalización de proteínas

La cristalización de proteínas es un proceso complejo que se ve afectado por diversos factores químicos y físicos (McPherson & Gavira, 2014) y que consta de varias etapas que se



pueden clasificar en nucleación, crecimiento cristalino y cese de crecimiento (Weber *et al.*, 1991). En la Figura 23 se representa una curva de solubilidad típica de una proteína y los procesos que tienen lugar en cada fase.

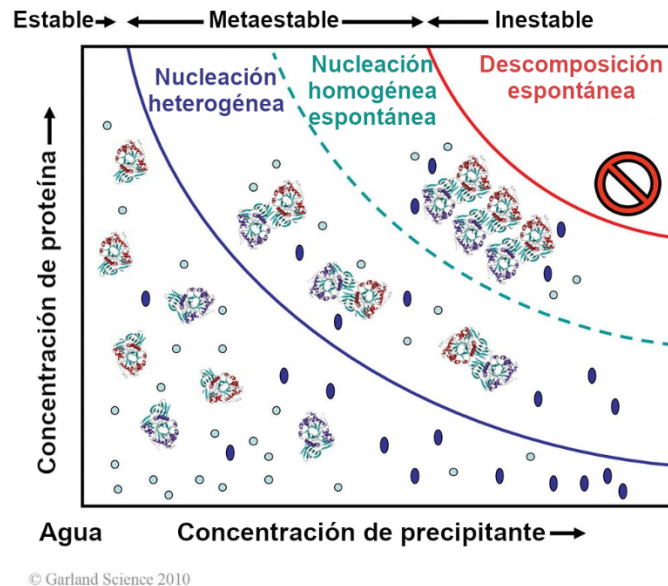


Figura 23. Diagrama de fases básico para una temperatura dada. La línea de solubilidad separa la región que contiene una sola fase (de disolución de proteína) de una región con dos fases, que contiene proteína precipitada y una disolución saturada en equilibrio termodinámico. Al pasar la línea de descomposición no es posible obtener cristales de calidad puesto que se forma precipitado. Es en la zona de nucleación donde comienzan a formarse los primeros núcleos o semillas que darán lugar al cristal. Para que los cristales crezcan a partir de los núcleos formados, es necesario alcanzar la zona metaestable (Biomolecular Crystallography by Bernhard Rupp, © 2009-2014 Garland Science/Taylor & Francis LLC).

La cristalización de proteínas requiere la presencia de un estado de sobresaturación que se puede alcanzar de distintas formas y mediante distintas técnicas (McPherson & Gavira, 2014). La técnica de cristalización utilizada en esta Tesis ha sido la difusión en el vapor, en la cual la sobresaturación se alcanza cuando el vapor de agua de la gota que contiene proteína y agente precipitante difunde hasta el reservorio que contiene la disolución de cristalización. En el caso de la difusión en el vapor por gota colgante, una gota de proteína se mezcla con aproximadamente una cantidad igual de agente precipitante del reservorio y se deposita sobre un cubreobjetos de 22 mm de diámetro (Thermo Scientific). Para sellar el sistema, se engrasa el borde del reservorio y se pone el cubre encima con la gota enfrentada a la disolución de cristalización. El método de difusión en el vapor por gota sentada se basa en el mismo principio, pero en este caso la gota de proteína y la disolución de cristalización descansa sobre un saliente o estante con una pequeña hendidura. Para este tipo de sistema el sellado del reservorio se puede llevar a cabo con una cinta adhesiva.

Para cristalizar las proteínas de interés, en primer lugar, es necesario realizar un cribado de las condiciones de cristalización para encontrar la más adecuada. Para ello se utilizaron los kits de cristalización de Hampton Research y Molecular Dimensions mostrados en el Apéndice 2 y las bandejas para gota sentada de 48 pocillos (MRC). Una vez conocida la condición en la que cristaliza la proteína o con la que aparece precipitado microcristalino o cristales susceptibles a ser mejorados, es necesario optimizarla. Para ello, se realizó un barrido de la concentración del agente precipitante por encima y por debajo de la concentración de cristalización en el orden de  $\pm 0,1$  M. Lo mismo ocurre para el tampón, ya que cuando se conoce el pH al cual la proteína cristaliza o con el que aparece un precipitado microcristalino se lleva a cabo un barrido probando tampones con valores de pH por encima y por debajo del pH de interés en un orden de  $\pm 1,0$  unidades de pH. En algunos casos se puede llevar a cabo un barrido más fino cambiando la composición de la disolución tampón. Como lo que se pretende es hacer un barrido de todas las condiciones posibles para optimizar las condiciones de cristalización, también se pusieron bandejas variando la relación proteína-agente precipitante en la gota en una relación de 1:1, 1:2 y 2:1. De esta manera, se realiza un cribado sencillo de la concentración de proteína para ver cuál es la más idónea.

Para llevar a cabo un control exhaustivo de las bandejas de cristalización, se ha utilizado la clasificación introducida por Hampton Research, asignando un número a cada una de las condiciones más habituales que se pueden observar en una gota. De esta manera, el 1 se corresponde con gota clara, el 2 con separación de fases, el 3 con precipitado granular, el 4 con precipitado microcristalino o microcristales, el 5 se corresponde con esferulitos, el 6 con agujas que crecen en una única dimensión, el 7 con cristales planos y el 8 y 9 con cristales bien formados menores y mayores a 0,2 mm, respectivamente. De esta manera, a través de la observación con el microscopio se puede controlar lo que hay en cada gota, así como su evolución.

En algunas ocasiones las gotas de proteína presentes en la bandeja se mantienen claras a pesar del paso del tiempo. Esto significa que el sistema no ha pasado el límite de solubilidad y por tanto no se ha alcanzado la sobresaturación. Sin embargo, se puede inducir la cristalización introduciendo intencionadamente núcleos de cristalización mediante la técnica de sembrado (Rupp, 2010). Existen, de forma general, dos métodos de sembrado comúnmente nombrados en inglés como microseeding y macroseeding y ambos han sido utilizados a lo largo de esta Tesis. Para llevar a cabo el método de microseeding, se trituran los cristales con una pequeña

varilla de vidrio y se realizan diferentes diluciones de estos con el tampón deseado. La solución diluida se añade a la nueva gota menos saturada con una micropipeta o con un bigote fino de gato o pelo de caballo. En el caso del macroseeding, lo que se hace directamente es introducir un cristal bien formado pero pequeño en una gota nueva en condiciones cercanas a la sobresaturación, pero cuando todavía se mantiene como gota clara. De esta manera, el pequeño cristal introducido puede crecer actuando como semilla para la proteína en disolución presente en la gota.

### 2.2.9 Difracción de rayos X de cristales macromoleculares, resolución estructural, refinado y análisis

Para transportar los cristales a las instalaciones de luz sincrotrón en un Dewar es necesario congelarlos rápidamente con nitrógeno líquido extrayéndolos directamente de la gota con un lazo Litholoop con un rango de tamaño de 0,02-0,5 mm (Molecular Dimensions, Sheffield, UK). Esto, además es necesario para minimizar el daño por radiación de los cristales durante el tiempo de medida. Sin embargo, el agua presente en los cristales puede formar hielo y romper el cristal si el proceso de congelación no se realiza de forma adecuada. Para evitar esto se utilizan agentes crio-protectores que se añaden en la gota donde crece el cristal o bien se transfiere el cristal a una disolución con el crio-protector previamente a la congelación. Los agentes crio-protectores más utilizados son: glicerol, PEGs de bajo peso molecular, MPD, concentraciones altas de sal (cloruro sódico, cloruro de magnesio, formiato sódico, etc) o azúcares como glucosa o sacarosa.

Todos los cristales de este trabajo se midieron en los sincrotrones de ALBA, en la línea de luz BL13-XALOC (Barcelona, España) y en ESRF, en las líneas ID30-A-1/MASSIF-1 e ID30-B/MAD (Grenoble, Francia). Los cristales montados en un lazo sobre una base magnética fueron posicionados en el goniómetro utilizando un brazo robótico. El cristal montado en el goniómetro se visualizó con un microscopio y una cámara digital y se centró en el haz de rayos X utilizando programas como el mxCube. A continuación, a una temperatura de 100 K se recogieron varias imágenes, generalmente cuatro a ángulos separados y a intervalos que nos permitan determinar la celda unidad y la orientación del cristal. Una vez analizadas estas imágenes, el programa EDNA ofrece una estrategia para la colección de los datos con el fin de minimizar el número de imágenes necesarias para alcanzar la completitud de los datos. En la

recogida de los datos se tuvo en cuenta en cada caso las características de la línea de luz, especialmente el tipo de detector, ya que ello determinaba la estrategia a seguir.

Los programas informáticos utilizados para el procesado, refinado y determinación estructural de las proteínas objeto de estudio fueron PHENIX Program Suite, versión 1.13-2998, CCP4 Program Suite, versión 7.0.066 y Coot versión 0.8.9 para Windows (Emsley *et al.*, 2004; Emsley *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2010; Alfonine *et al.*, 2012). Los modelos finales se validaron y revisaron utilizando MolProbity y PDB-REDO. Para analizar las estructuras obtenidas se han comparado unas con otras utilizando el programa *Superpose* de la suite del CCP4 (Krissinel & Henrick, 2004). La comparación de las estructuras del monómero y del dímero de los distintos dominios SH3 analizados en esta Memoria se ha realizado de forma sistemática superponiendo los residuos del extremo amino terminal (85-110) y carboxilo terminal (117-139) de las cadenas A y B del monómero de la proteína nativa con los residuos equivalentes del protómero abierto del dímero entrecruzado. En los casos en los que solo se determinó la estructura dimérica para una proteína concreta, la comparación se ha llevado a cabo superponiendo dicho dímero al monómero de la proteína c-Src-SH3 WT, utilizando las coordenadas PDB 6XVN. Para analizar las regiones más flexibles de la proteína y obtener los valores de factor B para cada residuo, se ha utilizado el programa *Baverage*, también de la plataforma del CCP4 (Dobson, 1991).

A lo largo de la Tesis se han observado iones de sodio en algunas de las estructuras obtenidas a alta resolución, por lo que para analizar y confirmar la unión de dicho metal a ciertos residuos se ha utilizado el servidor web Check my metal (<https://cmm.minorlab.org/>, Zheng *et al.*, 2014; Srinivasan *et al.*, 2017). Este servidor utiliza una serie de algoritmos para validar la geometría y coordinación del metal. Esto se traduce en varios parámetros como la ocupancia, el factor B, la geometría y las desviaciones geométricas (gRMSD) utilizando el algoritmo NEIGHBORHOOD (Zheng *et al.*, 2008). De esta manera, el servidor muestra los resultados utilizando un código de colores en el que el color verde, amarillo y rojo indican que los valores son aceptables, que se encuentran en el límite o que son atípicos.

## 2.2.10 Métodos para la detección de fibras amiloides

Existen distintos métodos para estudiar y comprobar la presencia de oligómeros en disolución como las fibras amiloides a través de la unión de distintos tintes como el rojo congo

(RC), la Tioflavina T (ThT) o el ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico (ANS) a este tipo de agregados.

### **2.2.10.1 Ensayos con rojo congo**

El RC es capaz de unirse específicamente a la estructura de lámina- $\beta$  que forma parte de las fibras amiloides, observándose un desplazamiento del máximo del espectro de absorción hacia longitudes de onda mayores.

Las medidas de RC se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible a 25 °C. La disolución madre de RC fue preparada a 0,1 mM en los tampones acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 5,0 y Hepes 0,1 M pH 7,0. La concentración final de muestra de amiloide y de RC fue de 10 y 20  $\mu$ M, respectivamente. El espectro de absorción para cada una de las muestras se recogió entre 400 y 600 nm, utilizando la disolución del tampón como blanco y una cubeta de vidrio de 1 mL. La presencia de fibras amiloides se determina por el desplazamiento del máximo de absorción a 496 nm hacia longitudes de onda mayores de aproximadamente 540 nm.

### **2.2.10.2 Ensayos con Tioflavina T y ANS**

Existen compuestos como la ThT y el ANS que son capaces de actuar como sondas fluorescentes que cuando se unen específicamente a ciertas estructuras o determinados estados conformacionales cambian el rendimiento cuántico de la fluorescencia. De esta manera, se observa un cambio en la intensidad de fluorescencia al recoger su espectro de emisión. En el caso de la ThT, su interacción específica a las fibras amiloides aumenta considerablemente su intensidad de fluorescencia a aproximadamente 482 nm cuando se excita a 450 nm. Lo mismo ocurre con el ANS, pero en este caso, la interacción se produce específicamente con las regiones hidrofóbicas expuestas al disolvente produciendo un aumento en la intensidad de fluorescencia a 465 nm.

Las medidas de fluorescencia para comprobar la presencia de las fibras amiloides con ThT y ANS se llevaron a cabo a una concentración de 100  $\mu$ M de disolución de amiloide y de 12,5  $\mu$ M y 25  $\mu$ M para la ThT y ANS, respectivamente. Las disoluciones madre de ambos compuestos se prepararon a 2 mM en acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 5,0 y Hepes 0,1 M pH 7,0. Estas medidas se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro a 25 °C. La muestra fue

excitada a 440 nm y el espectro de fluorescencia se recogió entre 450 y 600 nm. Las rendijas de emisión y excitación se mantuvieron a 5 nm para todas las medidas y se utilizó una cubeta de cuarzo para fluorescencia de 3 mm para volúmenes pequeños.

### 2.2.11 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento especialmente útil para analizar muestras biológicas y complejos macromoleculares, permitiendo la detección de agregados de proteínas *in situ*. En esta técnica, el haz de electrones se transmite a través de una muestra ultrafina. De esta manera, los electrones transmitidos son capaces de dar información de la estructura interna de la muestra, su morfología o el tamaño de las partículas, formando las imágenes.

Para visualizar las imágenes de las fibras amiloides, se utilizó el microscopio electrónico JEOL JEM 2100 disponible en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería. Este microscopio consta de un cañón termoiónico con filamento de LaB<sub>6</sub>, un potencial de aceleración entre 120 y 200 kV y una resolución puntual de 0,194 nm y 0,14 nm entre líneas. Para realizar las medidas de las fibras amiloides formadas por las proteínas objeto de estudio, se incubó la proteína en la condición adecuada para favorecer el crecimiento del amiloide durante el tiempo necesario. Para realizar las medidas, se colocaron 20 µL de la proteína sobre una rejilla de cobre recubierta de formvar y carbono y se dejó durante 4 minutos a 25 °C para que esta adsorbiera la muestra. La rejilla se lavó dos veces agua miliQ y se tiñeron las muestras con un 1 % (w/v) de acetato de uranilo durante 1 minuto.

## **Capítulo 3**

Efecto del motivo ATCUN en la estructura y propiedades biofísicas de la c-Src-SH3 tirosina quinasa





Las proteínas objeto de estudio en esta Tesis han sido obtenidas mediante expresión en sistemas heterólogos. Estos sistemas de expresión permiten la inclusión de etiquetas en el extremo amino o carboxilo terminal de las proteínas, que facilitan su purificación prácticamente en un solo paso cromatográfico. Una de las más populares es la etiqueta de histidinas que consiste en incorporar seis histidinas en uno de los extremos de la proteína que facilitan la unión de esta a una columna conteniendo níquel u otro metal (Bornhorst *et al.*, 2010). Estas etiquetas, especialmente si las proteínas son de pequeño tamaño, es conveniente eliminarlas una vez purificada la proteína utilizando proteasas altamente específicas. Para ello se incorpora una secuencia de aminoácidos específica para el corte, conocida como sitio de escisión. En estudios anteriores, nuestro grupo de investigación ha trabajado con el dominio SH3 de la proteína c-Src TQ con una cola de histidinas y un sitio de corte para la proteasa trombina (Bacarizo *et al.*, 2014). El sitio de corte codificado en la secuencia es Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, produciéndose este entre los residuos Arg y Gly. La acción de la proteasa produce un sitio de unión de metales compuesto por los residuos Gly-Ser-His delante de la metionina que señala el inicio de la secuencia clonada del dominio SH3 si el sitio de corte para la trombina se encuentra en el extremo 5' de un plásmido que precede al sitio *NdeI* (CATATG; His-Met). Esta secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal es equivalente a la que está presente de forma natural en algunas proteínas, como por ejemplo la albúmina, y es capaz de unir metales como cobre o níquel, recibiendo el nombre de motivo ATCUN (amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding motif). Dado que esta secuencia amino terminal puede unir metales divalentes, cabe esperar la presencia de metales como el Ni<sup>2+</sup> y el Cu<sup>2+</sup> unidos a estas proteínas. Esto se visualizó en las primeras estructuras monoméricas del dominio c-Src-SH3, cuyas proteínas WT y mutante Gln128Glu cristalizaron en presencia de Ni<sup>2+</sup> (Bacarizo *et al.*, 2014). Este metal formaba un complejo planar, ordenando el extremo amino terminal de la proteína que a su vez servía de contacto cristalino. También se obtuvo la estructura cristalina de la forma monomérica de los mutantes dobles His122Arg-Gln128Glu (PDB: 6XX3 y 6XX4) e His122Arg-Gln128Lys (PDB: 6XX2 y 6XX5) en presencia de níquel y cobre. Este motivo ATCUN en el extremo amino terminal también está presente en la estructura de la quimera c-Src-SH3 con el lazo RT de la Abl (PDB: 5ECA), en el mutante de la c-Src Thr96Gly/Gln128Arg (PDB: 4RTX), en la estructura del complejo formado entre la c-Src-SH3 con el péptido VSL12 (PDB: 4RTZ), en las estructuras de los mutantes de la c-Src Thr98Glu (PDB: 4HVU y 4HVV), Glu93Val (PDB: 5OAV), Gln128Glu (PDB: 5OB0), Glu97Thr (PDB: 5OB2), Glu93Val/Gln128Arg (PDB: 4RTW), Ser94Ala/Gln128Arg con el péptido APP12 (PDB: 4RTV), del mutante Thr98Glu con

el péptido VSL12 (PDB: 4HVW) y de la c-Src-SH3 nativa con el péptido NS5A (PDB: 4QT7), también está presente el motivo ATCUN aunque en ninguno de estos casos se ha obtenido la estructura en presencia de níquel o cobre y no se han modelado estos aminoácidos

Es indudable que la presencia de este sitio de unión de metales puede afectar a las propiedades de la proteína y este efecto puede ser más prominente si se trata de un dominio con pocos aminoácidos como es el dominio SH3. Por ello, en esta Tesis se obtuvo la proteína clonada en un vector que contenía la etiqueta de histidinas y el sitio de corte de TEV (pHTP1) que permitía obtener la proteína sin aminoácidos adicionales en la secuencia (Figura 24).

	..... ..... ..... ..... ..... .....
	60                  70                  80                  90                  100
<b>c-Src-TK</b>	FGTVATEOKL FGGFNSTDTV TSPQRAGALA <b>GV</b> TTTFVALY <b>DY</b> ESRTETDL
<b>c-Src SH3</b>	-----MGSS <b>HHHHHH</b> SSGP QQGLR <b>ENLYF</b> <b>Q</b> GVTTTFVALY <b>DY</b> ESRTETDL
<b>ATCUN-SH3</b>	-----MGSS <b>HHH</b> <b>HHH</b> SSGLVPK <b>G</b> SHMTFVALY <b>DY</b> ESRTETDL
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	110                  120                  130                  140                  150
<b>c-Src-TK</b>	<b>SFKKGERLQI</b> VNNTEGDWWL <b>AHSLTTGQTG</b> YIPSNYVAPS <b>DSIQAE</b> EWYF
<b>c-Src SH3</b>	SFKKGERLQI VNNTEGDWWL AHSLTTGQTG YIPSNYVAPS D-----
<b>ATCUN-SH3</b>	SFKKGERLQI VNNTEGDWWL AHSLTTGQTG YIPSNYVAPS D-----

Figura 24. Secuencias del dominio SH3 de la c-Src clonadas con el motivo ATCUN y sin él (ATCUN-SH3 y c-Src-SH3, respectivamente). Ambas de ellas se comparan con la secuencia de este dominio en la c-Src tirosina quinasa. Los residuos en negro se corresponden con los que pertenecen al dominio SH3 de la c-Src. Los residuos marcados en azul son las seis histidinas que forman la cola y los de color rojo aquellos que se corresponden con los sitios de corte para cada proteasa.

Los resultados de este estudio están publicados en el artículo *The effect of an engineered ATCUN motif on the structure and biophysical properties of the SH3 domain of c-Src tyrosine kinase* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

### 3.1 Expresión y purificación de la c-Src tirosina quinasa

La proteína con (ATCUN-SH3) y sin el motivo ATCUN (c-Src-SH3), se purificó a partir de células *E. Coli* BL21(DE3) en las que se indujo la expresión de la proteína a una temperatura de 22 °C. El corte de la cola de histidinas se realizó con la proteasa trombina para la ATCUN-SH3 y con la proteasa TEV para la c-Src-SH3. El rendimiento de la purificación fue de aproximadamente 10 mg de proteína por litro de cultivo para ambas proteínas. Para comprobar su pureza, se realizó una electroforesis en PAGE-SDS antes y después del corte (Figura 25).

Las fracciones de proteína puras se juntaron y se concentraron a 1 mg/mL, se alicuotaron en volúmenes de 1 mL en tubos Eppendorf y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Antes de

realizar los experimentos, las proteínas se dializaron en el tampón correspondiente con EDTA 1 mM para eliminar las trazas de metal que pudiera quedar unido tras su paso por la columna con níquel. A continuación, se dializó en el tampón de interés para eliminar el EDTA.

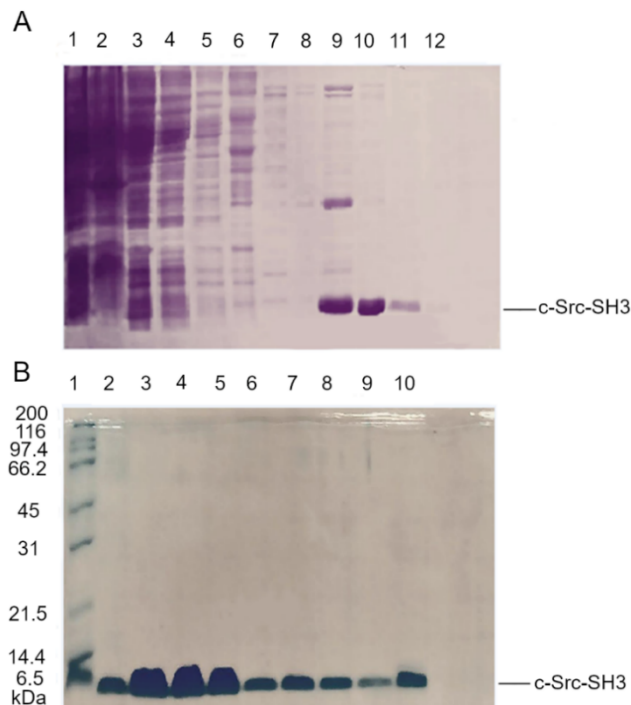


Figura 25. (A) PAGE-SDS de la purificación de c-Src-SH3 antes del corte con trombina. Calle 1: sonificado con los restos celulares y las proteínas, antes de centrifugar; calle 2: pellet; calle 3: sobrenadante; calle 4: FT (fracción del sobrenadante saliente de la columna de afinidad); calles 5, 6 y 7: W1 (lavado con TEC), W2 y W3 (lavados con TEC + imidazol 20 mM); calles 8, 9, 10, 11 y 12: E (eluciones de TEC + imidazol 250 mM). (B) Purificación de c-Src-SH3 después del corte con trombina. Calle 1: patrón; calle 2: FT; calles 3, 4 y 5: lavados con TEC; calles 6-10: lavados con TEC + imidazol 20 mM.

### 3.2 Solubilidad de las proteínas

Un efecto posible del motivo ATCUN es cambiar la solubilidad de la proteína. Por ello, se ensayó la solubilidad de ambas proteínas en ausencia y presencia de metal registrando su espectro UV-visible a 25 °C en los tampones acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0. La ATCUN-SH3 se puede concentrar hasta 30 mg/mL a pH 7,0. A pH 5,0, aunque la proteína aparentemente puede alcanzar concentraciones superiores a 25 mg/mL, el límite no se pudo determinar con precisión debido a que a concentraciones superiores a 20 mg/mL esta proteína forma fibras amiloides tras una hora de incubación (Bacarizo *et al.*, 2014). En el caso de la c-Src-SH3 se observó una menor solubilidad, ya que la proteína precipita al sobrepasar los 17,5 mg/mL a pH 7,0 y los 10 mg/mL

a pH 5,0. Estos experimentos nos permitieron a su vez determinar el coeficiente de extinción molar a partir de la pendiente de la recta obtenida al representar los valores de absorbancia frente a la proteína pesada en cada pH (Figura 26).

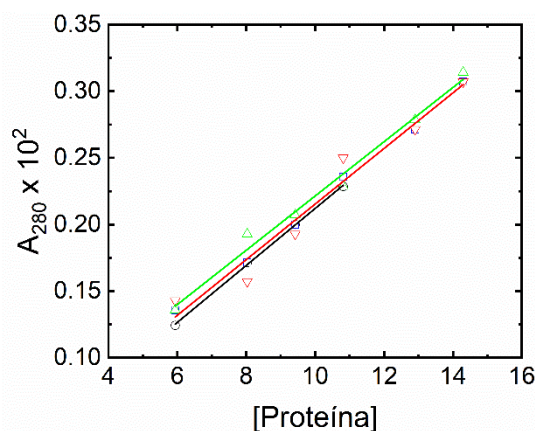


Figura 26. Representación de la absorbancia frente a la cantidad de proteína pesada de la c-Src-SH3 a pH 5,0 (negro) y 7,0 (azul) y de la ATCUN-SH3 a pH 5,0 (rojo) y 7,0 (verde).

Los valores obtenidos a pH 7,0 fueron  $17,9 \pm 0,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para la ATCUN-SH3 y  $17,7 \pm 0,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para la c-Src-SH3. A pH 5,0 se obtuvieron los valores  $17,8 \pm 0,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $17,5 \pm 0,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , para la ATCUN-SH3 y la c-Src-SH3 respectivamente. Comparando este valor con el obtenido con la herramienta ProtParam de ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005) de  $16,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , no se aprecia discrepancia dentro del error de la medida entre el valor medido experimentalmente y el calculado. Este resultado confirma que la diferencia en el extremo amino terminal no afecta al coeficiente de extinción molar de las proteínas.

### 3.3 Unión del níquel al motivo ATCUN de la c-Src-SH3

La unión de níquel a la ATCUN-SH3 se caracterizó mediante la medida de la amortiguación de la fluorescencia intrínseca de la proteína. La concentración del metal se varió entre 0 y 0,3 mM y los experimentos se realizaron a cuatro pHs entre 4,0 y 7,0. En la Figura 27, se muestran las curvas de unión obtenidas en los tampones acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 6,0 y 7,0 a 25 °C. Como blanco, se realizó el mismo experimento con la c-Src-SH3, que a diferencia de la ATCUN-SH3, no presentó amortiguación de la fluorescencia en presencia de níquel.

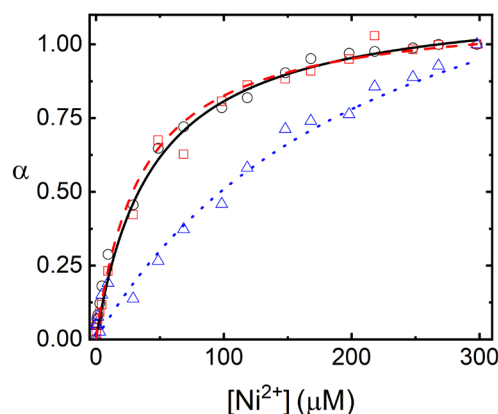


Figura 27. Determinación de las constantes de unión del níquel a la ATCUN-SH3 midiendo la amortiguación de la intensidad de fluorescencia a pH 5,0 ( $\triangle$ ), 6,0 ( $\square$ ) y 7,0 ( $\circ$ ).

A pH 4,0 no se observó unión del metal y los valores de la constante obtenidos para los pHs 5,0, 6,0 y 7,0 son respectivamente:  $4,3 \pm 0,9$  mM,  $22,4 \pm 2,0$  mM y  $28,0 \pm 3,0$  mM. Como se puede observar tanto en las gráficas como en los valores de las constantes, la unión es menor a pH 5,0, mientras que a pH 6,0 y 7,0 prácticamente no existe diferencia. Estos resultados concuerdan con la presencia de la histidina ionizada del motivo ATCUN que permite la unión del metal (Stanyon *et al.*, 2014). Para comprobar el  $pK_a$  teórico de la histidina del motivo ATCUN (His83), se utilizó el servidor PROPKA (Olsson *et al.*, 2011) con las coordenadas depositadas en el PDB de las estructuras de la c-Src-SH3 unidas a níquel. Algunas de las estructuras tienen varias cadenas en la unidad asimétrica, que se tuvieron en cuenta de forma independiente. El valor promedio del  $pK_a$  de la His83 teniendo en cuenta los valores determinados para cada una de las cadenas presentes en las estructuras disponibles fue  $5,1 \pm 0,5$ . Este resultado señala la presencia de una histidina desprotonada para poder facilitar la unión del metal al motivo ATCUN.

### 3.4 Determinación de la geometría del complejo de níquel mediante dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular (CD) es muy útil para medir la geometría de los complejos metálicos ya que en muchos casos estos producen una asimetría que afecta a cómo se desvía la luz polarizada. Son numerosos los trabajos que estudian la geometría de complejos metálicos de cobre y níquel mediante esta técnica (Nishida *et al.*, 1970; Czarnecki *et al.*, 1977; Stanyon *et al.*, 2014; Sedighipoor *et al.*, 2017). Por ello, la geometría del complejo formado por el níquel y la ATCUN-SH3 se estudió registrando el espectro de CD en la zona del espectro visible

(Figura 28) el cual muestra la forma típica de un complejo plano-cuadrado, con una banda positiva a 420 nm y una negativa a 480 nm.

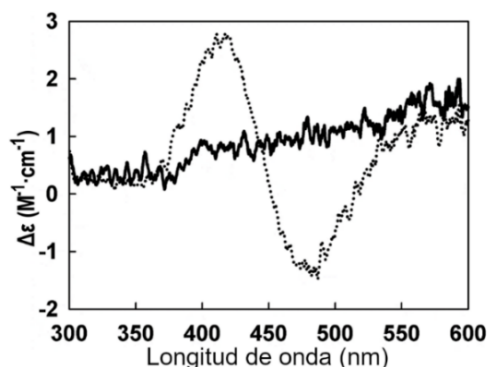


Figura 28. Espectro visible de CD de la ATCUN-SH3 con (línea punteada) y sin (línea) NiCl<sub>2</sub> 1 mM en fosfato sódico 10 mM pH 7,0.

Esta geometría es la que se observa en las estructuras cristalinas obtenidas para la proteína WT (PDB: 4JZ4, 4RTZ) y diversos mutantes (PDB: 4OMO, 4RTX, 6XX2, 6XX3, 6XX4, 6XX5) y se muestra en la Figura 29.

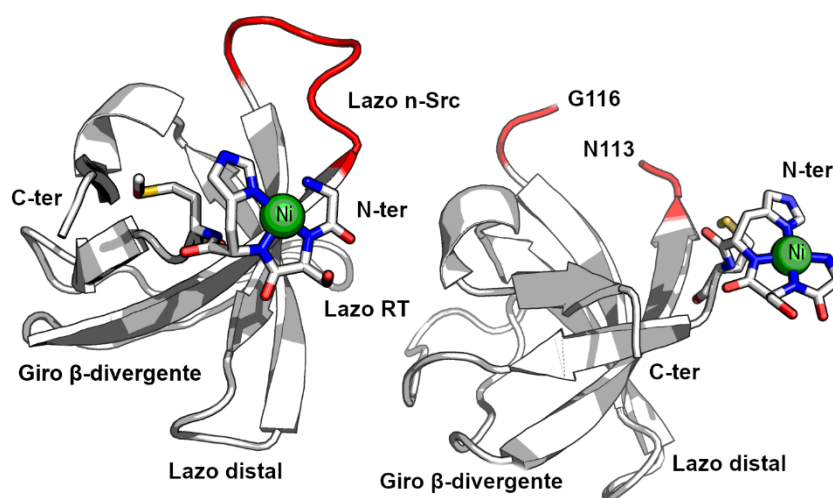


Figura 29. Motivo ATCUN en la proteína c-Src-SH3 WT (PDB: 4JZ4; Bacarizo *et al.*, 2014). La unidad asimétrica está formada por dos cadenas del dominio SH3 representadas en color blanco. En ambas cadenas se puede observar el motivo ATCUN formado por los residuos His83-Ser82-Gly81 unidos al átomo de níquel que se muestra en verde.

### 3.5 Estabilidad con el pH del dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa con y sin el motivo ATCUN

Las gráficas donde se representa la intensidad de fluorescencia normalizada frente al pH (1,0-14,0) muestran una doble sigmoide con una meseta en un rango amplio de pH en el cual la

proteína es estable, entre 5,0 y 11,0. El ajuste de estas curvas nos permite determinar el  $pK_a$  aparente de la proteína en la zona ácida y básica. Para ello se utilizó la Ec. 4 y se aplicó por separado a cada una de las curvas de la doble sigmoide. En la Figura 30 se puede observar que no existen diferencias significativas entre la ATCUN-SH3 y la c-Src-SH3 con y sin concentraciones saturantes de níquel (1 mM).

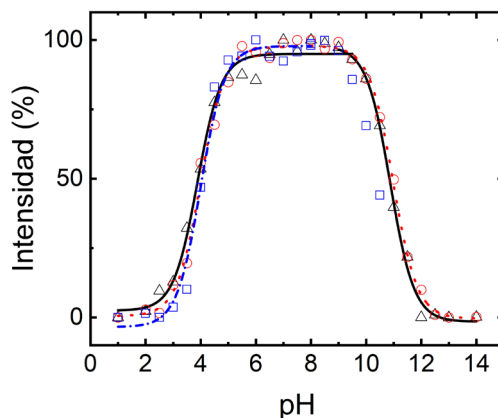


Figura 30. Estabilidad al pH de la c-Src-SH3 (negro,  $\blacktriangle$ ) y ATCUN-SH3 en ausencia (rojo,  $\circ$ ) y presencia (azul,  $\square$ ) de  $NiCl_2$  1 mM obtenida al representar la intensidad de fluorescencia normalizada frente al pH.

La primera transición se inicia a pH ácido y alcanza la meseta a pH 5,0, con un  $pK_a$  aparente de  $4,0 \pm 0,1$  para la c-Src-SH3 y  $4,1 \pm 0,1$  para la ATCUN-SH3. La segunda transición ocurre a pH básico con un  $pK_a$  de 10,8 para ambas proteínas. Sin embargo, este valor de  $pK_a$  no se pudo determinar en presencia de  $NiCl_2$  1 mM puesto que a pHs básicos se forman hidróxidos de níquel que precipitan y dificultan las medidas de fluorescencia.

El dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa tiene 17 grupos ionizables: 4 Asp, 4 Glu, 1 His, 2 Lys, 2 Arg, and 4 Tyr. La ATCUN-SH3 tiene una histidina adicional que se encuentra en el motivo ATCUN del extremo amino terminal. Ambas proteínas muestran prácticamente el mismo valor de  $pK_a$  y la transición observada a pH ácido se debe principalmente a la protonación de los residuos aspartato ( $pK_a=3,65$ ) y glutamato ( $pK_a=4,25$ ). A pH básico, la transición a pH 10,8 puede atribuirse a la protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos tirosina ( $pK_a=10,07$ ) o lisina ( $pK_a=10,53$ ). Estos resultados muestran que la protonación del residuo de histidina presente en el ATCUN no afecta a la estabilidad de la proteína frente al pH.

### 3.6 Desnaturalización química con cloruro de guanidinio

Se estudió la estabilidad de las proteínas con y sin el motivo ATCUN en presencia del agente desnaturante cloruro de guanidinio (GdnHCl) a pH 5,0 y pH 7,0, midiendo la fluorescencia intrínseca de la proteína a 25 °C. Las curvas se ajustaron siguiendo un modelo de dos estados a la Ec. 5. Los resultados obtenidos muestran que las proteínas c-Src-SH3 y ATCUN-SH3 presentan prácticamente los mismos parámetros termodinámicos y que la adición de NiCl<sub>2</sub> 1 mM aumenta la estabilidad de la ATCUN-SH3 a pH 7,0 (Figura 31).

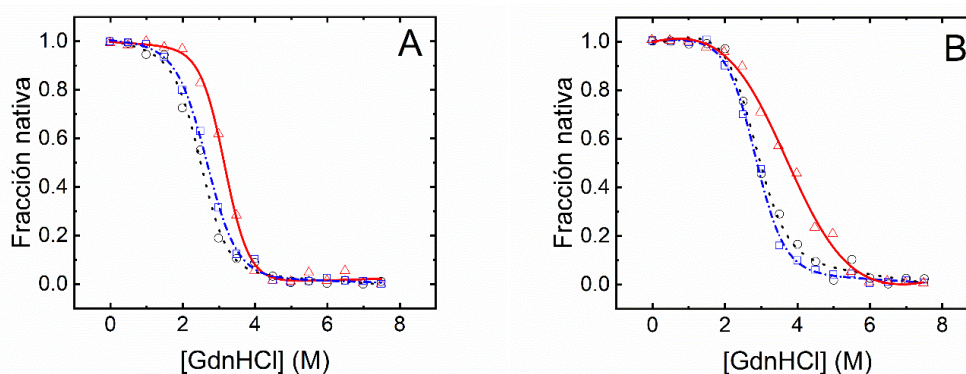


Figura 31. Fracción de proteína nativa de la c-Src SH3 a pH 5,0 (A) y 7,0 (B) frente a distintas concentraciones de cloruro de guanidinio. Las regresiones se muestran con líneas: c-Src-SH3 (negro, ---○---), ATCUN-SH3 en ausencia (azul, ---□---) y en presencia NiCl<sub>2</sub> 1 mM (rojo, —△—).

En la Tabla 4 se muestran los parámetros termodinámicos de  $\Delta G_w$  y  $m_{1/2}$  obtenidos para cada una de las proteínas a pH 5,0 y 7,0 en presencia y ausencia de NiCl<sub>2</sub> 1 mM.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos obtenidos de las curvas de desnaturalización a 25 °C

pH	$m_{1/2}$ (M)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)	
		5,0	7,0
c-Src-SH3	2,43±0,02	11,20±1,50	2,76±0,03
ATCUN-SH3	2,62±0,03	11,60±1,50	2,86±0,02
ATCUN-SH3 + Ni <sup>2+</sup>	3,20±0,02	16,50 ±1,00	3,61±0,15

### 3.7 Estabilidad térmica de la c-Src-SH3 tirosina quinasa con y sin el motivo ATCUN

La estabilidad frente a la temperatura de las proteínas con y sin el motivo ATCUN se midió mediante el cambio de la elipticidad a 222 nm a pH 5,0 y 7,0. Los parámetros termodinámicos



obtenidos  $\Delta H_m$ ,  $\Delta C_p$  y  $T_m$  se muestran en la Tabla 5 y las gráficas resultantes en la Figura 32. En todos los casos, las desnaturalizaciones térmicas fueron reversibles.

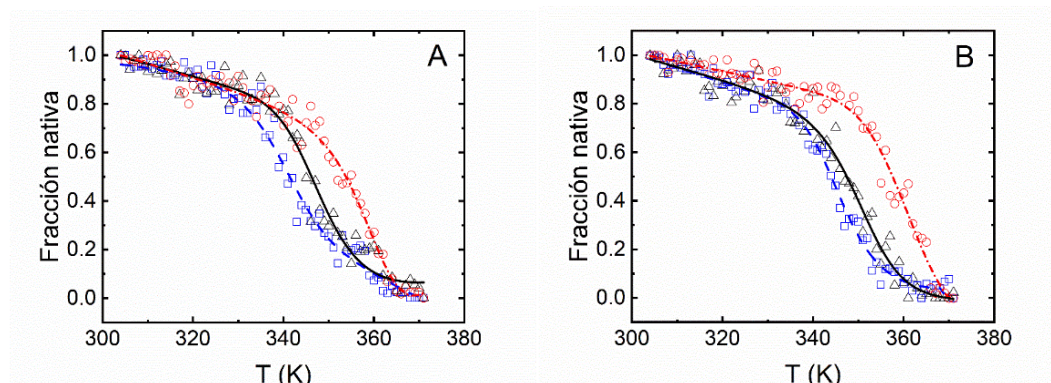


Figura 32. Fracción de la proteína nativa de la c-Src-SH3 frente a la temperatura tanto a pH 5,0 (A) como a pH 7,0 (B). Ajustes para la c-Src-SH3 (negro,  $\blacktriangle$ ), ATCUN-SH3 (azul,  $\square$ ) y ATCUN-SH3 (rojo,  $\circ$ ) con NiCl<sub>2</sub> 1 mM. Las regresiones se ajustaron a las Ec. 10 y 11.

Tabla 5.- Parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica de la c-Src-SH3

	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/mol·K)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/mol·K)
<b>pH</b>	<b>5,0</b>			<b>7,0</b>		
<b>c-Src-SH3</b>	72,4±0,4	308±14	2,2±0,2	75,6±0,5	321±32	2,2±0,1
<b>ATCUN-SH3</b>	71,5±0,6	300±29	2,2±0,1	74,1±0,3	331±23	2,3±0,1
<b>ATCUN-SH3 + Ni<sup>2+</sup></b>	82,1±0,2	399±33	3,4±0,1	84,7±0,3	498±32	3,8±0,3

Las proteínas que unen metales son en general más estables cuando están unidos a estos que en su ausencia (Arnold *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos con la proteína ATCUN-SH3 unida a níquel a pH 7,0 corroboran este tipo de observación.

### 3.8 Caracterización del estado de oligomerización de la c-Src-SH3

El estado de oligomerización de las proteínas se determinó midiendo el  $R_h$  mediante DLS a diferentes concentraciones de proteína y a varios pHs. A pH 5,0, la proteína c-Src-SH3 presenta un  $R_h$  de 1,7±0,1 nm en el intervalo de concentraciones de 5-10 mg/mL, que es el valor característico de la proteína monomérica. No se realizaron medidas a mayor concentración debido a la menor solubilidad de esta proteína. La ATCUN-SH3 en cambio se midió a concentraciones superiores, donde el  $R_h$  experimenta un aumento de su valor hasta 2,3±0,2 nm al superar los 15 mg/mL. Este es el valor de  $R_h$  típico del dímero del dominio SH3 (Bacarizo *et al.*, 2014). Las medidas realizadas con ambas proteínas en presencia de PEG 300 al 5 %

demuestran que este compuesto favorece la formación del dímero en disolución a pH 5,0 y a concentraciones de 5 mg/mL, ya que presentan un valor de  $R_h$  de  $2,3 \pm 0,1$  nm (Bacarizo *et al.*, 2014). A pH 7,0, no se observaron cambios significativos en el  $R_h$  en ambas proteínas en el rango de concentraciones de 5-15 mg/mL ni con la adición de PEG 300, siendo el valor promedio  $1,7 \pm 0,1$  nm para la ATCUN-SH3 y  $1,8 \pm 0,1$  nm para la c-Src-SH3.

Para comprobar si la unión del níquel al sitio ATCUN afectaba de alguna manera al estado de oligomerización de la ATCUN-SH3, se realizaron las mismas medidas, pero en presencia de  $\text{NiCl}_2$  1 mM. Se obtuvo un valor promedio de  $R_h = 1,7 \pm 0,1$  a ambos pHs, lo que indica que la presencia del níquel no afecta al estado de agregación de la proteína.

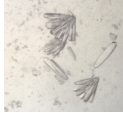
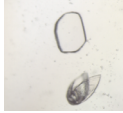

### 3.9 Cristalización y determinación estructural del dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa

La proteína sin el motivo ATCUN se cristalizó mediante el método de difusión en el vapor en gota sentada, mezclando 3  $\mu\text{L}$  de proteína a 10 mg/mL con 3  $\mu\text{L}$  de la disolución precipitante del reservorio. Las gotas se equilibraron frente a 200  $\mu\text{L}$  de dicho agente precipitante. Los cristales del dímero entrecruzado se obtuvieron en una condición similar a la descrita previamente (Bacarizo *et al.*, 2014) y la estructura del monómero se obtuvo de cristales que crecieron en dos condiciones distintas y que se muestran en la Tabla 6. Las estructuras de la ATCUN-SH3 con el níquel se describieron en un trabajo previo (Bacarizo *et al.*, 2014). Estos cristales crecieron mediante difusión en el vapor en gota sentada a 25 °C, usando una concentración de proteína de 10 mg/mL y como precipitante la disolución: sulfato amónico 1,4–1,8 M,  $\text{NiCl}_2$  5 mM, metil  $\beta$ -ciclodextrina 5 mM, glicerol al 10 % y Hepes 0,1 M a pH 7,5.

Todos los cristales de proteína de este trabajo se midieron en las instalaciones de luz sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia) y ALBA (Barcelona, España). Para la resolución estructural, se calcularon las fases mediante reemplazamiento molecular utilizando como modelo la cadena A de la estructura de la ATCUN-SH3 (PDB: 4JZ4) en el programa AutoMR dentro de la plataforma de Phenix (Adams *et al.*, 2010; Alfonine *et al.*, 2012). El modelo final se obtuvo realizando varios ciclos de refinado y modelado manual utilizando Coot (Emsley *et al.*, 2004; Emsley *et al.*, 2010). En los últimos pasos del refinado, cuando los factores R eran iguales o menores del 30%, se añadieron las moléculas de agua y aquellas moléculas de agente

precipitante visibles en la densidad electrónica de los mapas de diferencia. Las coordenadas finales se validaron en la aplicación web del Protein Data Bank (PDB) y a continuación se depositaron en el PDB para cada una de las estructuras.

Tabla 6. Condiciones de cristalización de los cristales de la c-Src-SH3 obtenidos

Imagen	Grupo espacial	Condición	T (°C)	Técnica
	$P2_1$	Sulfato amónico 2,0 M y Tris-HCl 0,1 M pH 8,0	15	Difusión en el vapor
	$P2_1$	Sulfato amónico 2,0 M y Hepes 0,1 M pH 7,0	25	Difusión en el vapor
	$P6_522$	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5 % y acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 5,0	25	Difusión en el vapor

Las estadísticas de la recogida de datos y del modelado final se muestran en la Tabla 1 del Apéndice 3. Las estructuras obtenidas para la proteína c-Src-SH3 fueron las siguientes:

- *Estructura del monómero a pH 7,0.* Cristalizó en presencia de sulfato amónico en el grupo espacial  $P2_1$ , con parámetros de celdilla  $a=28,3 \text{ \AA}$ ,  $b=40,5 \text{ \AA}$ ,  $c=43,5 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=104,3^\circ$  con dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 6XVN).
- *Estructura del monómero a pH 8,0.* Los cristales se obtuvieron en sulfato amónico en el grupo espacial  $P2_1$ , con parámetros de celda  $a=40,6 \text{ \AA}$ ,  $b=52,5 \text{ \AA}$ ,  $c=45,6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=90,1^\circ$  y cuatro moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 6XVM).
- *Estructura del dímero entrecruzado.* La proteína cristalizó en pH ácido, sulfato amónico y PEG 300 en el grupo espacial  $P6_522$  con parámetros de celdilla  $a=b=46,9 \text{ \AA}$ ,  $c=126,6 \text{ \AA}$  que son prácticamente iguales a los obtenidos en un trabajo previo para la ATCUN-SH3 ( $a=b=47,0 \text{ \AA}$  y  $c=126,2 \text{ \AA}$ ) y una molécula en la unidad asimétrica (PDB: 6XVO).

Las estructuras de los dos polimorfos de los monómeros para la proteína sin el motivo ATCUN se muestran en la Figura 33.

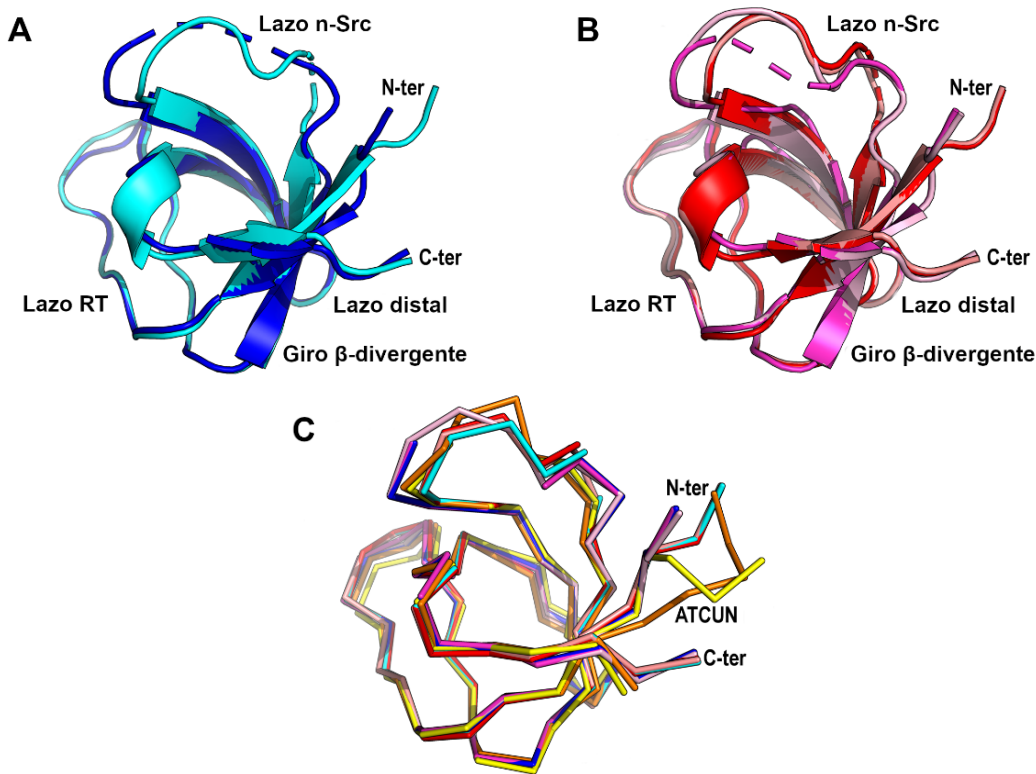


Figura 33. (A) Representación de la estructura de la WT a pH 7,0 (PDB: 6XVN). Las dos cadenas de la unidad asimétrica se muestran en azul (cadena A) y cian (cadena B). La línea discontinua se debe a los aminoácidos del lazo n-Src que no están modelados. (B) Representación de la WT a pH 8,0 (PDB: 6XVM). Las cuatro cadenas de la unidad asimétrica se muestran en rojo (cadena A), magenta (cadena B), salmón (cadena C) y rosa (cadena D). (C) Superposición de todas las cadenas de la estructura monomérica, donde las cadenas de la estructura del ATCUN (PDB: 4JZ4) se muestran en naranja (cadena A) y amarillo (cadena B).

En la estructura I, las dos cadenas muestran una conformación distinta, especialmente en el lazo n-Src. Lo mismo ocurre en la estructura II, en la que las cadenas B y D son equivalentes pero distintas a las cadenas A y C. Superponiendo ambas estructuras, se puede observar que la cadena A de la estructura I es equivalente a las cadenas B y D de la estructura II, mientras que la cadena B de la estructura I lo es a las cadenas A y C de la II. Las mayores diferencias entre todas las cadenas se encuentran en el lazo n-Src, el RT y el extremo amino terminal. Además, todas las cadenas exceptuando la C y D de la estructura II, tienen el lazo n-Src parcialmente modelado debido a la falta de densidad electrónica en los mapas de diferencia de los aminoácidos Thr114 y Glu115. Esto se debe a la gran flexibilidad de este lazo en la proteína libre asociada a su función en la unión de motivos ricos en prolina.

En ambas estructuras, el extremo amino terminal se modeló completamente. La comparación de las estructuras sin el motivo ATCUN con aquellas obtenidas previamente que sí contienen este motivo mantienen las interacciones y contactos ya descritos en trabajos anteriores

(Bacarizo *et al.*, 2014). Como diferencia principal, las estructuras del ATCUN-SH3 muestran los tres residuos amino terminales, Gly81-Ser82-His38, unidos a níquel a través de los átomos de nitrógeno peptídicos y de la cadena lateral de la histidina. La distancia promedio al átomo de níquel con los correspondientes átomos de nitrógeno es de  $1,9 \pm 0,1$  Å. En la Figura 34, se compara el extremo amino terminal modelado a pH 5,0 y a 7,5.

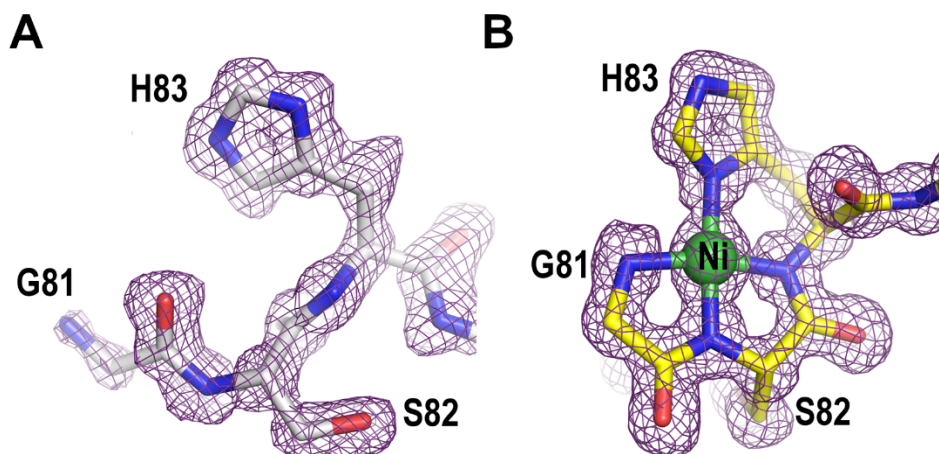


Figura 34. (A) Motivo ATCUN de la c-Src-SH3 a pH 5,0 (PDB: 4HVW). Los residuos que forman parte del motivo ATCUN se muestran con bastones. (B) Motivo ATCUN en la estructura resuelta a pH 7,5 (PDB: 4RTZ). Los residuos que pertenecen al motivo ATCUN unido al átomo de níquel se muestran con bastones y esferas, respectivamente.

En las Figuras 35 y 36, se muestra la superposición de los protómeros abiertos de la c-Src-SH3 con y sin el motivo ATCUN. La comparación de la c-Src-SH3 con la estructura descrita previamente para el dímero entrecruzado de la ATCUN-SH3 (PDB: 4JZ4; Bacarizo *et al.*, 2014) no muestra diferencias significativas como indica el RMSD de los residuos de la cadena principal que es  $0,19$  Å.

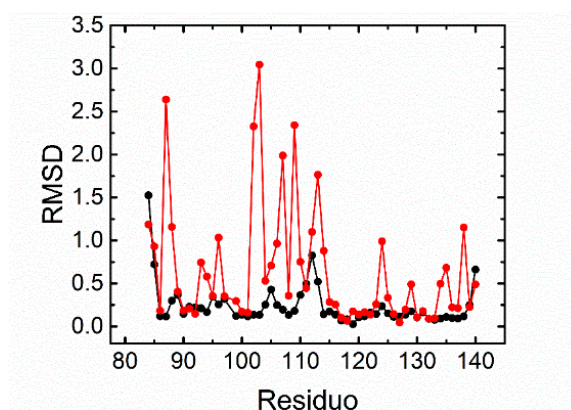


Figura 35. Superposición de la estructura del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 (6XVO) con la ATCUN-SH3 (4JZ3). En negro se muestran las desviaciones correspondientes a los residuos de la cadena principal y en rojo los de las cadenas laterales.

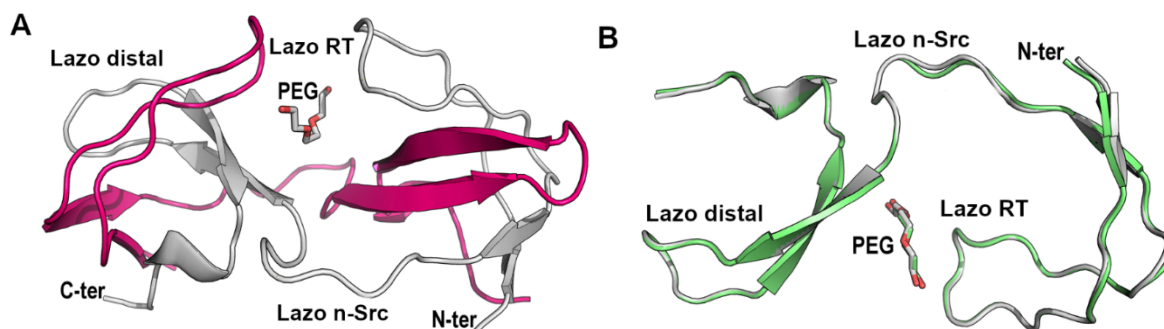


Figura 36. (A) Representación de la estructura de la c-Src-SH3 a pH 5,0 (blanco). El dímero entrecruzado mostrado en magenta se ha generado por simetría. La molécula de PEG que se encuentra en la interfaz del dímero se ha representado mediante bastones. (B) Superposición de las cadenas del protómero abierto en la estructura del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 sin el ATCUN (PDB: 6XVO) y con el ATCUN (PDB: 4JZ3).

### 3.10 Discusión

En este capítulo hemos estudiado el efecto producido por los aminoácidos que se introducen de forma artificial en la secuencia de las proteínas obtenidas en sistemas expresión heteróloga. Mientras estos representan grandes ventajas al poder introducir etiquetas que permiten la purificación de las proteínas en un solo paso mediante columnas cromatográficas de afinidad, la mayoría de las veces es necesario añadir un sitio de corte que introduce residuos adicionales en la secuencia amino o carboxilo terminal de la proteína. En esta Tesis hemos utilizado un pequeño dominio modular como el dominio SH3 de la c-Src TQ, de solo unos 60 residuos, cuyo comportamiento se puede ver afectado por la presencia de residuos adicionales de la etiqueta de histidinas. Por ello, esta se elimina tras la purificación mediante incubación con una proteasa. Esto implica introducir la secuencia específica para el corte de la proteasa entre la secuencia de las histidinas y la de la proteína. En estudios previos esto se llevó a cabo con la proteasa trombina y las estructuras del monómero de la c-Src-SH3 WT y el mutante Gln128Glu pusieron de manifiesto que los aminoácidos adicionales que quedaban tras el corte con la proteasa (Gly81-Ser82-His83) (PDB: 4JZ4, 4OMO) se unían a níquel o cobre formando un complejo plano-cuadrado (Bacarizo *et al.*, 2014). Este sitio de unión de níquel y cobre se denomina sitio ATCUN y está presente de forma natural en algunas proteínas. Sin embargo, lo más importante es que está presente en numerosas proteínas estudiadas que se han obtenido con el vector pET15b que presenta el sitio de corte para trombina tras la etiqueta de histidinas en el amino terminal. Ante la posibilidad de que estos aminoácidos adicionales puedan estar afectando al comportamiento de la proteína, al iniciar esta Tesis se clonaron las proteínas a estudiar en un nuevo vector que no introdujera aminoácidos adicionales a la secuencia codificada del dominio

SH3 de la c-Src-SH3. Por ello, se utilizó el vector pHTP1 que presenta también las seis histidinas, pero la proteasa en este caso es la TEV y no introduce residuos adicionales. Hemos realizado un estudio comparativo tanto de las estructuras como de las propiedades biofísicas de las proteínas obtenidas en ambos vectores para caracterizar el efecto de los aminoácidos que constituyen el sitio ATCUN.

Las estructuras de los dímeros entrecruzados de la c-Src-SH3 cristalizada en esta Tesis y de la ATCUN-SH3 obtenida previamente en nuestro laboratorio (PDB: 4JZ3) se han determinado a partir de cristales obtenidos a pH ácido. A este pH, la unión del níquel al motivo ATCUN no tiene lugar, por lo que las proteínas muestran un plegamiento prácticamente idéntico ya que los residuos del extremo amino terminal de ambas se encuentran desordenados. Sin embargo, en las estructuras del monómero de la ATCUN-SH3 obtenidas por encima de pH 6,5 (PDB: 4JZ4) sí se observa el níquel unido al extremo amino terminal de la proteína a través de los residuos Gly81-Ser82-His83, que adquieren una geometría plano-cuadrada confirmada por el espectro de CD en la zona visible. La estructura del complejo de níquel con el extremo amino terminal en la ATCUN-SH3 presenta características similares, aunque su orientación respecto al resto la proteína es muy diversa. Esto es consecuencia de que este sitio de unión de metales a su vez actúa de contacto cristalino. En la mayoría de las estructuras de la ATCUN-SH3, el anillo imidazol de la His83 forma una interacción  $\pi$ - $\pi$  con los anillos aromáticos de los residuos Tyr90 o Trp118 de la molécula generada por simetría. Además, la presencia del níquel obliga a adoptar una estructura tensionada de los tres aminoácidos ligados al metal, lo que da lugar a que la Ser82 se encuentre localizada fuera de las zonas favorecidas del Ramachandran. Una inspección de las estructuras que presentan este motivo ATCUN en el PDB demuestra que esta es precisamente una marca característica de la presencia de este motivo. De esta forma, el motivo Gly-Ser-His está presente en el extremo amino terminal de al menos 5000 estructuras de proteína depositadas en el PDB. De estas, al menos 9 proteínas (25 estructuras) han sido resueltas con el motivo ATCUN unido a un metal, aunque en la mayoría de los casos esta característica ni se cita en las correspondientes publicaciones que describen la estructura (Chaudhuri *et al.*, 2003; Athanasiadis *et al.*, 2005; Yaniv *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Bacarizo *et al.*, 2014; Higgins *et al.*, 2014; Pichlo *et al.*, 2019).

Al comparar la cadena principal de las estructuras obtenidas a pH neutro se puede observar que el motivo ATCUN, a pesar de las orientaciones distintas, no influye en el plegamiento global de la proteína. Por ello, la introducción de este motivo puede ser ventajoso desde el punto

de vista cristalográfico ya que se pueden generar nuevos contactos cristalinos que favorezcan y faciliten la cristalización. Además, también presenta la ventaja de, dado el número de electrones del metal introducido, ser útil para obtener las fases por dispersión anómala (Athanasiadis *et al.*, 2005; Yaniv *et al.*, 2012). En otros casos este motivo ATCUN unido a cobre también se ha utilizado para experimentos de caracterización del estado desplegado del dominio SH3 de la *Drosophila* drk N-terminal (drkN) mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (Donaldson *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 2007).

A pesar de que el motivo ATCUN ofrece ciertas ventajas en la caracterización estructural de las proteínas, nuestros resultados demuestran que deben considerarse también los cambios introducidos en las propiedades biofísicas de la proteína. En nuestro caso, las medidas de solubilidad muestran grandes diferencias entre la c-Src-SH3 y la ATCUN-SH3, siendo significativamente más soluble la proteína con el motivo ATCUN que la que no lo tiene. Este resultado es de esperar dado que se ha introducido en la secuencia tres aminoácidos que por sus características polares facilitan la solubilidad. Los estudios previos realizados con la proteína que contenía el motivo ATCUN demostraron que esta formaba dímeros a partir de concentraciones superiores a los 10 mg/mL, al mismo tiempo que a concentraciones superiores a 20 mg/mL y 25 °C se producían agregados de mayor orden que fueron caracterizados como fibras amiloides.

Al eliminar los tres aminoácidos polares del extremo amino terminal, la solubilidad de la proteína se reduce sensiblemente. La diferencia de solubilidad afecta de forma directa al estado de oligomerización de los dominios c-Src-SH3. Debido a esto, no se ha observado la formación de amiloides en la c-Src-SH3 expresada sin el sitio ATCUN ya que no se ha podido alcanzar la concentración necesaria (>20 mg/mL) para formar estos agregados (Bacarizo *et al.*, 2014). Las medidas de estabilidad realizadas mediante diferentes técnicas muestran que, en ausencia de níquel, tanto la c-Src-SH3 como la ATCUN-SH3 se comportan de una manera muy similar, sin embargo, la unión del metal al extremo amino terminal provoca un aumento de estabilidad química y térmica muy significativo, especialmente a pH 7,0. A pH 5,0, la constante de unión del metal disminuye y a pH 4,0 no se observa la unión al motivo ATCUN. Esta dependencia del pH en la unión del metal corrobora la presencia de la cadena lateral de la His83 desprotonada para formar parte del complejo quelante. Las diferencias en la estabilidad de la c-Src-SH3 y la ATCUN-SH3 pueden ser atribuidas a la estabilización energética que se produce tras la formación del complejo de níquel (Arnold *et al.*, 1994).



Tras los resultados descritos, cabe destacar que la presencia de este motivo ATCUN en el extremo amino terminal de las proteínas podría utilizarse para facilitar la cristalización de estas, además de desarrollar nuevas propiedades catalíticas en proteínas con interés biotecnológico (Neupane *et al.*, 2014; Mitial *et al.*, 2016). Sin embargo, las posibles modificaciones en las propiedades biofísicas de la proteína deben ser un factor a tener en cuenta.



## **Capítulo 4**

Propiedades biofísicas y estructurales de las quimeras  
y mutantes de la c-Src-SH3 tirosina quinasa



En este capítulo se va a analizar el efecto que produce el intercambio de los lazos RT y n-Src de la c-Src-SH3 por los presentes en la Fyn-SH3 (Figura 37). Además, debido a que estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado efectos electrostáticos en el lazo distal que pueden afectar a la estabilidad y plegamiento de este dominio modular, también hemos incluido varios mutantes de este lazo (Bacarizo *et al.*, 2014), que se encuentran recogidos en la Figura 38.

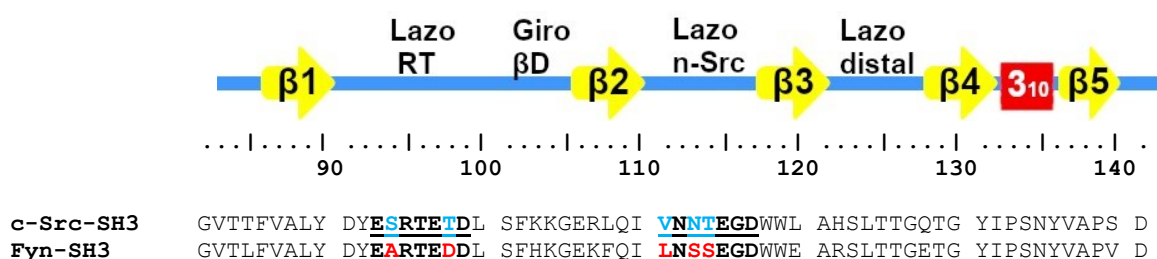


Figura 37. Secuencias alineadas del dominio SH3 de la c-Src y la Fyn tirosina quinasa. La representación esquemática de la estructura secundaria se muestra en la parte superior. Los lazos RT y n-Src se encuentran subrayados y los aminoácidos no conservados entre ambas proteínas se muestran en azul para el caso de la c-Src y en rojo para la Fyn, siendo la homología entre ambas del 80 %. La numeración mostrada se corresponde con la c-Src-SH3, 58-141, mientras que la Fyn SH3 presenta la numeración 59-142.

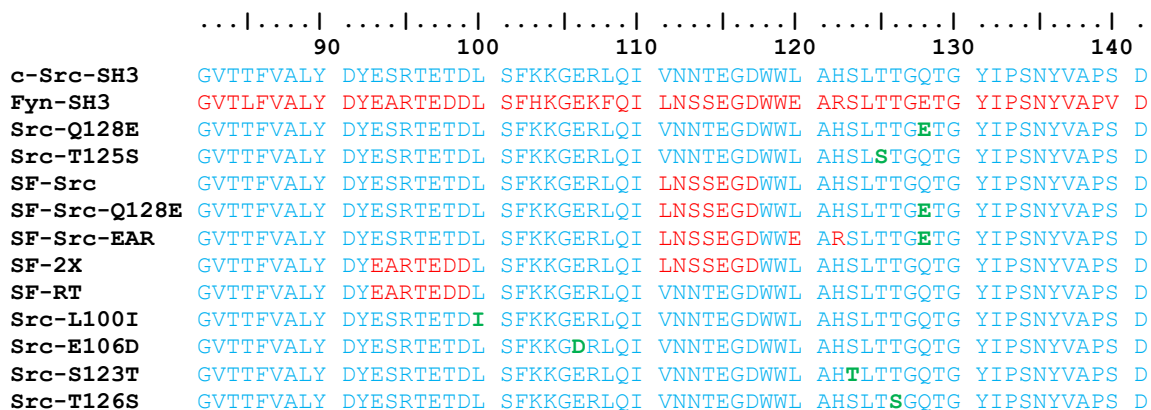


Figura 38. Secuencias de las proteínas del dominio SH3. La secuencia de la c-Src-SH3 se muestra en color azul y la de la Fyn-SH3 en color rojo. Las mutaciones puntuales se pueden observar en color verde. Como en la figura anterior, la numeración de referencia es la de la c-Src-SH3.

## 4.1 Expresión y purificación de las quimeras y mutantes de la c-Src

Las proteínas fueron clonadas con el vector de expresión pHTP1 con resistencia a kanamicina y un sitio de corte de la etiqueta de histidinas para la proteasa TEV. En la Tabla 7 se muestran las temperaturas de inducción utilizadas para optimizar la expresión de cada proteína, así como el valor medio de los rendimientos obtenidos de las purificaciones.

Tabla 7. Temperaturas de inducción y rendimiento obtenido de cada proteína

Proteína	T de inducción (°C)	Rendimiento (mg por L de cultivo)
SF-Src	37,0	157±12
SF-Src-Q128E	37,0	122±10
SF-Src-EAR	37,0	125±13
SF-2X	22,0	45±6
SF-RT	22,0	58±8
Src-L100I	22,0	20±4
Src-E106D	22,0	18±2
Src-S123T	22,0	5±1
Src-T125S	22,0	93±9
Src-T126S	22,0	25±4
Src-Q128E	22,0	16±2

Los mayores rendimientos se obtuvieron con las proteínas quimeras y el mutante Src-T125S. Por otro lado, es destacable el bajo rendimiento del mutante Src-S123T y otros mutantes del sitio de nucleación. A lo largo de la expresión y purificación, la pureza de la proteína se comprobó mediante PAGE-SDS (Figura 39). Una vez alcanzado el nivel de pureza deseado (>90%) tras pasar la proteína por columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 acoplada a un equipo FPLC ÄKTAprime plus, esta se guardó a -20 °C en alícuotas de 1 mL a una concentración ~1 mg/mL en tubos Eppendorf en el tampón fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 8,0, cloruro sódico 350 mM. Previo uso, la proteína se dializó en el tampón de interés.

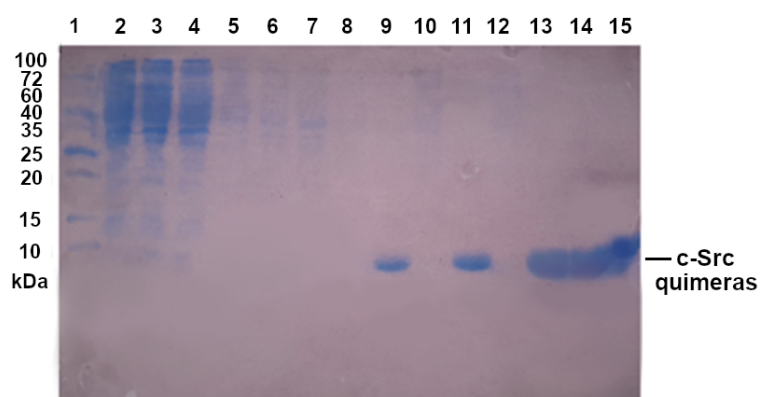


Figura 39. (A) PAGE-SDS de las purificaciones de las quimeras SF-Src, SF-RT y SF-2X. En la calle 1 se puede observar el patrón; en las calles 2, 3 y 4 se muestran los lavados con TEC de las quimeras SF-Src, SF-RT y SF-2X; en las calles 5, 6 y 7 los lavados con TEC + imidazol 20 mM de la SF-Src, SF-RT y SF-2X, en las calles 9 y 11 la proteína c-Src-SH3 y el mutante Src-Q128E, respectivamente, y en las calles 13, 14 y 15 las eluciones con TEC + 250 mM de imidazol que se corresponden con las proteínas SF-Src, SF-RT y SF-2X.

## 4.2 Solubilidad de las proteínas

En la Tabla 8 se muestran los límites de solubilidad de las quimeras y mutantes de la c-Src en los tampones acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0. El tramo lineal obtenido de la representación de la absorbancia medida en función de la concentración de proteína en disolución (Figura 40), proporciona el coeficiente de extinción molar que es el mismo a ambos pHs y tiene un valor promedio de  $\epsilon_{280}=17,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Este resultado es equivalente al valor calculado con la herramienta ProtParam ExPasy (Gasteiger E. *et al*, 2005), que da un valor de  $16,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Como era de esperar, el coeficiente de extinción molar no varía entre los diferentes mutantes y construcciones de la c-Src, ya que no se ven afectados aminoácidos implicados en la absorbancia a 280 nm de la proteína.

Los límites de solubilidad son similares a los obtenidos para la c-Src WT. A pH ácido, ninguna de las proteínas supera concentraciones mayores de 15 mg/mL, siendo la quimera SF-Src-EAR y los mutantes Src-Q128E, Src-L100I, Src-E106D y Src-T126S los más insolubles con un límite de solubilidad en torno a 12 mg/mL. A pH 7,0, ninguna de ellas alcanza concentraciones superiores a 20 mg/mL. La proteína menos soluble es el mutante Src-S123T, que precipita fácilmente al concentrarla a más de 8 mg/mL tanto a pH ácido como pH neutro.

Tabla 8. Solubilidad de las proteínas a pH 5,0 y 7,0

Proteína	Límite de solubilidad (mg/mL)	
	pH 5,0	pH 7,0
SF-Src	15,1	19,1
SF-Src-Q128E	13,2	18,7
SF-Src-EAR	12,3	17,9
SF-2X	15,6	19,2
SF-RT	14,2	18,6
Src-L100I	11,6	19,1
Src-E106D	11,8	18,5
Src-S123T	9,1	17,1
Src-T125S	15,1	18,7
Src-T126S	12,0	19,2
Src-Q128E	12,5	19,8

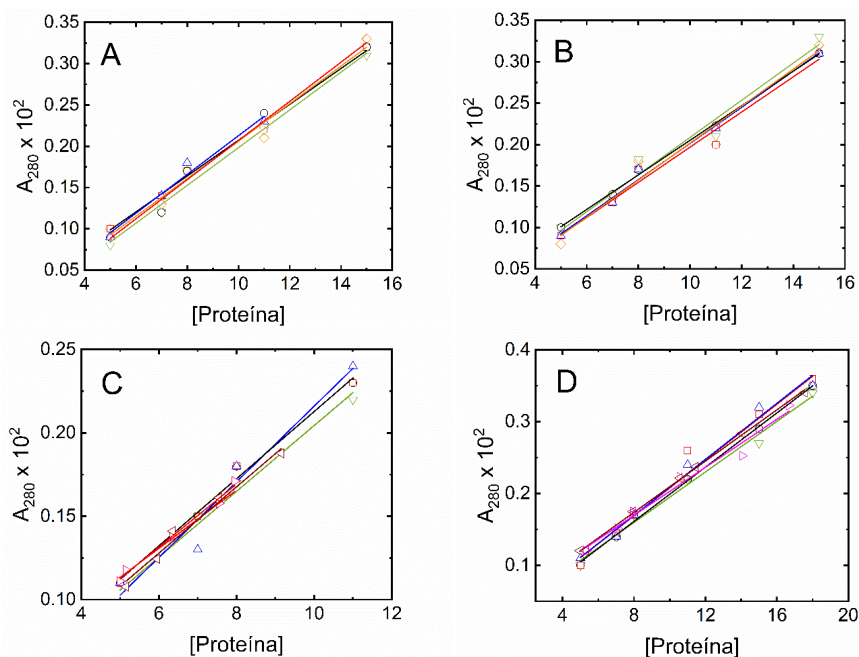


Figura 40. Representación de la absorbancia frente a la cantidad de proteína pesada de las quimeras de la c-Src-SH3: SF-Src (naranja), SF-Src-Q128E (negro), SF-Src-EAR (azul), SF-2X (rojo) y SF-RT (verde) a pH 5,0 (A) y 7,0 (B) y de los mutantes del sitio de nucleación: Src-L100I (azul), Src-E106D (negro), Src-S123T (verde), Src-T125S (marrón), Src-T126S (rojo) y Src-Q128E (magenta) a pH 5,0 (C) y 7,0 (D), respectivamente.

### 4.3 Estabilidad con el pH de los mutantes del dominio SH3 de la c-Src

Las curvas obtenidas al representar la intensidad de fluorescencia frente al pH en el intervalo de pH 1,0-14,0 presentan la forma característica de doble sigmoide, con una meseta en el rango de pH de máxima estabilidad de la proteína. En la Figura 41 se muestran las curvas para cada proteína ajustadas a la Ec. 4 y en la Tabla 9 los valores de pK<sub>a</sub> aparentes del desplegamiento en la zona ácida y básica, respectivamente.

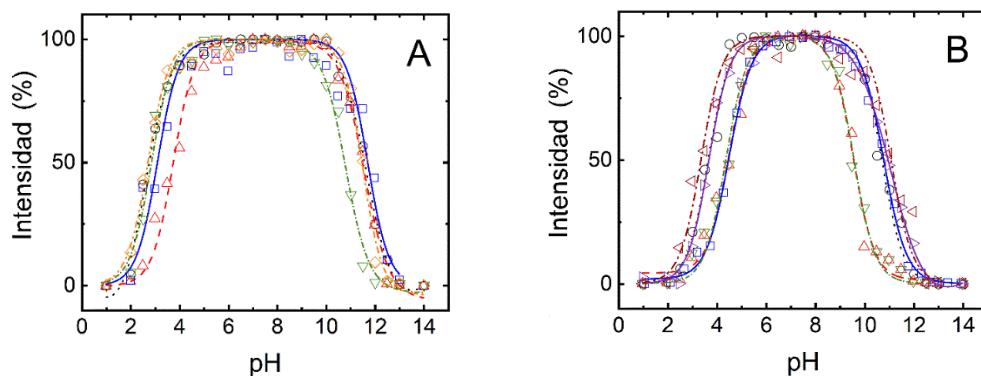


Figura 41. Estabilidad vs. pH de las (A) quimeras c-Src-SH3: SF-Src (azul, —□—), SF-Src-Q128E (naranja, ---◇---), SF-Src-EAR (verde, ---▽---), SF-2X (negro, ...○...) y SF-RT (rojo, ---△---). (B) Src-L100I (azul, —□—), Src-E106D (negro, ...○...), Src-S123T (rojo, ---△---), Src-T125S (marrón, ---◁---), Src-T126S (verde, ---▽---) y Src-Q128E (magenta, —▷—).



Tabla 9. Valores de pK<sub>a</sub> aparente obtenidos para la desnaturalización ácida y básica

Proteína	Número de grupos ionizables							
	pK <sub>a</sub> (Acido)	pK <sub>a</sub> (Básico)	Asp	Glu	His	Tyr	Lys	Arg
SF-Src	3,2±0,1	11,7±0,2	4	4	1	4	2	2
SF-Src-Q128E	3,0±0,1	11,4±0,1	4	5	1	4	2	2
SF-Src-EAR	3,0±0,1	10,6±0,2	4	6	0	4	2	3
SF-2X	3,1±0,1	11,5±0,1	5	4	1	4	2	2
SF-RT	3,9±0,1	11,4±0,1	5	4	1	4	2	2
Src-L100I	4,3±0,1	11,0±0,1	4	4	1	4	2	2
Src-E106D	3,6±0,1	11,2±0,1	5	3	1	4	2	2
Src-S123T	4,5±0,1	9,4±0,1	4	4	1	4	2	2
Src-T125S	3,4±0,1	11,4±0,2	4	4	1	4	2	2
Src-T126S	4,3±0,1	9,6±0,1	4	4	1	4	2	2
Src-Q128E	3,7±0,1	10,9±0,1	4	5	1	4	2	2

En todas las quimeras se observa una transición a pH ácido con un pK<sub>a</sub> en torno a 3,0, excepto en el caso de la quimera SF-RT, en la que el pK<sub>a</sub> aparente aumenta una unidad. Las transiciones a estos pHs se podrían atribuir a la protonación de algún resto aspártico (pK<sub>a</sub>=3,65) y en menor grado de glutámico (pK<sub>a</sub>=4,25). En la zona de desnaturalización básica, el pK<sub>a</sub> aparente medido está en torno a 11,0, y por tanto pueden estar implicados residuos tirosina (pK<sub>a</sub>=10,07), lisina (pK<sub>a</sub>=10,53) y en menor grado arginina (pK<sub>a</sub>=12,48). El intervalo de estabilidad frente al pH se extiende desde pH 4,0 a 11,0, excepto para la quimera SF-Src-EAR que es ligeramente más inestable a pH básico.

Los mutantes del sitio de nucleación presentan los mismos grupos ionizables que la c-Src WT (4 Asp, 4 Glu, 1 His, 2 Lys, 2 Arg y 4 Tyr), excepto los mutantes Src-E106D y Src-Q128E. De nuevo, los valores de pK<sub>a</sub> promedios en torno a pH 4,0, señalan a la protonación de residuos aspartato y glutamato como responsables de la desnaturalización en la zona ácida. En la zona básica es destacable la menor estabilidad de los mutantes Src-S123T y Src-T126S, que presentan un pK<sub>a</sub> aparente medio en torno a 9,5.

#### 4.4 Desnaturalización química con cloruro de guanidinio

En la Figura 42 se muestra la desnaturalización en presencia de cloruro de guanidinio de las diferentes quimeras y mutantes del dominio SH3 de la c-Src. Los experimentos se llevaron a cabo en acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0. Las curvas de desnaturalización se han ajustado a un modelo simple de dos estados

utilizando la Ec. 5 y en la Tabla 10 se muestran los valores obtenidos en este ajuste para cada proteína.

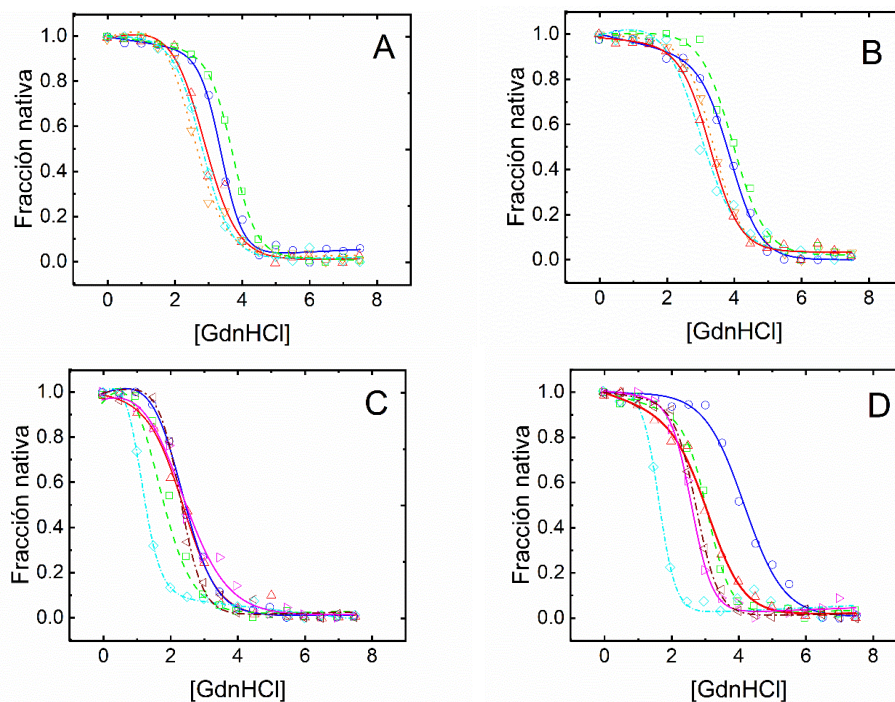


Figura 42. Fracción de la proteína nativa de las quimeras de la c-Src-SH3: SF-Src (azul, —○—), SF-Src-Q128E (naranja, ⋯▽⋯), SF-Src-EAR (cian, ---◇---), SF-RT (rojo, —△—) y SF-2X (verde, ---□---) frente a concentración de cloruro de guanidinio a (A) pH 5,0 y (B) pH 7,0; y de los mutantes del sitio de nucleación: Src-L100I (azul, —○—), Src-E106D (rojo, —△—), Src-S123T (cian, ---◇---), Src-T125S (marrón, --◁--), Src-T126S (verde, ---□---) y Src-Q128E (magenta, —▷—) frente a concentración de cloruro de guanidinio a (C) pH 5,0 y (D) pH 7,0.

Tabla 10. Parámetros termodinámicos obtenidos de las curvas de desnaturalización a 25 °C

	$m_{1/2}$ (M)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)	$m_{1/2}$ (M)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)
pH	5,0		7,0	
SF-Src	3,45	20,7±2,0	3,87	26,7±1,5
SF-Src-Q128E	2,52	13,1±1,0	3,10	20,1±1,0
SF-Src-EAR	2,73	14,0±1,5	2,80	15,8±1,0
SF-2X	3,92	26,5±2,0	4,34	31,7±2,0
SF-RT	2,91	17,2±2,0	3,20	24,5±2,0
Src-L100I	2,33	14,1±2,0	4,08	26,5±1,0
Src-E106D	2,32	13,6±1,0	3,00	17,3±1,0
Src-S123T	1,41	5,4±0,9	1,66	8,7±2,0
Src-T125S	2,44	16,8±1,0	2,66	15,5±2,0
Src-T126S	1,86	6,5±0,5	3,04	15,2±1,5
Src-Q128E	2,39	12,7±1,0	2,64	15,8±1,5

Todas las quimeras y mutantes son más estables a pH 7,0 que a pH 5,0 y la quimera SF-2X se caracteriza por ser la más estable a ambos pHs, lo que permite concluir que la introducción

de ambos lazos de la Fyn en el dominio SH3 de la c-Src producen una estabilización frente a la desnaturalización con GdnHCl. Es especialmente destacable la menor estabilidad del mutante Src-S123T, que junto con el mutante Src-T126S presenta los valores de  $m_{1/2}$  y  $\Delta G_w$  menores a pH 5,0. A diferencia, a pH 7,0 el mutante Src-T126S exhibe un comportamiento similar a otros mutantes del sitio de nucleación.

#### 4.5 Desnaturalización térmica de los mutantes de la c-Src-SH3

La estabilidad de las proteínas frente a la temperatura se determinó a pH 5,0 y 7,0 mediante CD, utilizando una rampa de temperatura entre 10 y 98 °C y monitorizando la elipticidad a 222 nm. En las Figuras 43 y 44 se muestran las gráficas resultantes tras representar la fracción de proteína nativa frente a la temperatura. En la Tabla 11 se pueden observar los parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste a un modelo de dos estados. La reversibilidad del proceso se comprobó volviendo a realizar la misma rampa de temperatura tras dejar enfriar las muestras.

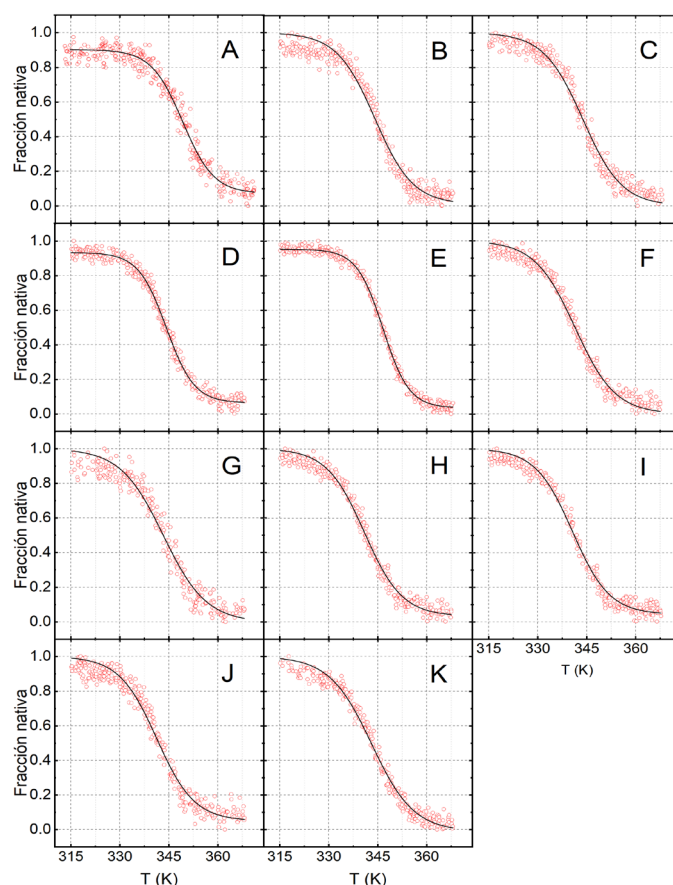


Figura 43. Fracción de la proteína nativa de las quimeras de la c-Src-SH3: (A) SF-Src, (B) SF-Src-Q128E, (C) SF-Src-EAR, (D) SF-RT, (E) SF-2X; y los mutantes: (F) Src-L100I, (G) Src-E106D, (H) Src-S123T, (I) Src-T125S, (J) Src-T126S y (K) Src-Q128E frente a la temperatura a pH 5,0.

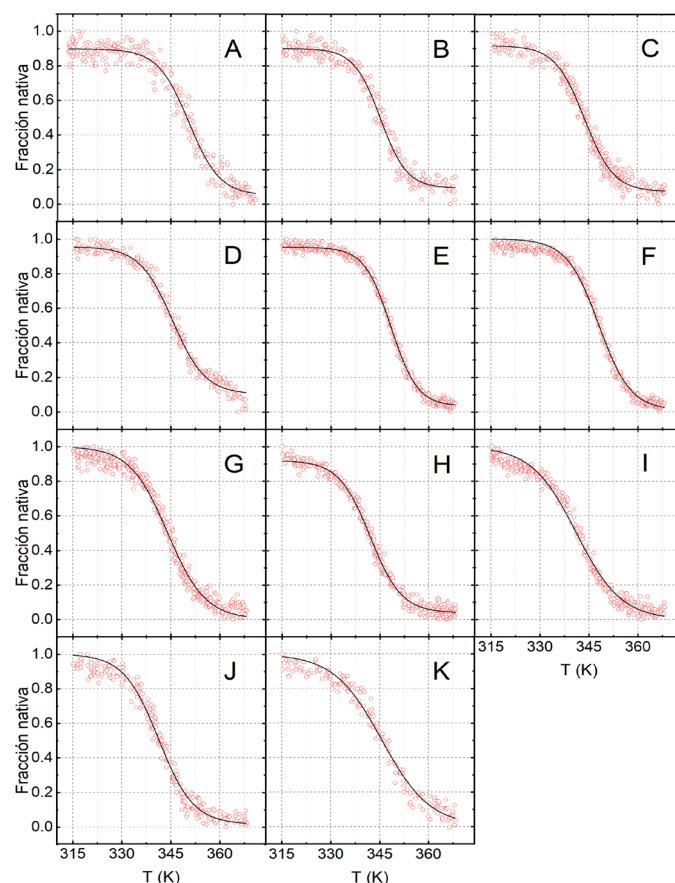


Figura 44. Fracción de la proteína nativa de las quimeras de la c-Src-SH3: (A) SF-Src, (B) SF-Src-Q128E, (C) SF-Src-EAR, (D) SF-RT, (E) SF-2X; y los mutantes: (F) Src-L100I, (G) Src-E106D, (H) Src-S123T, (I) Src-T125S, (J) Src-T126S y (K) Src-Q128E frente a la temperatura a pH 7,0.

Tabla 11. Parámetros termodinámicos y valores de  $T_m$  obtenidos a pH 5,0 y 7,0

Proteína	pH 5,0			pH 7,0		
	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/molK)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/molK)
<b>SF-Src</b>	75,5±0,2	399,21±21,00	3,4±0,1	76,6±0,2	436,43±23,00	3,5±0,2
<b>SF-Src-Q128E</b>	72,4±0,3	300,21±21,00	3,3±0,3	72,0±0,3	321,42±19,00	3,1±0,2
<b>SF-Src-EAR</b>	70,8±0,4	298,42±11,00	3,0±0,2	71,3±0,2	315,87±14,00	3,0±0,1
<b>SF-2X</b>	71,7±0,3	418,12±41,00	3,0±0,2	75,2±0,3	429,33±10,00	3,5±0,2
<b>SF-RT</b>	70,3±0,1	432,44±24,00	3,1±0,2	71,9±0,1	452,32±19,00	3,2±0,3
<b>Src-L100I</b>	68,4±0,2	398,49±28,00	3,3±0,2	70,1±0,2	419,66±27,00	3,5±0,2
<b>Src-E106D</b>	70,5±0,3	381,23±22,00	3,2±0,4	72,2±0,2	410,58±21,00	3,4±0,5
<b>Src-S123T</b>	68,7±0,4	173,56±12,99	1,5±0,1	69,6±0,4	200,67±18,00	1,6±0,2
<b>Src-T125S</b>	68,6±0,6	369,22±27,00	3,0±0,3	69,0±0,5	397,98±36,00	3,2±0,2
<b>Src-T126S</b>	68,3±0,2	386,77±13,00	3,2±0,3	70,4±0,3	418,22±32,00	3,4±0,4
<b>Src-Q128E</b>	70,3±0,5	371,78±32,00	3,1±0,2	73,2±0,2	412,66±22,00	3,3±0,3

A pH 5,0, todas las proteínas excepto la SF-Src y la SF-Src-Q128E, tienen una  $T_m$  ligeramente inferior a la c-Src-SH3 nativa (72,4 °C a pH 5,0 y 75,6 °C a pH 7,0). Los mutantes

Src-L100I, Src-S123T, Src-T125S y Src-T126S son los más inestables térmicamente a ambos pHs, mientras que la mutación de glutamina por glutámico en la posición 128 parece desestabilizar solo ligeramente respecto a la proteína WT.

Todas las proteínas son reversibles a la desnaturalización térmica excepto la Src-S123T y las que presentan la mutación en la posición 128, tales como Src-Q128E, SF-Src-Q128E y SF-Src-EAR.

#### 4.6 Caracterización del estado de oligomerización de los mutantes de la c-Src-SH3

La c-Src-SH3 WT, así como sus quimeras y mutantes, se caracterizan por presentar límites de solubilidad inferiores a 15 mg/mL para pH 5,0 y de 20 mg/mL para pH 7,0. Por este motivo, no es posible determinar el estado de agregación a concentraciones mayores tal como sí lo es para la proteína que presenta el motivo ATCUN. Como puede verse en la Tabla 12, el  $R_h$  para las quimeras y mutantes de la c-Src-SH3 se determinó teniendo en cuenta estas limitaciones.

Tabla 12. Valores de  $R_h$  (nm) a pH 5,0 (5-10 mg/mL) y 7,0 (5-15 mg/mL)

pH	$R_h$ (nm)					
	5,0		7,0		5,0	7,0
	+ 5%PEG300					
Proteína (mg/mL)	5	10	5	15	5	5
<b>SF-Src</b>	1,70±0,06	1,84±0,05	1,61±0,04	1,90±0,06	2,30±0,06	1,99±0,05
<b>SF-Src-Q128E</b>	1,83±0,08	1,83±0,04	1,77±0,06	1,86±0,05	2,30±0,02	1,81±0,09
<b>SF-Src-EAR</b>	1,95±0,06	1,97±0,04	1,87±0,05	2,01±0,03	2,39±0,04	1,78±0,08
<b>SF-2X</b>	2,10±0,08	1,97±0,06	1,79±0,07	2,10±0,06	2,30±0,09	1,98±0,01
<b>SF-RT</b>	1,82±0,03	1,76±0,04	1,61±0,12	1,94±0,06	2,40±0,06	1,96±0,05
<b>Src-L100I</b>	2,10±0,03	1,72±0,10	1,70±0,12	1,93±0,04	2,30±0,12	1,99±0,05
<b>Src-E106D</b>	1,79±0,16	1,71±0,10	1,64±0,04	1,68±0,04	2,31±0,09	1,79±0,04
<b>Src-S123T</b>	1,95±0,15	-	1,88±0,04	2,13±0,07	2,30±0,05	2,00±0,04
<b>Src-T125S</b>	1,95±0,03	1,99±0,06	1,95±0,06	2,03±0,04	2,42±0,13	2,15±0,07
<b>Src-T126S</b>	1,73±0,04	1,71±0,10	1,64±0,04	1,68±0,04	2,20±0,03	2,07±0,08
<b>Src-Q128E</b>	1,79±0,04	1,96±0,05	1,78±0,06	2,26±0,07	2,30±0,05	1,86±0,02

Los resultados obtenidos nos indican que, a las concentraciones estudiadas, las quimeras y mutantes de la c-Src se encuentran fundamentalmente en estado monomérico. Solo la adición del 5 % de PEG 300 favorece la formación del dímero a concentraciones tan bajas como 5 mg/mL a pH 5,0. Este comportamiento es análogo al encontrado en la proteína WT.

## 4.7 Cristalización y determinación estructural de los mutantes de la c-Src-SH3

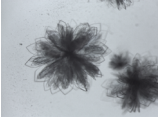
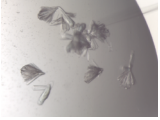

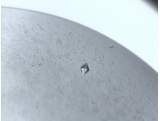

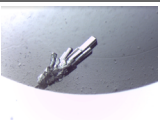




Las condiciones de cristalización para cada proteína se obtuvieron mediante experimentos de cribado. Para ello, se usaron las disoluciones comerciales expuestas en Materiales y métodos. En todos los casos, la concentración de proteína utilizada fue 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM a pH 8,0 y se usó la técnica de difusión en el vapor en gota sentada. En la Tabla 13 se muestran las condiciones de cristalización para cada una de las proteínas objeto de estudio. Como puede observarse en esta tabla, todos los cristales se obtuvieron utilizando sulfato amónico como precipitante. Para favorecer la formación del dímero a pH ácido se añadió a las condiciones de cribado PEG 300 al 5 %, ya que se ha demostrado previamente a través de los experimentos de DLS que la adición de este compuesto favorece la formación de dímeros incluso a bajas concentraciones de proteína.

Algunos cristales, especialmente los de los mutantes del sitio de nucleación, cristalizaban en macla en forma de racimo. En ocasiones se podían obtener cristales individuales rompiendo la macla con un golpe seco en el centro de esta, pero alguna de estas maclas producía cristales planos que difractaban de forma anisotrópica. Para mejorar su calidad, se estudió el efecto de ciertos agentes capaces de controlar la nucleación como el glicerol, PEGs de bajo peso molecular o la adición de concentraciones bajas de sales. En estos casos al cribado de sulfato amónico se le añadió 5 % PEG 300, 10 % glicerol y LiCl 40 mM. Este procedimiento sirvió para mejorar la calidad de los cristales del mutante Src-E106D y Src-L100I. En ningún caso fue necesaria la adición de agentes crioprotectores para proceder al congelado de los cristales en nitrógeno líquido para ser transportados a las instalaciones de luz sincrotrón donde se recogieron los datos.

La resolución estructural se llevó a cabo utilizando las coordenadas de los dominios SH3 de la c-Src WT (PDB: 4JZ4 para la forma monomérica y 4JZ3 para el dímero entrecruzado) como modelo para el reemplazamiento molecular utilizando el programa *Phaser* de la plataforma de Phenix. En todos los casos se utilizó la cadena A y se eliminaron las moléculas de solvente de las coordenadas. El refinado y modelado se realizó manualmente utilizando Coot. Las moléculas de agua y de precipitante se añadieron cuando los factores R eran iguales o menores

del 30 %. Tras el refinado, se validaron las coordenadas finales en el *Validation Server* (<https://validate-rcsb-1.wwpdb.org>) y fueron depositadas en el PDB.

Tabla 13. Condiciones de cristalización de los cristales de proteína obtenidos

Imagen	Proteína	Condición	T (°C)	Técnica
	SF-Src	Sulfato amónico 1,5 M, Hepes 0,1 M pH 7,0	25	Difusión en el vapor
	SF-Src-Q128E	Sulfato amónico 2,0 M, glicerol 10%, MES 0,1 M pH 6,0	15	Difusión en el vapor
	SF-Src-Q128E	Sulfato amónico 1,5 M, PEG 300 5 %, MES 0,1 M pH 6,0	25	Difusión en el vapor
	SF-2X	Sulfato amónico 1,0 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 4,5	25	Difusión en el vapor
	SF-2X	Sulfato amónico 1,5 M y MES 0,1 M pH 6,0	25	Difusión en el vapor
	SF-2X	Sulfato amónico 1,0 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 4,5, betaciclodextrina 5 mM	25	Difusión en el vapor
	Src-Q128E	Sulfato amónico 1,5 M, PEG 300 5 %, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 5,0	25	Difusión en el vapor
	Src-T125S	Sulfato amónico 2,0 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 5,0, PEG 300 5 %	25	Difusión en el vapor
	Src-E106D	Sulfato amónico 2,0 M, MES 0,1 M pH 6,0, PEG 300 5 %, LiCl 40 mM, glicerol 10 %	25	Difusión en el vapor
	Src-L100I	Sulfato amónico 2,2 M, MES 0,1 M pH 6,5, PEG 300 5 %, LiCl 40 mM, glicerol 10 %	25	Difusión en el vapor

#### 4.7.1 Estructura de la quimera SF-Src

En la quimera SF-Src se introdujo el lazo n-Src de la Fyn-SH3 (Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser) para analizar el efecto de dicho lazo en la formación del dímero entrecruzado. Esta proteína cristalizó en diferentes condiciones, resultando en las estructuras siguientes:

- *Estructura del monómero.* Se cristalizó en presencia de sulfato amónico 1,5 M y pH neutro en el grupo espacial  $P2_1$ , con parámetros de celdilla  $a=28,5 \text{ \AA}$ ,  $b=40,5 \text{ \AA}$ ,  $c=43,2 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=104,05^\circ$  y dos moléculas en la unidad asimétrica del monómero del dominio SH3 (PDB: 7A35).
- *Estructura del dímero entrecruzado.* Los cristales se obtuvieron en sulfato amónico 2,0 M a pH 5,0, usando acetato sódico como tampón y 5 % PEG 300. Los cristales pertenecían al grupo espacial  $P6_522$  con parámetros de celdilla  $a=b=47,2 \text{ \AA}$ ,  $c=125,2 \text{ \AA}$  (PDB: 7A34).

El resumen de las estadísticas de las estructuras de esta quimera se muestra en la Tabla 12 del Apéndice 3. En la Figura 45 se han comparado las diferentes cadenas presentes en la unidad asimétrica de las estructuras, así como la comparación con la proteína WT. Como se puede observar, las mayores diferencias de las estructuras de este mutante, tanto en su forma monomérica como dimérica, se encuentran en la región del lazo n-Src, cuyos residuos se han modelado completamente en todas las estructuras. Este lazo presenta una alta flexibilidad, como queda evidenciado en la representación del factor B de la Figura 46.

A pesar de las diferencias en el modelado de este lazo, la sustitución de los residuos presentes en el lazo n-Src de la c-Src por los presentes en la Fyn no modifica su comportamiento como lazo bisagra.



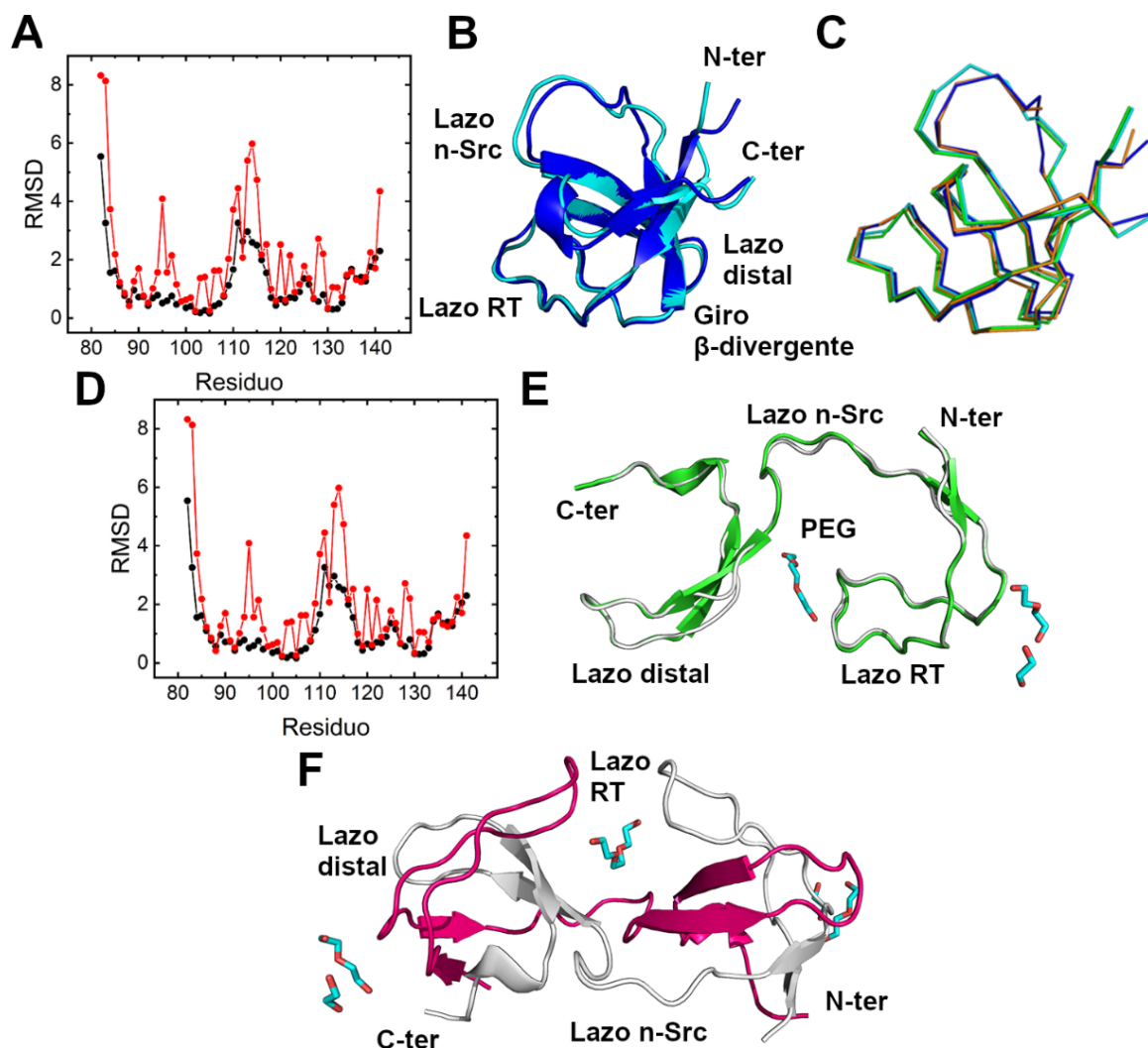


Figura 45. (A) RMSD de la cadena principal (negro) y de las laterales (rojo) obtenido al superponer las moléculas A y B de la estructura 7A35. El valor medio de la desviación es de 1,15 Å. (B) Superposición de las cadenas presentes en la estructura monomérica de la SF-Src a pH 7,0. En color azul se muestra la cadena A y en color cian la cadena B. (C) Superposición de las cadenas A (azul) y B (cian) de la SF-Src con las cadenas A (verde) y B (naranja) de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVN). (D) RMSD de la cadena principal (negro) y de las cadenas laterales (rojo) tras comparar los protómeros del dímero de la SF-Src y el de la c-Src. El valor medio es de 0,19 Å. (E) Comparación del dímero entrecruzado de la SF-Src (blanco) con el de la c-Src-SH3 (verde) (PDB: 6XVO). (F) Dímero entrecruzado de la SF-Src. La cadena complementaria se ha generado por simetría (magenta).

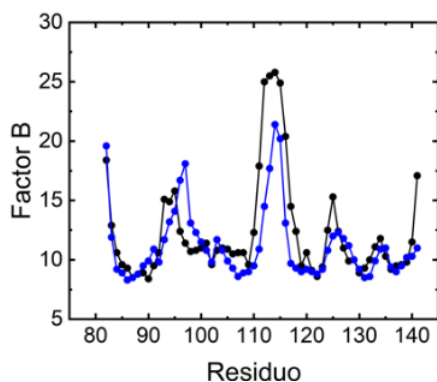


Figura 46. Factores B de los residuos de la cadena principal de la cadena A (negro) y B (azul) de la estructura de la SF-Src cristalizada a pH neutro (PDB: 7A35).

Al igual que en la proteína WT, la estructura monomérica presenta dos cadenas en la unidad asimétrica que representan conformaciones distintas del dominio. Al analizar el lazo n-Src de la quimera SF-Src se pueden observar ciertas diferencias conformacionales entre las dos cadenas independientes que forman parte de la estructura del monómero y que afectan al enlace que se produce entre la Ser113 (OG) y el Glu115 (N) (Figura 47). A pesar de las mutaciones introducidas en el lazo n-Src, este mutante muestra interacciones similares a las descritas en el monómero de la proteína nativa (Plaza-Garrido, 2020).

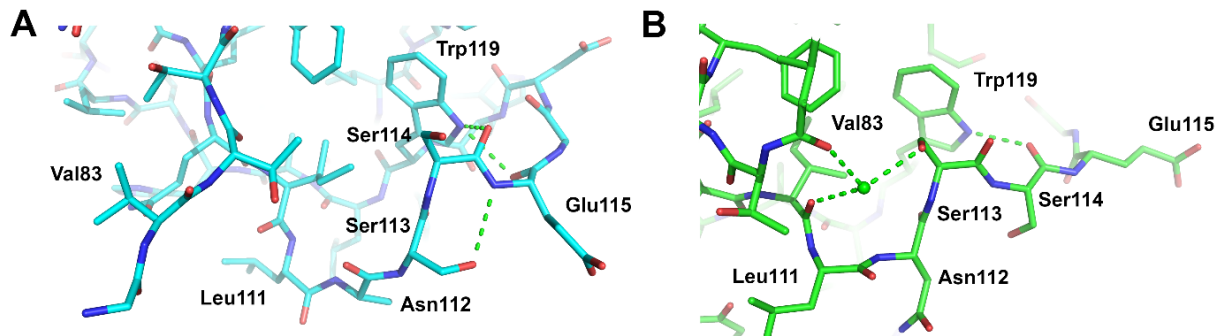


Figura 47. Diferencias en los puentes de hidrógeno (verde) que se forman con el residuo Ser113 del lazo n-Src en (A) la cadena A (cian) y (B) en la cadena B (verde). En la molécula A, la cadena lateral del residuo Asn112 no se ha modelado debido a la falta de densidad. El enlace entre la Ser114 (O) y el Trp119 (NE1) (Ser115 y Trp120 en la Fyn) se conserva en la c-Src, en la Fyn y en la SF-Src.

Cuando se comparan las dos cadenas del dominio SH3 presentes en la unidad asimétrica, las diferencias conformacionales se encuentran también en el lazo distal, sin embargo, la red de enlaces de hidrógeno entre dicho lazo y el giro  $\beta$ -divergente se mantiene entre ambas moléculas (Figura 48).

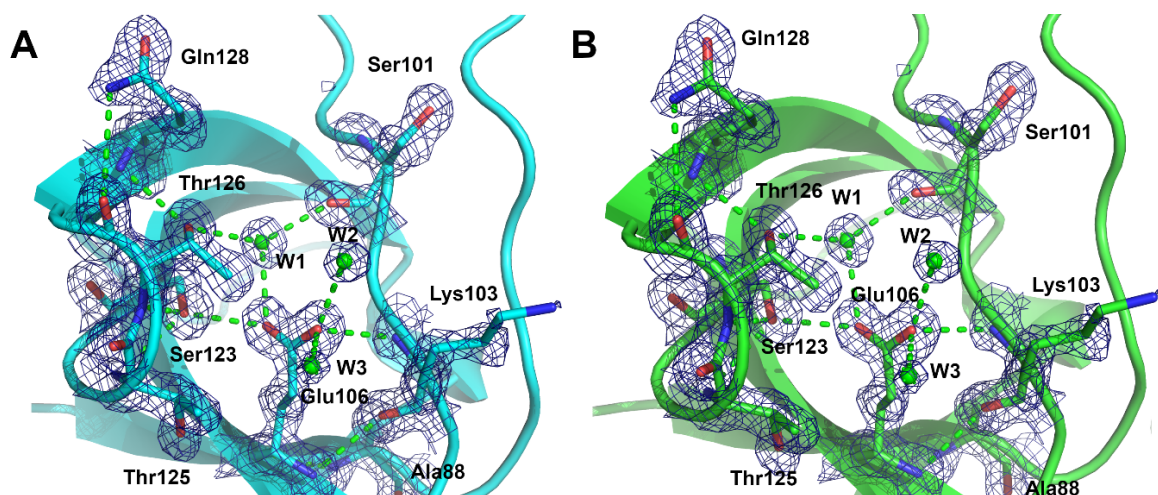


Figura 48. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc con contorno de  $1.5 \sigma$  del sitio de nucleación de la SF-Src. La cadena A se muestra en cian (A) y la cadena B en verde (B). Los puentes de hidrógeno situados entre los residuos del giro  $\beta$ -divergente y del lazo distal, así como las moléculas de agua (W) se muestran en verde.

Hemos comparado la estructura del dímero entrecruzado con las dos cadenas presentes en la unidad asimétrica del monómero y se muestra en la Figura 49. Los RMSD de los residuos de la cadena principal son 0,33 y 0,43 Å para las cadenas A y B, respectivamente, por lo que no hay diferencias significativas exceptuando las zonas de los lazos RT y n-Src. En el caso de la estructura del dímero entrecruzado, el lazo n-Src actúa como bisagra y sufre cambios significativos de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de sus residuos. En la Tabla 14 se muestran los ángulos diedros observados en los residuos del lazo n-Src de los dímeros entrecruzados y los monómeros de la c-Src y la SF-Src y de la estructura monomérica de la Fyn-SH3.

Tabla 14. Ángulos diedros de los residuos en el lazo n-Src<sup>A</sup>

Proteína	Residuos	Monómero $\phi$	Monómero $\psi$	Dímero $\phi$	Dímero $\psi$
<b>c-Src-SH3</b> (PDB: 6XVN y 6XVO)	Val111	-98,2	-5,2	-107,2	106,2
	Asn112	<b>SM</b>	<b>SM</b>	-47,1	132,8
	Asn113	-103,3	-171,1	-161,9	175,5
	Thr114	-107,6	28,3	-75,9	-21,9
	Glu115	-66,9	145,3	-72,2	-25,8
<b>SF-Src</b> (PDB: 7A34 y 7A35)	Leu111	-100,5	-5,9	-105,6	149,6
	Asn112	<b>-127</b>	<b>-134,7</b>	-95,9	122,5
	Ser113	-101,3	-168,2	-121,2	164,3
	Ser114	-86,7	15,1	-58,7	-29,3
	Glu115	-69,8	145,5	-80,4	-19,8
<b>Fyn-SH3</b> (PDB: 7A2J)	Leu112	-95,1	136,5		
	Asn113	-102,9	-49,8		
	Ser114	-123,1	-2,2		
	Ser115	-100,6	11,8		
	Glu116	-83,8	-16,1		

<sup>A</sup> En negrita se muestran los residuos fuera de las regiones favorecidas del Ramachandran o sin modelar (SM).

Las mutaciones en el lazo n-Src no afectan a las interacciones que estabilizan al dímero entrecruzado, que son prácticamente las mismas que las presentes en el dímero de la proteína WT (Plaza-Garrido *et al.*, 2020), como por ejemplo el puente de hidrógeno/salino que se forma entre los residuos Glu115A/B (OE1/OE2) y Arg95B/A (NH1/NH2) que conecta los lazos n-Src y RT de las dos cadenas. En el sitio de nucleación se mantiene la red de enlaces de hidrógeno característica entre los residuos en el lazo distal y el giro  $\beta$ -divergente, tal y como se muestra en la Figura 50.

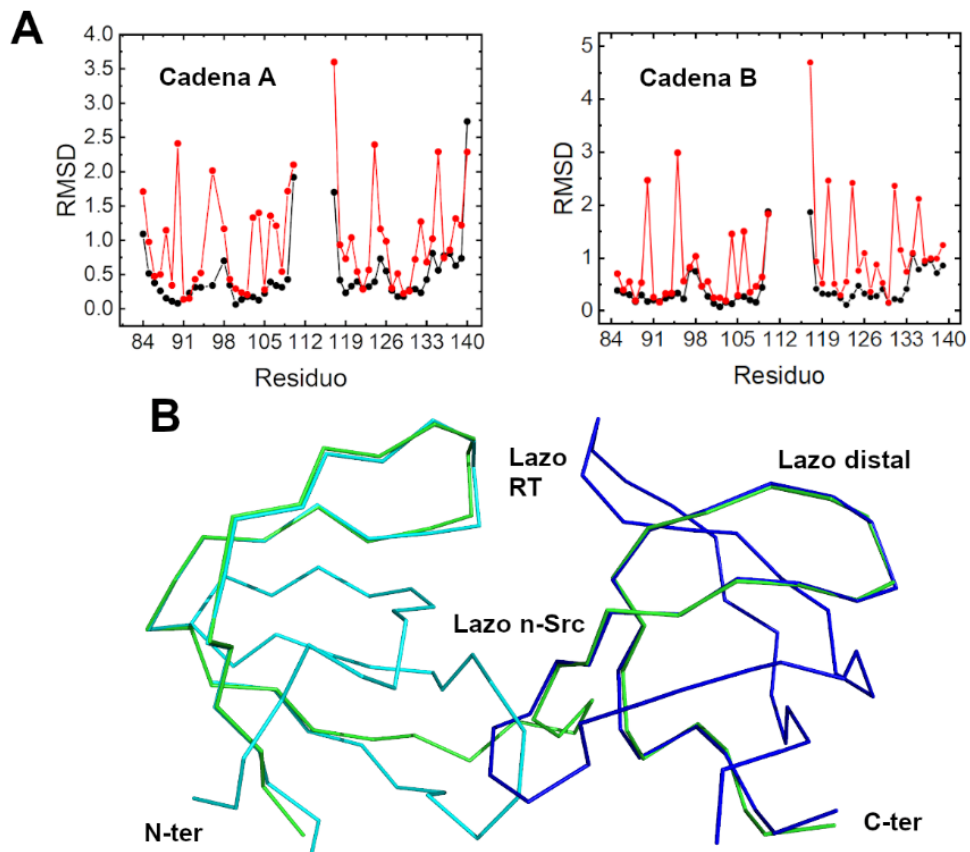


Figura 49. (A) RMSD de los residuos de la cadena principal (negro) y las cadenas laterales (rojo) del dímero entrecruzado de la SF-Src (PDB: 7A34) con la cadena A y B de la estructura monomérica (PDB: 7A35). (B) Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado (verde) de la SF-Src con la cadena A del monómero. La superposición de las regiones N- y C-terminal se muestran en cian y azul, respectivamente.

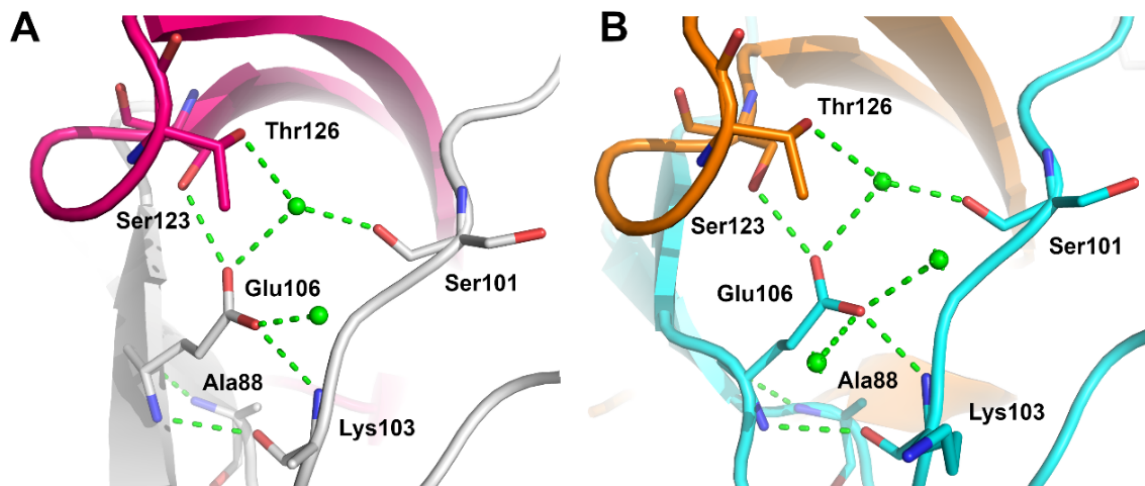


Figura 50. Sitio de nucleación de la estructura del dímero entrecruzado de la (A) SF-Src y (B) c-Src-SH3 (PDB: 6XVO). Los residuos de la cadena A se muestran en color blanco y cian y los que forman parte de la cadena generada por simetría (cadena B) en magenta y naranja. Los puentes de hidrógeno y las moléculas de agua se representan en verde.

#### 4.7.2 Estructura de la quimera SF-Src-Q128E

En la quimera SF-Src se introdujo además del lazo n-Src modificado (Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser) la mutación en la posición 128 (Gln128Glu) para estudiar si existía algún efecto sinérgico entre las modificaciones en el sitio de nucleación y en el lazo bisagra. En este caso, la proteína cristalizó en dos condiciones distintas dando lugar a las siguientes estructuras:

- *Estructura del monómero a pH 6,0.* Cristalizó en presencia de sulfato amónico (1,5-2,0 M) en MES 0,1 M pH 6,0 en el grupo espacial  $P2_1$ , con una celda unidad  $a=32,3 \text{ \AA}$ ,  $b=40,4 \text{ \AA}$ ,  $c=38,6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=100,4^\circ$  y dos moléculas en la unidad asimétrica del monómero del dominio (PDB: 7A38).
- *Estructura del monómero a pH 7,0.* En este caso se usó como tampón Hepes 0,1 M y los cristales también pertenecían al grupo espacial  $P2_1$  con una celda unidad  $a=23,3 \text{ \AA}$ ,  $b=63,9 \text{ \AA}$ ,  $c=30,3 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=95,8^\circ$  y dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A39).
- *Estructura del dímero a pH 6,0.* Los cristales obtenidos a pH ácido y en presencia de PEG 300 pertenecían al grupo espacial  $P6_522$ , con parámetros de celdilla  $a=b=46,8 \text{ \AA}$ ,  $c=126,5 \text{ \AA}$  (PDB: 7A3A).

Las estadísticas de las estructuras obtenidas de este mutante se encuentran en la Tabla 13 del Apéndice 3. En la Figura 51 se han comparado las distintas cadenas de la SF-Src-Q128E, así como la comparación con la proteína nativa.

En el monómero de la proteína obtenido a pH 6,0 la cadena A se modeló en su totalidad, pero no la cadena B, ya que el lazo n-Src no presenta suficiente densidad electrónica en los mapas de diferencia para modelar los residuos Ser113, Ser114 y Glu115. A diferencia, a pH 7,0, ambas cadenas en la unidad asimétrica se han modelado completamente. Esta flexibilidad del lazo n-Src se ve claramente reflejada en la representación de los factores B de la Figura 52, que alcanza los valores más altos precisamente en este lazo.

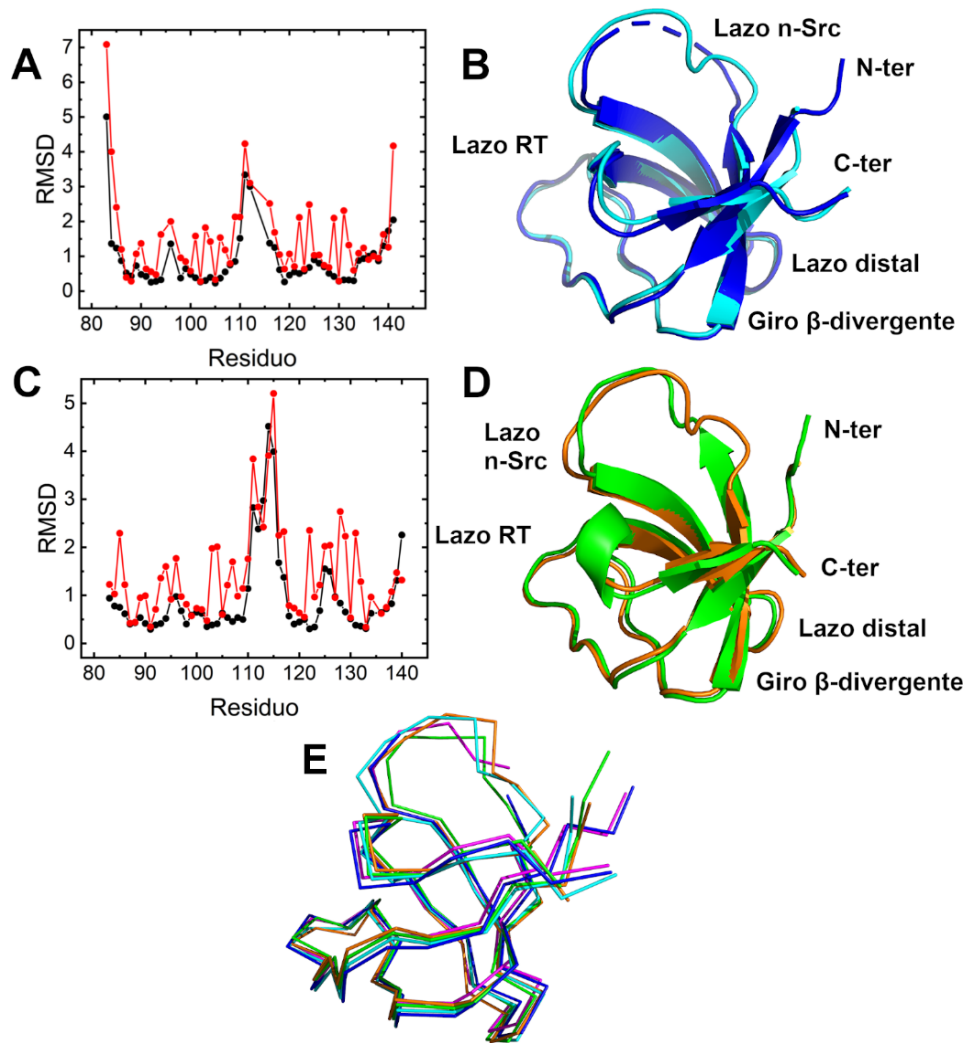


Figura 51. (A) RMSD de los residuos de la cadena principal (negro) y las cadenas laterales (rojo) obtenido al comparar las cadenas A y B de la estructura 7A38 obtenida a pH 6,0. El RMSD de la cadena principal es de 0,85 Å. (B) Estructura de la SF-Src-Q128E a pH 6,0. En cian se muestra la cadena A y en azul la cadena B. La línea discontinua se debe a los residuos que no se han podido modelar en el lazo n-Src debido a la falta de densidad electrónica. (C) RMSD de los residuos de la cadena principal (negro) y las cadenas laterales (rojo) tras superponer las cadenas A y B de la estructura 7A39. (D) Estructura de la SF-Src-Q128E a pH 7,0. En naranja se muestra la cadena A y en verde la cadena B. (E) Superposición de todas las cadenas de las dos estructuras de la SF-Src-Q128E y de la cadena A de la c-Src-SH3 (magenta, PDB: 6XVN).

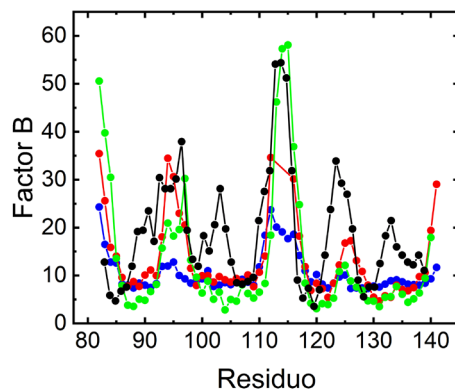


Figura 52. Estructuras de la SF-Src-Q128E cristalizadas a pH 6,0 (PDB: 7A38, negro para la cadena A y rojo para la B) y pH 7,0 (PDB: 7A39, azul para la cadena A y verde para la B).

Al introducir la mutación Gln128Glu en el lazo distal además del lazo n-Src, debido a que se trata de la sustitución de un residuo neutro por uno que puede adquirir carga negativa al desprotonarse la cadena lateral, se produce un reajuste de las interacciones electrostáticas. De esta manera, la comparación de las estructuras obtenidas a pH 6,0 y pH 7,0 con la proteína WT muestra un desplazamiento en el lazo distal ( $\sim 1,2$  Å) debido a las diferencias tanto en la capa de hidratación alrededor de la posición 128 como en la conformación del residuo (Figura 53).

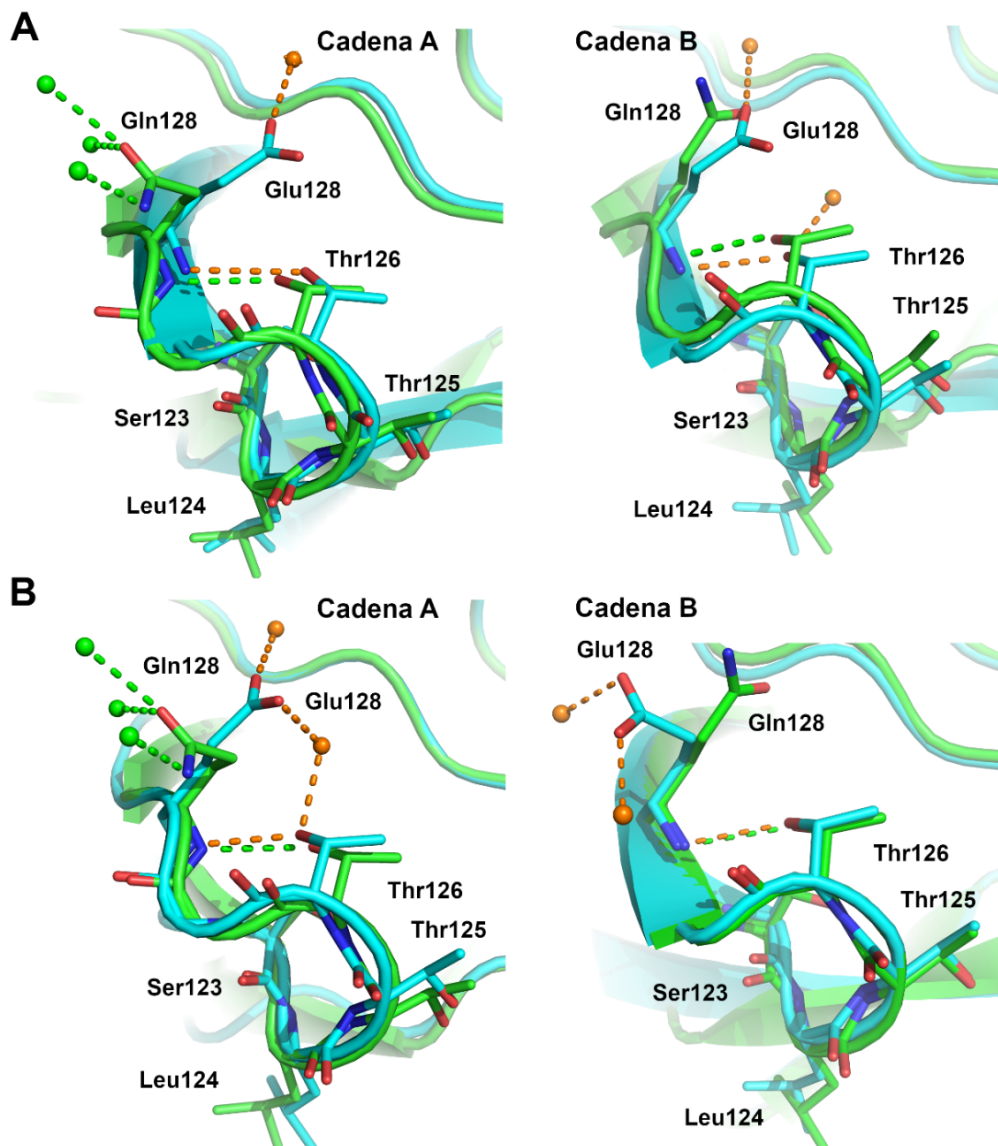


Figura 53. Cambios conformacionales en las cadenas del lazo distal de las estructuras de la c-Src-SH3 (verde, PDB: 6XVN) y de la SF-Src-Q128E (cian) obtenidas a (A) pH 6,0 (PDB: 7A38) y (B) 7,0 (PDB: 7A39). Los puentes de hidrógeno asociados a la estructura de la c-Src se muestran en verde y los de la SF-Src-Q128E en naranja.

La única cadena de la estructura del dímero entrecruzado obtenido se ha modelado en su totalidad y no se observan diferencias reseñables en su comparación con el dímero entrecruzado de la SF-Src y la proteína WT (Figura 54), siendo el RMSD entre ambas estructuras de  $0,30$  Å.

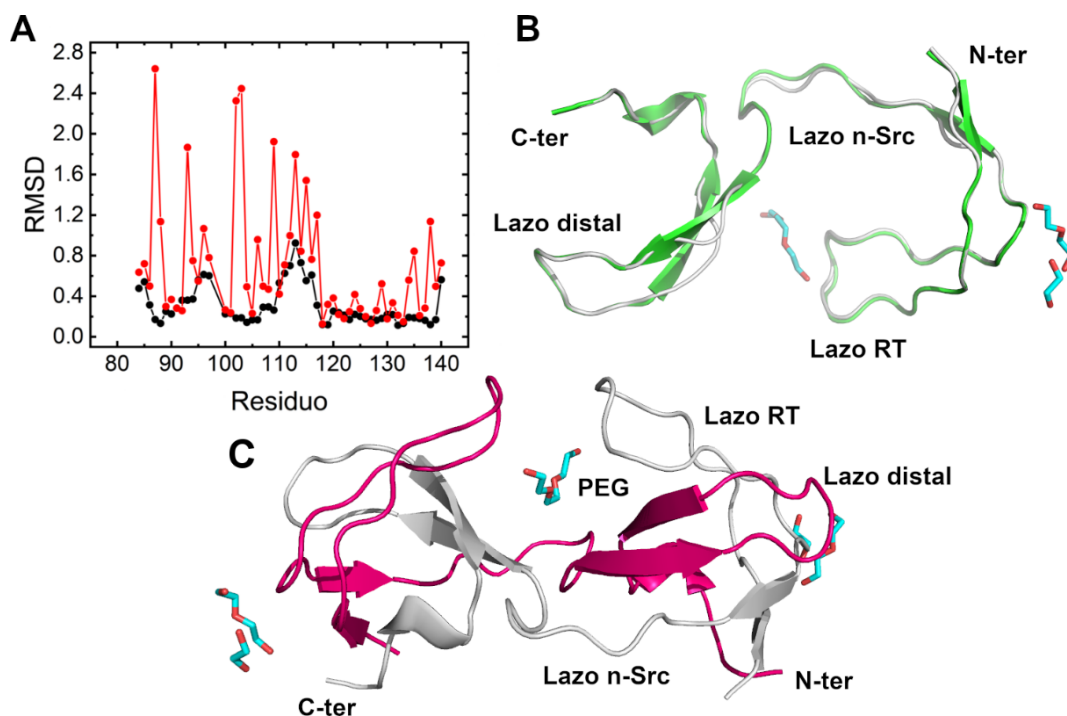


Figura 54. (A) RMSD del esqueleto polipeptídico obtenido tras superponer el oligómero abierto de la SF-Src-Q128E (PDB: 7A3A) con el de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO). (B) Superposición de las cadenas del protómero abierto en la estructura del dímero entrecruzado de la SF-Src-Q128E (blanco) con la c-Src-SH3 (verde). (C) Representación de la estructura de la SF-Src-Q128E a pH 5,0 (blanco). El dímero entrecruzado se ha generado por el operador de simetría (magenta). La molécula de PEG que se encuentra en la interfaz del dímero se ha representado mediante bastones en color cian.

En la Tabla 15 se muestran los valores de los ángulos diedros de los residuos del lazo bisagra n-Src entre las proteínas c-Src, SF-Src-Q128E y Fyn.

Tabla 15. Ángulos diedros de los residuos del lazo n-Src<sup>A</sup>

Proteína	Residuos	Monómero $\phi$	Monómero $\psi$	Dímero $\phi$	Dímero $\psi$
<b>c-Src-SH3</b> (PDB: 6XVN y 6XVO)	Val111	-98,2	-5,2	-107,2	106,2
	Asn112	<b>SM</b>	<b>SM</b>	-47,1	132,8
	Asn113	-103,3	-171,1	-161,9	175,5
	Thr114	-107,6	28,3	-75,9	-21,9
	Glu115	-66,9	145,3	-72,2	-25,8
<b>SF-Src-Q128E</b> (PDB: 7A38 y 7A39)	Leu111	-83 <sup>B</sup> , -80,6 <sup>C</sup>	-27,7 <sup>B</sup> , -25,1 <sup>C</sup>	-118,8	154,6
	Asn112	-123,6 <sup>B</sup> , -127,4 <sup>C</sup>	108,8 <sup>B</sup> , 104,1 <sup>C</sup>	-95,6	118,6
	Ser113	-126,3 <sup>B</sup> , -117,3 <sup>C</sup>	26,8 <sup>B</sup> , 26 <sup>C</sup>	-112,5	164
	Ser114	-90,4 <sup>B</sup> , -74,6 <sup>C</sup>	-16,9 <sup>B</sup> , -46,7 <sup>C</sup>	-73,4	-26,9
	Glu115	-147,5 <sup>B</sup> , -147,1 <sup>C</sup>	155,9 <sup>B</sup> , 158,5 <sup>C</sup>	-71,7	-27,3
<b>Fyn-SH3</b> (PDB: 7A2J)	Leu112	-95,1	136,5		
	Asn113	-102,9	-49,8		
	Ser114	-123,1	-2,2		
	Ser115	-100,6	11,8		
	Glu116	-83,8	-16,1		

<sup>A</sup> En negrita se muestran los residuos fuera del Ramachandran o que no se han podido modelar (SM). <sup>B</sup> Estructura obtenida a pH 6,0 (PDB: 7A38). <sup>C</sup> Estructura obtenida a pH 7,0 (PDB:7A39).



Como en casos previos, el pH parece ser un factor clave para la formación del dímero. Este efecto puede ser atribuido a la presencia de los restos Asp117 de las cadenas entrecruzadas situados en la interfaz abierta. Esto requiere que el residuo se encuentre protonado a fin de evitar la repulsión de las cargas negativas (Figura 55).

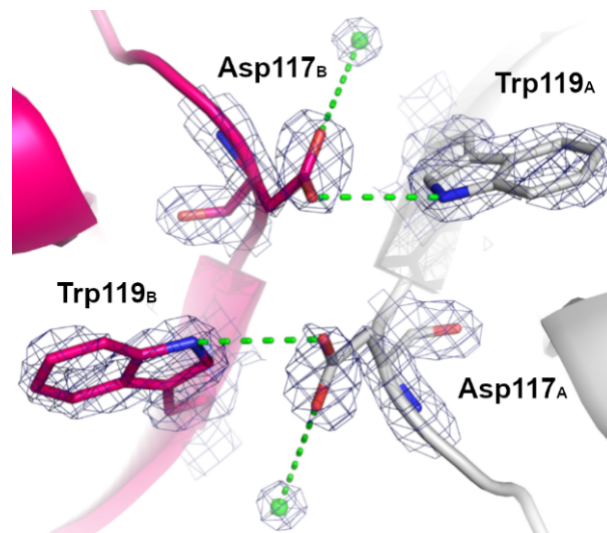


Figura 55. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  de los residuos Asp117 y Trp119 situados en la interfaz abierta. La cadena generada por simetría se muestra en color magenta y los puentes de hidrógeno en verde.

Al no haber diferencias reseñables en el plegamiento general de los monómeros obtenidos a pH 6,0 y 7,0, el dímero entrecruzado de la SF-Src-Q128E se ha comparado con las cadenas A y B de la estructura monomérica determinada a pH 6,0, siendo el RMSD de los residuos de la cadena principal 0,48 y 0,31 Å, respectivamente (Figura 56).

De nuevo, el núcleo hidrofóbico se mantiene a pesar de la apertura del monómero, no hay diferencias significativas en el residuo mutado en la posición 128 (Gln128Glu) y tampoco se observan cambios conformacionales destacables debido al cambio en la carga del residuo.

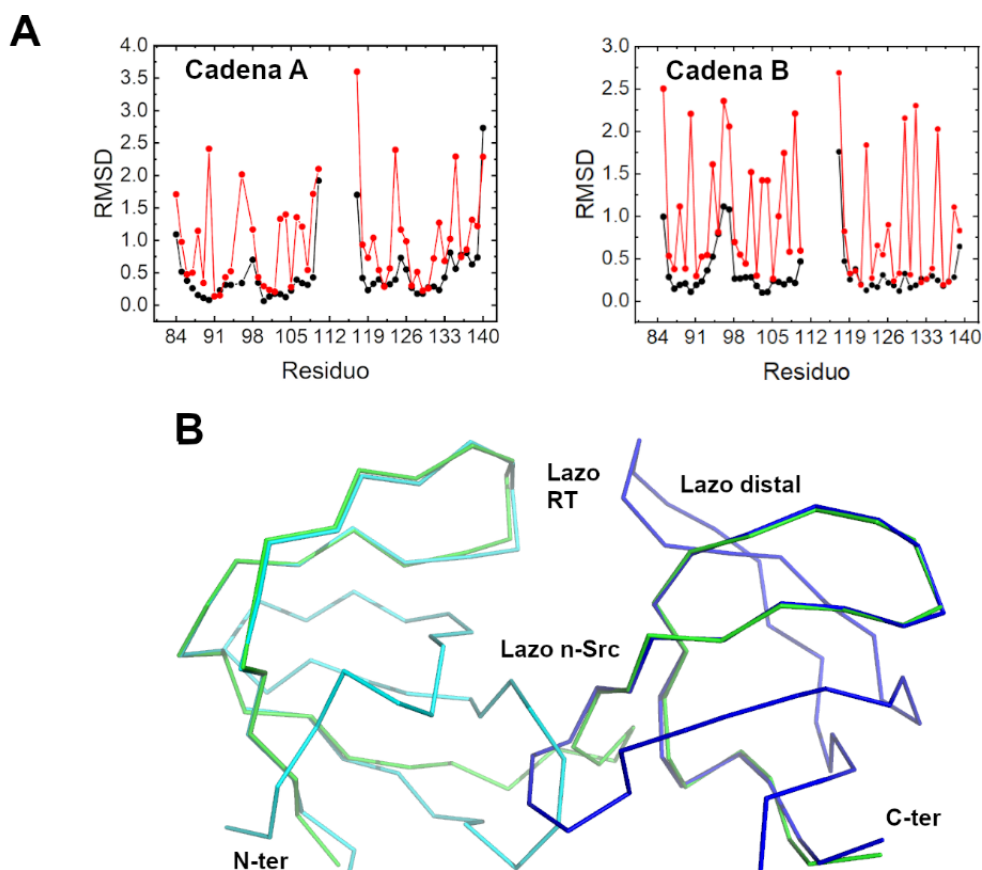


Figura 56. (A) RMSD para los residuos de la cadena principal (negro) y para las cadenas laterales (rojo) del dímero de la SF-Src-Q128E (PDB: 7A3A) al compararlo con las cadenas A y B de su monómero (PDB: 7A38). (B) Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado de la SF-Src-Q128E (verde) con la cadena A de la estructura monomérica: la superposición de las regiones N- y C-terminal se muestran en cian y azul, respectivamente.

#### 4.7.3 Estructura de la quimera SF-2X

En la quimera SF-2X (Val111Leu-Asn113Ser-Thr114Ser-Ser94Ala-Thr98Asp) se han intercambiado los lazos n-Src y RT de la c-Src-SH3 por los de la Fyn-SH3. Las estructuras se han determinado a partir de cristales obtenidos en sulfato amónico 1,0-1,5 M, tanto a pH ácido como neutro y en todos los casos los cristales difractaron a resolución atómica ( $\sim 1,0$  Å). De esta manera, los datos obtenidos fueron los siguientes:

- *Estructura del monómero a pH 3,0.* Cristalizó utilizando como tampón citrato sódico 0,1 M en el grupo espacial  $P2_1$ , con dos moléculas en la unidad asimétrica y parámetros de celdilla  $a=23,2$  Å,  $b=63,3$  Å,  $c=30,1$  Å,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=95,7^\circ$  (PDB: 7A33).
- *Estructura del monómero a pH 4,5.* Los cristales obtenidos en tampón acetato sódico pertenecían al grupo espacial  $P2_1$ , con dos moléculas en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=23,3$  Å,  $b=63,9$  Å,  $c=30,3$  Å,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=95,8^\circ$  (PDB: 7A31).

- *Estructura del monómero a pH 7,0*. Los cristales en este caso se obtuvieron en tampón Hepes 0,1 M en el grupo espacial  $P3_121$ , con cuatro moléculas en la unidad asimétrica y los parámetros de celdilla:  $a=b=87,9 \text{ \AA}$ ,  $c=56,0 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$  (PDB: 7A32).

Como en el caso de la c-Src, las diferencias en los lazos también son notables entre las diferentes moléculas presentes en la misma unidad asimétrica y representan las dos conformaciones distintas de la proteína, sin embargo, esta quimera presenta una menor variabilidad del lazo n-Src que la observada para otros dominios, especialmente a pHs ácidos. En relación con la flexibilidad, en la Figura 57 se muestran los gráficos de los factores B para las distintas cadenas de cada una de las estructuras. Las estadísticas de las estructuras se encuentran en la Tabla 11 del Apéndice 3 y en la Figura 58 se muestran las superposiciones de las distintas cadenas.

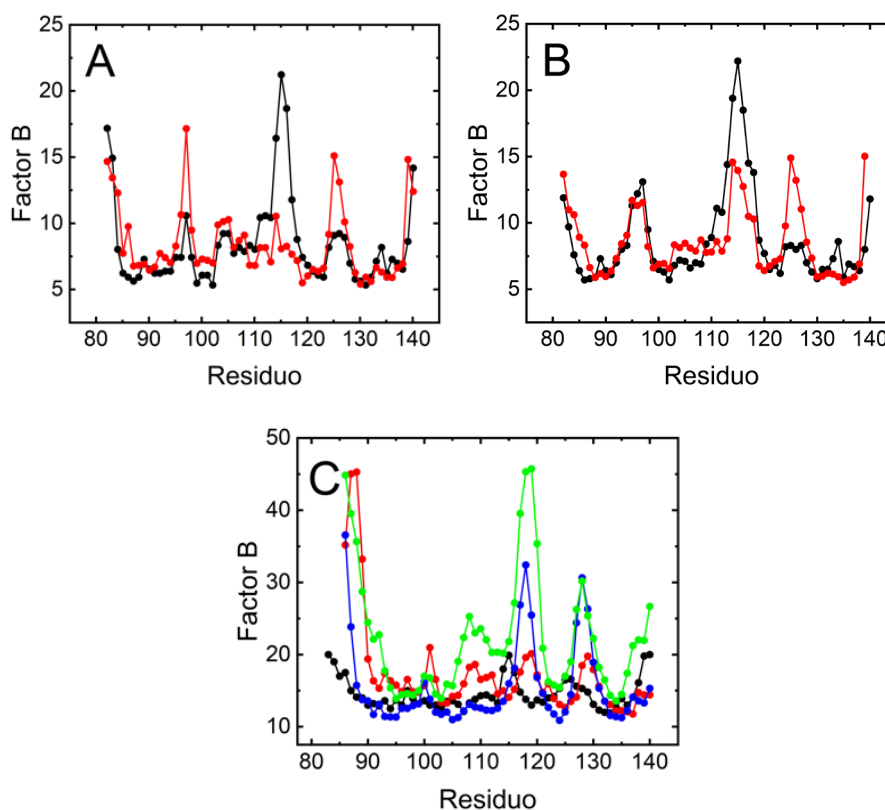


Figura 57. Factores B de los residuos de la cadena principal de las estructuras de la SF-2X cristalizada a (A) pH 3,0 (PDB: 7A33), (B) pH 4,5 (PDB: 7A31) y (C) pH 7,0 (PDB: 7A32). Las cadenas A se muestran en negro, las B en rojo, la C en azul y la D en verde.

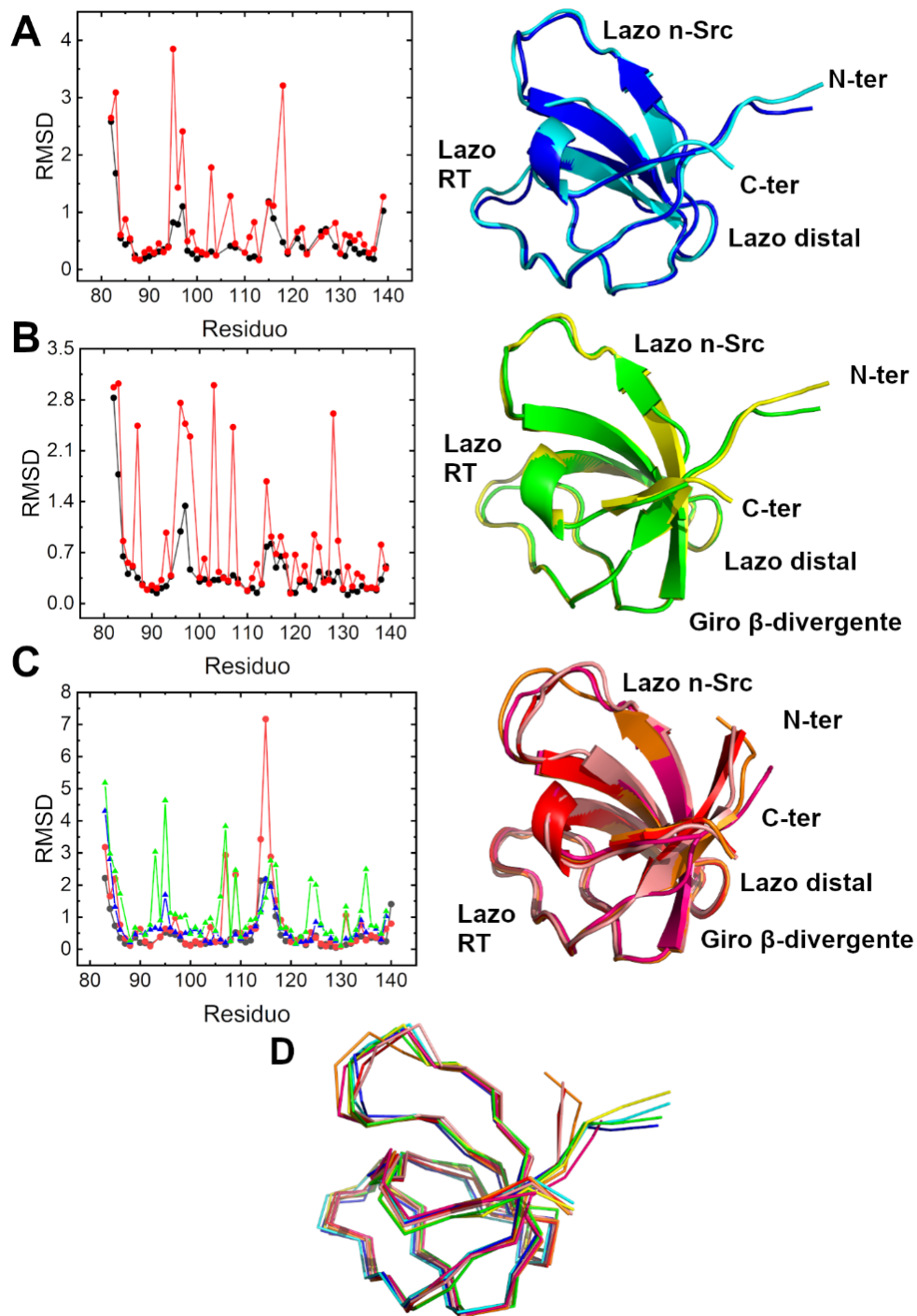


Figura 58. (A) Representación de la estructura de la SF-2X a pH 3,0. En color cian se muestra la cadena A y en color azul la cadena B. El RMSD de los residuos de la cadena principal es de 0,48 Å. (B) Comparación de las cadenas A (cian) y B (verde) de la estructura obtenida a pH 4,5. El RMSD entre ambas cadenas es de 0,40 Å. (C) Representación de la estructura obtenida a pH 7,0, desviación de 0,45 Å entre las cadenas A y B (negro) y 0,69 Å entre las C y D (azul). Las cadenas se muestran en color salmón (cadena A), naranja (cadena B), magenta (cadena C) y rojo (cadena D). (D) Superposición de todas las cadenas.

Las peculiaridades presentes en estas estructuras se deben precisamente a las mutaciones que se producen al intercambiar el lazo RT del dominio SH3 de la c-Src por el de la Fyn,

introduciendo ciertas modificaciones en los enlaces de hidrógeno que podrían estabilizar el lazo. Así, la Ala94 (N) forma un puente de hidrógeno con la Ser101 (OG), pero su cadena lateral pierde el enlace que formaba la Ser94 (OG) con la Thr96 (O) en el caso de la c-Src. En su lugar, es precisamente el Asp98 (OE1) el que interacciona con la Thr96 (OG1). El aminoácido Asp98 se encuentra además en doble conformación en ambas cadenas. Estas diferencias dentro del lazo RT provocan que su conformación sea distinta al compararlo con el de la c-Src WT (Figura 59).

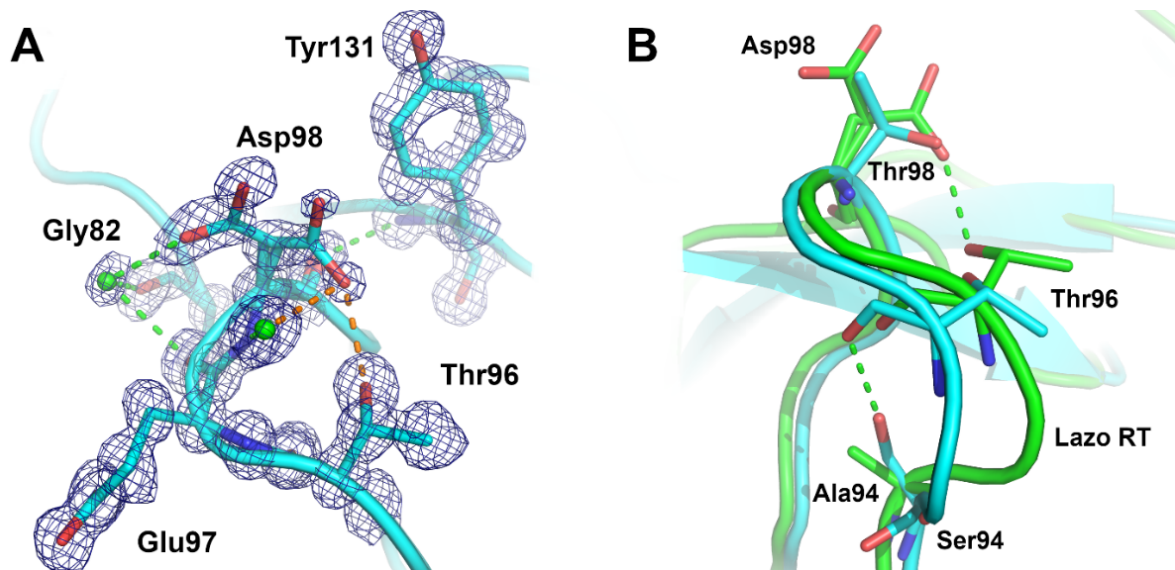


Figura 59. (A) Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a  $1.5 \sigma$  de la doble conformación del Asp98 presente en el lazo RT. Una de las nuevas conformaciones establece un enlace de hidrógeno (naranja) adicional con la Thr96. Una de las moléculas de agua (verde) enlaza a los residuos Gly82, Glu97 y Asp98. (B) Comparación de los residuos presentes en el lazo RT de las proteínas SF-2X (verde, PDB: 7A33) y c-Src WT (cian, PDB: 6XVO).

A diferencia de la estructura obtenida a pH 3,0, el Asp98 se encuentra en una única conformación a pH 4,5 y 7,0, pero muestra ciertas diferencias entre las distintas cadenas. Sin embargo, en todas ellas se mantienen los puentes de hidrógeno del Asp98 (N/O) con la Thr96 (OG1/O) y la Tyr131 (N) (Figura 60). Otra diferencia observada entre las distintas estructuras es que a pH 7,0, en las cadenas A y B, hay un puente salino entre la Arg95A y el Asp99B, que también se encuentra entre las cadenas A-C y B-C.

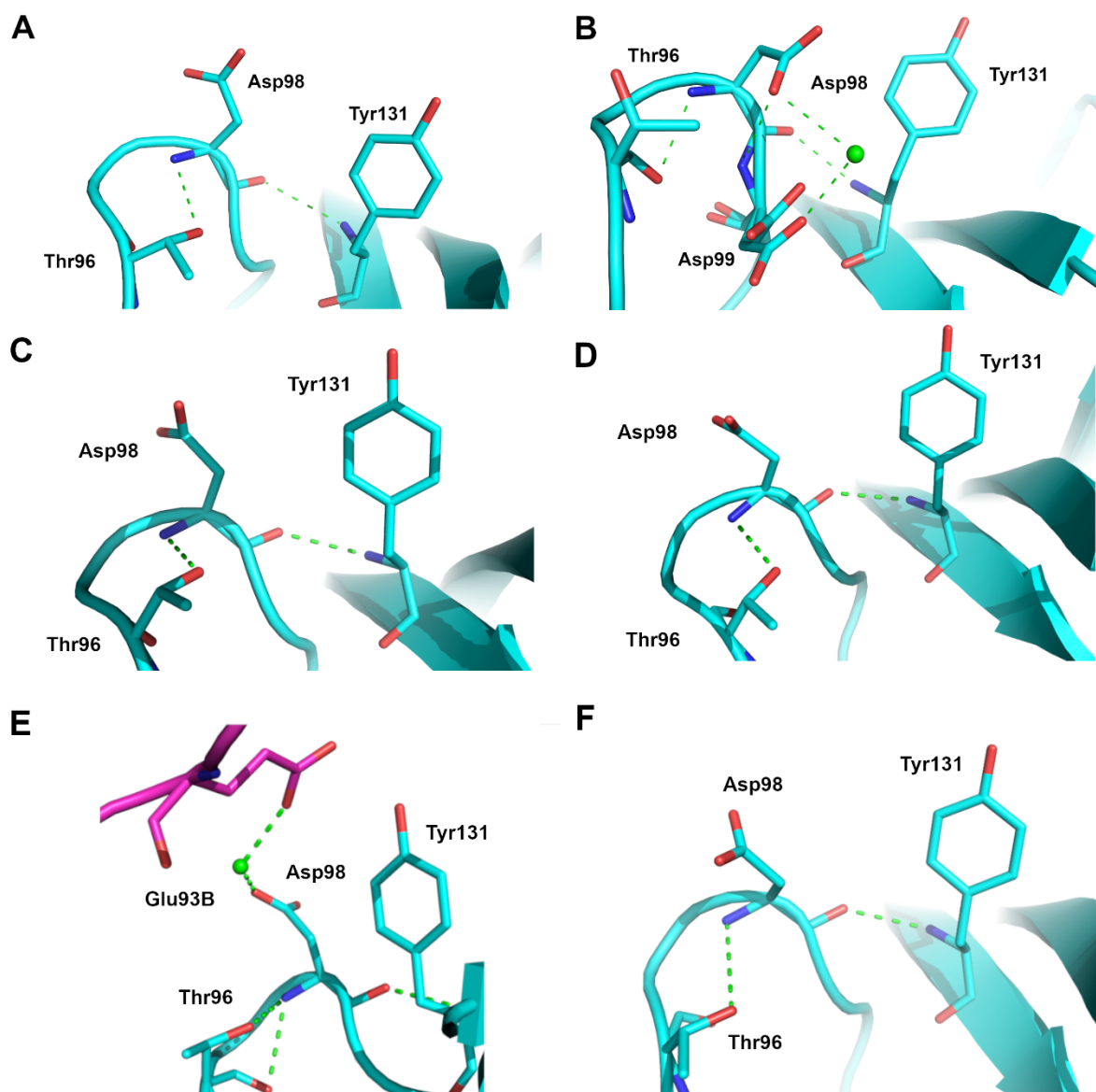


Figura 60. Distintas conformaciones del Asp98 en el lazo RT para las cadenas A (A) y B (B) de la estructura de la SF-2X obtenida a pH 4,5 (PDB: 7A31); y para las cadenas A (C), B (D), C (E) y D (F) para la estructura obtenida a pH 7,0 (PDB: 7A32). Los puentes de hidrógeno y las moléculas de agua se muestran en color verde y el Glu93 de la cadena B en magenta.

En el sitio de nucleación, la comparación de las estructuras obtenidas a diferentes pHs muestra cierta diversidad conformacional en los residuos y en los enlaces de hidrógeno en torno al lazo distal y al giro  $\beta$ -divergente. A pH 3,0, el Glu106 se encuentra en doble conformación, así como la Thr125 (Figura 61). A diferencia, en las estructuras obtenidas a pH 4,5 y 7,0 el sitio de nucleación y el lazo distal se mantienen sin cambios significativos, mostrando los enlaces característicos de este tipo de dominios.

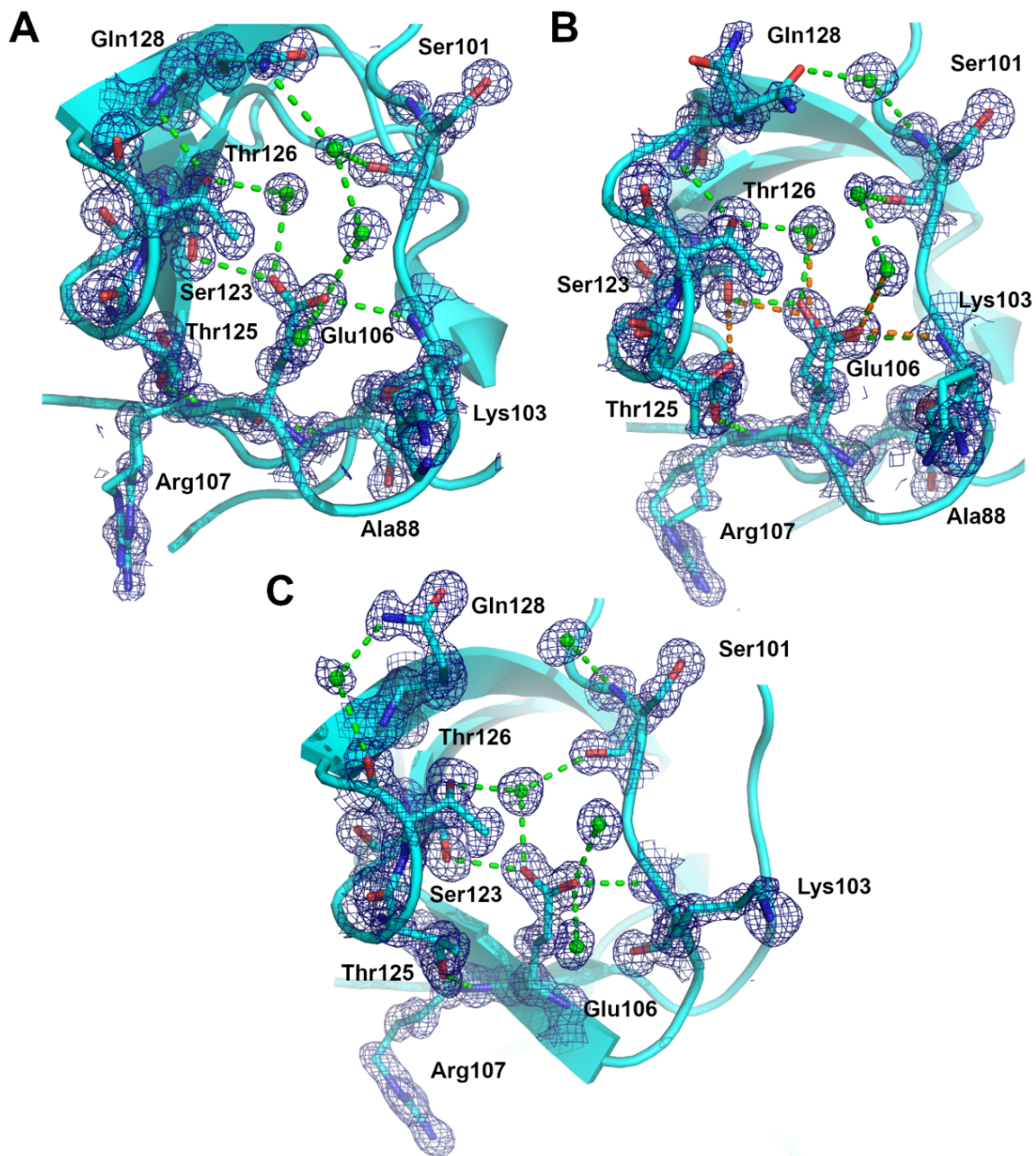


Figura 61. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  del sitio de nucleación de la SF-2X. Se muestran las cadenas A (A) y B (B) de la estructura obtenida a pH 3,0 (PDB: 7A33). No hay diferencias significativas para el resto de las cadenas (C) (PDB: 7A31 y 7A32). Los puentes de hidrógeno se muestran en color verde y naranja para cada una de las distintas conformaciones.

La calidad de los datos ha permitido además identificar la presencia de un ion sodio interaccionando con residuos del lazo n-Src. El ion muestra las distancias interatómicas típicas de 2,3 Å y la coordinación octaédrica con átomos de oxígeno de los residuos implicados y moléculas de agua (Figura 62).

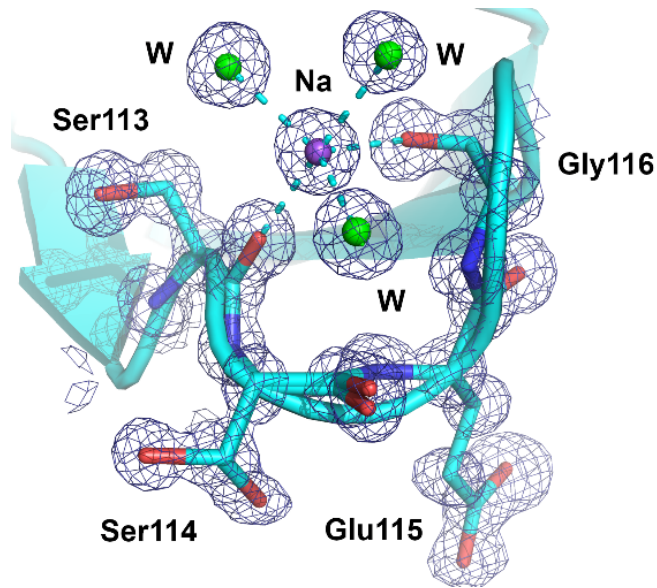


Figura 62. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  del contacto con el ion de sodio en el lazo n-Src de la SF-2X entre los residuos Ser113 (O) y Gly116 (O).

#### 4.7.4 Estructura del mutante Src-Q128E

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se trabajó con el mutante Gln128Glu con el motivo ATCUN, demostrando que la carga del residuo 128 es clave en la estabilidad de la proteína (Bacarizo *et al.*, 2014). Por este motivo, para esta Tesis se diseñó de nuevo este mutante, pero sin el motivo ATCUN en el extremo amino terminal, obteniendo la siguiente estructura:

- *Estructura del dímero a pH 5,0.* Los cristales crecieron en sulfato amónico 2,0 M, pH 5,0 y PEG 300 al 5 % y pertenecían al grupo espacial  $P6_522$  con parámetros de celdilla  $a=b=46,9 \text{ \AA}$ ,  $c=126,6 \text{ \AA}$  (PDB: 7A30).

Los parámetros de celda obtenidos son similares a los del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3, tanto con el motivo ATCUN (proteína WT, PDB: 4JZ3; mutante Gln128Glu PDB: 4OMN) como sin él (proteína WT PDB: 6XVO). Sólo hay presente una cadena en la unidad asimétrica en la estructura, generando el dímero mediante el operador de simetría. En la Figura 63 se muestra la superposición de los protómeros abiertos de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO) y el mutante Src-Q128E. El RMSD de los residuos de la cadena principal es pequeño, con un valor de  $0,20 \text{ \AA}$ . Los datos estructurales se muestran en la Tabla 10 del Apéndice 3.



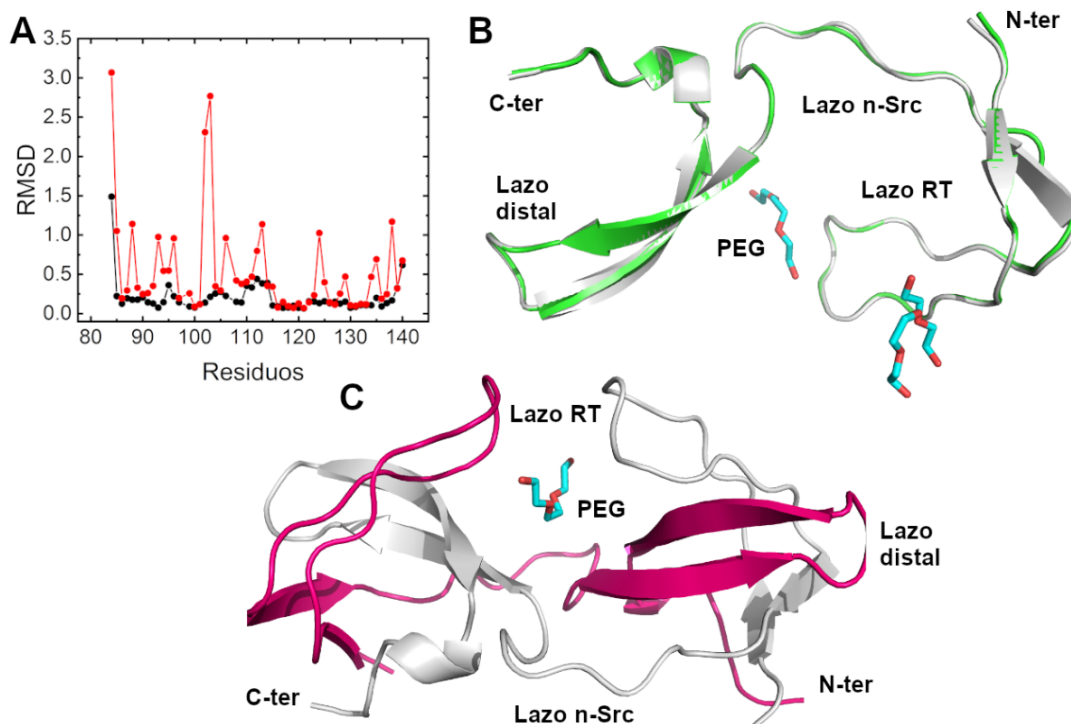


Figura 63. (A) RMSD obtenido tras superponer el oligómero abierto de la Src-Q128E (PDB: 7A30) con el de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO). (B) Superposición de las cadenas del protómero abierto en la estructura del dímero entrecruzado de la Src-Q128E (blanco) con la c-Src-SH3 (verde). (C) Representación de la estructura de la Src-Q128E a pH 5,0 (blanco). El dímero entrecruzado se ha generado por simetría (magenta). La molécula de PEG se ha representado con bastones en cian.

Los RMSD de los residuos de la cadena principal tras comparar el protómero abierto con las cadenas A y B del monómero son 0,47 y 0,44 Å y su superposición se encuentra en la Figura 64. En la Tabla 16 se muestra el valor de los ángulos diedros de los residuos del lazo n-Src entre las estructuras de la c-Src-SH3 y del mutante Gln128Glu, con y sin el motivo ATCUN.

Tabla 16. Ángulos diedros de los residuos del lazo n-Src<sup>A</sup>

Proteína	Residuos	Monómero $\phi$	Monómero $\psi$	Dímero $\phi$	Dímero $\psi$
<b>c-Src-SH3</b> (PDB: 6XVN y 6XVO)	Val111	-98,2	-5,2	-107,2	106,2
	Asn112	<b>SM</b>	<b>SM</b>	-47,1	132,8
	Asn113	-103,3	-171,1	-161,9	175,5
	Thr114	-107,6	28,3	-75,9	-21,9
	Glu115	-66,9	145,3	-72,2	-25,8
<b>Src-Q128E</b> (ATCUN, PDB: 4OMO y 4OMN)	Val111	-91,7	-45,6	-96,1	128,7
	Asn112	-139,6	119,2	-76,8	142,1
	Asn113	-123,1	31,5	-158,3	162,6
	Thr114	-65,6	-29,8	-77,5	-15,2
	Glu115	-100,6	148,5	-78,4	-31,4
<b>Src-Q128E</b> (PDB: 7A30)	Val111			-96,5	109,3
	Asn112			-79,7	141,3
	Asn113			-159,8	-176,8
	Thr114			-76,4	-11,3
	Glu115			-78,6	-33,1

<sup>A</sup> En negrita se muestran los residuos fuera del Ramachandran o que no se han podido modelar (SM).

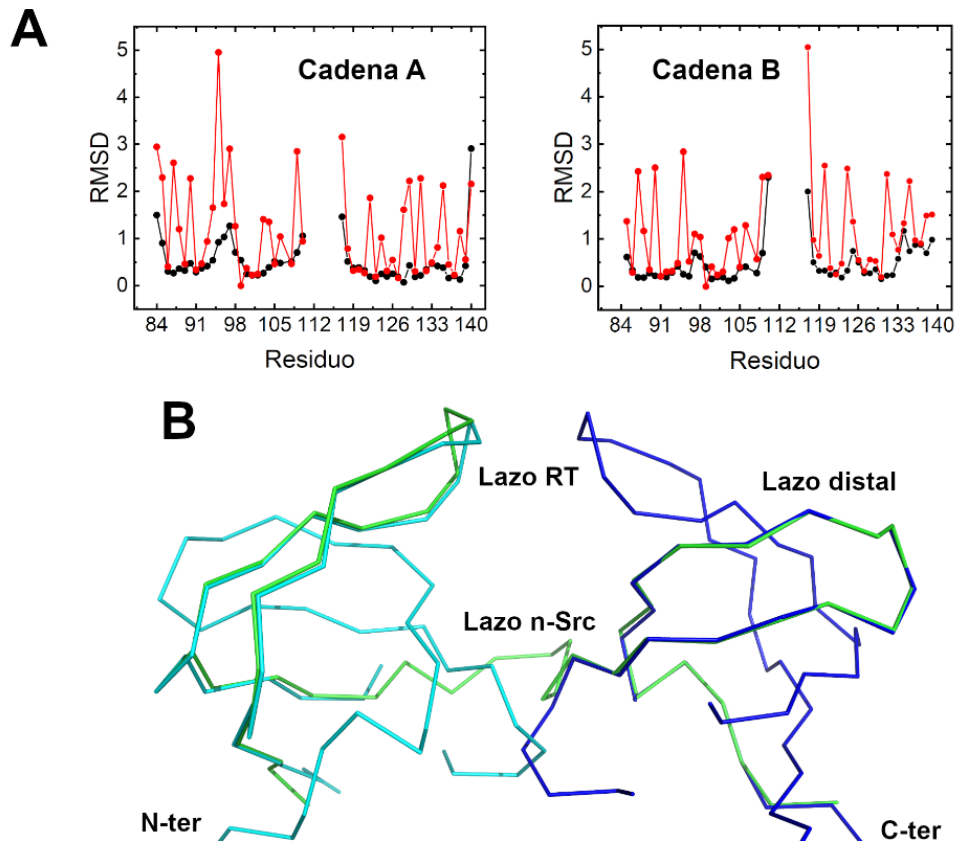


Figura 64. (A) RMSD para los residuos de la cadena principal (negro) y para las cadenas laterales (rojo) del dímero del mutante Src-Q128E (PDB: 7A30) al compararlas con las cadenas A y B del monómero de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVN). (B) Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado del mutante Src-Q128E (verde) con la cadena A de la estructura monomérica de la c-Src-SH3 WT: la superposición de las regiones N- y C-terminal se muestran en cian y azul, respectivamente.

La mutación Gln128Glu de esta proteína no afecta a la distribución de puentes de hidrógeno en esa posición, ya que tanto el residuo Gln128 de la c-Src-SH3 WT (PDB: 4JZ3) como el Glu128 del mutante Src-Q128E forma los mismos enlaces de hidrógeno como puede verse en la Figura 65.

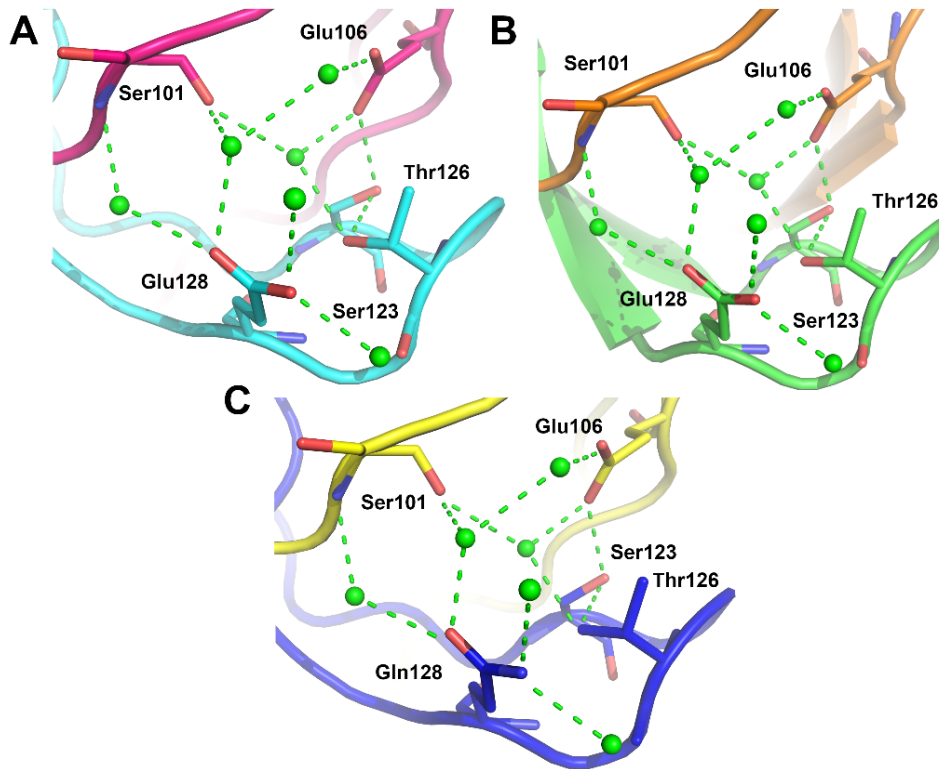


Figura 65. Distribución de los puentes de hidrógeno en el sitio de nucleación alrededor del residuo Glu128 para la (A) Src-Q128E (cian, PDB: 7A30), (B) Q128E con el motivo ATCUN (verde, PDB: 4OMN) y (C) Gln128 de la c-Src-SH3 (azul, PDB: 6XVO). En magenta, naranja y amarillo se muestran las cadenas complementarias del dímero generadas por simetría.

#### 4.7.5 Estructura del mutante Src-T125S

El objetivo de clonar esta proteína es analizar la importancia del puente de hidrógeno que se observa en algunas estructuras entre las cadenas laterales del Glu106 y la Thr125. Además, el residuo en la posición 125 es la única diferencia entre el dominio SH3 de la proteína de pollo y la humana. En esta Tesis, al igual que en todos los trabajos de plegamiento de este dominio SH3, se ha trabajado con la proteína de pollo. De hecho, las estructuras de la Src humana disponibles en el PDB corresponden a la estructura de la quinasa completa o a la del dominio en complejo con péptidos, pero no del dominio libre. Para esta proteína se obtuvo la siguiente estructura, cuyas estadísticas se muestran en la Tabla 16 del Apéndice 3:

- *Estructura del dímero a pH 5,0.* Los cristales se obtuvieron en sulfato amónico 2,0 M, pH 5,0 y PEG 300 en el grupo espacial  $P6_5$  con parámetros de celdilla  $a=b=47,2 \text{ \AA}$ ,  $c=126,4 \text{ \AA}$  y dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A3D).

En la Figura 66 se muestra la estructura de la Src-T125S y su superposición con el dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 WT (PDB: 6XVO).

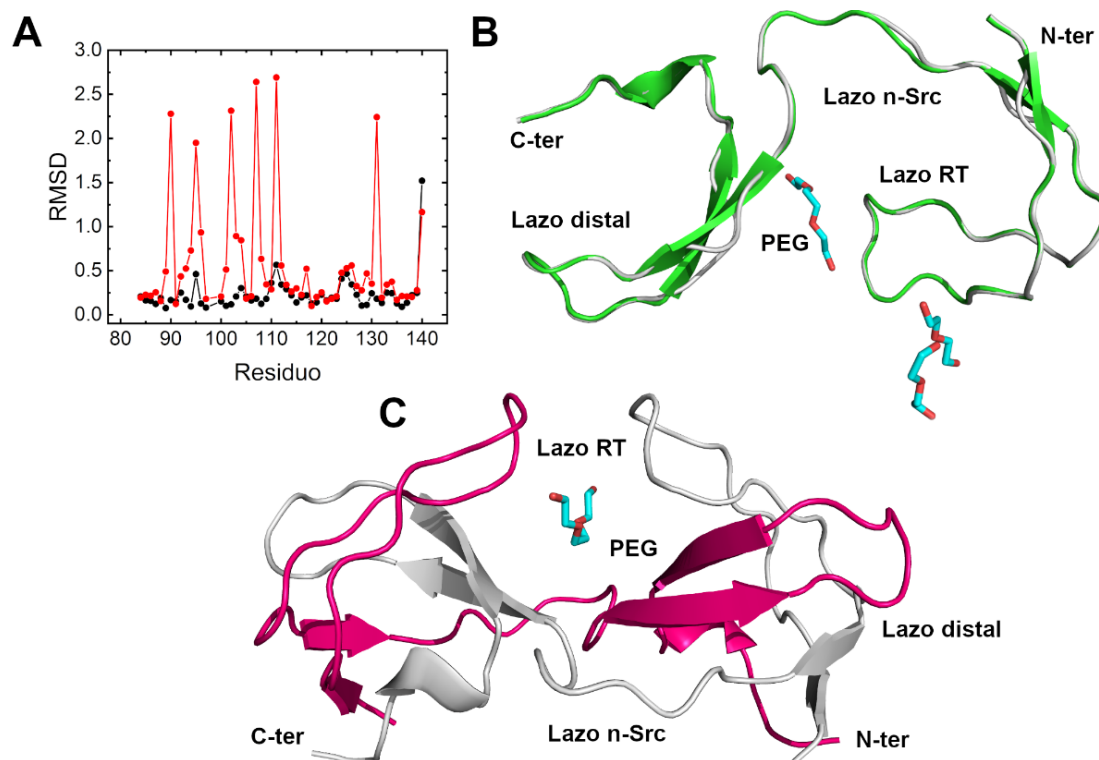


Figura 66. (A) RMSD obtenido tras superponer el oligómero abierto de la Src-T125S (PDB: 7A3D) con la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO) para los átomos de la cadena principal (negro) y cadenas laterales (rojo). (B) Estructura de la Src-T125S (verde) superpuesta a la del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 (blanco). (C) Dímero entrecruzado completo, en blanco se muestra la cadena A y en magenta la B. La molécula de PEG que se encuentra en la interfaz del dímero se ha representado en cian mediante bastones.

Las diferencias observadas entre ambas estructuras son insignificantes, el RMSD para los residuos de la cadena principal es de 0,25 Å. La comparación del oligómero abierto con las dos cadenas presentes en el monómero se encuentra en la Figura 67, siendo el RMSD de 0,53 y 0,40 Å para las cadenas A y B, respectivamente. Todos los restos modelados en la estructura del dímero del mutante Src-T125S mantienen los valores de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  en las zonas permitidas del Ramachandran y su valor para el lazo n-Src se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Ángulos diedros de los residuos del lazo n-Src<sup>A</sup>

Proteína	Residuos	Monómero $\phi$	Monómero $\psi$	Dímero $\phi$	Dímero $\psi$
<b>c-Src-SH3</b> (PDB: 6XVN y 6XVO)	Val111	-98,2	-5,2	-107,2	106,2
	Asn112	<b>SM</b>	<b>SM</b>	-47,1	132,8
	Asn113	-103,3	-171,1	-161,9	175,5
	Thr114	-107,6	28,3	-75,9	-21,9
	Glu115	-66,9	145,3	-72,2	-25,8
<b>Src-T125S</b> (PDB: 7A3D)	Val111			-120,8 <sup>C</sup>	122,5 <sup>C</sup>
	Asn112			-71,1 <sup>C</sup>	143,3 <sup>C</sup>
	Asn113			-155,8 <sup>C</sup>	169,8 <sup>C</sup>
	Thr114			-69,8 <sup>C</sup>	-28,1 <sup>C</sup>
	Glu115			-69,5 <sup>C</sup>	-30,1 <sup>C</sup>

<sup>A</sup> En negrita se muestran los residuos fuera del Ramachandran o sin modelar (SM).

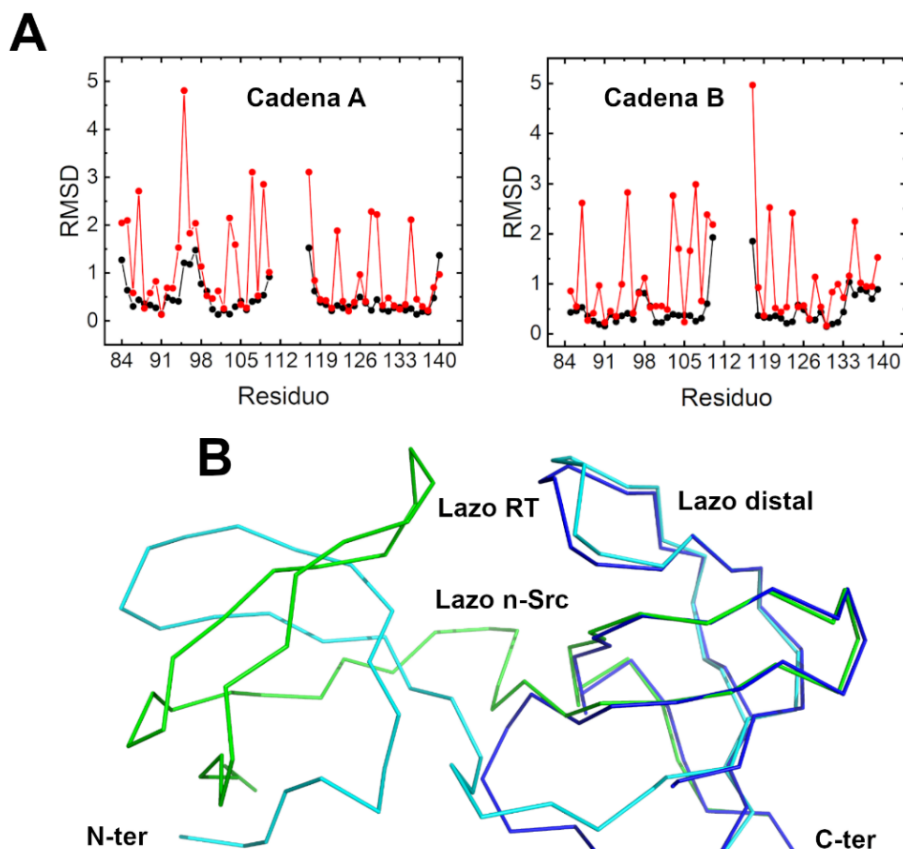


Figura 67. (A) RMSD para los átomos de la cadena principal (negro) y para las cadenas laterales (rojo) del dímero del mutante Src-T125S (PDB: 7A3D) con las cadenas A y B del monómero de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVN). (B) Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado de la Src-T125S (verde) con la cadena A de la estructura monomérica de la c-Src-SH3 WT: la superposición de las regiones N- y C-terminal se muestran en cian y azul.

Los dímeros entrecruzados tanto de la c-Src-SH3 WT (Plaza-Garrido *et al.*, 2020) como de la Src-T125S, son muy similares y presentan las mismas interacciones en la interfaz abierta entre las cadenas A y B, incluyendo el puente salino entre las cadenas laterales de los residuos Arg95A/B y Glu115B/A. La Src-T125S se caracteriza por presentar una Ser en la posición 125, sin embargo, como se puede observar en la Figura 68, no hay diferencias significativas entre las estructuras de las dos proteínas.

Para comprobar el efecto de la Ser125 en el monómero, se ha superpuesto la estructura de la c-Src (código PBB 6XVN) con una de las estructuras depositadas en el PDB del dominio SH3 de la Src humana unido al péptido RGT (PDB: 4HXJ, Xiao *et al.*, 2013) (Figura 69). También se han comparado los factores B de ambas estructuras.

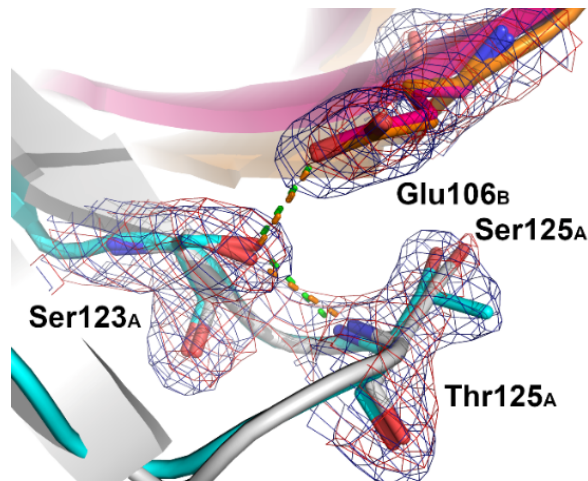


Figura 68. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  de la posición 125 de la c-Src-SH3 (cian y naranja, mapa en azul) y de la c-Src-T125S (blanco y magenta, mapa en rojo).

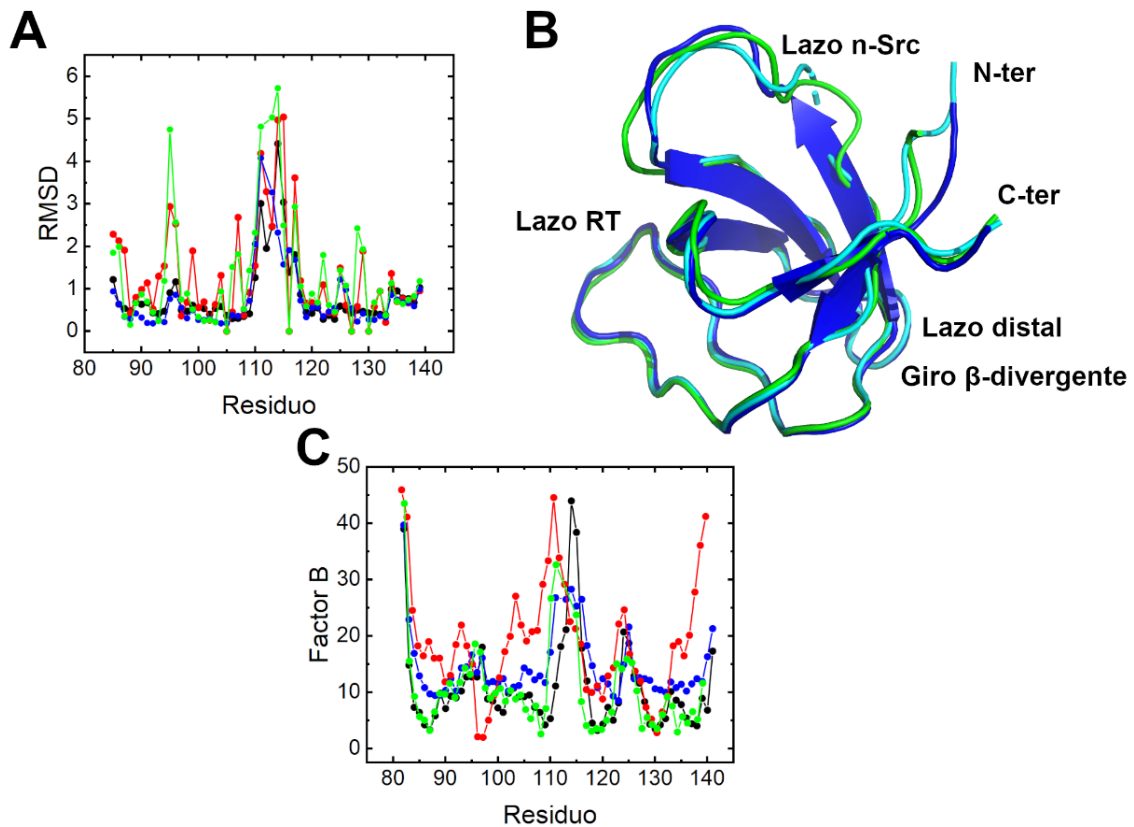


Figura 69. (A) RMSD de la superposición de las cadenas A y B de la c-Src humana con la cadena A de la c-Src para las cadenas principales (negro y azul) y las cadenas laterales (rojo y verde). (B) Superposición de la cadena A del dominio SH3 de la c-Src (cian) con las cadenas A (azul) y B (verde) de la Src humana. (C) Factor B por residuo de las cadenas A y B de las proteínas Src humana (negro y rojo) y c-Src (azul y verde).

El residuo 125 es importante porque participa en la unión del lazo distal con el giro  $\beta$ -divergente. Al comparar dicha posición entre las distintas cadenas de los monómeros de la c-

Src y la Src humana se puede observar una ligera variación en la distribución de los puentes de hidrógeno (Figura 70).

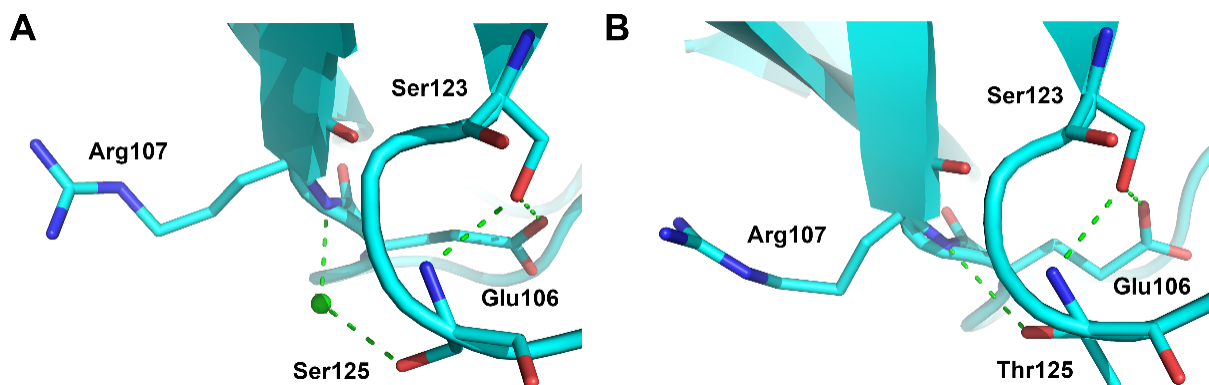


Figura 70. Puentes de hidrógeno asociados a la posición 125 de las cadenas A y B tanto del dominio SH3 de la Src humana (A) como la c-Src (B).

#### 4.7.6 Estructura del mutante Src-L100I

El estudio del mutante de la c-Src Leu100Ile es interesante puesto que la Leu100 es un residuo que está muy conservado entre los dominios SH3. Además, en estudios previos, se han observado diferencias en la red de puentes de hidrógeno del sitio de unión asociados a cambios conformacionales de este aminoácido (Bacarizo *et al.*, 2014). A partir de los cristales obtenidos se determinó la siguiente estructura:

- *Estructura del monómero.* En la condición de cristalización se utilizó como tampón MES 0,1 M pH 6,0, en presencia de PEG 300 y sulfato amónico 2,0 M. Para controlar la nucleación se añadió también 10 % glicerol y cloruro de litio 40 mM. A pesar de la presencia de PEG 300 y el pH ácido, la estructura corresponde al monómero del dominio y los cristales pertenecen al grupo espacial  $P2_1$ , con parámetros de celdilla  $a=37,5 \text{ \AA}$ ,  $b=92,4 \text{ \AA}$ ,  $c=37,6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=102,2^\circ$  y cuatro moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A3C).

En la Figura 71 se muestra la estructura obtenida y en la Tabla 14 del Apéndice 3 el resumen de esta. Las cadenas presentan diferentes conformaciones dentro de la unidad asimétrica, comportándose de la misma forma que el monómero 6XVM de la c-Src-SH3 WT (Plaza-Garrido *et al.*, 2020), ya que la cadena A tiene la misma conformación que la C y la cadena B es igual a la D. El lazo n-Src vuelve a ser la región con mayores discrepancias y además la que presenta mayor flexibilidad, tal y como se muestra en el gráfico de los factores B de la Figura 72.

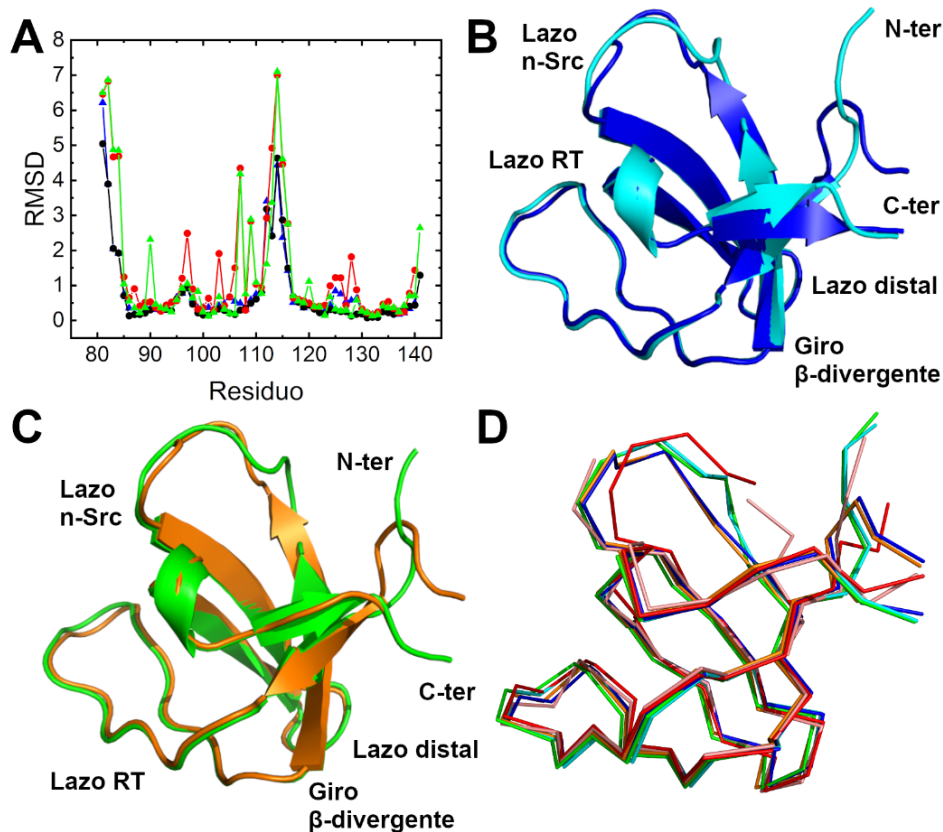


Figura 71. (A) RMSD obtenido tras superponer las distintas cadenas de la estructura. La desviación de las cadenas A y B se muestra en negro para la principal y rojo para las laterales, mientras que para las cadenas C y D, se muestra en azul y verde para la principal y las laterales. El RMSD medio para las cadenas es de 1,40 Å. (B y C) Cadenas A (cian), B (azul), C (verde) y D (naranja) presentes en la unidad asimétrica de la estructura del mutante Src-L100I. (D) Superposición de todas las cadenas de la estructura del mutante a las cadenas A (rojo) y B (salmón) de la c-Src WT (PDB: 6XVN).

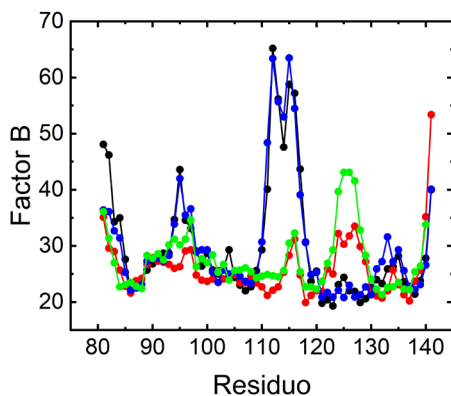


Figura 72. Factores B para los átomos de las cadenas principales A (negro), B (rojo), C (azul) y D (verde) de la Src-L100I (PDB: 7A3C).

En la cadena D, se puede observar un desplazamiento del lazo distal con respecto a las cadenas A, B y C, que se mantienen sin cambios. Este desplazamiento del lazo no afecta a los enlaces que se forman a través de sus residuos, sin embargo, el Glu106 de dicha cadena presenta una conformación ligeramente distinta a la del resto de moléculas de la unidad asimétrica, tal y



como se muestra en la Figura 73A. Al comparar el mutante Leu100Ile con la posición equivalente de la c-Src-SH3 WT (PDB: 6XVM), se puede observar que no existen diferencias conformacionales significativas (Figura 73B).

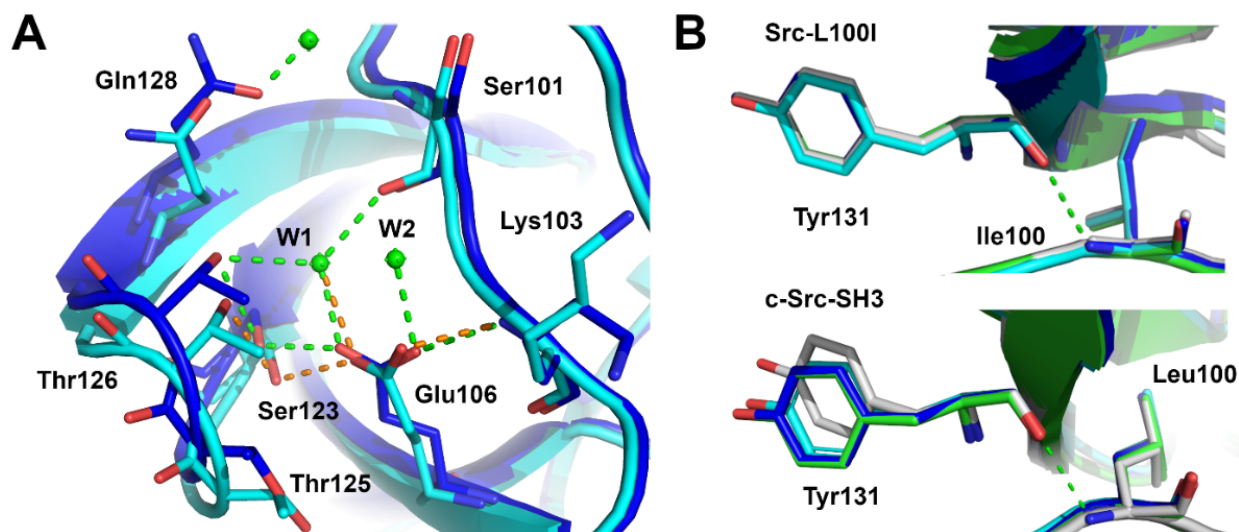


Figura 73. (A) Sitio de nucleación de las cadenas A (azul) y D (cian) del mutante Src-L100I. Los puentes de hidrógeno asociados a la cadena A se muestran en verde y los de la cadena D en naranja. El Glu106A interacciona con las moléculas de agua W1 y W2, mientras que el Glu106D interacciona sólo con la molécula W1. (B) Puentes de hidrógeno de los residuos Ile100 y Leu100 en la estructura de la Src-L100I y c-Src-SH3 para las cadenas A (verde), B (cian), C (azul) y D (blanco).

#### 4.7.7 Estructura del mutante Src-E106D

El Glu106 es un residuo importante para el correcto plegamiento de la proteína debido a que el enlace que se forma a través de su cadena lateral con la Ser123 del lazo distal es clave en el estado de transición del plegamiento de la proteína. Por este motivo es interesante estudiar los cambios que puede provocar la mutación de dicho residuo. La estructura del mutante Src-E106D (Glu106Asp) obtenida fue la siguiente:

- *Estructura del dímero a pH 6,0.* Cristalizó en presencia de PEG 300, sulfato amónico 2,5 M, cloruro de litio 40 mM y un 10 % de glicerol para controlar la nucleación, utilizando MES 0,1 M como tampón. Los cristales pertenecían al grupo espacial  $P6_522$ , con parámetros de celdilla  $a=b=46,9 \text{ \AA}$ ,  $c=125,7 \text{ \AA}$  y una molécula en la unidad asimétrica, generando el dímero entrecruzado del dominio por simetría (PDB: 7A3B).

En la Figura 74 se muestra la estructura del oligómero y la superposición de su única cadena con el dímero de la c-Src-SH3 WT. El resumen de las estadísticas de la estructura se encuentra en la Tabla 15 del Apéndice 3.

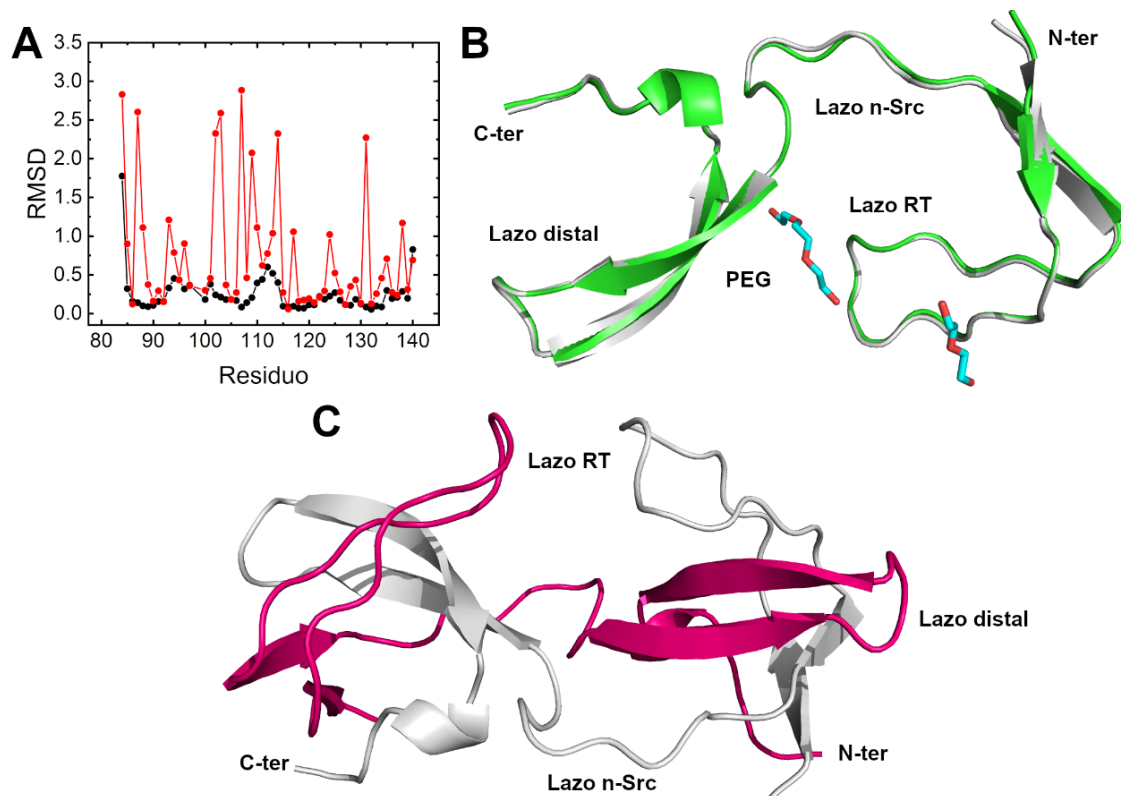


Figura 74. (A) RMSD de la superposición del oligómero abierto del mutante Src-E106D (PDB: 7A3B) y la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO). En negro se muestra la desviación correspondiente a la cadena principal (valor promedio 0,25) y en rojo la de las cadenas laterales. (B) Estructura del Src-E106D (verde) superpuesta a la del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 (blanco). (C) Dímero entrecruzado generado por simetría (magenta). Las moléculas de PEG se han representado en color cian con bastones.

La estructura del dímero entrecruzado del mutante Src-E106D se ha modelado en su totalidad, con todos los residuos en las zonas permitidas del Ramachandran y se ha comparado con las cadenas A y B del monómero (Figura 75), con un RMSD para los átomos de la cadena principal de 0,38 y 0,42 Å. En la Tabla 18 se muestra el valor de los ángulos diedros para el lazo n-Src, que actúa como bisagra en ambas proteínas.

Tabla 18. Ángulos diedros de los residuos del lazo n-Src<sup>A</sup>

Proteína	Residuos	Monómero $\phi$	Monómero $\psi$	Dímero $\phi$	Dímero $\psi$
<b>c-Src-SH3</b> (PDB: 6XVN y 6XVO)	Val111	-98,2	-5,2	-107,2	106,2
	Asn112	<b>SM</b>	<b>SM</b>	-47,1	132,8
	Asn113	-103,3	-171,1	-161,9	175,5
	Thr114	-107,6	28,3	-75,9	-21,9
	Glu115	-66,9	145,3	-72,2	-25,8
<b>Src-E106D</b> (PDB: 7A3B)	Val111			-114,7	122,7
	Asn112			-61,8	129,4
	Asn113			-132,5	150,5
	Thr114			-55,4	-42,6
	Glu115			-66,9	-20,7

<sup>A</sup> En negrita se muestran los residuos fuera del Ramachandran o que no se han podido modelar (SM).

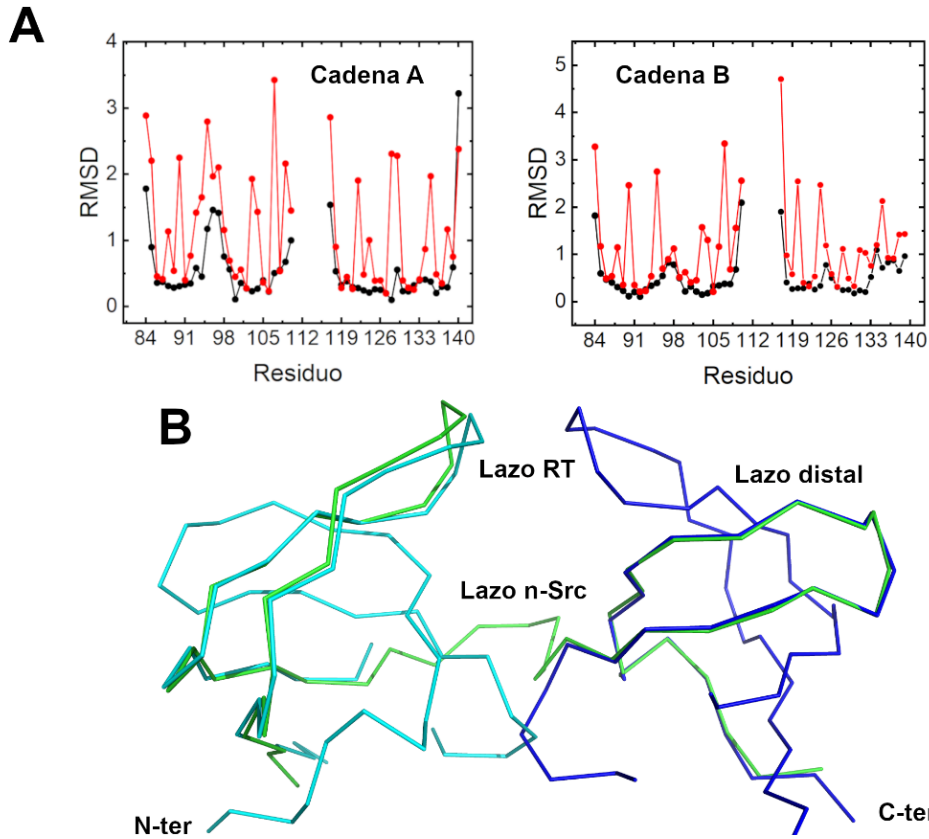


Figura 75. (A) RMSD de los átomos de la cadena principal (negro) y de las cadenas laterales (rojo) frente al número de residuo del dímero del mutante Src-E106D (PDB: 7A3B) con las cadenas A y B del monómero de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVN). (B) Superposición del protómero abierto del dímero entrecruzado del Src-E106D (verde) (PDB: 7A3B) con la cadena A del monómero de la c-Src-SH3 WT (PDB: 6XVN): la superposición de las regiones N- y C-terminal se muestran en cian y azul.

Al analizar la posición 106 en ambas estructuras, se puede observar que en el caso del mutante existe algo poco común en este tipo de dominios, y es que el Asp106 pierde el enlace de hidrógeno directo a través de su cadena lateral con la Ser123 (Figura 76), produciéndose a través de una molécula de agua.

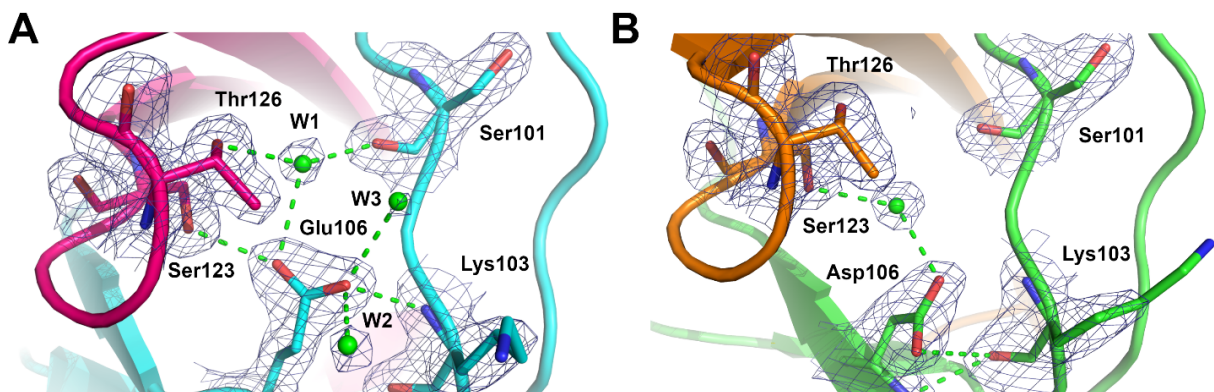


Figura 76. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a  $1.5 \sigma$  de los puentes de hidrógeno alrededor de la posición 106 del sitio de nucleación de (A) c-Src WT (cian) y (B) Src-E106D (verde). Los puentes de hidrógeno y las moléculas de agua se muestran en verde y las cadenas generadas por simetría que forman el dímero entrecruzado en magenta y naranja.

A pesar de la mutación, el dímero entrecruzado se forma ya que las interacciones que favorecen su estabilización frente al monómero no experimentan cambios.

#### 4.7.8 Estructura del mutante Src-T126S

El mutante Src-T126S (Thr126Ser) se estudió porque este residuo forma parte del conjunto de enlaces de hidrógeno asociados a la interacción entre el Glu106 del giro  $\beta$ -divergente y la Ser123 del lazo distal. Se obtuvo la siguiente estructura:

- *Estructura del dímero a pH 6,0.* La proteína cristalizó en MES, sulfato amónico 2,5 M y en presencia de PEG 300, en el grupo espacial  $P6_522$ , con parámetros de celdilla  $a=b=46,9$  Å,  $c=125,9$  Å y una molécula en la unidad asimétrica (PDB: 7A3E).

En la Figura 77 se muestra la comparación de su cadena abierta con la equivalente del dímero de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO), así como la estructura del dímero entrecruzado del mutante. Las estadísticas de la estructura se encuentran en la Tabla 17 del Apéndice 3.

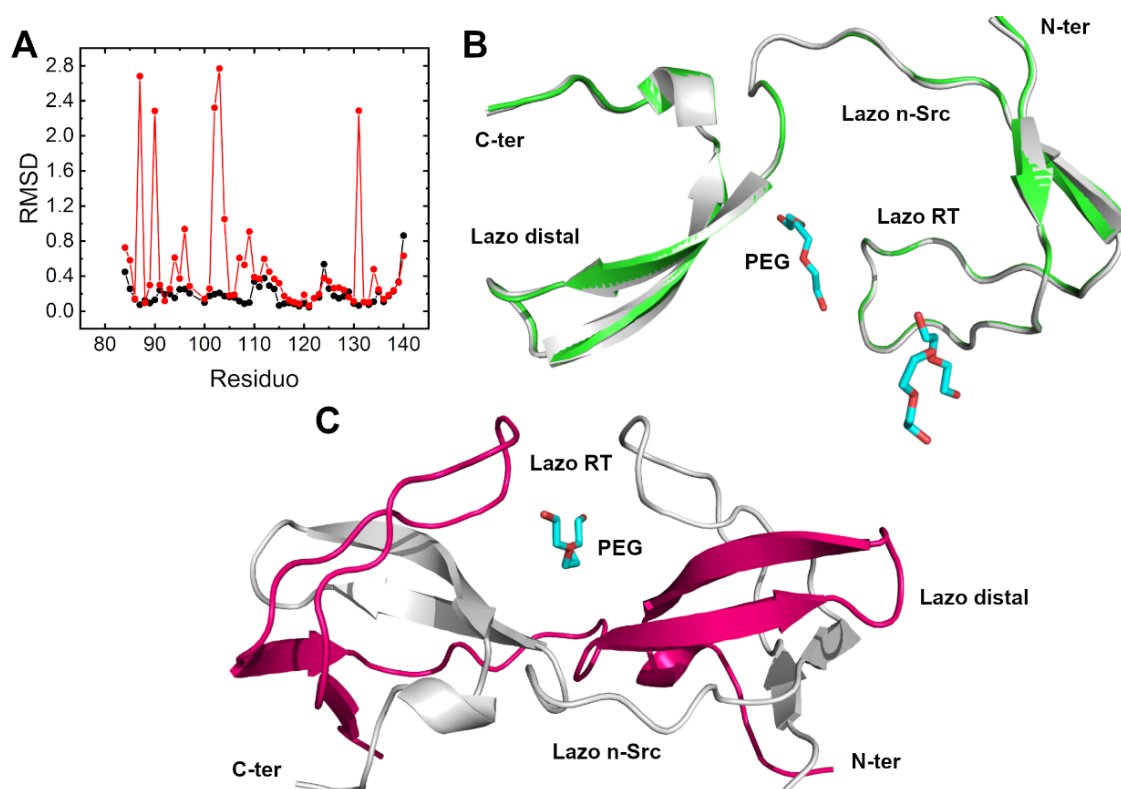


Figura 77. (A) RMSD al superponer el oligómero abierto del mutante Src-T126S (PDB: 7A3E) con la c-Src-SH3 (PDB: 6XVO). En negro se muestra la desviación correspondiente a la cadena principal (valor promedio 0,19) y en rojo la de las cadenas laterales. (B) Estructura del Src-T126S (verde) superpuesta a la del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 (blanco). (C) Dímero entrecruzado completo del dominio generado por simetría (magenta).

La comparación del protómero abierto con las cadenas presentes en la unidad asimétrica del monómero se muestra en la Figura 78. El RMSD para los residuos superpuestos del dímero y de las cadenas presentes en el monómero es de 0,51 Å para la cadena A y de 0,41 Å para la cadena B. En la Tabla 19 se muestra el valor de los ángulos diedros para los residuos del lazo n-Src.

Tabla 19. Ángulos diedros de los residuos del lazo n-Src<sup>A</sup>

Proteína	Residuos	Monómero $\phi$	Monómero $\psi$	Dímero $\phi$	Dímero $\psi$
<b>c-Src-SH3</b> (PDB: 6XVN y 6XVO)	Val111	-98,2	-5,2	-107,2	106,2
	Asn112	<b>SM</b>	<b>SM</b>	-47,1	132,8
	Asn113	-103,3	-171,1	-161,9	175,5
	Thr114	-107,6	28,3	-75,9	-21,9
	Glu115	-66,9	145,3	-72,2	-25,8
<b>Src-T126S</b> (PDB: 7A3E)	Val111			-98,8	111,9
	Asn112			-76,5	134,6
	Asn113			-152,3	174,2
	Thr114			-70,6	-18,1
	Glu115			-79,6	-28,8

<sup>A</sup>En negrita se muestran los residuos fuera del Ramachandran o que no se han podido modelar (SM).

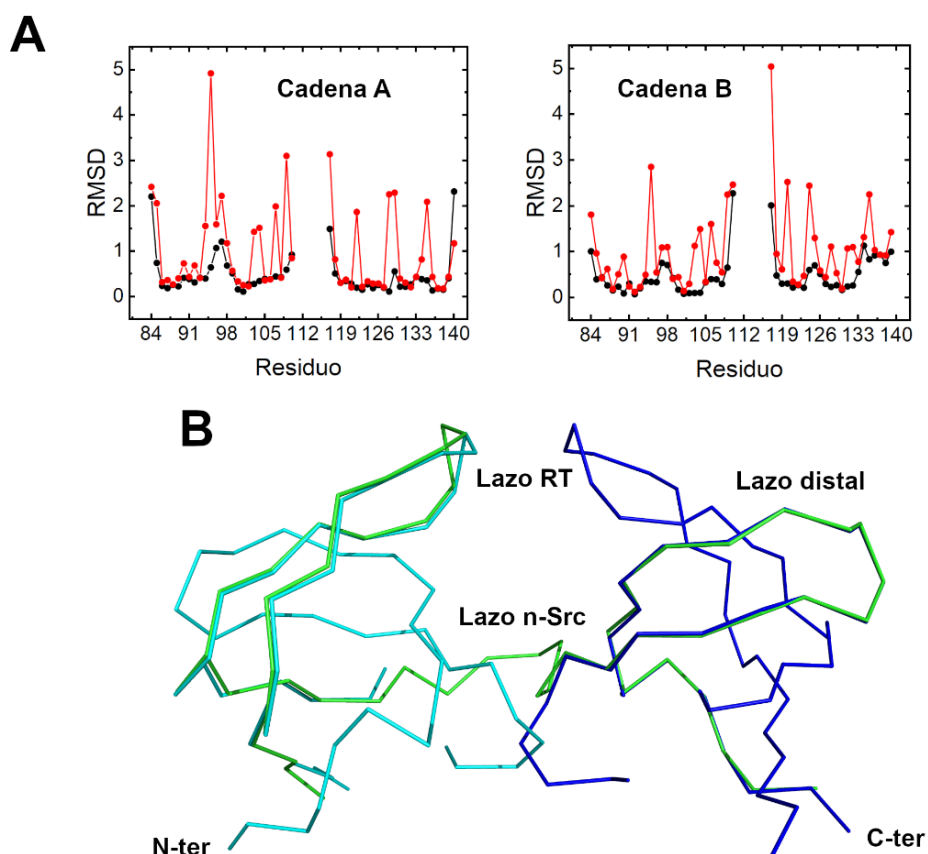


Figura 78. (A) RMSD de los residuos de la cadena principal (negro) y de las cadenas laterales (rojo) frente al número de residuo del dímero del mutante Src-T126S (PDB: 7A3E) con las cadenas A y B del monómero de la c-Src-SH3 (PDB: 6XVN). (B) Superposición del protómero abierto del dímero entrecruzado del Src-T126S (verde) con la cadena A del monómero de la c-Src-SH3 WT: la superposición de las regiones de los extremos N- y C-terminal se muestran en cian y azul.

La mutación introducida en la posición 126 intercambiando el residuo treonina por una serina no afecta a la formación del dímero entrecruzado. Las interacciones características del sitio de nucleación se mantienen y no se observan cambios conformacionales del lazo distal, tal y como se puede observar en la Figura 79. Además, la mutación no afecta ni al resto de contactos de la interfaz que favorecen la formación del dímero ni al lazo n-Src.

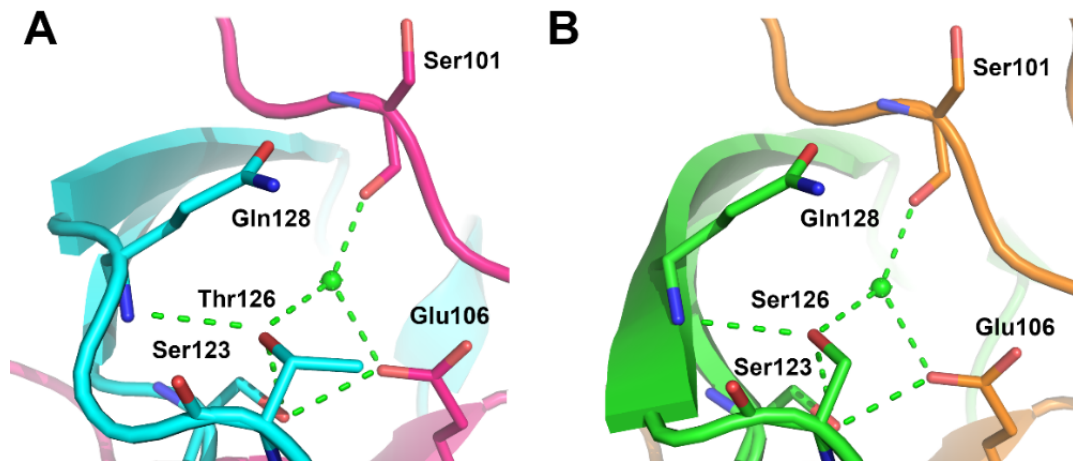


Figura 79. Diferencias entre la Thr126 de la estructura de las proteínas (A) c-Src-SH3 WT (cian, PDB: 6XVO) y (B) de la Ser126 del mutante Src-T126S (verde, PDB: 7A3E). En verde se muestran los puentes de hidrógeno y en magenta y naranja las cadenas generadas por simetría.

## 4.8 Discusión

El dominio SH3 de la c-Src es un buen modelo para analizar procesos de plegamiento alternativos, así como caracterizar las regiones de mayor susceptibilidad a actuar como bisagras y su relación con el 3D-DS, tanto de forma experimental como computacional (Zhuravlev *et al.*, 2014; Bonjack-Shterengartz *et al.*, 2017; Lafita *et al.*, 2019). Al tratarse de un dominio modular de pocos residuos (~60), fácil de purificar y sin la presencia de cofactores o puentes disulfuro hacen que tanto la proteína nativa como algunos de sus mutantes hayan sido ampliamente estudiados desde el punto de vista de plegamiento (Grantcharova *et al.*, 1997; Grantcharova *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 1998). Sin embargo, poco se ha explorado cuáles son las bases moleculares de la tendencia que tiene esta proteína a formar dímeros entrecruzados más allá de algunos estudios computacionales (Tian & Best, 2016; Bonjack-Shterengartz *et al.*, 2017; Lafita *et al.*, 2019). Este comportamiento no es exclusivo del dominio SH3 de la c-Src, también se han encontrado otros dominios SH3 que son capaces de formar dímeros entrecruzados. Incluso está presente en algunos dominios SH2 de varias tirosina quinasas como por ejemplo la Grb2-SH2 (Schiering *et al.*, 2000), la Grb7-SH2 (Pias *et al.*, 2010), la Fyn-SH2

(Huculeci *et al.*, 2015) o la p59<sup>Fyn</sup>-SH2 (Huculeci *et al.*, 2017). Esto hace pensar que quizás este tipo de comportamiento sea algo más general en este tipo de dominios y que incluso pueda tener algún papel funcional. Por ejemplo, la forma entrecruzada del dominio Nck1-SH3.1 no puede unirse a CD3- $\epsilon$  de los receptores de las células T y se ha propuesto que la formación de estos dímeros entrecruzados puede estar detrás de la inactivación de la enzima (Richter *et al.*, 2020).

El objetivo del estudio recogido en este capítulo es profundizar en los determinantes estructurales que promueven la formación de estas estructuras oligoméricas. Para llevar a cabo este estudio se han diseñado varias quimeras del dominio SH3 de la c-Src, intercambiando sus lazos n-Src, RT y ambos, por los presentes en la Fyn-SH3. A pesar de compartir un elevado porcentaje de la secuencia el comportamiento de estos dos dominios respecto a la formación de dímeros entrecruzados es totalmente distinta. Además, se han estudiado algunos mutantes de residuos en el lazo distal y en el giro  $\beta$ -divergente que pueden afectar al enlace de hidrógeno establecido entre la serina (Ser123 en c-Src y Ser124 en Fyn) y el glutámico (Glu106 en c-Src y Glu107 en Fyn) que juegan un papel clave en el estado de transición del plegamiento de estos dominios SH3.

En general las mutaciones introducidas en los lazos RT y n-Src del dominio c-Src-SH3 tienen un efecto menor en la estabilidad de la proteína que las mutaciones introducidas en el lazo distal, especialmente en los mutantes Src-S123T y Src-T126S, en los que se observa una menor estabilidad química frente al pH y frente al agente caotrópico cloruro de guanidinio. Estas diferencias se deben principalmente al papel que juegan los residuos presentes en las posiciones 123 y 126 en el dominio SH3 de la c-Src, cuya interacción con el residuo Glu106 del giro  $\beta$ -divergente es clave en el plegamiento del dominio (Grantcharova *et al.*, 1998; Riddle *et al.*, 1999; Grantcharova *et al.*, 2000; Northey *et al.*, 2002). Las estructuras resueltas por nuestro grupo de investigación y en esta Tesis demuestran una alternancia en la formación de los enlaces de hidrógeno que conforman el lazo distal. Por ejemplo, las estructuras de la forma WT de la proteína tienen más de una molécula en la unidad asimétrica (PDB: 6XVM y 6XVN). Estas moléculas representan dos conformaciones distintas de la proteína donde las diferencias más notables se encuentran en el lazo n-Src y el lazo distal. Las conformaciones presentes en este último muestran distintas redes de enlaces de hidrógeno entre los residuos Ser123-Glu106 y los residuos Thr125, Thr126 y algunas moléculas de agua. La mutación en el residuo 123 del mutante Src-S123T, es altamente desestabilizante y no se ha podido determinar su estructura. Esta proteína es la más inestable de todas las de la Tesis y su desnaturalización térmica es

irreversible, lo que demuestra la importancia del enlace entre el Glu106 (OE1) y la Ser123 (OG). Este resultado es comparable al observado en bibliografía para la Fyn-SH3, en la que la mutación Ser124Thr también produce una desestabilización de la  $T_m$  de 15 °C con respecto a la proteína nativa, probablemente debido a que el grupo hidroxilo del residuo Thr124 tiene mayores dificultades para formar el puente de hidrógeno con el Glu107 que el correspondiente residuo serina (Maxwell *et al.*, 1998). El residuo en la posición 106 es uno de los más conservados en los dominios SH3 y normalmente se trata de un aminoácido aspartato o glutamato. En el mutante Src-E106D, los valores de  $\Delta G_w$  y  $T_m$  son similares a los del dominio SH3 de la c-Src nativa, probablemente debido a que la mutación es conservativa y la longitud de la cadena del ácido carboxílico tiene un efecto menor en la red de interacciones formadas. Aunque a pesar de los muchos intentos no hemos podido obtener la estructura del monómero de este mutante, la estructura del dímero entrecruzado muestra cambios relevantes en el sitio de nucleación, ya que se visualiza la pérdida del enlace de hidrógeno directo entre el Asp106 y la cadena lateral de la Ser123 y en su lugar una molécula de agua media esta interacción clave.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la posición 128 afecta significativamente a la estabilidad de la proteína. Este residuo es uno de los que muestra más variabilidad entre las tirosina quinasas de la familia Src más afines a la c-Src. Mientras que en la c-Src es un residuo glutamina (polar y sin carga), en la Fyn este residuo es un glutamato (que puede ionizarse y presentar carga negativa) y en la c-Yes es una lisina (que presenta carga positiva). En los estudios anteriores a esta Tesis con los mutantes Gln128Lys (PDB: 4OMP) y Gln128Arg (PDB: 4OML) de la c-Src con el motivo ATCUN se observó un aumento en la estabilidad respecto a la proteína nativa. Sin embargo, al introducir un residuo que puede adquirir carga negativa cuando se desprotona su cadena lateral como el glutamato (Glu128), el dominio SH3 experimenta una disminución de la  $T_m$  de ~5 °C (Bacarizo *et al.*, 2014). Las proteínas de este capítulo con mutaciones en dicha posición (SF-Src-Q128E, SF-Src-EAR y Src-Q128E) muestran cambios equivalentes en la estabilidad térmica y, además, el proceso de plegamiento tras la desnaturalización térmica es irreversible. Ello pone en evidencia la importancia de dicho residuo en el proceso de plegamiento de la proteína contribuyendo a la estabilidad electrostática de esta región, que además está en contacto directo con el núcleo hidrofóbico de la proteína. Este está formado por los residuos Phe102 y Leu108 que forman un contacto hidrofóbico y por el aminoácido Glu106, que interacciona mediante enlaces de hidrógeno a través de su cadena lateral con el átomo de nitrógeno de la cadena principal de la



Lys103. La interacción entre el Glu106 y la Lys103 es característica de estos dominios y conecta el giro  $\beta$ -divergente y el lazo RT.

Un resultado interesante es que, a pesar de los pocos cambios y la naturaleza conservativa de los mismos en la mayoría de los casos, la sustitución de los lazos de la c-Src-SH3 por los de la Fyn-SH3 ha provocado un cambio significativo de la estabilidad y todas las proteínas quimeras (SF-Src, SF-RT y SF-2X) son más estables que la proteína nativa. En el caso de la SF-2X, al analizar su estructura se observa una redistribución de los puentes de hidrógeno entre los dos residuos introducidos en el lazo RT (Ser94Ala y Thr98Asp) para suplir la pérdida de la cadena lateral polar de la Ser94. En su lugar, es el Asp98 el que interacciona con la Thr96 a través de su cadena lateral, produciendo un desplazamiento del lazo RT. Estos cambios podrían estabilizar en cierta medida la estructura monomérica sobre el dímero entrecruzado. La quimera SF-2X, además, es la única proteína de este grupo que ha cristalizado en su forma monomérica en un amplio rango de pH (3,0-7,0), con cambios notables en las conformaciones del Asp98. El análisis de las estructuras del monómero y dímero entrecruzado de la SF-Src, en cambio, no revelan diferencias significativas asociadas al intercambio del lazo n-Src. Cabe destacar que en la c-Src el Asp99 está involucrado en la unión de los péptidos ricos en prolina. Este residuo puede establecer hasta cinco enlaces de hidrógeno a través de su cadena lateral y presenta un valor de  $pK_a$  aparente inusualmente bajo que parece ser un requisito para poder formar la red de interacciones que se establece en el lazo RT. Una explicación al bajo valor de  $pK_a$  calculado para este residuo es que algunas conformaciones del lazo RT pueden dar como resultado a un núcleo muy compacto que se ajusta mejor al residuo desprotonado (Kilambi & Gray, 2012). Tras la unión de las SRPs, la red de interacciones alrededor del Asp99 cambia para facilitar el puente salino entre Asp99 y el residuo de arginina del péptido (Bacarizo *et al.*, 2015). Curiosamente, aunque el Asp99 forma interacciones salinas en los complejos entre la c-Src-SH3 y las SRPs, no forma interacciones entre dominios en la conformación inactiva y cerrada de las estructuras de las quinasas completas (Williams *et al.*, 1997, Sicheri *et al.*, 1997). En la Tabla 20 se muestran los valores de  $pK_a$  aparente calculados con Rosetta (Kilambi *et al.*, 2012) para la c-Src-SH3 y la quimera con las mutaciones en el lazo RT SF-2X.

Tabla 20. Valores de pK<sub>a</sub> aparente de los grupos ionizables calculado con Rosetta

Residuo	c-Src-SH3 (PDB: 6XVN) A/B	SF-2X pH 3,0 (PDB: 7A33) A/B	SF-2X pH 4,5 (PDB: 7A31) A/B	SF-2X pH 7,0 (PDB: 7A32) A/B/C/D
TYR 90	9,3/9,8	9,8/9,8	9,8/9,3	9,7/9,8/9,8/9,8
ASP 91	2,8/3	3,1/3,2	3,1/3,2	2,9/3,1/2,3/2,8
TYR 92	11,9/13,1	9,4/10,2	9,4/10,2	10/10,5/10,2/10,1
GLU 93	4/4,6	4,2/4,1	4,2/4,1	4,7/4,6/5,2/4,4
GLU 97	4,4/3,8	4,5/4,5	4,4/4,3	4,7/4,8/4,7/3,7
ASP 98	Thr98 en la c-Src	3,6/3,5	3,6/3,6	3,3/3,5/3,1/3,6
<b>ASP 99</b>	<b>2,1/1,6</b>	<b>2,6/3,0</b>	<b>2,5/2,5</b>	<b>1,4/3,1/2,1/1</b>
LYS 103	10,8/10,6	11,6/11,7	11,6/11,5	10,6/11/12,1/10,7
LYS 104	10,6/10,6	10,7/10,7	10,7/10,7	10,6/10,6/10,6/10,6
GLU 106	3,5/4,1	3,1/3,1	3,1/3,1	2,9/2,9/4/3,3
GLU 115	4,6/SM	4/4,7	4/4,7	4,9/4,1/4,2/5,5
ASP 117	3,8/3,7	3,6/3,6	3,6/3,6	3,9/3,2/3,3/3,7
HIS 122	5,9/6,2	6,5/6,6	6,5/6,6	6/6,5/6,7/6,1
TYR 131	9,8/9,5	10,7/11,1	10,6/11,1	12,1/9,7/12,6/10,1
TYR 136	9,9/10,1	9,9/9,9	10/9,9	8,9/9,4/11,7/9,9

Que el Asp99 tenga un valor de pK<sub>a</sub> aparente tan bajo podría señalar que la transición observada a pH ácido no es consecuencia de la desprotonación de dicho residuo. Prácticamente todas las quimeras de la Tesis presentan el mismo rango de estabilidad con el pH (3,1-11,5) y son más estables que la proteína c-Src-SH3 en la región ácida. Sin embargo, la SF-Src-EAR es más inestable que el resto de las quimeras y que la c-Src en la zona básica, con un pK<sub>a</sub> de 10,6±0,2. Esta diferencia podría deberse a que esta proteína es la única de todo el grupo que carece de la His122 y en su lugar se encuentra la Arg122. La introducción de esta arginina, con un pK<sub>a</sub> aparente más alto, podría desestabilizar algunas de las interacciones que estabilizan a la proteína. Los mutantes del sitio de nucleación, en cambio, presentan un rango de estabilidad menor que el de las quimeras y más cercano al de la c-Src WT, siendo las proteínas Src-S123T y Src-T126S las más inestables a pH básico, con un pK<sub>a</sub> de 9,4±0,1 y 9,6±0,1, respectivamente. Estos mutantes presentan los mismos grupos ionizables que la c-Src WT, sin embargo, las mutaciones afectan a dos posiciones clave en el plegamiento del dominio debido a los enlaces de hidrógeno que se producen en torno al Glu106 presente en el sitio de nucleación.

Al igual que en el caso de la proteína WT, las estructuras del monómero de las quimeras y mutantes de este capítulo están formadas por dos o cuatro moléculas en la unidad asimétrica, mostrando las mayores diferencias en el lazo n-Src y en los lazos RT y distal. Al comparar las estructuras se observan desplazamientos del lazo distal atribuibles a cambios en la capa de hidratación y el conjunto de enlaces de hidrógeno alrededor del residuo 128. Esta red de enlaces es diferente para cada cadena, lo que se asocia con cambios en la conformación de la cadena

lateral del residuo Leu124 situado en el lazo distal entre los aminoácidos Ser123, Thr125 y Thr126. Este residuo aparentemente juega un papel de interruptor entre las dos conformaciones prevalentes identificadas. De hecho, la mutación de este residuo de leucina a valina en la forma oncogénica de la proteína v-Src, elimina este efecto probablemente debido a que la cadena lateral de la valina es más corta que la de la leucina. De esta manera, en la estructura monomérica de la v-Src con las mutaciones Asp117Asn y Leu124Val solo se encuentra una molécula del dominio en la unidad asimétrica y, además, no se observan cambios conformacionales en el lazo distal (Salinas-García *et al.*, 2021).

Las diferencias observadas entre los lazos de los dominios SH3 se asocian con su mayor flexibilidad, tal y como indican los valores RMSD y de factor B que son en general más altos que el promedio de la estructura. El lazo n-Src es el que presenta una mayor variabilidad conformacional y flexibilidad, lo que en algunos casos imposibilita su total modelado. Ello puede estar relacionado con el papel de este lazo como bisagra que permite la apertura de los monómeros para formar los dímeros entrecruzados en la c-Src, modificando el ángulo diedro de alguno de sus residuos hasta en 100 °. En bibliografía existen numerosos estudios en los que, como en nuestro caso, se han intercambiado secuencias de lazos bisagras entre proteínas que forman dímeros entrecruzados y otras que no los forman, como por ejemplo en la ribonucleasa A (Crestfield *et al.*, 1962; Liu *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 2005; López-Alonso *et al.*, 2010), la onconasa (Esposito *et al.*, 2019) o la monelina (Nandwani *et al.*, 2019). Un caso especial es el de la c-Src-SH3, a la que se le intercambiaron los lazos n-Src y RT por los de la Abl (SA-2X), produciéndose el 3D-DS a través de los dos lazos (Cámara-Artigas *et al.*, 2014). También se ha analizado el efecto de algunas mutaciones puntuales en los lazos bisagra, como por ejemplo en la proteína Grb2-SH2, que sigue formando dímeros entrecruzados a pesar de mutar su residuo Trp121 que es el que se ha determinado ser responsable de la apertura del monómero (Papaioannou *et al.*, 2016; Hosoe *et al.*, 2019); en la FOXP2 (Perumal *et al.*, 2015) o en la gelsolina, que resalta de nuevo la importancia de la flexibilidad a la hora de formar el dímero entrecruzado (Bonì *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, no se ha descrito la formación de dímeros entrecruzados para el dominio SH3 de la Fyn TQ, por tanto, al intercambiar los residuos del lazo n-Src de la c-Src-SH3 por aquellos presentes en el dominio Fyn-SH3, si el condicionante de la formación de los dímeros entrecruzados es debido exclusivamente a este lazo, debería prevenirse la formación del dímero. Sin embargo y al igual que ocurrió con la SA-2X en estudios previos, en el que la introducción

del lazo n-Src de la Abl no cambiaba el comportamiento del dominio en la formación de los dímeros entrecruzados, el lazo n-Src de la Fyn presenta el mismo comportamiento y actúa como lazo bisagra en las quimeras SF-Src y SF-Src-Q128E. Sin embargo, la quimera SF-2X no forma el dímero entrecruzado en las condiciones estudiadas, por lo que es probable que al introducir el lazo RT de la Fyn en la c-Src se produzca una estabilización del monómero. Este resultado pone en evidencia que en la apertura del protómero juegan un papel clave otros elementos de la proteína además del lazo bisagra. En concreto el lazo RT, que es el que se intercambia durante el 3D-DS, siendo además el último elemento que se incorpora al plegamiento del dominio modular. En experimentos de plegamiento realizados con mutantes de la c-Src en los que se ha entrecruzado el lazo RT o los extremos carboxilo y amino terminal se ha observado una ralentización en la etapa de desplegamiento, lo que sugiere que la disociación de los extremos y la apertura del lazo RT son etapas limitantes en el proceso (Grantcharova *et al.*, 2000). Estudios experimentales y de dinámicas moleculares mostraron, además, que las primeras regiones del dominio que se ordenan durante el plegamiento son los tres lazos n-Src, distal y RT (Baker *et al.*, 1999). La lámina formada por el lazo distal y el lazo n-Src contiene los residuos que constituyen el núcleo hidrofóbico de plegamiento del dominio SH3 (Ile110, Ala121 e Ile132). A través de esta lámina- $\beta$  se dan más interacciones estabilizadoras que en otras porciones de la proteína de longitud similar, además de las interacciones con el lazo RT a través de los residuos Phe102, Lys103, Glu106 y Leu108 (Riddle *et al.*, 1999; Northey *et al.*, 2002). Estas interacciones débiles entre el núcleo de plegamiento y el lazo RT y su plegamiento tardío podrían explicar la facilidad de intercambio de este elemento para dar lugar a los dímeros entrecruzados. Por tanto, una estabilización de este lazo podría tener un papel clave en la formación de las estructuras entrecruzadas.

Existen diversos factores que pueden favorecer la apertura del monómero y su posterior entrecruzamiento. La caracterización de la formación de los dímeros en disolución se llevó a cabo mediante medidas de DLS. Como en todo proceso de oligomerización, uno de los factores importantes en el 3D-DS es la concentración (Schlunegger *et al.*, 1997). Así, de forma general, al aumentar la concentración de proteína se favorece la formación de los dímeros entrecruzados. Estudios previos con el dominio c-Src-SH3 con el motivo ATCUN demostraron que a pH 5,0 y a concentraciones de 15 mg/mL el  $R_h$  de la proteína aumentaba desde el valor correspondiente al monómero ( $R_h= 1,8$  nm) hasta el del dímero ( $R_h= 2,4$  nm) (Bacarizo *et al.*, 2014). En nuestro caso, como ya se vio en el capítulo 3 de esta Tesis, el dominio sin el motivo ATCUN presenta

una solubilidad menor por lo que no se puede alcanzar la concentración necesaria a pH 5,0 para poder observar el dímero entrecruzado. Otra consecuencia es que tampoco se observa la formación de fibras amiloides. En estudios previos comprobamos que la adición de 5 % de PEG 300 facilitaba la formación de los dímeros entrecruzados a concentraciones menores. Los experimentos realizados en presencia de este aditivo corroboran también con las proteínas ensayadas en esta Tesis la formación de los dímeros a concentraciones de 5 mg/mL. Al igual que ocurría en estudios previos, a pH 7,0 el  $R_h$  observado es el del monómero esté o no el PEG presente para todas las proteínas estudiadas en este capítulo. Los resultados obtenidos indican que las especies monomérica y dimérica se encuentran en equilibrio en disolución y que este depende de factores como el pH o la presencia de ciertas moléculas en la disolución. Una de estas moléculas es el PEG de baja masa molecular que se intercala en la interfaz del dímero entrecruzado. El papel que juega el PEG en la estabilización del dímero entrecruzado se debe fundamentalmente a la formación de puentes de hidrógeno que no están presentes en la estructura monomérica y a que facilita un empaquetamiento más compacto de la interfaz del dímero, lo que favorece energéticamente su formación. Por otro lado, la presencia de péptidos con secuencias ricas en prolina estabiliza el monómero. Las estructuras de los complejos de las proteínas quimeras y estos péptidos corroboran los estudios previos en los que se proponía que la formación del complejo dominio-péptido estabiliza la forma monomérica de la proteína (Bacarizo *et al.*, 2014; Bacarizo *et al.*, 2015).

El pH también es un factor clave durante el proceso por lo que se deduce la implicación de algún aminoácido sujeto a protonación que es requisito para la estabilización del dímero. Las estructuras resueltas en este capítulo de la forma dimérica de las proteínas muestran que a pH ligeramente ácido (pH 4,0-5,0) ciertos residuos presentes en la interfaz abierta y que son importantes para mantener la integridad del dímero se encuentren protonados, pudiendo formar puentes de hidrógeno tal y como ocurre con los residuos Asp117 de ambas cadenas, que forman un contacto en el que los Trp119 de ambas cadenas están también involucrados. La distancia entre estos aspartatos (3,8-4,2 Å) sugiere que la presencia de una carga negativa sobre ellos desestabilizaría energéticamente al dímero entrecruzado. Por otra parte, la formación de ciertos puentes salinos también puede jugar un papel crítico en la estabilización del oligómero, como por ejemplo el formado por la Arg95 y el Glu115. Esto se pone en evidencia en la estructura del dominio SH3 de la v-Src, la variante oncogénica del virus del sarcoma de Rous (RSV) de pollo. En la v-Src-SH3, la mutación de la Arg95 por el Trp95 hace que se pierdan las

interacciones que forma la Arg95 con el Glu115 en los dímeros entrecruzados de la c-Src, por lo que a pesar de haber cristalizado la proteína a pH ácido y en presencia de PEG 200 la estructura obtenida fue la del monómero. En cambio, el mutante de la v-Src-SH3 Trp95Arg-Ile96Thr cristalizó en la misma condición obteniéndose el dímero entrecruzado (Salinas-García *et al.*, 2021). Así, la Arg95 situada en el lazo RT de la c-Src y de los mutantes estudiados en este trabajo estabiliza el dímero entrecruzado a través de la formación de un puente salino con el Glu115 presente en el lazo n-Src de la cadena generada por simetría y, además, interacciona con la molécula de PEG situada en la interfaz. El Glu115 es importante en las estructuras del dímero entrecruzado, ya que además de este puente salino el residuo forma a través de su cadena lateral enlaces de hidrógeno que no se observan en las estructuras monoméricas con los aminoácidos Arg95 (NH1/NH2), Trp119 (NE), His122 (NE2) y Tyr131 (OH). El residuo glutamato presente en dicha posición en el lazo n-Src de la Fyn también ha establecido esos enlaces en las quimeras SF-Src y SF-Src-Q128E, por lo que la formación del dímero no se ve afectada.

En otros dímeros entrecruzados del dominio SH3 el pH también es un factor crítico. En la CRKL y en la p47<sup>phox</sup> el 3D-DS tiene lugar también a pH ácido, siendo los lazos RT y distal, respectivamente, los que actúan como bisagra (Groemping *et al.*, 2003; Yuzawa *et al.*, 2004; Harkiolaki *et al.*, 2006). Sin embargo, la Eps8 (Kishan *et al.*, 2008), es monomérica a pH ácido cuando los glutámicos están protonados. Esta dependencia con el pH se relaciona con la distribución de cargas de la proteína. El dominio SH3 de la Eps8, en cambio, no presenta puentes salinos entre las dos cadenas del dímero entrecruzado, pero sí que tiene cuatro puentes salinos intramoleculares que estabilizan la estructura.

Por último, la carga presente en la posición 128 también es importante ya que en la c-Src las alteraciones de las cargas electrostáticas entre el residuo 128 y el Glu106 (situados a una distancia de  $\sim 7$  Å) podrían influir en la apertura del monómero y en la posterior estabilización del dímero entrecruzado (Bacarizo *et al.*, 2014). Existen varios estudios que sugieren que el 3D-DS puede verse favorecido al introducir mutaciones cerca de los lazos bisagra o en zonas críticas de la proteína. Un ejemplo, el dominio B1 de la proteína L donde se estudió la mutación de un residuo en un giro- $\beta$  de la proteína, lo que perturbaba el núcleo hidrofóbico y detonaba en el 3D-DS (O'Neill *et al.*, 2001). Por este motivo, se incluyeron en este estudio varios mutantes en el lazo distal, pero en general dichas mutaciones no han afectado a la capacidad de la c-Src para formar el dímero entrecruzado, ya que se siguen manteniendo el resto de las

interacciones características de la interfaz abierta que estabilizan al dímero, pero sí se ha demostrado que afectan notablemente a la estabilidad del dominio. Esto es debido fundamentalmente a la red de enlaces de hidrógeno que se establece entre los residuos próximos a la Ser123 y la atmósfera de hidratación en torno a los mismos y por este motivo, los mutantes más inestables de toda la Tesis han sido la Src-S123T y la Src-T126S, ya que las interacciones que se producen entre la Ser123 y los residuos en la posición 125 y 126 son características del sitio de nucleación de estos dominios SH3, al igual que el enlace a través de la cadena lateral de la Ser123 con el Glu106.





## **Capítulo 5**

Propiedades biofísicas y estructurales de las quimeras  
y mutantes de la Fyn-SH3 tirosina quinasa



En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en la caracterización biofísica y estructural de las quimeras Fyn-Src, en las que se ha introducido el lazo RT, n-Src y ambos, de la c-Src en la Fyn-SH3. Al igual que en el caso del dominio SH3 de la c-Src, también se ha estudiado el mutante en el lazo distal que sustituye el residuo Glu129Gln, que está presente en la secuencia del dominio c-Src-SH3. En la Figura 80 se muestran las secuencias de cada una de las proteínas.

	... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
	90 100 110 120 130 140
<b>c-Src-SH3</b>	GVTTFVALY DYESRTETDL SFKKGERLQI VNNTEGDWWL AHSLTTGQTG YIPSNYVAPS D
<b>Fyn-SH3</b>	GVTTFVALY DYEARTEDDL SFHKGEKFQI LNSSEGDWWE ARSLTTGETG YIPSNYVAPV D
<b>Fyn-E129Q</b>	GVTTFVALY DYEARTEDDL SFHKGEKFQI LNSSEGDWWE ARSLTTGQTG YIPSNYVAPV D
<b>FS-Src</b>	GVTTFVALY DYEARTEDDL SFHKGEKFQI VNNTEGDWWE ARSLTTGETG YIPSNYVAPV D
<b>FS-Src-LAH</b>	GVTTFVALY DYEARTEDDL SFHKGEKFQI VNNTEGDWWL AHSLTTGETG YIPSNYVAPV D
<b>FS-Src-E129Q</b>	GVTTFVALY DYEARTEDDL SFHKGEKFQI VNNTEGDWWE ARSLTTGQTG YIPSNYVAPV D
<b>FS-RT</b>	GVTTFVALY DYESRTETDL SFHKGEKFQI LNSSEGDWWE ARSLTTGETG YIPSNYVAPV D
<b>FS-2X</b>	GVTTFVALY DYESRTETDL SFHKGEKFQI VNNTEGDWWE ARSLTTGETG YIPSNYVAPV D

Figura 80. Secuencias de las proteínas del dominio SH3. La secuencia de la c-Src-SH3 se muestra en color azul y la de la Fyn-SH3 en color rojo. Las mutaciones puntuales se muestran en color verde. La numeración de referencia utilizada es la de la c-Src-SH3.

## 5.1 Expresión y purificación de las quimeras y mutantes de la Fyn-SH3

Todas las proteínas fueron clonadas con el vector de expresión pHTP1 con resistencia a kanamicina y con un sitio de corte de la etiqueta de histidinas para la proteasa TEV. En la Tabla 21 se muestran las temperaturas de inducción optimizadas y un valor promedio del rendimiento de las purificaciones realizadas.

Tabla 21. Temperaturas de inducción y rendimiento obtenido de cada proteína

Proteína	T de inducción (°C)	Rendimiento (mg por L de cultivo)
Fyn WT	37,0	50±7
Fyn-E129Q	37,0	62±10
FS-Src	37,0	50±4
FS-Src-E129Q	22,0	50±4
FS-Src-LAH	37,0	85±6
FS-2X	37,0	63±7
FS-RT	37,0	82±4

Durante el proceso de purificación se realizaron electroforesis para comprobar la presencia de la proteína y su pureza. La Figura 81 muestra el proceso de purificación antes y después del corte con la proteasa TEV.

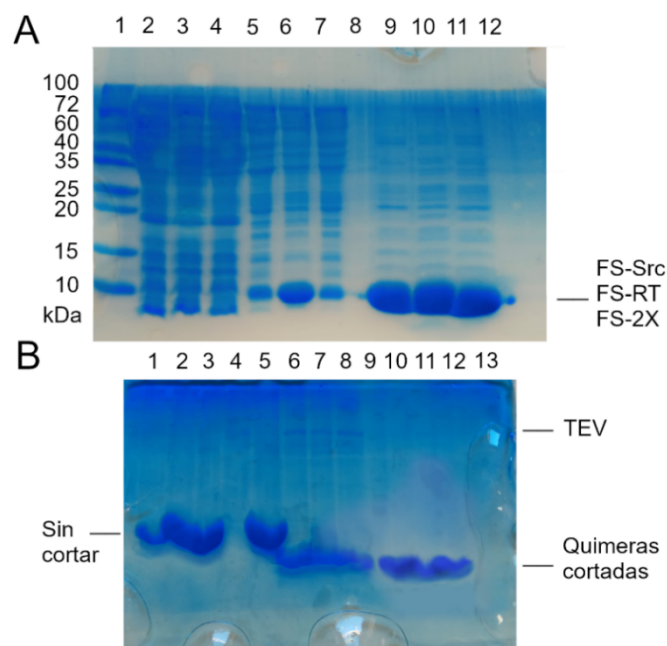


Figura 81. (A) PAGE-SDS de las purificaciones de las quimeras FS-Src, FS-RT y FS-2X antes del corte con TEV. En la calle 1 se puede observar el patrón; en las calles 2, 3 y 4 se muestra la fracción saliente de la columna de afinidad al pasar el sobrenadante tras centrifugar; en las calles 5, 6 y 7 los lavados con TEC + imidazol 20 mM y en las calles 9, 10 y 11 las eluciones con TEC + 250 mM de imidazol que se corresponden con las proteínas FS-Src, FS-RT y FS-2X, respectivamente. (B) PAGE-SDS tras el corte con TEV. En las calles 1, 2 y 3 se pueden observar las proteínas FS-Src, FS-RT y FS-2X, respectivamente, antes del corte. En la calle 5, la c-Src-SH3 pura que se utilizó como patrón. En las calles 6, 7 y 8 se observan las proteínas ya cortadas y además la banda de TEV sobre los 30 kDa y en las calles 10, 11 y 12, las proteínas FS-Src, FS-RT y FS-2X, respectivamente, tras pasar por columna de cromatografía de Ni<sup>2+</sup>-NTA y eliminar la TEV.

En todos los casos, se realizó un último paso de purificación usando una columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 con un equipo FPLC para eliminar posibles impurezas y agregados. Las proteínas puras se alicuotaron en fracciones de 1 mL a una concentración de 1 mg/mL en tubos Eppendorf en el tampón fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 8,0, cloruro sódico 350 mM y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

## 5.2 Solubilidad de las proteínas

En la Tabla 22 se recogen los límites de solubilidad obtenidos a pH 5,0 en tampón acetato sódico/ácido acético 50 mM y a pH 7,0 en tampón fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM para cada proteína.

Al igual que en el dominio SH3 de la c-Src, el dominio Fyn-SH3 y sus quimeras son más solubles a pH 7,0, alcanzando un máximo de aproximadamente 25 mg/mL. En general, los límites de solubilidad de los dominios SH3 de la Fyn son mayores comparados con la c-Src. El

coeficiente de extinción molar se determinó a partir de la pendiente de la recta obtenida al representar los valores de absorbancia frente a la proteína pesada en cada pH, tal y como se muestra en la Figura 82. A partir del valor medio obtenido de las pendientes se determinaron los coeficientes de extinción molar:  $\epsilon_{280}=17,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{280}=16,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para pH 5,0 y 7,0, respectivamente, que es equivalente al calculado con la herramienta ProtParam ExPASy  $\epsilon_{280}=16,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Gasteiger *et al.*, 2005).

Tabla 22. Solubilidad de los dominios SH3 de la Fyn TQ y mutantes a pH 5,0 y 7,0

Proteína	Límite de solubilidad (mg/mL)	
	pH 5,0	pH 7,0
Fyn WT	21,7	25,2
Fyn-E129Q	21,0	24,8
FS-Src	21,4	25,1
FS-Src-E129Q	22,1	24,9
FS-Src-LAH	22,8	24,1
FS-2X	20,7	23,5
FS-RT	20,0	23,1

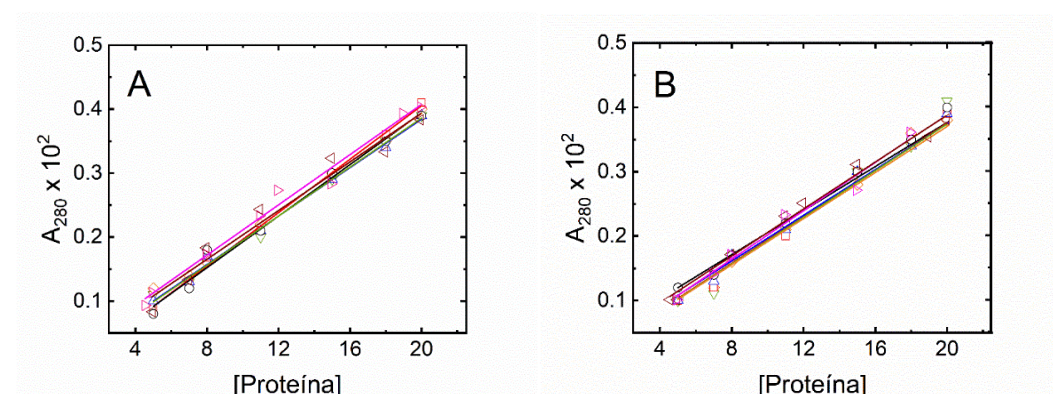


Figura 82. Representación de la absorbancia frente a la cantidad de proteína pesada de las quimeras de la Fyn-SH3: Fyn WT (magenta), Fyn-E129Q (marrón), FS-Src (azul), FS-Src-E129Q (negro), FS-Src-LAH (naranja), FS-RT (verde) y FS-2X (rojo) a pH 5,0 (A) y 7,0 (B).

### 5.3 Estabilidad con el pH de los mutantes del dominio SH3 de la Fyn

Las curvas de la estabilidad frente al pH obtenidas presentan una doble sigmoide y una meseta que se corresponde con el rango de pH donde la proteína es estable y se encuentra plegada. A partir del punto de inflexión de las sigmoides a pH ácido y básico determinamos el  $pK_a$  aparente de plegamiento para cada una de las proteínas. La Figura 83 muestra las curvas obtenidas al representar la intensidad de fluorescencia frente al pH y en la Tabla 23 se recogen los valores de  $pK_a$ .

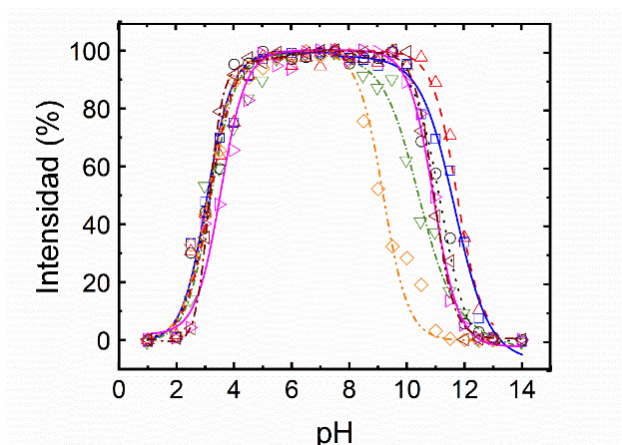


Figura 83. Estabilidad vs. pH de las quimeras de la Fyn-SH3: Fyn WT (magenta, —▷—), Fyn-E129Q (marrón, --◁--), FS-Src (verde, --▽--), FS-Src-E129Q (naranja, ---◇---), FS-Src-LAH (azul, —□—), FS-RT (rojo, ---Δ---) y FS-2X (negro, ⋯○⋯). Las curvas ajustadas a la Ec. 8 se muestran como líneas.

Tabla 23. Valores del  $pK_a$  de desplegamiento ácido y básico

Proteína	Número de grupos ionizables							
	$pK_a$ (ácido)	$pK_a$ (básico)	Asp	Glu	His	Tyr	Lys	Arg
Fyn WT	3,5±0,1	10,9±0,1	5	6	1	4	2	2
Fyn-E129Q	3,2±0,1	10,9±0,1	5	5	1	4	2	2
FS-Src	3,1±0,1	10,4±0,2	5	6	1	4	2	2
FS-Src-E129Q	3,2±0,1	9,2±0,2	5	5	1	4	2	1
FS-Src-LAH	3,1±0,1	11,4±0,2	5	5	2	4	2	1
FS-2X	3,2±0,1	11,1±0,1	4	6	1	4	2	2
FS-RT	3,3±0,1	11,8±0,1	5	5	1	4	2	1

El valor del  $pK_a$  aparente obtenido en la transición ácida sugiere que estas son debidas fundamentalmente a la protonación de los residuos aspártico ( $pK_a=3,65$ ) y, con una contribución menor, de los residuos glutámico ( $pK_a=4,25$ ), mientras que las transiciones observadas a pH básico se deben principalmente a la protonación de las cadenas laterales de la tirosina ( $pK_a=10,07$ ) o lisina ( $pK_a=10,53$ ). Todas las proteínas presentan un intervalo de estabilidad de pH bastante amplio, entre 4,0 y 11,0, exceptuando la FS-Src-E129Q que presenta un intervalo más estrecho de pH y se desnatura por encima de pH 8,0. En esta proteína además del intercambio del lazo n-Src de la Fyn-SH3 por el de la c-Src-SH3, se ha introducido la mutación puntual Glu129Gln. Comparando este mutante con la Fyn-E129Q, la cual no presenta grandes diferencias al compararla con la Fyn-SH3, es de esperar algún efecto sinérgico entre la mutación puntual en el sitio de nucleación de la proteína y el lazo n-Src del dominio c-Src-SH3 que reduce su intervalo de estabilidad en la zona básica.

En la zona ácida la proteína WT es la que presenta un mayor valor de  $pK_a$  aparente, lo que señala una ligera desestabilización introducida probablemente por el residuo glutámico en el sitio de nucleación. Este efecto ya se observaba en los mutantes puntuales del residuo 128 en el dominio c-Src-SH3 (Bacarizo *et al.*, 2014).

## 5.4 Desnaturalización química con cloruro de guanidinio

La Figura 84 muestra las curvas de desnaturalización obtenidas tanto a pH 5,0 (acetato sódico/ácido acético) como a pH 7,0 (fosfato monosódico/fosfato disódico). En la Tabla 24 se recogen los valores de  $m_{1/2}$  y de  $\Delta G_w$  para cada una de las quimeras de la Fyn-SH3 a 25 °C.

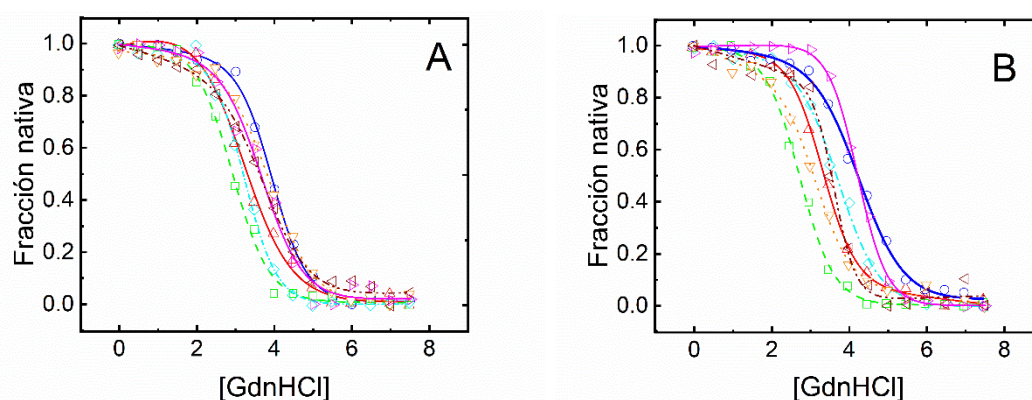


Figura 84. Fracción de la proteína nativa de las quimeras de la Fyn-SH3: Fyn WT (magenta, —▷—), Fyn-E129Q (marrón, --◁--), FS-Src (cian, ---◇---), FS-Src-E129Q (naranja, ⋯▽⋯), FS-Src-LAH (azul, —○—), FS-RT (rojo, —△—), FS-2X (verde, ---□---), frente a concentración de cloruro de guanidinio tanto a pH 5,0 (A) como a pH 7,0 (B).

Tabla 24. Parámetros termodinámicos obtenidos de las curvas de desnaturalización a 25 °C

	$m_{1/2}$ (M)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)	$m_{1/2}$ (M)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)
pH	5,0		7,0	
<b>Fyn-SH3</b>	3,41	17,0±1,0	4,26	26,8±1,0
<b>Fyn-E129Q</b>	3,38	16,3±1,0	3,80	20,3±1,0
<b>FS-Src</b>	3,50	21,1±1,0	3,84	28,2±1,5
<b>FS-Src-E129Q</b>	3,36	20,2±0,9	3,69	20,8±0,9
<b>FS-Src-LAH</b>	3,53	23,7±2,0	4,10	29,6±1,0
<b>FS-2X</b>	2,56	12,1±1,0	2,96	17,5±2,0
<b>FS-RT</b>	3,29	16,5±1,0	3,72	21,2±1,0

En general todas las proteínas estudiadas son más estables a pH neutro, excepto en el caso de la FS-Src-E129Q que no hay diferencias a ambos pHs. A pH 7,0, la Fyn-SH3, FS-Src y FS-Src-LAH son las que poseen un mayor valor de  $\Delta G_w$  y por tanto mayor estabilidad y, además,

las proteínas con la mutación Glu129Gln presentan valores de  $\Delta G_w$  parecidos, siendo más inestables que la Fyn WT probablemente debido a cambios en la electrostática del lazo distal (Bacarizo *et al.*, 2014). Cabe destacar que la quimera que presenta los dos lazos intercambiados, FS-2X, se caracteriza por ser la más inestable de todo el grupo, tanto a pH 5,0 como a pH 7,0.

## 5.5 Desnaturalización térmica de los mutantes de la Fyn-SH3 WT

Las curvas de la desnaturalización térmica de las proteínas se obtuvieron mediante CD, representando la variación de la elipticidad obtenida a 222 nm frente a la temperatura tanto en acetato sódico/ácido acético 10 mM pH 5,0 como en fosfato monosódico/fosfato disódico 10 mM pH 7,0. Las curvas de desnaturalización están representadas en la Figura 85. Los parámetros termodinámicos obtenidos  $\Delta H_m$ ,  $\Delta C_p$  y  $T_m$  se muestran en la Tabla 25.

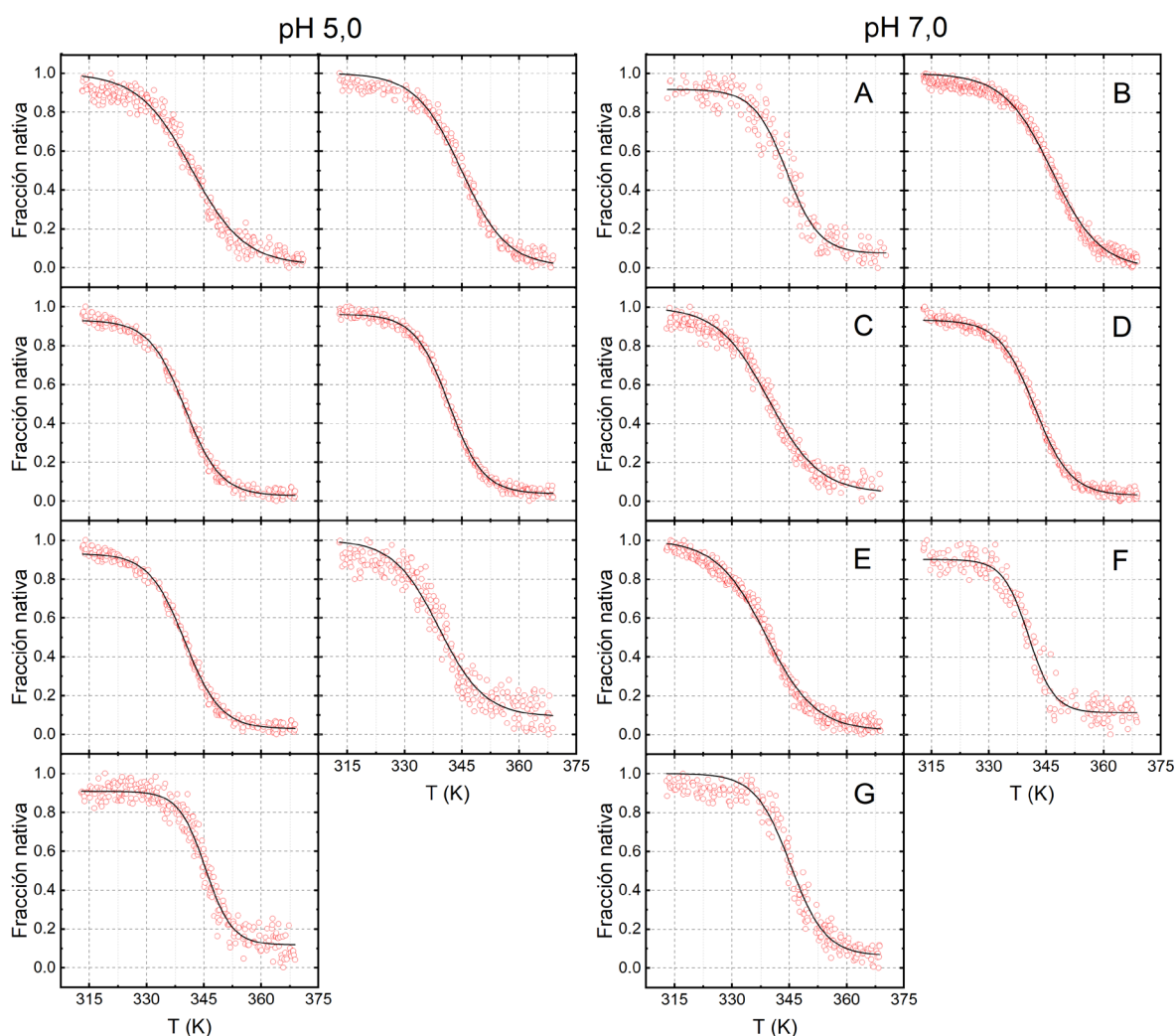


Figura 85. Fracción de la proteína nativa de las quimeras de la Fyn-SH3 (A), Fyn-E129Q (B), FS-Src (C), FS-Src-LAH (D), FS-Src-E129Q (E), FS-2X (F) y FS-RT (G) a pH 5,0 y 7,0.



Tabla 25. Parámetros termodinámicos y valores de  $T_m$  obtenidos para cada una de las proteínas a pH 5,0 y 7,0

Proteína	pH 5,0			pH 7,0		
	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/molK)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/molK)
<b>Fyn-SH3</b>	72,6±0,4	395,23±12,00	3,3±0,2	72,1±0,4	421,46±31,00	3,3±0,2
<b>Fyn-E129Q</b>	73,9±0,4	402,66±21,00	3,1±0,2	74,8±0,2	430,56±12,00	2,3±0,3
<b>FS-Src</b>	68,0±0,5	299,41±27,00	2,1±0,3	69,4±0,1	310,75±12,00	2,2±0,4
<b>FS-Src-LAH</b>	71,6±0,2	389,00±13,00	3,2±0,1	72,4±0,2	451,22±20,00	3,3±0,3
<b>FS-Src-E129Q</b>	67,5±0,2	293,32±17,00	2,1±0,2	67,9±0,6	301,24±22,00	2,3±0,4
<b>FS-2X</b>	70,2±0,1	374,64±42,00	3,1±0,2	72,1±0,5	419,39±21,00	3,2±0,2
<b>FS-RT</b>	73,8±0,2	400,23±21,00	3,3±0,2	75,1±0,5	429,83±23,00	3,4±0,2

En la mayoría de los casos, no hay diferencias notables en la temperatura media de desnaturalización a los dos pHs estudiados, siendo las más estables térmicamente el mutante Fyn-E129Q y la quimera FS-RT a ambos pHs. Todas las proteínas son reversibles prácticamente al 100%, excepto las proteínas Fyn-E129Q y FS-Src-E129Q.

## 5.6 Caracterización del estado de oligomerización de los mutantes de la Fyn-SH3

El dominio SH3 de la Fyn TQ forma dímeros en disolución en presencia de metales divalentes como el  $\text{Cu}^{2+}$  o el  $\text{Zn}^{2+}$  con un valor de  $R_h$  de 2,4-2,5 nm (Martin-García *et al.*, 2012). Para evitar agregados por la presencia de iones metálicos, la proteína se trató con EDTA 1 mM antes de proceder a las medidas de DLS. En la Tabla 26 se muestran los valores promedio de diez medidas obtenidos para el  $R_h$  de cada una de las proteínas tanto en acetato sódico/ácido acético pH 5,0 como en fosfato monosódico/fosfato disódico pH 7,0. Las concentraciones de proteína variaron de 5 a 20 mg/mL para ambos pHs exceptuando en las quimeras FS-RT y FS-2X, que se midieron hasta 15 mg/mL a pH 5,0.

En el dominio SH3 de la c-Src, la formación del dímero entrecruzado se veía favorecida por la adición de PEGs de bajo peso molecular a pH ácido. Por tanto, se añadió un 5 % de PEG 300 a ambos pHs para comprobar si se afectaba el  $R_h$  del dominio SH3 de la Fyn. La concentración de proteína final que se utilizó fue de 5 mg/mL en todos los casos. Los resultados de la tabla muestran que la adición de un 5 % de PEG 300 facilita la formación del dímero en la disolución a pH 5,0, mientras que no afecta en general al estado de oligomerización a pH 7,0.

Tabla 26. Valores de  $R_h$  (nm) a pH 5,0 y 7,0 en presencia y ausencia de PEG 300 5%




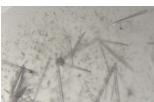

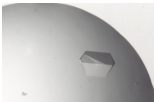


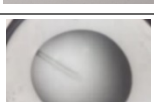
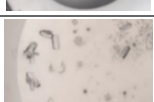
pH	$R_h$ (nm)					
	5,0		7,0		5,0	7,0
	+ 5%PEG300					
Proteína (mg/mL)	5	20	5	20	5	5
Fyn WT	2,08±0,04	2,07±0,05	1,97±0,04	2,04±0,04	2,38±0,06	1,94±0,06
Fyn-E129Q	1,76±0,04	1,83±0,06	1,80±0,05	1,77±0,06	2,44±0,26	2,03±0,01
FS-Src	1,86±0,04	2,10±0,07	1,90±0,03	2,00±0,05	2,32±0,01	1,79±0,06
FS-Src- E129Q	2,02±0,04	2,10±0,07	1,87±0,05	1,95±0,05	2,38±0,06	1,76±0,06
FS-Src-LAH	1,63±0,06	2,20±0,06	1,59±0,04	2,10±0,06	2,63±0,07	1,62±0,02
FS-2X	1,82±0,09	1,84±0,05	1,50±0,04	1,93±0,06	2,32±0,06	1,91±0,06
FS-RT	1,84±0,06	1,89±0,02	1,65±0,04	2,10±0,06	2,42±0,04	1,77±0,02

La comparación de los valores de los  $R_h$  obtenidos con los característicos de la c-Src-SH3 indican que este dominio y sus diferentes variantes están presentes en la disolución preferentemente en su forma monomérica en el intervalo de concentraciones ensayado. A pesar de que a pH 5,0 y en presencia de PEG 300 se obtiene un radio equivalente al del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3, hasta la fecha no hemos logrado corroborar la presencia de la formación de un oligómero entrecruzado con datos estructurales. A pesar de ello, no podemos descartar la posibilidad de que el dímero en disolución sea el entrecruzado.

## 5.7 Cristalización y determinación estructural de los mutantes de la Fyn-SH3

Las condiciones de cristalización de las diferentes proteínas se obtuvieron mediante experimentos de cribado utilizando las disoluciones comerciales indicadas en Materiales y métodos. En todos los casos, la concentración de proteína utilizada fue 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM a pH 8,0 y se utilizó la técnica de difusión en el vapor en gota sentada. En la Tabla 27 se muestran las condiciones de cristalización para cada una de las proteínas. Para la resolución estructural de las quimeras de la Fyn-SH3 y el mutante Fyn-E129Q, se calcularon las fases mediante reemplazamiento molecular utilizando como modelo la cadena A de la estructura de la Fyn-SH3 (PDB: 3UA6) en el programa *Phaser* dentro de la plataforma de Phenix. El modelo final, al igual que en otros casos, se obtuvo realizando distintos ciclos de refinado y modelado manual utilizando Coot, añadiendo las moléculas de agua cuando los factores R eran inferiores al 30 %. Las coordenadas finales se validaron en la aplicación web del Protein Data Bank (*Validation Server*) y a continuación se depositaron en el PDB para cada una de las estructuras.

Tabla 27. Condiciones de cristalización las proteínas del dominio SH3 de la Fyn

<b>Imagen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Condición</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Técnica</b>
	<b>Fyn WT</b>	Formiato sódico 4,0 M, Hepes 0,1 M pH 7,5	15	Difusión en el vapor
	<b>Fyn-E129Q</b>	Formiato sódico 3,5 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 4,0	25	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src</b>	Sulfato amónico 2,0 M, citrato sódico/ácido cítrico 0,1 M pH 3,0	15	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src-E129Q</b>	Sulfato amónico 1,5 M, de acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 4,0	15	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src-LAH</b>	Sulfato amónico 1,0 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 4,0	25	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src-LAH</b>	Sulfato amónico 2,0 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 5,0	25	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src-LAH</b>	Sulfato amónico 1,5 M, MES 0,1 M pH 6,0	25	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src-LAH</b>	Sulfato amónico 2,0 M, citrato sódico/ácido cítrico 0,1 M pH 3,0, PEG 300 5%	25	Difusión en el vapor
	<b>FS-Src-LAH VSL12</b>	Sulfato amónico 2,0 M, acetato sódico/ácido acético 0,1 M pH 4,0	25	Difusión en el vapor
	<b>FS-RT</b>	Formiato sódico 4,0 M, acetato sódico pH 4,0	25	Difusión en el vapor

### 5.7.1 Estructura de la Fyn-SH3 WT

La estructura de la Fyn-SH3 se obtuvo a partir de cristales formados en formiato sódico 1,5 M y pH 7,5 y los datos se procesaron inicialmente en el grupo espacial  $C2_1$ . Sin embargo, los valores de factor R de esta estructura eran inusualmente altos a pesar de la calidad de los datos, por lo que se llevó a cabo el procesado de las imágenes integrándolas en el grupo espacial  $P1$  para analizar si estos altos valores obtenidos eran consecuencia de las diferencias locales debido a que las moléculas presentes en la unidad asimétrica no eran exactamente iguales. De esta manera, las estructuras analizadas del dominio SH3 de la Fyn fueron las siguientes:

- *Estructura en el grupo espacial C2<sub>1</sub>*. Los parámetros de celdilla fueron a=73,0 Å, b=46,7 Å, c=42,8 Å,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=97,8^\circ$  y dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A2J).
- *Estructura en el grupo espacial P1*. Con parámetros de celdilla a=42,8 Å, b=43,3 Å, c=43,3 Å,  $\alpha=65,3^\circ$ ,  $\beta=83,4^\circ$  y  $\gamma=83,4^\circ$  y cuatro moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A2K).

En la Figura 86 se muestra la superposición de las distintas cadenas de la Fyn-SH3 para cada una de las estructuras y las estadísticas de estas se encuentran en la Tabla 2 del Apéndice 3.

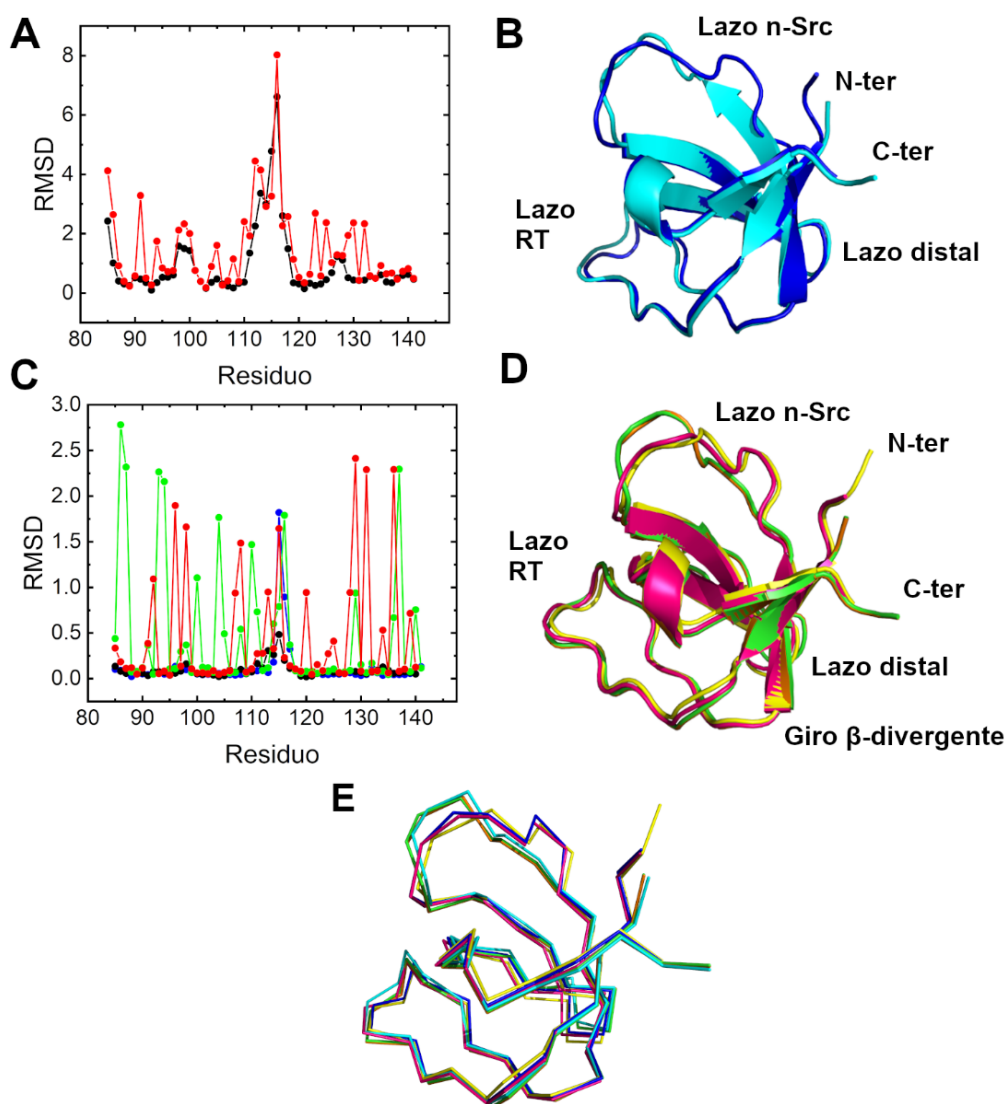


Figura 86. (A) RMSD de los residuos de la cadena principal (negro) y las cadenas laterales (rojo) obtenido al superponer las cadenas A y B, con un valor medio de 1,18 Å. (B) Estructura de la Fyn-SH3 a pH 7,5 (PDB: 7A2J). Las dos cadenas de la unidad asimétrica se muestran en azul (cadena A) y cian (cadena B). (C) RMSD de las cuatro cadenas de la Fyn-SH3 para la cadena principal y las cadenas laterales de las moléculas A y B (negro y rojo) y C y D (azul y verde). El valor de la desviación es de 1,02 Å. (D) Representación de la Fyn a pH 7,5 (PDB: 7A2K). Las cuatro cadenas de la unidad asimétrica se muestran en naranja (cadena A), verde (cadena B), amarillo (cadena C) y magenta (cadena D). (E) Superposición de todas las cadenas de ambas estructuras.

Al comparar las distintas cadenas la mayor variabilidad conformacional se encuentra en los lazos, especialmente en la estructura monoclinica. Además, en la estructura procesada en el triclinico se observa de nuevo la presencia de dos especies distintas, ya que las cadenas A y C son equivalentes, pero distintas de las B y D. Las regiones más flexibles se corresponden con los lazos y además se puede observar la diferencia que existe entre las cadenas, que alternan la flexibilidad entre el lazo RT y distal (Figura 87). Los residuos Asn113, Ser114, Ser115 y Glu116 de la cadena B de la estructura en el grupo  $C2_1$  se han modelado con las cadenas laterales truncadas por la falta de densidad electrónica en los mapas de diferencia.

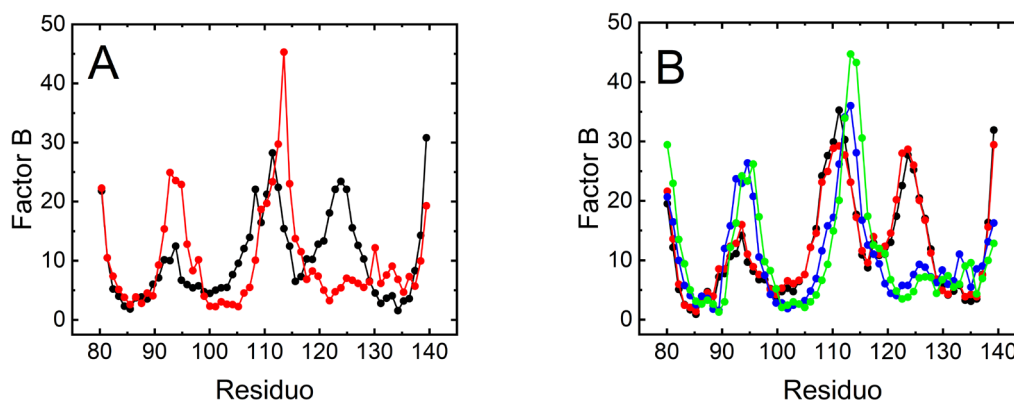


Figura 87. (A) Factores B para los residuos de la estructura de la Fyn en el grupo espacial  $C2_1$ . La cadena A se muestra en negro y la B en rojo. (B) Factores B para los residuos de la estructura en el grupo espacial  $P1$ . La cadena A se muestra en negro, la B en rojo, la C en azul y la D en verde.

Entre las diversas moléculas de la misma unidad asimétrica existen cambios en la disposición de las cadenas laterales de algunos residuos aromáticos, lo que muestra la plasticidad del sitio de unión. Así, el Trp119 forma una interacción catión- $\pi$  entre el anillo aromático y el grupo guanidino de la Arg123. Sin embargo, esta interacción no se observa en las cadenas que interaccionan con la molécula que se genera por simetría (Figura 88). El contacto intermolecular de la Arg123 es interesante puesto que su unión a través de puentes de hidrógeno/salino con el Asp100 imita el enlace presente en las estructuras del complejo de este dominio con péptidos ricos en prolina.

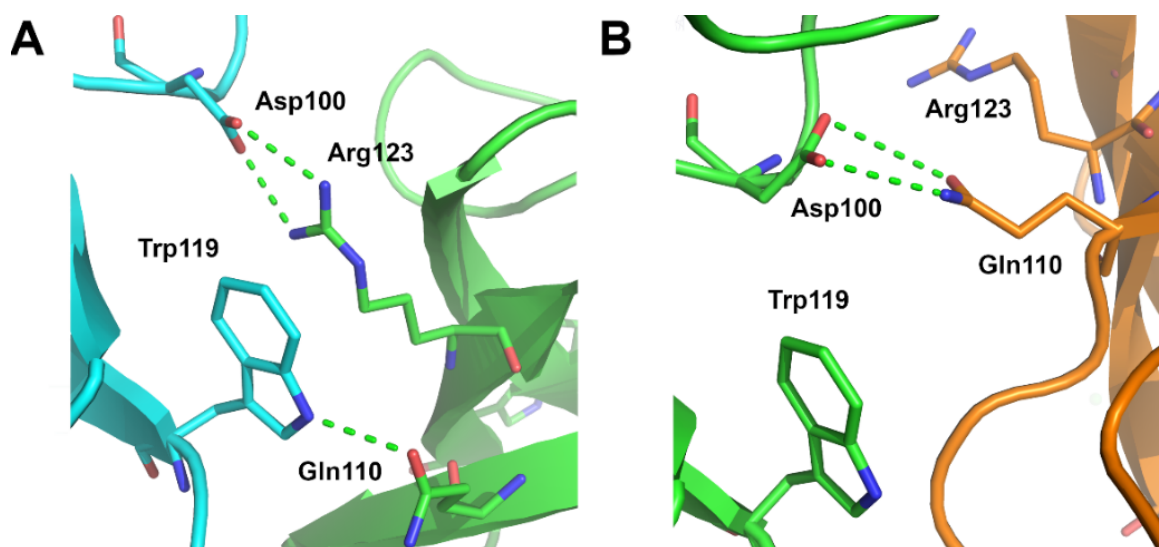


Figura 88. (A) Contacto entre las cadenas A ( $C2_1$ ), A/B ( $P1$ ) (verde) y B ( $C2_1$ ), C/D ( $P1$ ) (cian). El Trp119 (NE1) forma un puente de hidrógeno (verde) con el residuo Gln110 (OE1). La Arg123 (NH1/NH2), forma puentes de hidrógeno/salino con el Asp100 (OD1/OD2). (B) Contacto entre las cadenas A ( $C2_1$ ), A y B ( $P1$ ) (verde) y las cadenas generadas por simetría (naranja). Se pierde la interacción con la Arg123 y el Asp100 se enlaza con la Gln110 (NE2/OE1).

En ambas estructuras existen diferencias en el lazo distal que provocan una pequeña variación en los puentes de hidrógeno que involucran a los residuos presentes en el sitio de nucleación (Figura 89).

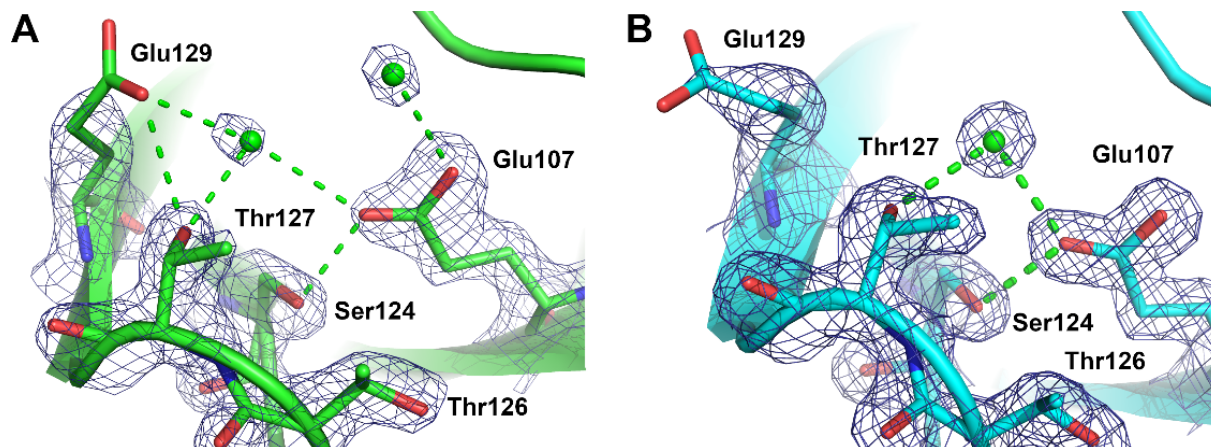


Figura 89. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  del sitio de nucleación. Se muestran las diferencias en los puentes de hidrógeno (verde) asociados al residuo Glu129 de las cadenas (A) A de la estructura monoclinica y B/D de la triclínica; y de las cadenas (B) B de la estructura monoclinica y A/C de la triclínica.

Además, la alta resolución y calidad de los datos nos ha permitido modelar un ion sodio unido a los residuos de la hélice  $3_{10}$  (Figura 90). Este sodio se ha modelado teniendo en cuenta los criterios de distancia y coordinación.

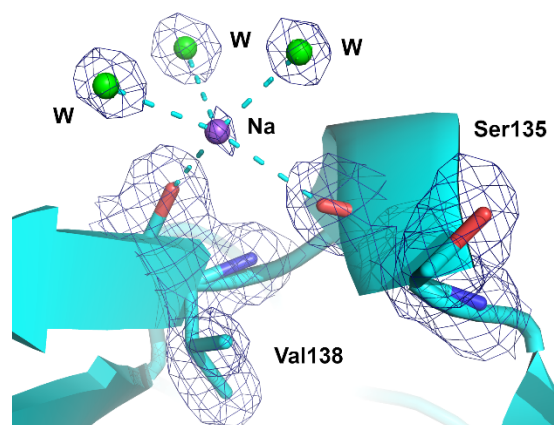


Figura 90. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a  $1.5 \sigma$  de la interacción entre los residuos Ser135 y Val138 con el sodio. El metal se muestra en color morado, las moléculas de agua en verde y los aminoácidos como bastones en color cian.

Al indexar los datos en el grupo espacial  $P1$ , los valores R de la estructura no cambiaron sustancialmente. En el grupo  $C2_1$  los valores tras el refinado fueron 0,212 y 0,246, mientras que en el grupo  $P1$  fueron solo ligeramente menores 0,201 y 0,235.

### 5.7.2 Estructura del mutante Fyn-E129Q

Este mutante se diseñó teniendo en cuenta que estudios previos con el dominio SH3 de la c-Src demostraron que la naturaleza del residuo en la posición 128 afecta a la estabilidad de la proteína (Bacarizo *et al.*, 2014). Se obtuvo la siguiente estructura cuyas estadísticas de refinado se muestran en la Tabla 3 del Apéndice 3.

- *Estructura del monómero a pH 4,0.* Los cristales crecieron en formiato sódico 3,5 M, utilizando acetato sódico 0,1 M como tampón, en el grupo espacial  $C2_1$  con parámetros de celdilla  $a=73,6 \text{ \AA}$ ,  $b=45,9 \text{ \AA}$ ,  $c=42,9 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=97,1^\circ$  y dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A2L), muy similares a los valores obtenidos para la estructura de la Fyn-SH3.

En la Figura 91 se muestra la superposición de las cadenas A y B del mutante Fyn-E129Q con la cadena A de la Fyn-SH3 y en la Figura 92 el gráfico asociado a los factores B. En este caso, al igual que ocurre con la Fyn-SH3, las cadenas A y B de la Fyn-E129Q presentan una conformación distinta, observándose mayores diferencias en los residuos Ser115 y Glu116 del lazo n-Src, además, sus cadenas laterales no están modeladas en la cadena B debido a la falta de densidad electrónica en los mapas de diferencia. También se observan diferencias en el lazo RT y en los extremos amino y carboxilo terminal.

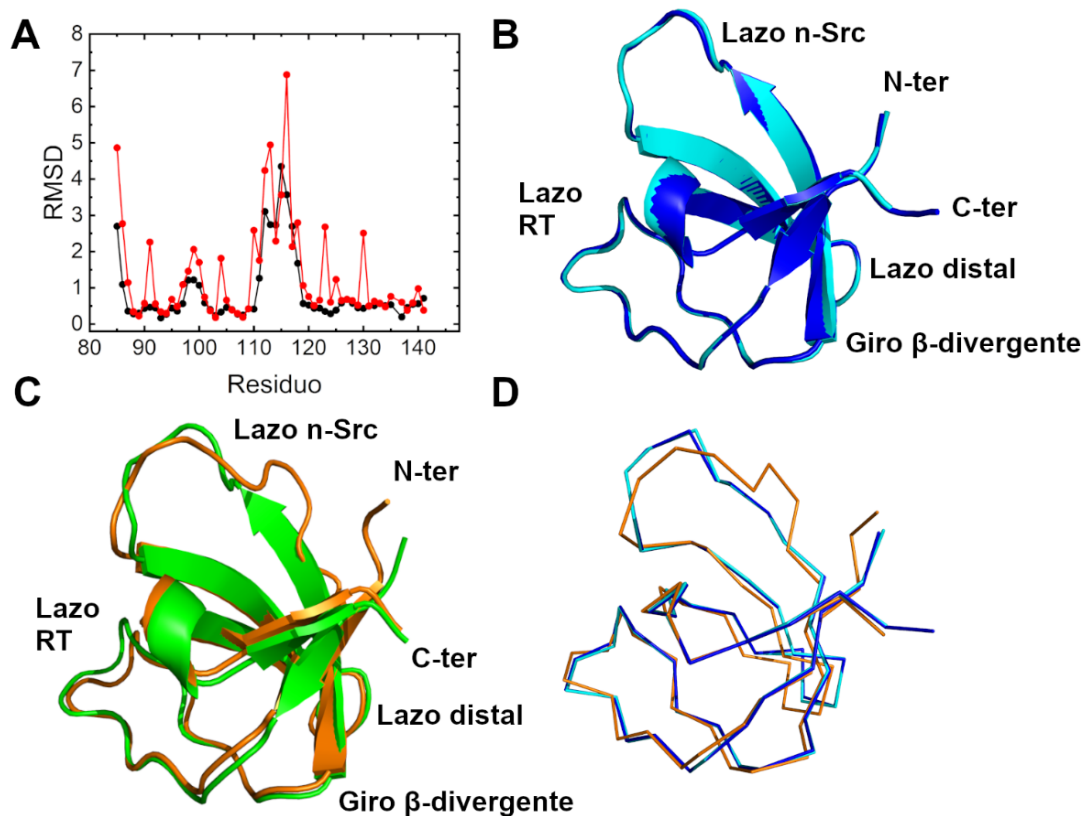


Figura 91. (A) RMSD para las cadenas presentes en la unidad asimétrica de la Fyn-E129Q. En negro se muestra la cadena principal y en rojo las cadenas laterales. (B) Superposición de la cadena A de la Fyn-SH3 (PDB: 7A2J) cristalizada a pH 7,5 (cian) con la cadena A de la Fyn-E129Q (azul). En este caso no se observan diferencias destacables entre ambas proteínas, siendo el valor de RMSD de 0,16 Å. (C) Superposición de la cadena A de la Fyn-SH3 (verde) con la cadena B de la Fyn-E129Q (naranja). (D) Superposición de la cadena A de la Fyn (cian) con las cadenas A y B (azul y naranja) de la Fyn-E129Q.

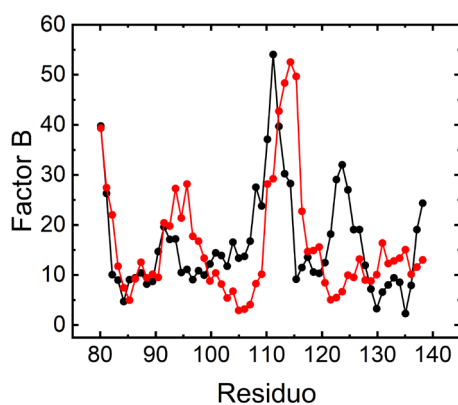


Figura 92. Factores B para cada uno de los residuos de la estructura de la Fyn-E129Q (PDB: 7A2L), tanto para la cadena A (negro) como para la cadena B (rojo).

El residuo mutado en la posición 129 presenta distintas conformaciones, tanto en la Fyn-SH3 como en el mutante Fyn-E129Q debido a los cambios que se producen en el conjunto de moléculas de agua que rodean dicho residuo (Figura 93). En la cadena A, al igual que en el caso



de la Fyn-SH3, también se encuentra el contacto del ion de sodio con los residuos de la hélice 3<sub>10</sub> Ser135 (OG) y Val138 (O).

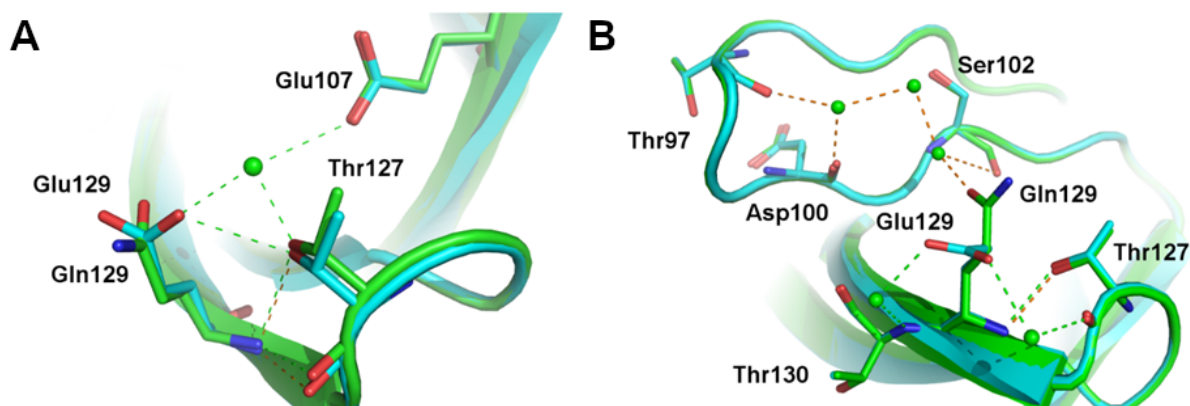


Figura 93. Diferencias en la red de moléculas de agua alrededor del residuo 129 para la cadena A (A) y B (B) de la Fyn-SH3 (cian) y el mutante Fyn-E129Q (verde). Las moléculas de agua se muestran en verde. Los puentes de hidrógeno asociados al Glu129 aparecen en color verde y los del residuo Gln129 en naranja.

### 5.7.3 Estructura de las quimeras FS-Src y FS-Src-E129Q

El objetivo de diseñar la quimera FS-Src era comprobar si al sustituir el lazo n-Src de la Fyn-SH3 por el lazo n-Src de la c-Src-SH3, este dominio era capaz de formar dímeros entrecruzados. En el mutante FS-Src-E129Q, además se ha intercambiado el residuo en la posición 129 para estudiar si existe algún efecto sinérgico entre el lazo n-Src y el residuo 129 en la formación de los dímeros. En ambos casos, se obtuvo solo una estructura que correspondía a la forma monomérica:

- *Estructura del monómero de la FS-Src.* Esta quimera (Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr) cristalizó en presencia de sulfato amónico 1,5 M y pH 4,5 en el grupo espacial  $P6_1$  con parámetros de celdilla  $a=46,0 \text{ \AA}$ ,  $b=46,0 \text{ \AA}$ ,  $c=58,6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$  y una única molécula en la unidad asimétrica (PDB: 7A2U).
- *Estructura del monómero de la FS-Src-E129Q.* La quimera (Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr-Glu129Gln) se obtuvo en presencia de sulfato amónico 1,5 M y pH 4,0 en el grupo espacial  $P6_1$  con parámetros de celdilla  $a=45,5 \text{ \AA}$ ,  $b=45,5 \text{ \AA}$ ,  $c=58,6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$  y una molécula en la unidad asimétrica (PDB: 7A2V).

En las Figuras 94 y 95 se muestra la estructura de cada proteína superpuesta a la Fyn-SH3. El resumen de las estadísticas obtenidas para el refinado se encuentra en las Tablas 5 y 6 del

Apéndice 3. Las estructuras presentan prácticamente el mismo plegamiento general, sin mostrar diferencias significativas.

En el caso de la FS-Src, el RMSD es de 0,58 Å y 0,92 Å para las cadenas A y B de la Fyn-SH3, mientras que para la quimera FS-Src-E129Q, el RMSD es 0,64 Å y 0,97 Å para cada cadena de la Fyn-SH3. Los valores más altos de RMSD se corresponden con los lazos RT, distal y especialmente n-Src, que coinciden con las regiones más flexibles de las proteínas estudiadas tal y como muestran los valores de factor B obtenidos en la Figura 96.

Los residuos presentes en el lazo n-Src Val112, Asn114, Thr115 y Glu116 se han modelado en su totalidad, encontrándose además en ambos mutantes el Glu116 fuera de las zonas permitidas del Ramachandran.

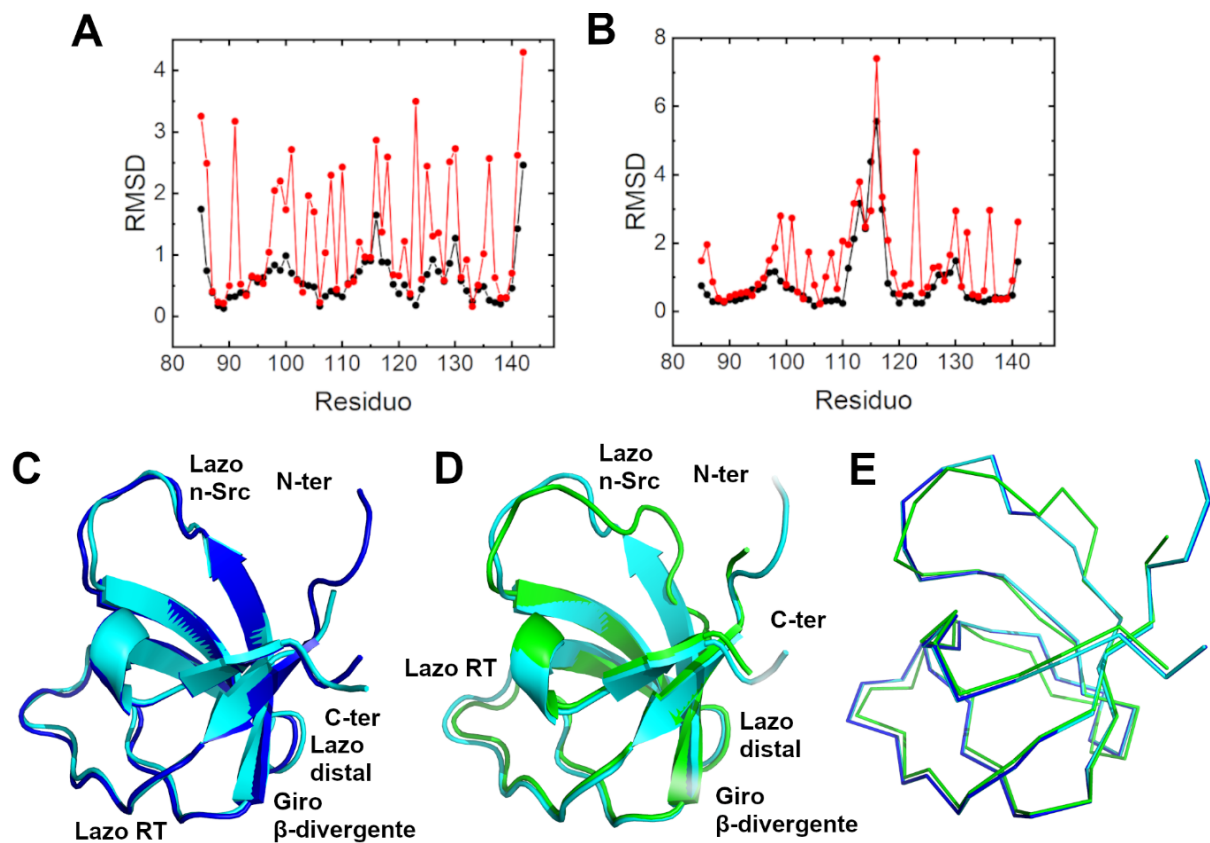


Figura 94. (A) RMSD de la cadena de la FS-Src al superponerla con la cadena A de la Fyn-SH3 (PDB: 7A2J). (B) RMSD de la cadena de la FS-Src tras superponerla con la cadena B de la Fyn-SH3. En negro se muestran los valores para la cadena principal y en rojo para las cadenas laterales. (C) Superposición de la cadena A de la Fyn-SH3 cristalizada a pH 7,5 (azul) con la cadena A de la FS-Src (cian). (D) Superposición de la cadena B de la Fyn-SH3 (verde) con la cadena A de la FS-Src (cian). (E) Superposición de las tres cadenas.

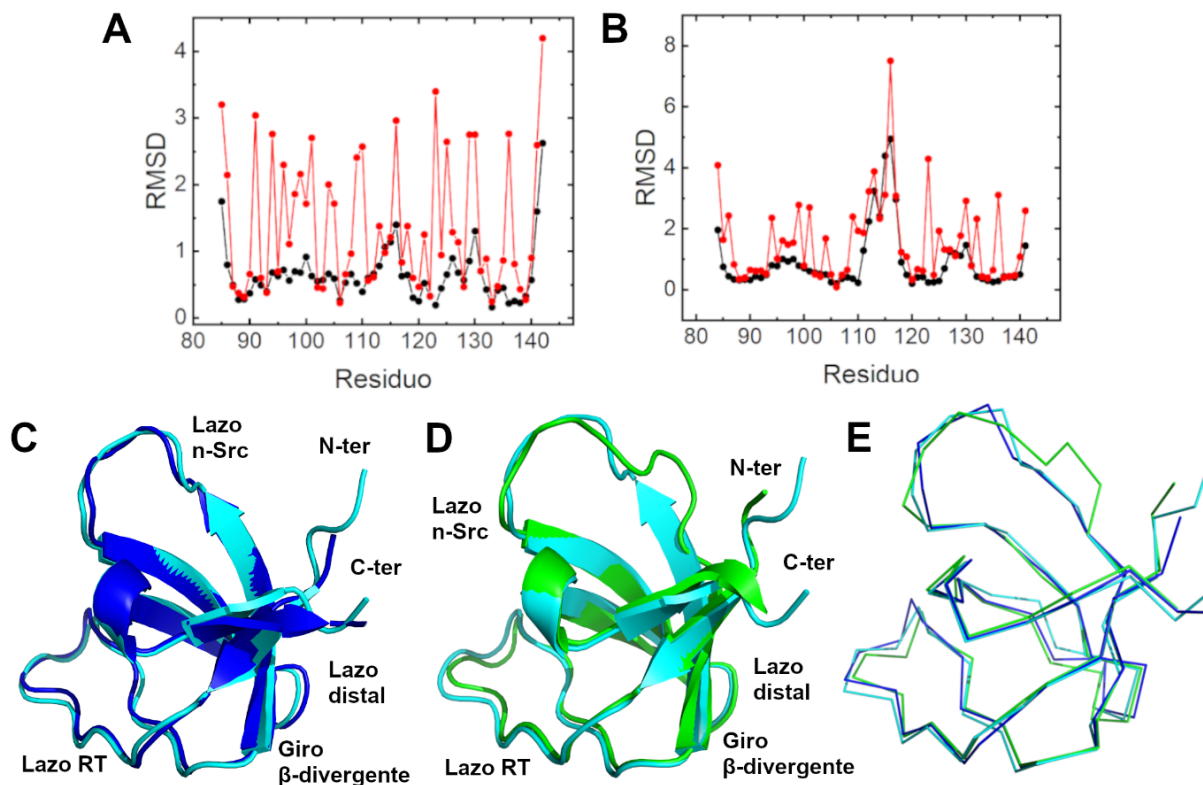


Figura 95. (A) RMSD obtenido tras superponer la cadena de la FS-Src-E129Q con la cadena A de la Fyn-SH3 (PDB: 7A2J). (B) RMSD obtenido tras superponer la cadena de la FS-Src-E129Q con la cadena B de la Fyn-SH3. En negro se muestran los valores para la cadena principal y en rojo para las cadenas laterales. (C) Superposición de la cadena A de la Fyn-SH3 cristalizada a pH 7,5 (azul) con la cadena A de la FS-Src-E129Q (cian). (D) Superposición de la cadena B de la Fyn-SH3 (verde) con la cadena A de la FS-Src (cian). (E) Comparación de las tres cadenas.

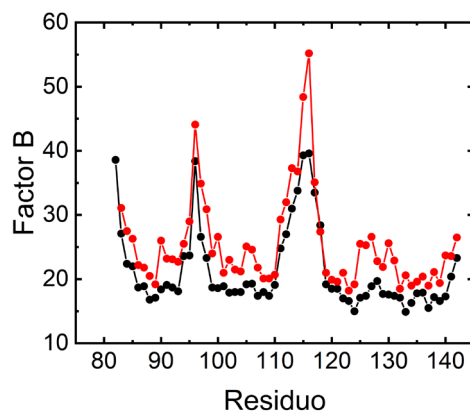


Figura 96. Factores B para los residuos de la única cadena presente en las estructuras de las proteínas FS-Src (negro) y FS-Src-E129Q (rojo).

En las condiciones en las que se obtuvieron estos cristales, la mutación Glu129Gln de la FS-Src no introduce cambios significativos en el sitio de nucleación (Figura 97A) y, además, la red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y los residuos del lazo distal y del giro  $\beta$ -divergente se mantiene (Figura 97B).

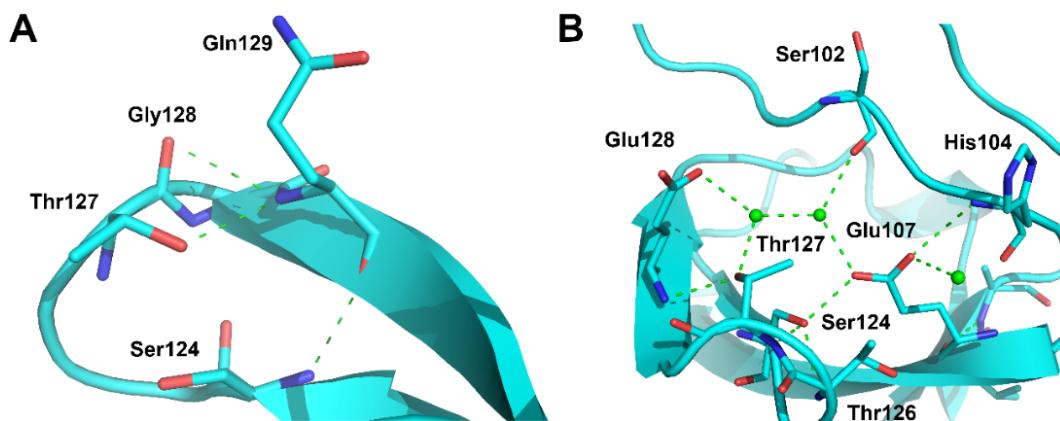


Figura 97. (A) Distribución de los puentes de hidrógeno (verde) alrededor del residuo Gln129 con los residuos del lazo distal de la FS-Src-E129Q. (B) Red de enlaces de hidrógeno entre los residuos del lazo distal (124-128) y el giro  $\beta$ -divergente (104-107) a través de las moléculas de agua W1 y W2 (verde) de la FS-Src (PDB: 7A2Y).

#### 5.7.4 Estructura de la quimera FS-Src-LAH

En el caso de la FS-Src-LAH (Leu112Val-Ser114Asn-Ser115Thr-Glu121Leu-Arg123His) además de intercambiar el lazo n-Src de la Fyn por el de la c-Src se introdujeron las mutaciones Glu121Leu y Arg123His. De esta manera, se puede analizar si estos residuos que no se encuentran conservados entre la Fyn y la c-Src influyen en el plegamiento del dominio. La quimera FS-Src-LAH cristalizó en presencia de sulfato amónico 1,0-2,0 M y en un amplio rango de pH, desde 4,0 hasta 6,0. Las estructuras obtenidas a pH 5,0 y pH 6,0 han difractado a resolución atómica de  $\sim 1,0$  Å y son las siguientes:

- *Estructura del monómero a pH 4,0.* La proteína cristalizó en presencia de acetato sódico 0,1 M, en el grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=28,0$  Å,  $b=32,5$  Å,  $c=60,1$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2T).
- *Estructura del monómero a pH 5,0.* Los cristales se obtuvieron utilizando acetato sódico 0,1 M como tampón, en el grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=28,1$  Å,  $b=32,2$  Å,  $c=60,2$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2S).
- *Estructura del monómero a pH 6,0.* Los cristales obtenidos en MES 0,1 M pertenecían al grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=28,2$  Å,  $b=32,4$  Å,  $c=60,3$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2R).

En la Tabla 7 del Apéndice 3 se resumen las estructuras obtenidas de esta quimera y en la Figura 98 se muestra la superposición de las cadenas de las distintas estructuras. Como puede verse, no se aprecian diferencias notables entre la cadena principal de las tres estructuras (el

RMSD de los átomos de la cadena polipeptídica principal es menor de 0,1 Å). La flexibilidad de los lazos también se mantiene similar entre ellas, tal y como se muestra en la Figura 99.

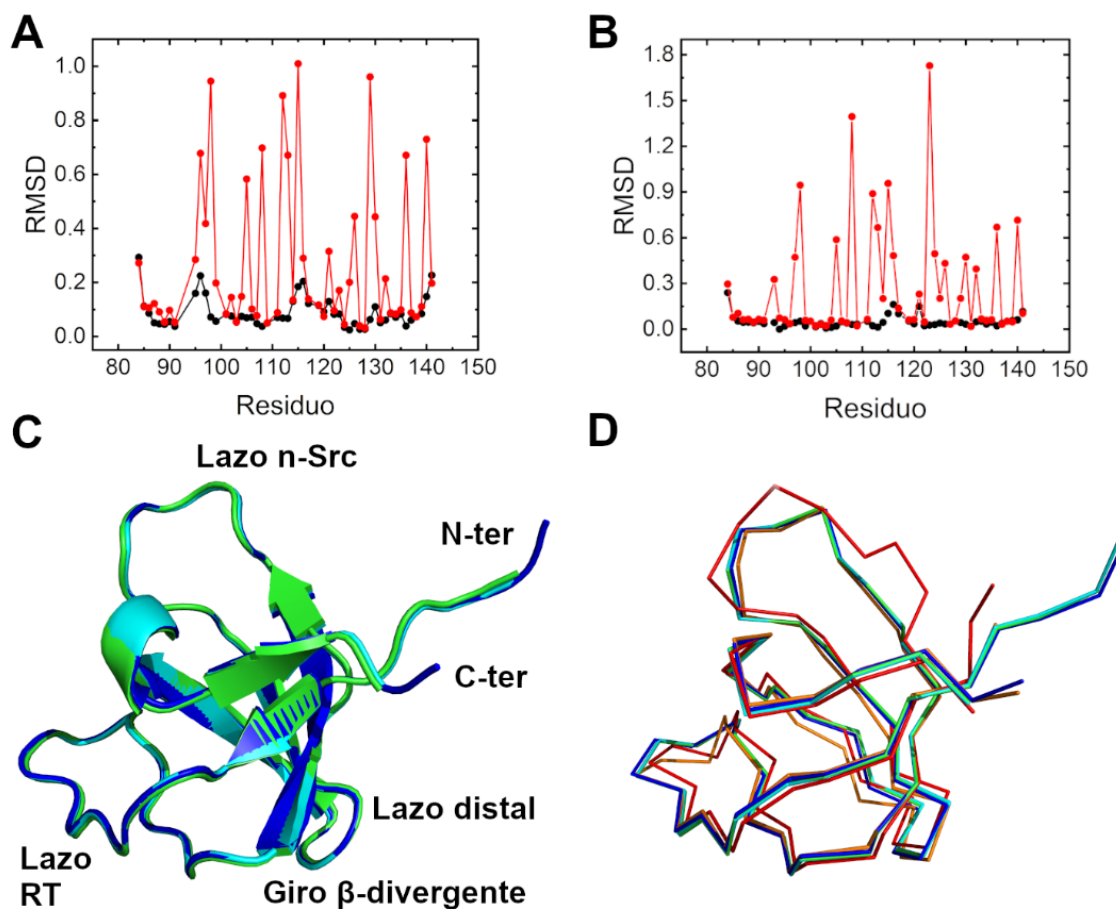


Figura 98. RMSD de la superposición de las cadenas de la FS-Src-LAH cristalizada a pH 4,0 (PDB: 7A2T) con la obtenida a (A) pH 5,0 (PDB: 7A2S) y (B) pH 6,0 (B) (PDB: 7A2R) para la cadena principal (negro) y las laterales (rojo). (C) Superposición de las cadenas de la FS-Src-LAH a pH 4,0 (cian), 5,0 (azul) y 6,0 (verde). (D) Comparación de las tres estructuras de la quimera FS-Src-LAH con la molécula A (rojo) y B (naranja) presentes en la unidad asimétrica de la estructura de la Fyn-SH3 (PDB: 7A2J).

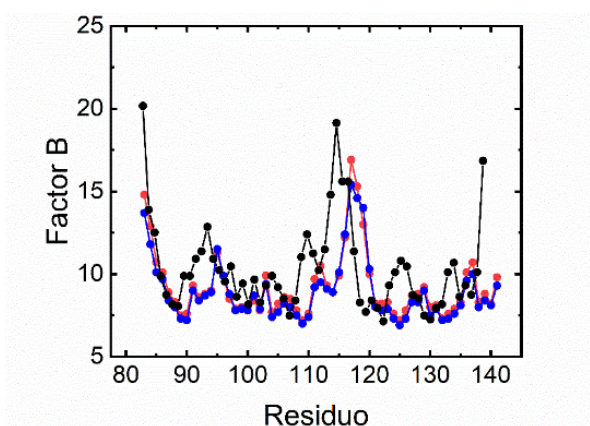


Figura 99. Factores B para cada uno de los residuos de la estructura de la FS-Src-LAH obtenida a pH 4,0 (negro), pH 5,0 (rojo) y pH 6,0 (azul).

No se observan cambios asociados al pH en la conformación de los residuos del lazo distal, ni en la red de moléculas de agua alrededor del Glu107; manteniéndose las interacciones características con los residuos Ser102, His104, Ser124, Thr126, Thr127 y Glu129 (Figura 100).

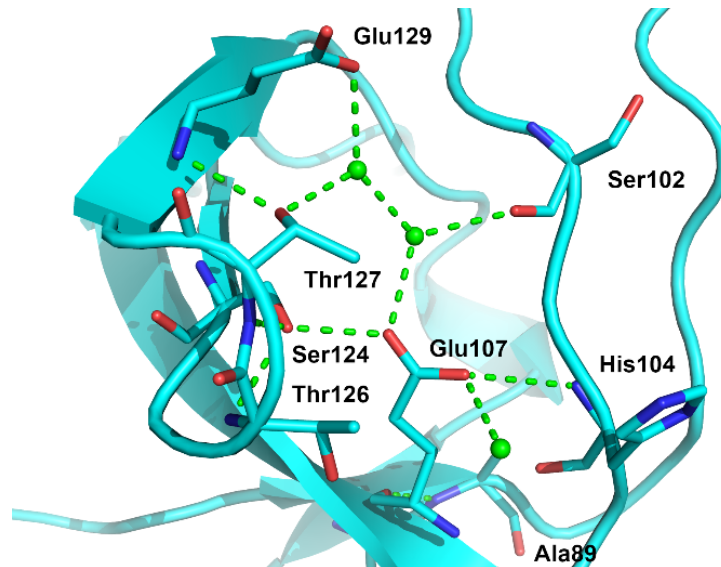


Figura 100. Sitio de nucleación de la quimera FS-Src-LAH. Los puentes de hidrógeno y las moléculas de agua se muestran en color verde y los residuos implicados como bastones en cian.

La diferencia principal en esta proteína es que las mutaciones Glu121Leu y Arg123His introducidas favorecen la formación de nuevos puentes de hidrógeno a los ya presentes en la proteína WT, lo que podría contribuir a la mayor estabilidad de esta proteína conforme se la compara al resto de las quimeras de la Fyn-SH3 estudiadas (Figura 101).

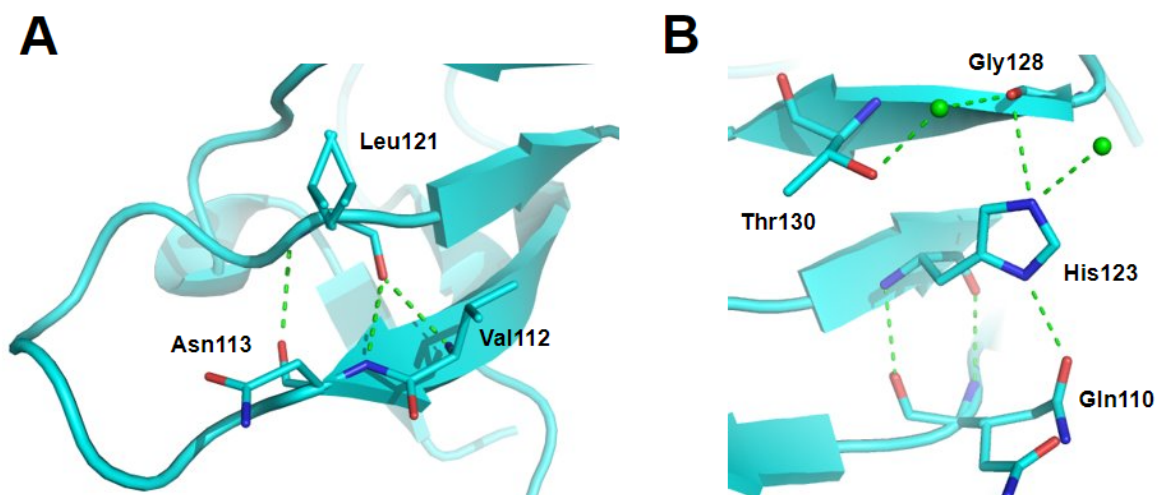


Figura 101. En verde se muestran los puentes de hidrógeno entre los residuos (A) Leu121 (O) e (B) His123. La His123 (ND1/NE2) estabiliza a la proteína a través de su interacción con los residuos Gln110 (OE1) y Gly128 (O).

Además, hemos obtenido los cristales de esta quimera en presencia de PEG 300 y pH ácido con el fin de favorecer la formación de la especie entrecruzada. Bajo estas condiciones los experimentos de DLS mostraban un dímero en disolución, sin embargo, todas las estructuras resueltas correspondían al monómero del dominio y se obtuvieron a resolución atómica de  $\sim 1,0$  Å.

- *Estructura del monómero a pH 3,0.* Los cristales crecieron en sulfato amónico 2,0 M, 5 % de PEG 300 y betaciclodextrina 5 mM, usando como tampón citrato sódico. Pertenecían al grupo espacial  $P2_12_12_1$  con una molécula en la unidad asimétrica y parámetros de celdilla  $a=21,8$  Å,  $b=32,1$  Å,  $c=59,6$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2Q).
- *Estructura del monómero a pH 4,5.* Cristalizó en sulfato amónico 1,5 M, 5 % de PEG 300 y acetato sódico en el grupo espacial  $P2_12_12_1$  con una molécula en la unidad asimétrica y parámetros de celdilla  $a=21,9$  Å,  $b=32,1$  Å,  $c=59,7$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2O).
- *Estructura del monómero a pH 5,0.* Se obtuvo en sulfato amónico 2,0 M, 5 % de PEG 300 y acetato sódico, en el grupo espacial  $P2_12_12_1$  con una molécula en la unidad asimétrica y parámetros de celdilla  $a=29,3$  Å,  $b=32,1$  Å,  $c=59,9$  Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2P).

El resumen de las estadísticas de las estructuras se encuentra en la Tabla 8 del Apéndice 3. En la Figura 102 se muestra la superposición de las tres cadenas, comparándolas además con una de las moléculas de la FS-Src-LAH sin PEG y con las dos cadenas de la Fyn-SH3. Las regiones de mayor flexibilidad asociadas a los factores B se representan en la Figura 103.

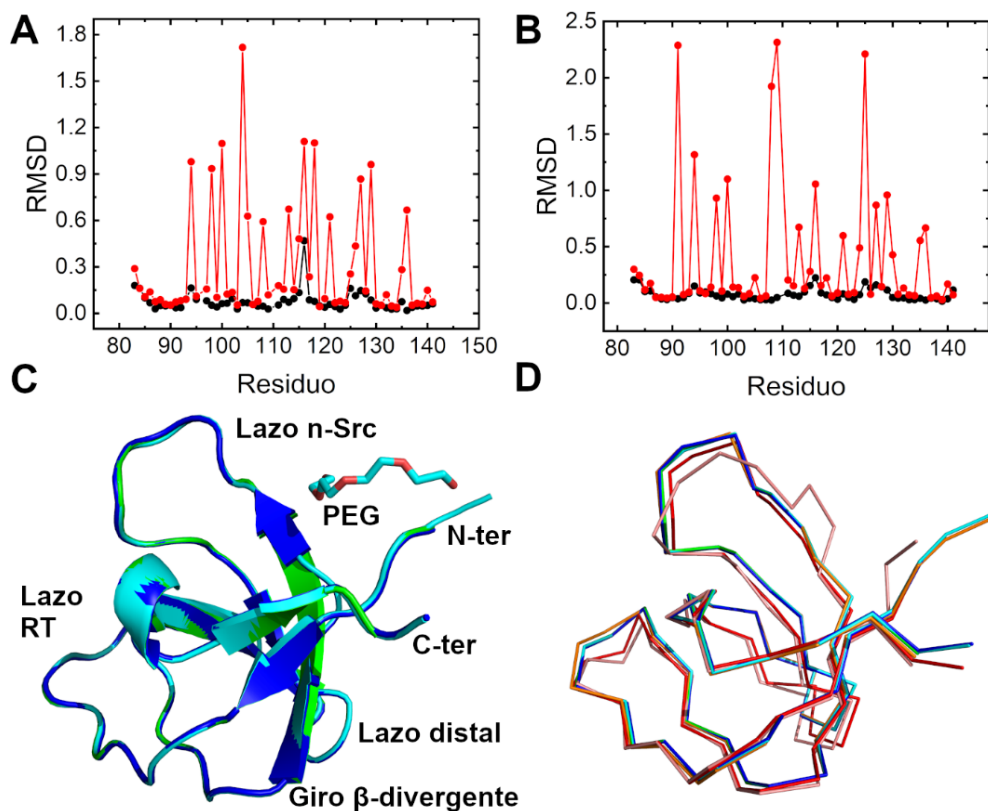


Figura 102. RMSD obtenido al superponer las cadenas de la FS-Src-LAH con PEG 300 obtenida a pH 3,0 (PDB: 7A2Q) con las obtenidas a (A) pH 4,5 (PDB: 7A2O) y (B) pH 5,0 (PDB: 7A2P) para la cadena principal y las cadenas laterales (negro y rojo, respectivamente). (C) Comparación de las cadenas de la FS-Src-LAH a pH 3,0 (cian), 4,5 (verde) y 5,0 (azul). (D) Superposición de las tres cadenas con la FS-Src-LAH (PDB: 7A2S, naranja) y con las dos cadenas presentes en la unidad asimétrica de la Fyn-SH3 en el grupo C2<sub>1</sub> (rojo y salmón). La molécula de PEG presente en la estructura se muestra en color verde.

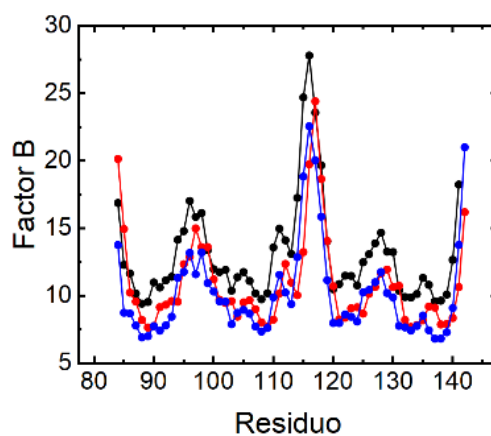


Figura 103. Factores B para cada uno de los residuos de las estructuras de la FS-Src-LAH en presencia de PEG obtenidas a pH 3,0 (negro), pH 4,5 (rojo) y pH 5,0 (azul).

Las estructuras obtenidas en presencia de PEG no muestran grandes diferencias entre ellas y presentan un RMSD de 0,12 Å. Las interacciones anteriormente descritas se conservan, incluyendo las que se dan en el sitio de nucleación. En este caso la densidad electrónica indica



la interacción de una molécula de PEG con los residuos Gly83 (O) y Thr85 (OG1) del extremo amino terminal y con la Ile111 (O) próxima al lazo n-Src (Figura 104).

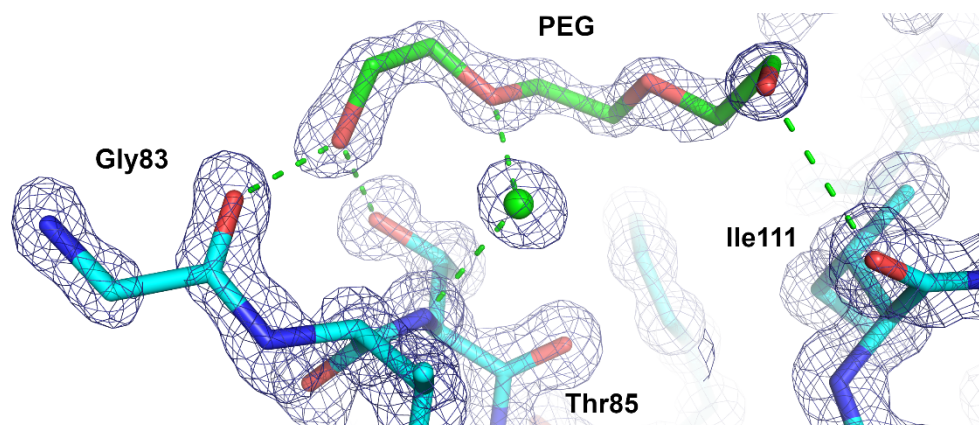


Figura 104. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc con contorno 1.5  $\sigma$  de la molécula de PEG (verde) interaccionando con los residuos Gly83, Thr85 e Ile111 (cian). Los puentes de hidrógeno y la molécula de agua se muestran en color verde.

También se cristalizó esta quimera con el péptido VSL12 (VSLARRPLPLP). Los cristales se obtuvieron en sulfato amónico (0,5-1,0 M), obteniendo las siguientes estructuras:

- *Estructura del monómero a pH 3,0.* El mutante cristalizó en citrato sódico en el grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y parámetros de celdilla  $a=32,9$  Å,  $b=32,9$  Å,  $c=62,8$  Å,  $\alpha= \beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2W).
- *Estructura del monómero a pH 4,0.* Los cristales se obtuvieron en acetato sódico, en el grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=21,9$  Å,  $b=32,1$  Å,  $c=59,7$  Å,  $\alpha= \beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2Y).
- *Estructura del monómero a pH 5,0.* Se cristalizó en presencia de acetato sódico, en el grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=32,9$  Å,  $b=33,1$  Å,  $c=62,6$  Å,  $\alpha= \beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2X).
- *Estructura del monómero a pH 6,0.* La proteína cristalizó usando como tampón MES, en el grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con una molécula en la unidad asimétrica y con parámetros de celdilla  $a=29,6$  Å,  $b=33,6$  Å,  $c=61,9$  Å,  $\alpha= \beta=\gamma=90$  (PDB: 7A2Z).

Los datos de las estructuras se encuentran en la Tabla 9 del Apéndice 3. En la Figura 105 se puede encontrar la superposición entre las distintas cadenas de la FS-Src-LAH y la Fyn-SH3 y en la Figura 106 los factores B para cada estructura.

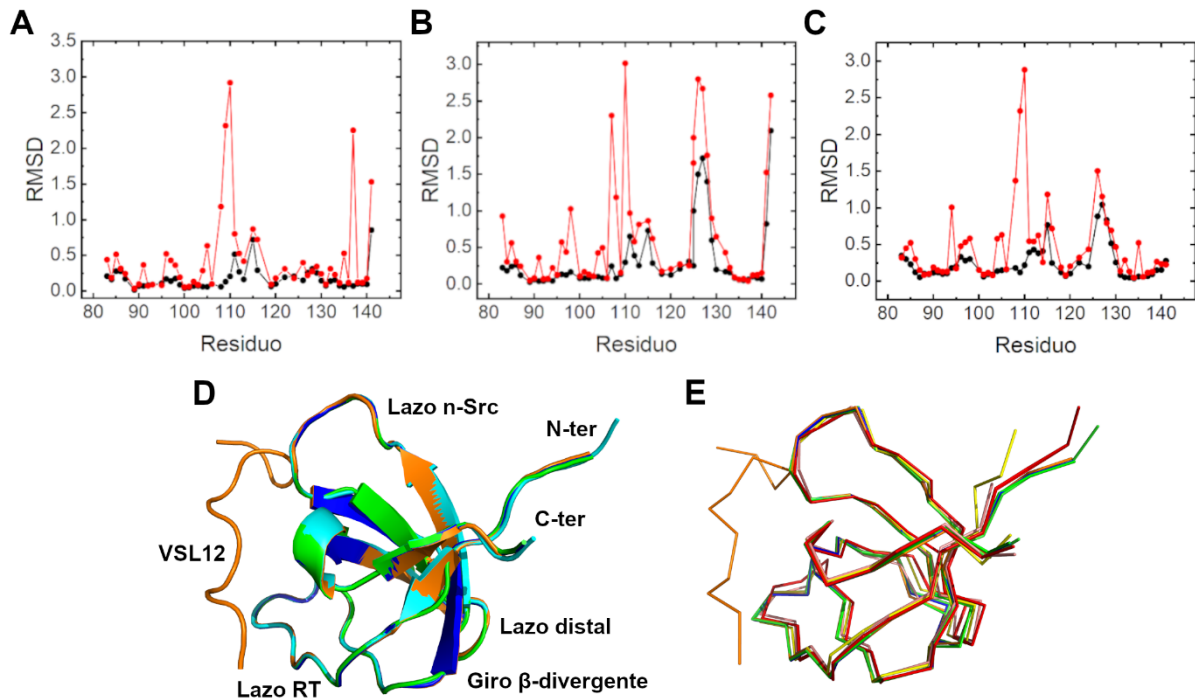


Figura 105. RMSD de los residuos de la cadena principal (negro) y las cadenas laterales (rojo) tras superponer las cadenas de la FS-Src-LAH con el péptido VSL12 cristalizada a pH 3,0 (PDB: 7A2W) con las obtenidas a (A) pH 4,0 (PDB: 7A2Y), (B) 5,0 (PDB: 7A2X) y (C) 6,0 (PDB: 7A2Z). (D) Superposición de las cadenas de la FS-Src-LAH a pH 3,0 (cian), 4,0 (azul), 5,0 (verde) y 6,0 (naranja). (E) Comparación de las cuatro cadenas con la FS-Src-LAH (PDB: 7A2S, rojo) y con las dos cadenas presentes en la unidad asimétrica de la Fyn-SH3 en el grupo C<sub>2</sub><sub>1</sub> (amarillo y salmón). El péptido VSL12 se muestra en color naranja.

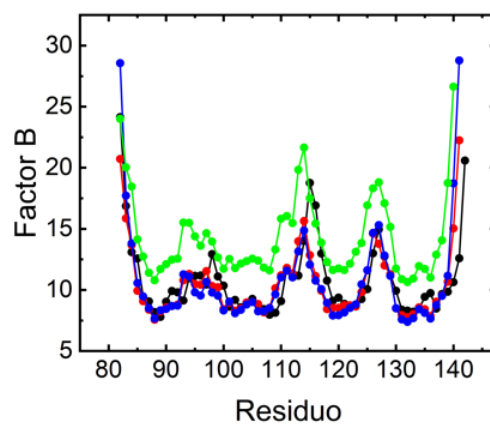


Figura 106. Factores B para cada uno de los residuos de las estructuras de la FS-Src-LAH en presencia del péptido obtenidas a pH 3,0 (negro), pH 4,0 (rojo), pH 5,0 (azul) y pH 6,0 (verde).

Aunque en la cadena principal apenas se aprecian diferencias, sí las hay en la disposición de ciertas cadenas laterales. De esta manera, en las estructuras obtenidas a pH 3,0 y 4,0 el Asp99 se ha modelado en doble conformación (Figura 107), mientras que a pH 5,0 y 6,0 el residuo se encuentra en una única conformación. En todos los casos, la Arg6 del péptido VSL12 forma un puente salino con la cadena lateral del Asp100 situado en el lazo RT.

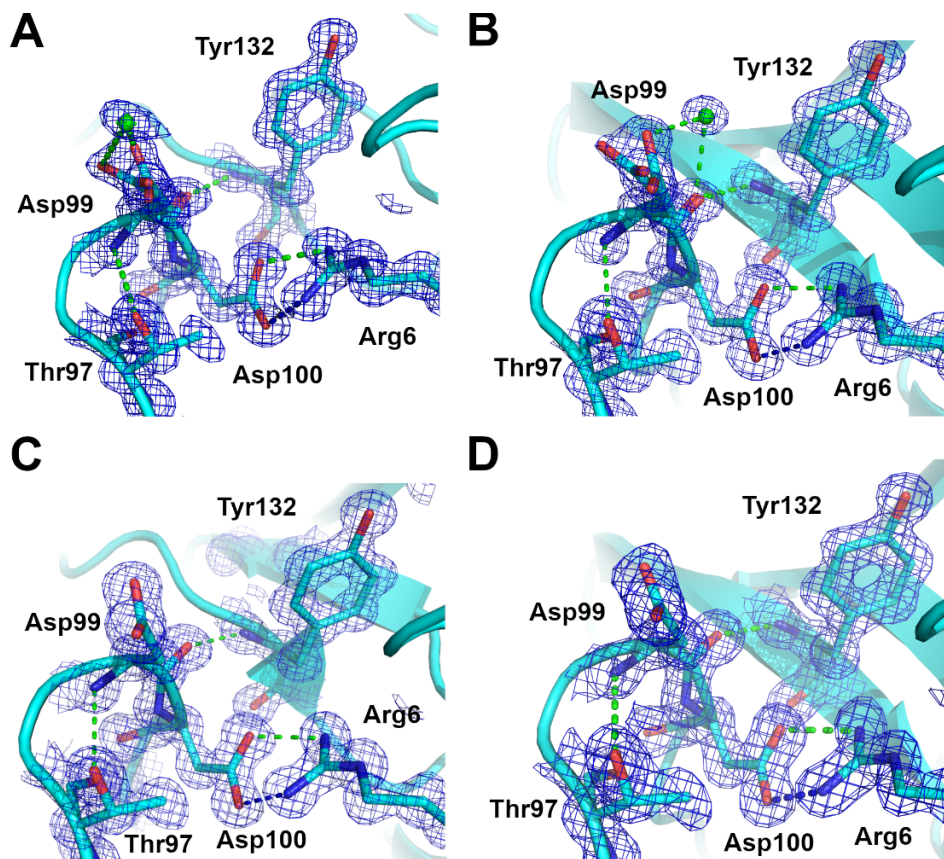


Figura 107. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  de la doble conformación del Asp99 en la FS-Src-LAH a los pHs: (A) pH 3,0, (B) pH 4,0, (C) pH 5,0 y (D) pH 6,0. Las moléculas de agua y los puentes de hidrógeno se muestran en verde y el puente salino en azul.

La constante de unión del péptido a la FS-Src-LAH es  $4,4 \pm 0,5 \mu\text{M}^{-1}$  a pH 5,0 y  $14,2 \pm 1,1 \mu\text{M}^{-1}$  a pH 7,0 (Figura 108). El valor de la constante a pH 7,0 es similar a la obtenida para la unión del péptido a la Fyn-SH3 WT documentada en bibliografía de  $16,6 \mu\text{M}^{-1}$  (Cámara-Artigas *et al.*, 2016).

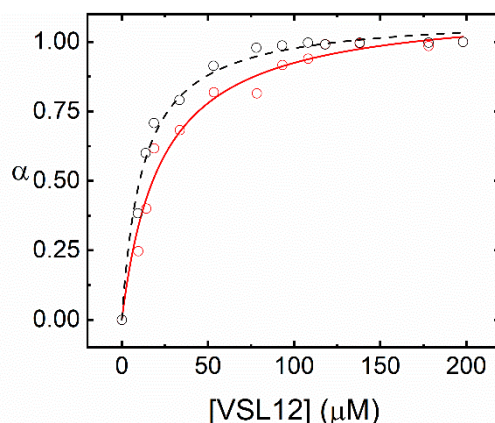


Figura 108. Determinación de la constante de unión del péptido VSL12 a la FS-Src-LAH seguida por la amortiguación de fluorescencia intrínseca de la proteína. Las curvas se han ajustado a la Ec. 9 para pH 5,0 (rojo, —○—) y pH 7,0 (negro, ---○---) tras representar la fracción de saturación ( $\alpha$ ) frente a la concentración del péptido ( $\mu\text{M}$ ).

La mayor parte de las interacciones en las estructuras obtenidas de la FS-Src-LAH unida al péptido VSL12 se mantienen de unas a otras, sin embargo, la peculiaridad observada en esta proteína es que el residuo Glu107 presenta distintas conformaciones que modifican algunos de los puentes de hidrógeno. En el caso de la estructura obtenida a pH 4,0 (PDB: 7A2Y) y 5,0 (PDB: 7A2X), las cadenas laterales de los residuos Glu107, Leu125, Thr126 y Thr127 se encuentran en doble conformación, por lo que hay una redistribución de los puentes de hidrógeno con ciertas moléculas de agua, perdiendo el enlace con el Glu129 y permitiendo modelar el lazo distal en dos conformaciones distintas. Además, en una de las conformaciones se pierde el puente de hidrógeno del átomo OE1 del Glu107 con la Ser124 (OG), pero lo mantiene a través de una molécula de agua. A pH 6,0 (PDB: 7A2Z), el Glu107 se observa en una única conformación (Figura 109). Es importante señalar que es la primera estructura en la que se visualiza la pérdida del enlace entre las cadenas laterales del Glu107 y la Ser124, que es crítico en el proceso del plegamiento de este dominio.

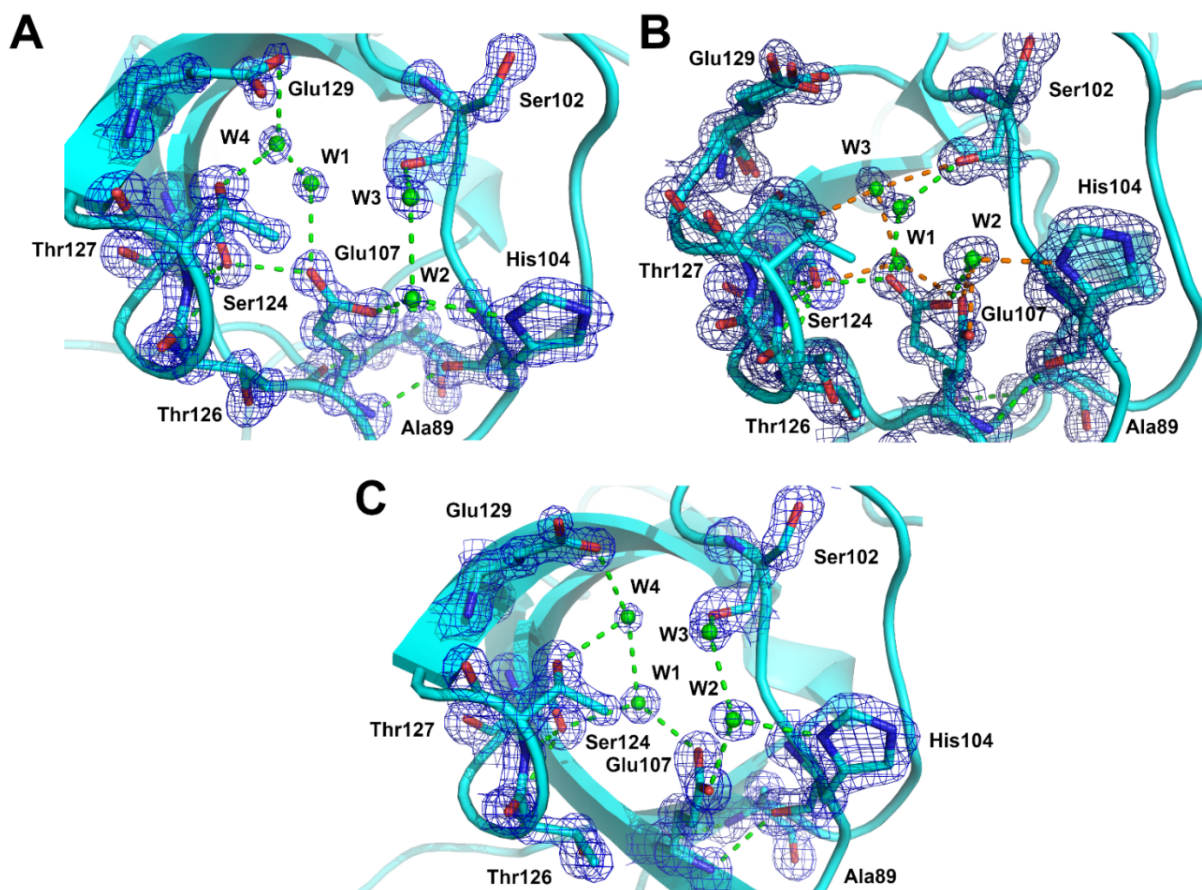


Figura 109. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  de la distribución de los puentes de hidrógeno del Glu107 en sus distintas conformaciones. (A) Estructura obtenida a pH 3,0 (PDB: 7A2W). (B) Estructura obtenida a pH 5,0 (PDB: 7A2X). En verde se muestran los puentes de hidrógeno asociados al Glu107A y en naranja los formados por el Glu107B. (C) Estructura obtenida a pH 6,0 (PDB: 7A2Z).

El péptido VSL12 se une a la FS-Src-LAH a través de varios puentes de hidrógeno que se producen entre los residuos presentes en el primer y segundo bolsillo de unión de la proteína (Figura 110). La unión se produce mediante una interacción tipo II, ya que la orientación del péptido va en el sentido carboxilo a amino terminal.

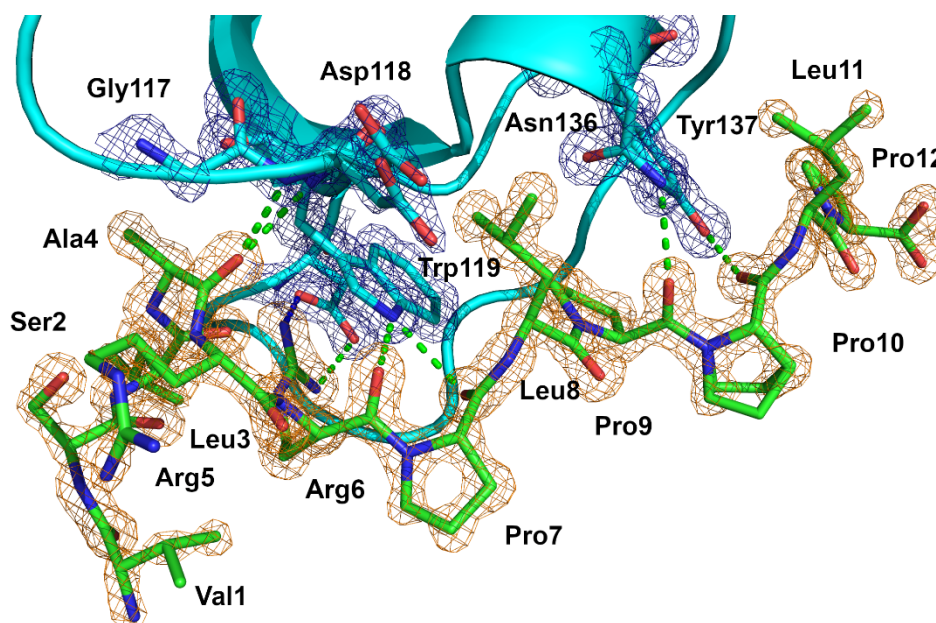


Figura 110. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  del péptido VSL12 (VSLARRPLPLP) unido a la proteína FS-Src-LAH a través de los residuos: Gly117 (N), Asp118 (N), Trp119 (NE1), Asn136 (ND2) y Tyr137 (OH). Los puentes de hidrógeno y el péptido se muestran en verde y los aminoácidos de la proteína en cian.

### 5.7.5 Estructura de la quimera FS-RT

En la FS-RT se ha introducido el lazo RT de la c-Src-SH3, lo que implica las mutaciones de los residuos Ala95Ser y Asp99Thr. En la misma gota, se obtuvieron dos tipos de cristales de la proteína en presencia de formiato sódico 4,5 M y acetato sódico 0,1 M a pH 4,0 con distintos grupos espaciales, similares a los obtenidos para la proteína nativa Fyn, dando lugar a las siguientes estructuras:

- *Estructura del polimorfo 1.* Los cristales obtenidos pertenecen al grupo espacial  $C2_1$  con parámetros de celdilla  $a=72,7 \text{ \AA}$ ,  $b=47,1 \text{ \AA}$ ,  $c=42,7 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=97,4^\circ$  y dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB: 7A2M).
- *Estructura del polimorfo 2.* Se obtuvo en el grupo espacial  $P2_1$  con parámetros  $a=42,2 \text{ \AA}$ ,  $b=47,8 \text{ \AA}$ ,  $c=73,1 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90^\circ$ ,  $\beta=98,4^\circ$  y con cuatro moléculas del monómero del dominio SH3 en la unidad asimétrica (PDB: 7A2N).

La información de la estructura y sus estadísticas se encuentran en la Tabla 4 del Apéndice 3. En la Figura 111 se muestra la comparación de las distintas cadenas obtenidas.

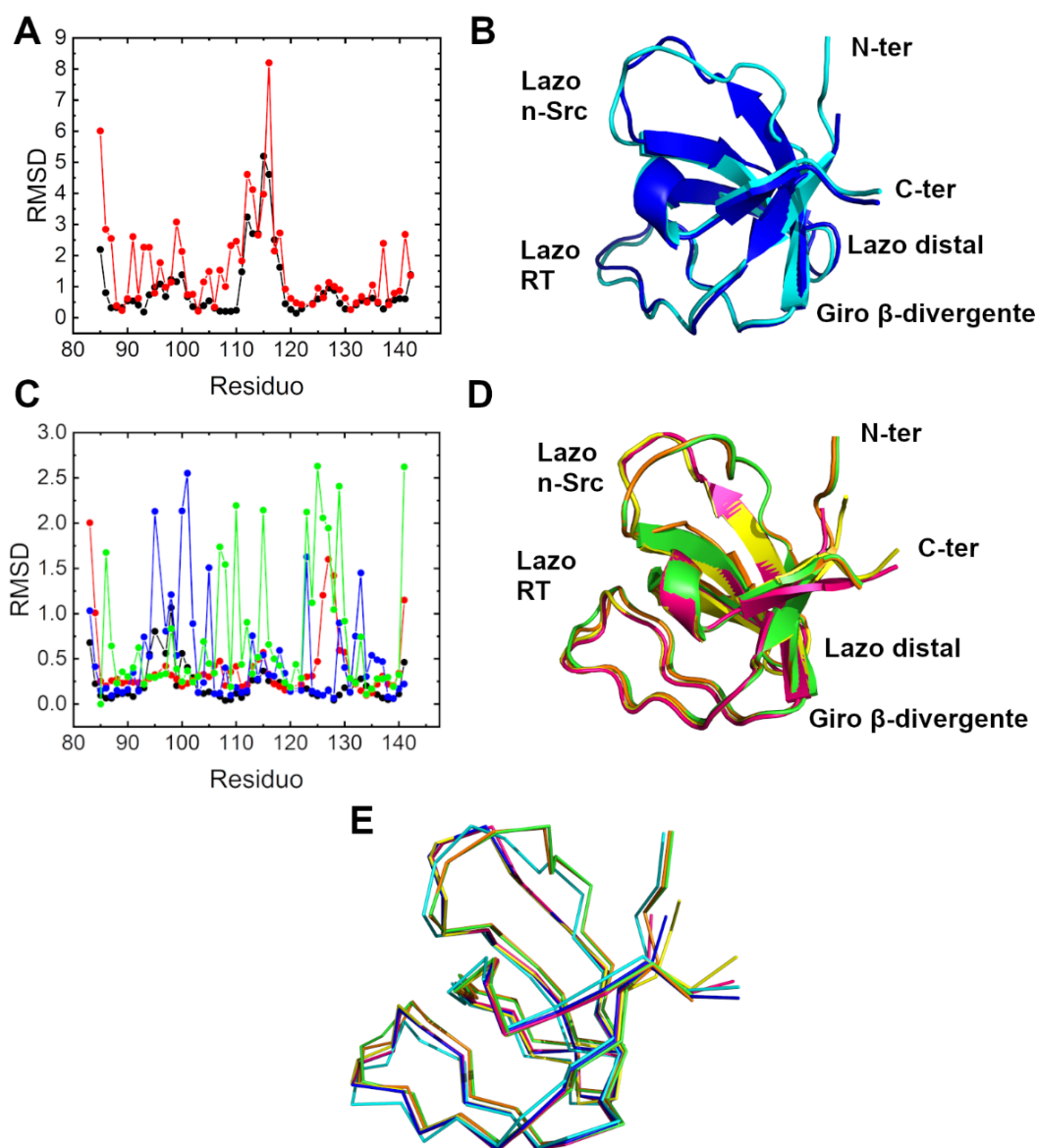


Figura 111. (A) RMSD por residuo tras comparar las cadenas A y B del polimorfo 1. Las mayores diferencias se observan en los residuos Glu115 y Gly116 del lazo n-Src y en el extremo N-terminal. (B) Representación del polimorfo 1 de la FS-RT a pH 4,0 (PDB: 7A2M). Las dos cadenas de la unidad asimétrica se muestran en azul (cadena A) y cian (cadena B). (C) RMSD de las cuatro cadenas principales (negro y rojo) y de las cadenas laterales (azul y verde) del polimorfo 2 de la FS-RT. (D) Superposición de las cuatro cadenas de la FS-RT en el grupo espacial  $P2_1$ , que se muestran en naranja (cadena A), amarillo (cadena B), verde (cadena C) y magenta (cadena D). (E) Superposición de todas las cadenas de la estructura monomérica.

En el caso del polimorfo 1, las dos cadenas presentes en la unidad asimétrica presentan conformaciones similares, pero con diferencias significativas en el lazo flexible n-Src, con un RMSD de 1,02 Å. El polimorfo 2, al igual que en otras estructuras con cuatro moléculas en la

unidad asimétrica, mantiene la misma conformación entre las cadenas A y C y las cadenas B y D. La cadena A del polimorfo 1 es equivalente a las cadenas B y D del polimorfo 2, mientras que la cadena B del polimorfo 1 es equivalente a las cadenas A y C del polimorfo 2. De esta manera, de nuevo queda de manifiesto la presencia de dos especies distintas características de las estructuras de estos dominios SH3. Cabe destacar que, tal y como se muestran en la Figura 112, existen diferencias significativas en la conformación del lazo RT en ambas cadenas. Especialmente en la cadena B del polimorfo 1, el lazo RT es muy flexible y las cadenas laterales de los residuos Arg96, Thr97 y Glu98 no se han podido modelar debido a la falta de densidad electrónica en los mapas de diferencia. En el polimorfo 2, en cambio, no se observan tantas diferencias conformacionales asociadas a la flexibilidad del lazo RT.

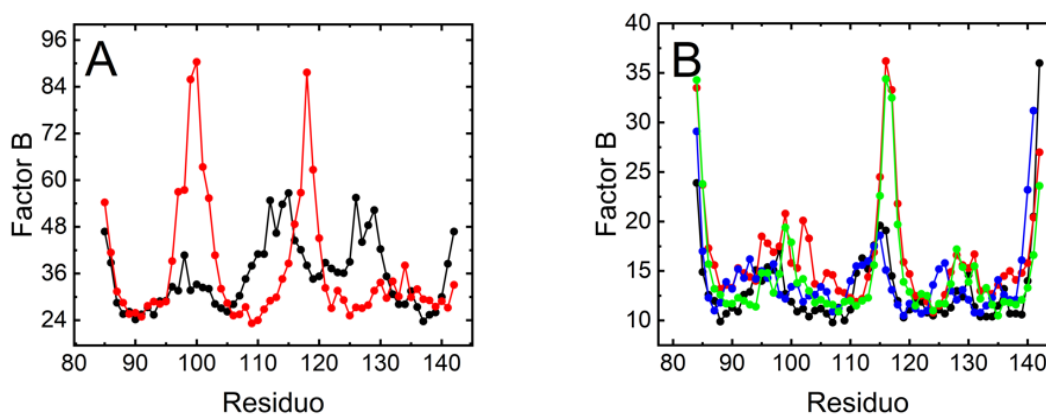


Figura 112. (A) Factores B de la estructura de la FS-RT en el grupo espacial  $C2_1$  (PDB: 7A2M). En negro se muestran los valores para la cadena A y en rojo para la B. (B) Factores B de la estructura de la FS-RT en el grupo espacial  $P2_1$  (PDB: 7A2N). En negro se muestran los valores para la cadena A, en rojo para la B, en azul para la C y en verde para la D.

Las diferencias observadas en el lazo RT de estas estructuras se deben a la inserción de un residuo polar como la Ser95, mediante el cual se forman nuevos puentes de hidrógeno a través de su cadena lateral que no se observan en la estructura de la Fyn TQ. El residuo Thr99, en cambio, mantiene unas interacciones muy similares a las del Asp99 de la nativa (Figura 113).

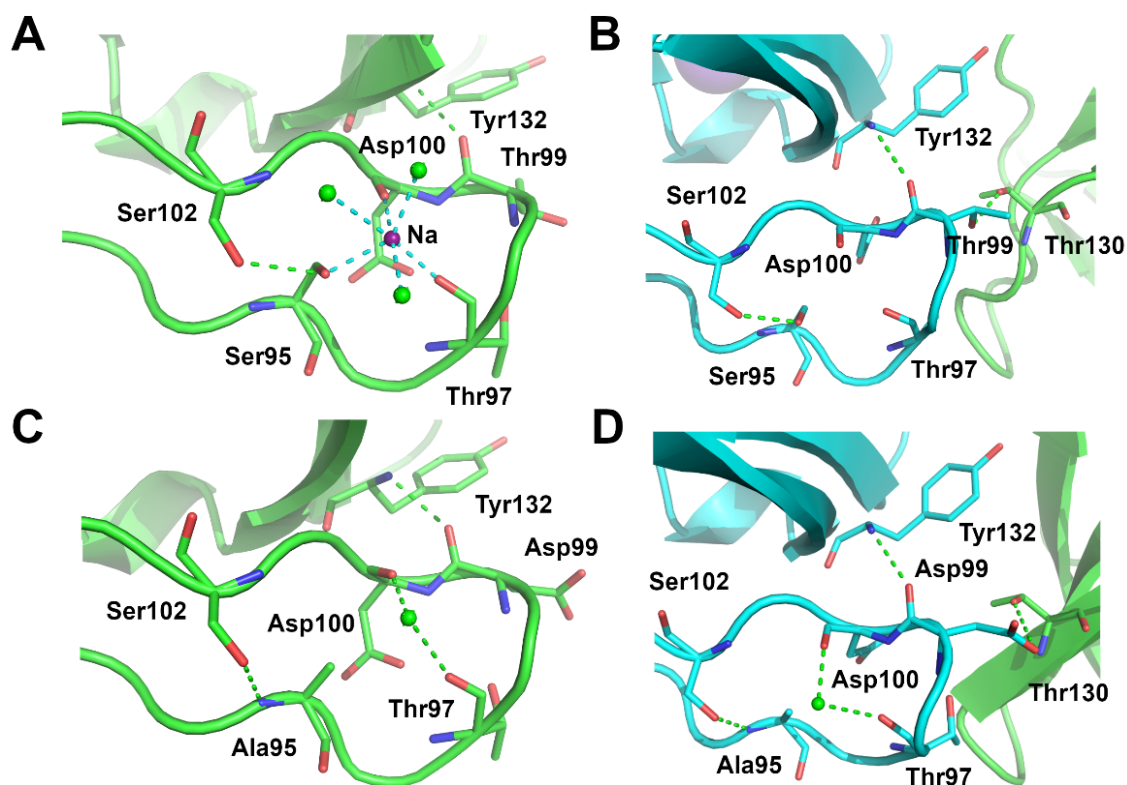


Figura 113. En los paneles A y B se muestran las interacciones asociadas a las mutaciones del lazo RT de la FS-RT para las cadenas A (estructura monoclinica) y A/C/D (estructura triclinica), en color verde, y para las cadenas B de ambas estructuras, en cian. En los paneles C y D se muestran las interacciones del lazo RT en las cadenas A (verde) y B (cian) de la Fyn-SH3 TQ (PDB: 7A2J).

Al introducir la Ser95 en el lazo RT se ha podido observar la presencia de un ion de sodio con el que interacciona a través de su cadena lateral, tal y como se muestra en la Figura 114.

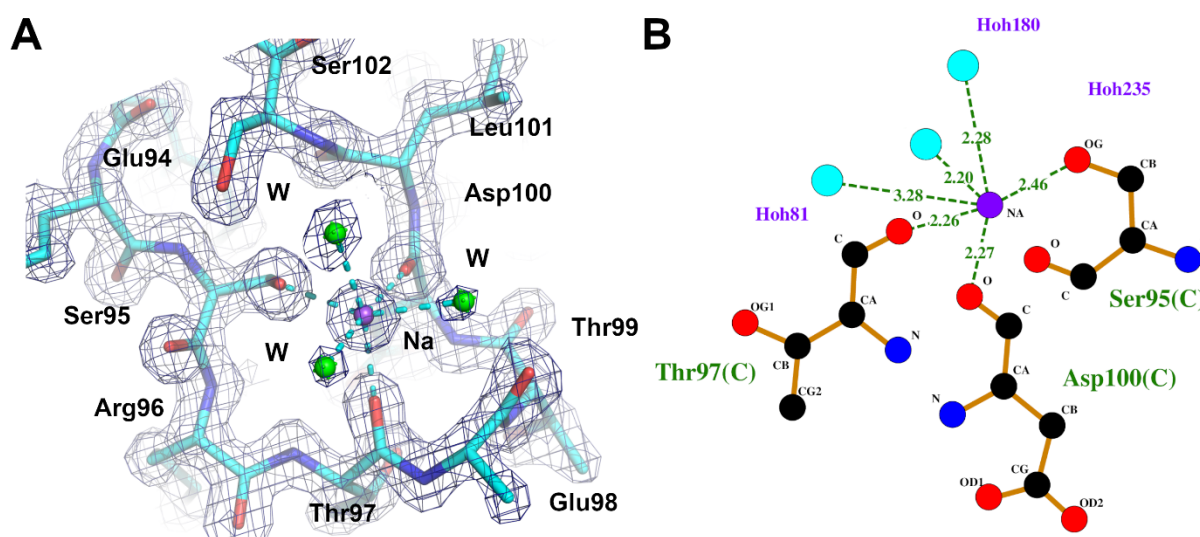


Figura 114. (A) Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a  $1.5 \sigma$  de los residuos del lazo RT interaccionando con el ion de sodio. (B) Diagrama esquemático de la unión sodio-proteína obtenido mediante el programa Ligplot.



## 5.8 Discusión

El dominio SH3 de la Fyn TQ, al igual que el de la c-Src, ha sido ampliamente estudiado y caracterizado desde el punto de vista de plegamiento analizando el efecto que producen sobre la estabilidad ciertas mutaciones puntuales en el núcleo hidrofóbico y en las cargas superficiales de la proteína (Maxwell *et al.*, 1998; Mittermaier *et al.*, 2004; Schweiker *et al.*, 2006). La Fyn-SH3 es una proteína que presenta una alta homología secuencial con la c-Src-SH3, sin embargo, hasta la fecha no existe información estructural acerca de la formación de dímeros entrecruzados en la misma. Por este motivo, en este capítulo hemos estudiado el efecto de introducir los lazos n-Src, RT y ambos de la c-Src en la Fyn-SH3. También hemos estudiado la influencia del residuo en la posición 129 con los mutantes Fyn-E129Q y FS-Src-E129Q.

En general todas las quimeras basadas en el dominio SH3 de la Fyn TQ son notablemente más estables que las de la c-Src. Ello se evidencia incluso en los altos rendimientos de proteína expresada y purificada, que en algunos casos rondaron los 100 mg por litro de cultivo, que sin duda son rendimientos excepcionales. Los experimentos realizados para medir la estabilidad química frente al agente cloruro de guanidinio muestran que las quimeras FS-Src, FS-Src-LAH y FS-RT son las que presentan una mayor estabilidad, mientras que la quimera FS-2X, a la que se le ha introducido tanto el lazo RT como el n-Src de la c-Src, es la más inestable de todo el grupo. Una de las causas de estabilización puede encontrarse en la coordinación con ciertos iones facilitada por las mutaciones introducidas. Por ejemplo, en la FS-RT, la Ser95 que sustituye al residuo Ala95 forma puentes de hidrógeno a través de su cadena lateral, y se encuentra coordinada a través de un ion de sodio con los residuos Thr97 y Asp100. La coordinación de este ion sodio la completan varias moléculas de agua que se han podido modelar con precisión gracias a la alta resolución de las estructuras obtenidas.

Los experimentos de desnaturalización térmica muestran un aumento en el valor de la  $T_m$  en comparación con el dominio SH3 de la Fyn WT al sustituir el Asp99 de la Fyn por la treonina presente en la secuencia del lazo de la c-Src (Thr98). Este resultado es comparable al obtenido en un estudio previo, en el cual el Asp99 de la Fyn situado en el lazo RT fue sustituido por una lisina para analizar el efecto de las interacciones electrostáticas superficiales (Schweiker *et al.*, 2007). Como consecuencia, la estabilidad térmica del mutante resultante también era mayor que la de la proteína nativa.

En la Fyn-SH3 los residuos Asp99 y Asp100 forman parte del tercer bolsillo de unión para los péptidos ricos en prolina (Shelton & Harris, 2008; Martín-García *et al.*, 2012), por lo que es de esperar que cambios en el pH puedan producir alteraciones en los enlaces que se producen en la unión de motivos ricos en prolina. En el caso la Fyn-SH3 y tal y como ocurre con el Asp99 de la c-Src-SH3, el valor de pK<sub>a</sub> calculado con Rosetta (Kilambi *et al.*, 2012) del Asp100 sigue siendo inusualmente bajo, tal y como se muestra en la Tabla 28. Adicionalmente, la sustitución del Asp99 por el aminoácido treonina en la FS-RT modifica la red de enlaces de hidrógeno establecidos por este residuo, lo que podría explicar el mayor rango de estabilidad con el pH de esta proteína. Además, a pesar de los cambios introducidos en el lazo RT, el Asp100 sigue teniendo un valor aparente de pK<sub>a</sub> muy bajo. Los cambios en la red de puentes de hidrógeno del lazo RT hace que en algunas de las estructuras obtenidas a buena resolución y a distintos pHs sea común encontrar el Asp98 en la c-Src y el Asp99 en la Fyn en distintas conformaciones, como en el caso de las quimeras SF-2X y FS-Src-LAH.

Tabla 28. Valores de pK<sub>a</sub> aparente de los grupos ionizables calculado con Rosetta

Residuo	Fyn-SH3 (PDB: 7A2J)	FS-RT (PDB: 7A2M)
	A/B	A/B
TYR 91	9,8/9,8	9,8/9,8
ASP 92	2,9/2,8	1/2,7
TYR 93	13,1/11,4	12,4/11,2
GLU 94	4,6/4,6	4,6/3,9
GLU 98	5,1/4,4	4,4/4,4
ASP 99	3,6/4,1	Mutado a Thr99
<b>ASP 100</b>	<b>2,2/1,2</b>	<b>1/1</b>
HIS 104	6,9/6,9	7/6,9
LYS 105	10,6/10,6	10,6/10,7
GLU 107	2,8/2,7	3,1/3,2
LYS 108	10,1/10	10,3/10,1
GLU 116	4/4,4	4/4,4
ASP 118	3,7/3,5	3,7/3,7
GLU 121	4,4/4,6	5,4/4,6
GLU 129	4,2/4,5	4/4,6
TYR 132	10,8/13,4	11,8/11,2
TYR 137	9,8/9,9	9,8/9,8
ASP 142	3,8/SM	3,7/3,7

SM: Residuos sin modelar

Al igual que en la c-Src, el residuo en la posición 129 de la Fyn-SH3 también juega un papel relevante en la estabilidad del dominio y ha sido analizado en estudios previos. Por ejemplo, se determinó que la mutación del Glu129 por una lisina provocaba un notable aumento en la estabilidad térmica (+6 °C) debido al reajuste de las cargas electrostáticas al mutar un residuo

que puede adquirir carga negativa al desprotonarse su cadena lateral por uno de carga opuesta como la lisina (Schweiker *et al.*, 2007). Este resultado es equivalente al obtenido en los estudios realizados en nuestro laboratorio con la c-Src-SH3 (Bacarizo *et al.*, 2014). Además, asociados con la mutación de este residuo, también existen cambios en las curvas de estabilidad con el pH. Las proteínas Fyn-SH3 y Fyn-E129Q presentan prácticamente los mismos valores de pK<sub>a</sub> para la región básica y ácida, sin embargo, en los casos en los que se han introducido simultáneamente mutaciones en la posición 129 y en el lazo n-Src se observan cambios en la estabilidad, especialmente en la FS-Src-E129Q, que presenta una desestabilización en la zona básica y se desnaturaliza por encima de pH 8,0.

La proteína FS-Src-LAH, presenta una mayor estabilidad a pH ácido. En este caso, la Arg123 ha sido reemplazada por la His123, de modo que es la única del grupo que cuenta con dos histidinas y por tanto dos residuos que son ionizables en la zona neutra-medio ácida. La His123 aparentemente confiere una mayor estabilidad química a la FS-Src-LAH dentro del grupo de las quimeras Fyn-Src. La cadena lateral de esta histidina forma puentes de hidrógeno con los residuos Gln110 (OE1) y Gly128 (O) que no se observan en presencia de la arginina. Esta quimera ha cristalizado en un rango de pH de 3,0 a 6,0, sin embargo, a pesar de haber cristalizado en presencia de PEG 300 y a pH ácido, la estructura obtenida es la del monómero. Los cambios conformacionales del Glu107 del sitio de nucleación de la FS-Src-LAH asociados al pH son interesantes puesto que, al igual que ocurre en la Src-E106D, se pierde el enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de dicho residuo y la Ser124 (PDB: 7A2Z). En su lugar, una molécula de agua hace de puente entre ambos residuos. Dicho resultado es destacable puesto que es la primera vez que se ha observado este cambio en el sitio de nucleación de los dominios SH3 de la c-Src y la Fyn TQ, que, además, ocasiona un reordenamiento de las moléculas de agua características de esta región. Esto es interesante puesto que la molécula de agua W1 se mantiene en todas las estructuras obtenidas, tratándose muy posiblemente de un agua estructural necesaria para mantener los puentes de hidrógeno y las interacciones en el sitio de nucleación.

La FS-Src-LAH ha cristalizado también unida al péptido rico en prolina VSL12 (VSLARRPLPLP). En estudios anteriores se han obtenido estructuras de los dominios SH3 de la c-Src y la Fyn en presencia de los péptidos NS5A (Shelton & Harris, 2008; Martín-García *et al.*, 2012; Bacarizo *et al.*, 2015), APP12 y VSL12 (Bacarizo *et al.*, 2013; Cámara *et al.*, 2016). La Fyn TQ es uno de los dominios SH3 capaz de unir secuencias ricas en prolina tanto de clase

I (Morton *et al.*, 1996) como clase II (Shelton & Harris, 2008). Además, cada una de las cadenas de la proteína presentes en la misma unidad asimétrica puede interactuar con distintas orientaciones del péptido. Esta peculiaridad se ha observado en otros dominios SH3, como por ejemplo en las proteínas CIN85 y  $\beta$ -PIX en complejo con un péptido prolina-arginina de Cbl-b (Jozic *et al.*, 2005), en el dominio SH3 del extremo amino terminal de la CMS unido a la Cbl-b (Moncalián *et al.*, 2006) y en la cortactina en complejo con el péptido P4 de la AMAP1 (Hashimoto *et al.*, 2006). En todos estos casos, los residuos arginina y lisina juegan un papel clave en la formación de estos complejos (Moncalián *et al.*, 2006). De esta manera, en el complejo  $\beta$ -PIX-Cbl-b las Arg904 y Arg908 del péptido están situadas entre los residuos Trp43 y Trp54 y forman dos puentes salinos con los residuos Asp23 y Glu24 del lazo RT de la proteína. En la estructura CIN85-Cbl-b también se observa este tipo de interacción y en la Fyn-SH3-NS5A, Fyn-SH3-VSL12 y Fyn-SH3-APP12, los residuos Arg8, Arg6 y Arg7 de los péptidos, respectivamente, interactúan a través de un puente salino con el Asp100 de la Fyn-SH3. En este caso, los residuos aromáticos Trp119 y Tyr132 también establecen interacciones catión- $\pi$  con los residuos arginina. En la estructura resuelta durante esta Tesis de la FS-Src-LAH, estas interacciones se mantienen y el Asp100 forma un puente salino con la Arg6 del péptido VSL12. Además, también se observa la interacción del Trp119 a través de su anillo aromático con el grupo guanidino de la Arg6 que se encuentra aproximadamente a 3,5 Å. Las mayores diferencias al comparar la estructura del complejo de la FS-Src-LAH-VSL12 con la Fyn-SH3 y el resto de las quimeras se encuentran en los residuos Tyr91, Trp119 y Tyr137, ya que están involucrados en la unión de los péptidos ricos en prolina. Los cambios conformacionales en las cadenas laterales de los residuos que forman el bolsillo de unión son necesarios para acomodar el péptido.

Al igual que ocurre con la c-Src, el dominio SH3 de la Fyn también se ha cristalizado con varias moléculas en la unidad asimétrica. Por ello hemos analizado las diferencias existentes entre las distintas moléculas presentes. En el caso de la Fyn-SH3, el RMSD al comparar la cadena A de nuestra estructura (PDB: 7A2J) con otra previamente obtenida por nuestro grupo de investigación (PDB: 3UA6) es de 0,42 Å, sin embargo, al comparar las cadenas A y B presentes en la misma unidad asimétrica, el RMSD es de 1,50 Å. Ocurre lo mismo al comparar la cadena A de la c-Src sin el ATCUN (PDB: 6XVN) con la del motivo ATCUN, que tienen un RMSD medio de 0,16 Å, mientras que las dos cadenas de la unidad asimétrica tienen un RMSD de 0,78 Å. En las estructuras en las que hay 4 moléculas en la unidad asimétrica como en la c-

Src (PDB: 6XVM), la SF-2X (PDB: 7A32), la Fyn (PDB: 7A2K) o la FS-RT (PDB: 7A2N) se observan dos cadenas equivalentes entre sí y otras dos distintas, por lo que la presencia de las dos especies del dominio dentro de la misma unidad asimétrica prevalece. Las quimeras FS-Src, FS-Src-E129Q y FS-Src-LAH, en cambio, presentan una única molécula en la unidad asimétrica, sin embargo, en la estructura de la FS-Src-LAH a pH 5,0 con el péptido VSL12 (PDB: 7A2X) se ha podido modelar el lazo distal en su totalidad en dos conformaciones distintas, además de presentar un número significativo de residuos en doble conformación. Esto implica que, a pesar de observar sólo una molécula, sigue habiendo más de una especie en la disolución y que a alta resolución es posible ver esos cambios conformacionales, aunque solo esté presente una cadena en la unidad asimétrica. Las conformaciones del lazo distal presentan diferencias en la distribución de puentes de hidrógeno tal y como se observó previamente en la c-Src (Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2016).

La alta resolución y calidad de los datos nos ha permitido analizar la presencia de iones de sodio. Estos fueron identificados previamente en la estructura de la Fyn-SH3 WT (Martín-García *et al.*, 2012) y ha sido ratificada su presencia en algunas de las estructuras obtenidas en esta Tesis. Los cationes monovalentes como el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> pueden tener relevancia fisiológica en las macromoléculas biológicas (Ayala & Di Cera, 1994). De hecho, en un gran número de enzimas estos cationes metálicos son necesarios para desarrollar correctamente la catálisis, además de actuar como efectores alostéricos que modifican la estructura global de la proteína para dar lugar a su forma activa o inactiva (Suelter, 1970). La trombina representa un gran ejemplo de cómo el ion Na<sup>+</sup> pueden desencadenar eventos moleculares que conducen a importantes cambios en su función fisiológica como es el paso de anticoagulante a procoagulante (Di Cera *et al.*, 1995; Dang *et al.*, 1995).

En esta Tesis hemos modelado iones de sodio tanto en la hélice 3<sub>10</sub> de las proteínas Fyn WT y Fyn-E129Q, como en el lazo n-Src de la SF-2X y SF-Src y en el lazo RT de la FS-RT. Al comparar las estructuras obtenidas con otras proteínas del dominio SH3, como por ejemplo con la Abl, se ha podido observar que en ocasiones se ha modelado una molécula de agua en la posición en la que aparece el sodio en la hélice 3<sub>10</sub> en nuestras estructuras. El patrón de hidratación del dominio SH3 de la Abl ha sido ampliamente estudiado y caracterizado (Palencia *et al.*, 2010; Zafra-Ruano *et al.*, 2012) y se ha sugerido la presencia de aguas interfaciales en dos regiones de la proteína: hélice 3<sub>10</sub> y lazo n-Src. Sin embargo, estructuras a resolución atómica (~1,0 Å), ponen en evidencia la presencia del ion sodio ocupando el puesto de alguna

de estas aguas. La presencia de estos iones sodio se caracteriza estructuralmente por tener unas distancias de enlace menores que las de los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua (2,2-2,3 Å) y una geometría octaédrica al coordinarse con 6 átomos, normalmente de oxígeno. Un ejemplo de este tipo unión se puede observar en una de las estructuras de lisozima obtenida por nuestro grupo de investigación a 1,1 Å (PDB: 6F1R, Plaza-Garrido *et al.*, 2018), proteína que utilizamos en el laboratorio como modelo de distintas técnicas de cristalización (Figura 115). El modelado de este tipo de iones está facilitado por la mayor calidad de los datos cristalográficos. Por ejemplo, en las estructuras de la Abl-SH3 obtenidas a más de 2 Å, como las estructuras con código PDB 3EGU y 3EG0, la resolución no permite modelar los iones sodio ya que tanto el error en las distancias interatómicas como el número de moléculas de agua modeladas se ve afectado por la resolución. En cambio, en la estructura de la Abl-SH3 obtenida a 1,6 Å (PDB: 4JJD), en la Fyn-SH3 (PDB: 7A2J y 7A2K) y en su mutante Fyn-E129Q (PDB: 7A2L) este sodio se modela con argumentos en la hélice 3<sub>10</sub>. Es habitual modelar moléculas de agua en lugar de iones de sodio, ya que la densidad electrónica observada es fácilmente atribuible al átomo de oxígeno de una molécula de agua durante el refinado (Nayal & Di Cera, 1996). Por este motivo existen estudios en los que se han desarrollado métodos capaces de identificar moléculas de agua que podrían estar mal asignadas en una estructura cristalográfica (Nayal & Di Cera, 1996; Müller *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2008).

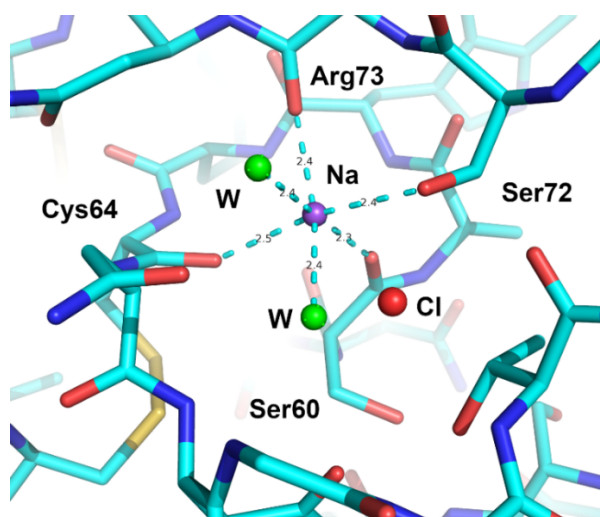


Figura 115. Contacto característico de la lisozima con el ion sodio (morado) a través de los residuos Ser60, Cys64, Ser72 y Arg73 y con dos moléculas de agua (verde). En rojo se muestra el ion cloro.

Los resultados de esta Tesis ponen en evidencia que los datos obtenidos a resolución atómica son esenciales para observar ciertas características de las proteínas que, en algunos casos, pueden tener significado fisiológico. Además, un mejor modelado y caracterización del

solvente podría ser crítico en el desarrollo de nuevos fármacos *in silico*. Los datos cristalográficos a alta resolución, además de facilitar el modelado de las estructuras, revelan características que podrían estar ocultas en las estructuras de las proteínas obtenidas a menor resolución. Así, gracias a la alta resolución, en las proteínas que han cristalizado en un rango amplio de pH (3,0-6,0) se pueden observar cambios conformacionales asociados a este, como por ejemplo las distintas conformaciones de los residuos Asp98, Glu106 y Thr125 en la c-Src y Asp99, Glu107 y Thr126 en el caso de la Fyn-SH3, que provocan modificaciones en la red de puentes de hidrógeno que se forman alrededor de estos residuos y que juegan un papel clave en el estado de transición del plegamiento del dominio SH3.





## **Capítulo 6**

Estudios de formación de fibras amiloides en los dominios c-Src y Fyn SH3 y sus mutantes



En este capítulo analizaremos el efecto que produce la adición de un cosolvente como el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en las transiciones conformacionales y en la formación de agregados oligoméricos de mayor orden, como las fibras amiloides, de las proteínas objeto de estudio. El TFE promueve la formación local de enlaces de hidrógeno al disminuir la polaridad del medio, lo que tiene un efecto en la agregación de las proteínas globulares. Además, este tipo de alcoholes fluorados podrían tener un papel importante a la hora de estabilizar estructuras del estado transición ya que son capaces de inducir y mantener estados parcialmente desplegados no nativos de las proteínas (Viguera *et al.*, 1996; Chiti *et al.*, 1999; Schweimer *et al.*, 2002; Zerovnik *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2010; Sekhar *et al.*, 2011; Chatani *et al.*, 2012; Dammers *et al.*, 2015; Di Carlo *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016).

## 6.1 Cribado de las condiciones de formación de las fibras amiloides

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de solubilidad y estabilidad realizados con las diferentes quimeras y mutantes se diseñó un experimento para cribar las posibles condiciones de formación de fibras amiloides. Se partió de las condiciones utilizadas para formar los amiloides de la c-Src-SH3 WT y se modificó el pH, la concentración de sal (0, 0,1 y 0,5 M) y la temperatura (25, 30 y 37 °C). La concentración utilizada para cada proteína se escogió según su intervalo de solubilidad. Los pHs seleccionados y los tampones utilizados fueron:

- pH 3,0 citrato sódico/ácido cítrico 50 mM.
- pH 5,0 acetato sódico/ácido acético 50 mM.
- pH 7,0 fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM.
- pH 12,0 fosfato trisódico/hidróxido sódico 50 mM.

Para incubar las muestras se utilizó un agitador orbital con termostatación. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 450 rpm y las muestras se incubaron 1 semana. Los resultados obtenidos a 25 °C se muestran de forma esquemática en las tablas 29-37. Los resultados positivos se representan en verde, las disoluciones que se mantuvieron estables en el tiempo se muestran en azul, las muestras con un leve precipitado en suspensión aparecen en naranja y en rojo las proteínas que precipitaron totalmente. Los experimentos realizados a 30 y 37 °C mostraron resultados muy similares, pero con la formación de más precipitado, mientras

que aquellas proteínas que no precipitaban y se mantenían solubles en el tiempo, no llegaban a formar las fibras.

Tabla 29. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 25 °C sin NaCl

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
SF-Src	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue				
SF-Src-Q128E	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
SF-RT	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
SF-2X	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue				
Src-Q128E	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
Src-T125S	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue				
Src-L100I	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
Src-E106D	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
Src-S123T	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
Src-T126S	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue								
Fyn WT	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue
FS-Src	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue
FS-RT	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue
FS-2X	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue

Tabla 30. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 30 °C sin NaCl

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue				
SF-Src-Q128E	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-RT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-2X	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue				
Src-Q128E	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T125S	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue				
Src-L100I	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-E106D	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-S123T	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T126S	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Fyn WT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 31. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 37 °C sin NaCl

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue				
SF-Src-Q128E	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-RT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-2X	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue				
Src-Q128E	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T125S	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue				
Src-L100I	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-E106D	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-S123T	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T126S	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Fyn WT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Orange	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 32. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 25 °C con NaCl 0,1 M

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
SF-Src	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
SF-Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
SF-RT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
SF-2X	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
Src-T125S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-L100I	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
Src-E106D	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
Src-S123T	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
Src-T126S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue								
Fyn WT	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Orange	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 33. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 30 °C con NaCl 0,1 M

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
SF-Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-RT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-2X	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T125S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-L100I	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-E106D	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-S123T	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T126S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Fyn WT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 34. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 37 °C con NaCl 0,1 M

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
SF-Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-RT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-2X	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T125S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-L100I	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-E106D	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-S123T	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T126S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Fyn WT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Orange	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 35. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 25 °C con NaCl 0,5 M

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
SF-Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-Src-EAR	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-RT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
SF-2X	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T125S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-L100I	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-E106D	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-S123T	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Src-T126S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue								
Fyn WT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 36. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 30 °C con NaCl 0,5 M

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
SF-Src	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
SF-Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
SF-Src-EAR	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
SF-RT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
SF-2X	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-Q128E	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
Src-T125S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Blue	Blue				
Src-L100I	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
Src-E106D	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
Src-S123T	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
Src-T126S	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Blue								
Fyn WT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
Fyn-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-LAH	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-Src-E129Q	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-RT	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue
FS-2X	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue

Tabla 37. Representación esquemática de las condiciones de formación de las fibras amiloides a 37 °C con NaCl 0,5 M

pH	5 mg/mL				10 mg/mL				15 mg/mL				20 mg/mL			
	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12	3	5	7	12
c-Src WT	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
SF-Src	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Blue				
SF-Src-Q128E	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
SF-Src-EAR	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
SF-RT	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
SF-2X	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Blue				
Src-Q128E	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
Src-T125S	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Blue				
Src-L100I	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
Src-E106D	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
Src-S123T	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
Src-T126S	Red	Red	Orange	Blue	Red	Red	Red	Blue								
Fyn WT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
Fyn-E129Q	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
FS-Src-LAH	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
FS-Src	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
FS-Src-E129Q	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
FS-RT	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue
FS-2X	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue

Aunque la formación de fibras amiloides fue descrita previamente para el dominio c-Src-SH3 clonada con el motivo ATCUN, no hemos conseguido reproducir la formación de estos agregados con la proteína clonada sin dicho motivo. En todos los casos, una concentración de proteína de 5 mg/mL en ausencia de cloruro sódico evita que estas precipiten en todo el intervalo de pHs ensayado, pero esta concentración no es suficiente para la formación de los amiloides. A partir de los 10 mg/mL, se empezó a observar precipitado en mayor o menor medida a pH ácido, que decantaba en el fondo del tubo Eppendorf transcurridas unas horas.

## 6.2 El 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) como agente inductor de las fibras amiloides en la c-Src-SH3

Se ha ensayado si la adición de ciertas moléculas, como los fluoroalcoholes, pueden favorecer la formación de las fibras amiloides. Este efecto se ha descrito previamente en estudios realizados con proteínas como SOD1 (Kumar *et al.*, 2018), cristalina  $\alpha$  (Khan *et al.*, 2015; Garvey *et al.*, 2017), quimotripsina  $\alpha$  (Pallares *et al.*, 2004), estefina B (Zerovnik *et al.*, 2009), microglobulina  $\beta$ -2 (Yamamoto *et al.*, 2007; Chatani *et al.*, 2012), sinucleína  $\alpha$  (Di carlo *et al.*, 2016), macroglobulina  $\alpha$ -2 (Rehman *et al.*, 2017) o la PI3K SH3 (Lim *et al.*, 2010). Para



caracterizar el comportamiento de la proteína en presencia de TFE se realizaron experimentos con la c-Src-SH3, tanto con la proteína con (ATCUN-SH3) como sin el motivo ATCUN (c-Src-SH3).

### 6.2.1 Caracterización de los equilibrios conformacionales del dominio c-Src-SH3 en presencia de TFE

Los cambios conformacionales en el dominio SH3 de la c-Src en presencia de TFE se estudiaron mediante CD-UV lejano, representando la elipticidad a 222 nm frente a distintas concentraciones de TFE (0-60 %) (Figura 116). La concentración de las proteínas fue de 20  $\mu\text{M}$  en acetato sódico/ácido acético 10 mM a pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 10 mM a pH 7,0. En el caso del dominio ATCUN-SH3 se estudió también el efecto de la adición de  $\text{NiCl}_2$  1 mM. Los datos de los parámetros termodinámicos obtenidos ajustando los datos experimentales a un modelo de dos estados (Ec. 10 y 11) se muestran en la Tabla 38.

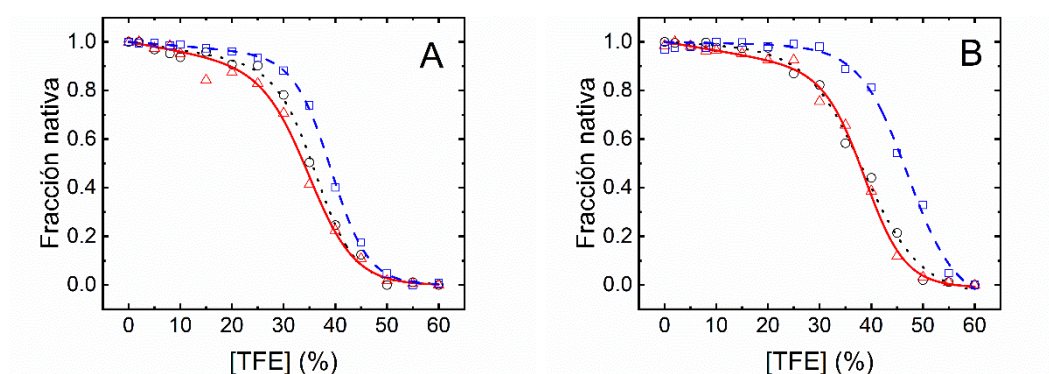


Figura 116. Fracción de proteína nativa del dominio SH3 de la c-Src (negro,  $\cdots\circ\cdots$ ), ATCUN-SH3 en ausencia (rojo,  $-\Delta-$ ), y en presencia  $\text{NiCl}_2$  1 mM (azul,  $---\square---$ ) a pH 5,0 (A) y 7,0 (B) y a concentraciones crecientes de TFE. La elipticidad aumenta a medida que aumenta la cantidad de TFE en la disolución.

Tabla 38. Parámetros termodinámicos obtenidos mediante dicroísmo circular a 25  $^{\circ}\text{C}$

	$m_{1/2}$ (%)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)	$m_{1/2}$ (%)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)
<b>pH</b>		5,0	7,0	
<b>c-Src SH3</b>	32,7 $\pm$ 1,0	14,2 $\pm$ 2,5	39,3 $\pm$ 1,2	19,3 $\pm$ 2,0
<b>ATCUN-SH3</b>	33,0 $\pm$ 1,2	13,6 $\pm$ 1,5	39,2 $\pm$ 1,3	18,8 $\pm$ 1,7
<b>ATCUN-SH3 + <math>\text{Ni}^{2+}</math></b>	39,8 $\pm$ 2,0	18,5 $\pm$ 1,0	47,1 $\pm$ 2,0	23,2 $\pm$ 1,4

La unión del níquel al motivo ATCUN de la c-Src-SH3 sigue aumentando la estabilidad de la proteína, especialmente a pH neutro.

El análisis de las transiciones conformacionales inducidas por el TFE en el dominio c-Src-SH3 se llevó a cabo también midiendo tanto la fluorescencia intrínseca de la proteína como la de la sonda fluorescente ANS a distintas concentraciones de TFE. Las curvas de titulación están representadas en la Figura 117 y los resultados se encuentran en la Tabla 39.

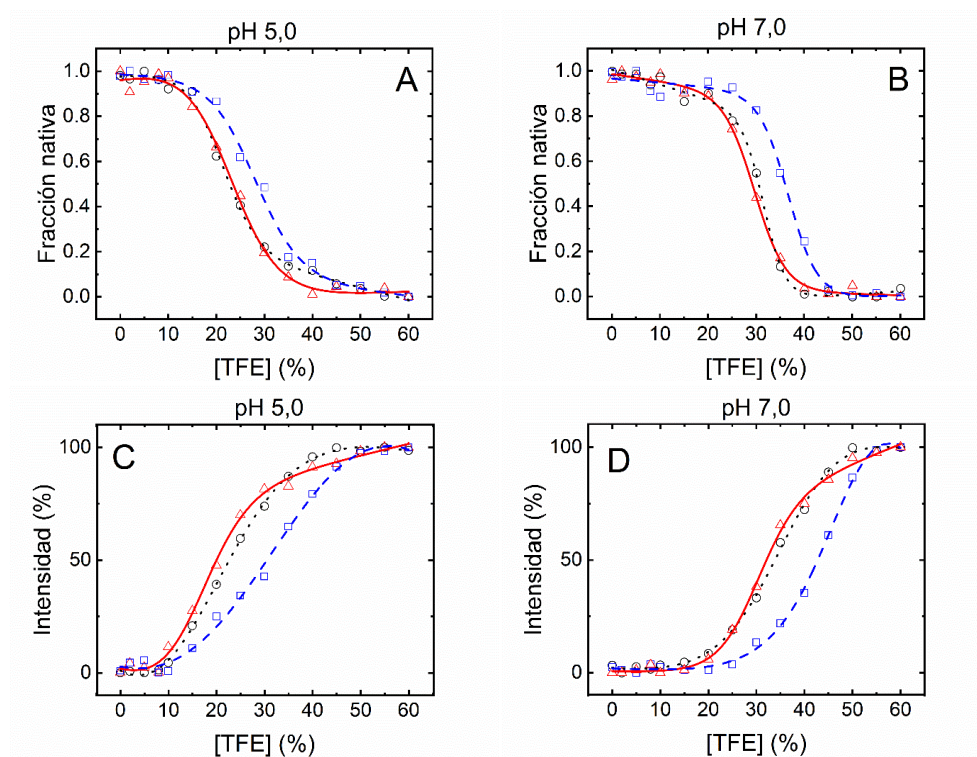


Figura 117. Titulación con TFE monitorizada por la fluorescencia intrínseca a pH 5,0 (A) y 7,0 (B) a una longitud de onda de excitación de 280 nm y concentraciones crecientes de TFE de 0 a 60 %. También se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia del ANS a 480 nm a 25 °C en pH 5,0 (C) y 7,0 (D) de las proteínas c-Src-SH3 (negro,  $\dots\circ\dots$ ), ATCUN-SH3 en ausencia (rojo,  $-\Delta-$ ), y en presencia  $\text{NiCl}_2$  1 mM (azul,  $---\square---$ ).

Tabla 39. Parámetros termodinámicos obtenidos de la desnaturalización con TFE a 25 °C

		$m_{1/2}$ (%)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)	$m_{1/2}$ (%)	$\Delta G_w$ (kJ/mol)
pH		5,0		7,0	
Fluorescencia intrínseca	c-Src SH3	25,8±1,5	12,3±1,8	31,6±2,1	17,8±2,0
	WT-ATCUN	25,2±1,0	12,3±1,2	31,7±1,9	18,2±1,5
	WT-ATCUN + $\text{Ni}^{2+}$	31,3±1,5	17,9±2,0	37,2±2,0	24,5±1,9
ANS	c-Src SH3	24,7±1,0	11,6±1,5	35,2±1,0	17,2±1,3
	WT-ATCUN	23,9±1,1	12,0±1,0	33,8±2,0	18,1±1,5
	WT-ATCUN + $\text{Ni}^{2+}$	30,0±1,0	18,2±1,4	41,2±2,1	25,7±1,4

También se estudió la desnaturalización térmica en presencia del TFE a pH 5,0 y 7,0 y a diferentes concentraciones del cosolvente, correspondientes a la zona de antes (15%), media (30%) y después de la transición (50%). Sin embargo, los parámetros termodinámicos de la

proteína en presencia de TFE al 30 y 50% no se pudieron determinar debido a la gran dispersión de los puntos y la ausencia de una transición clara entre el estado nativo y desnaturado. Las curvas en presencia de un 15 % de TFE se muestran en la Figura 118 y los parámetros termodinámicos obtenidos en la Tabla 40.

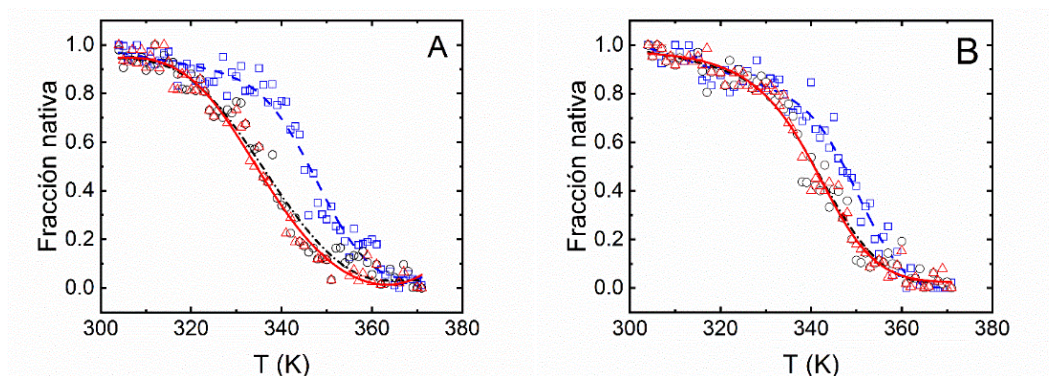


Figura 118. Fracción de proteína nativa de la c-Src-SH3 vs temperatura a pH 5,0 (A) y pH 7,0 (B) seguida a 222 nm en presencia de TFE al 15 %. Se muestra el ajuste para las proteínas: c-Src-SH3 (negro,  $\bullet\text{---}\bullet\text{---}\bullet$ ), ATCUN-SH3 en ausencia (rojo,  $\text{---}\Delta\text{---}$ ), y en presencia  $\text{NiCl}_2$  1 mM (azul,  $\text{---}\square\text{---}$ ).

Tabla 40. Parámetros termodinámicos obtenidos de las desnaturaciones con TFE

	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/mol·K)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kJ/mol)	$\Delta C_p$ (kJ/mol·K)
pH	5,0			7,0		
<b>c-Src-SH3</b>	59,8±0,3	212±21	1,5±0,3	67,3±0,3	234±12	1,7±0,2
<b>ATCUN-SH3</b>	59,2±0,5	224±22	1,6±0,2	67,5±0,2	241±20	1,7±0,3
<b>ATCUN-SH3 + Ni<sup>2+</sup></b>	74,4±1,0	315±31	2,3±0,5	77,3±1,0	356±31	2,6±0,1

Al 15 % de TFE la  $T_m$  tiene una desestabilización de alrededor 12 °C a pH 5,0. El mismo resultado se observa a pH 7,0 pero en este caso el desplazamiento es menor, de 8 °C, tanto en la c-Src-SH3 como en la ATCUN-SH3. La menor estabilidad en presencia del fluoroalcohol puede ser causada por cambios tanto en la estructura secundaria como en el reordenamiento de la estructura terciaria. En presencia de TFE, ambas proteínas c-Src-SH3 y ATCUN-SH3 se comportan de la misma forma y no existen diferencias significativas en el proceso de desnaturación.

### 6.2.2 Caracterización de los estados de oligomerización de la c-Src-SH3 en presencia de TFE

Para analizar el estado de oligomerización en presencia de distintas cantidades de TFE se midió el valor del  $R_h$  de la proteína a 3 mg/mL en el intervalo de concentraciones de TFE de 0

al 10 % en acetato sódico/ácido acético 50 mM a pH 5,0. Se seleccionó este pH ya que fue en el que se observaron mayores discrepancias entre las técnicas utilizadas para caracterizar las transiciones de plegamiento de la proteína, lo que puede ser indicativo de la presencia de oligómeros. Además, a este pH se favorece la formación de las fibras amiloides. En estas medidas no se pudo superar la concentración de TFE al 10 % ya que la muestra era muy polidispersa y la cantidad de agregados de gran tamaño que se formaban impedían medir el pico de la proteína. En la Figura 119 se muestra la variación del  $R_h$  frente a la concentración de TFE y se observa cómo hasta una concentración del 8 % se mantiene estable y a partir de esta concentración aumenta abruptamente formando un agregado de tamaño considerable (unos 500 nm de media). El  $R_h$  de la c-Src-SH3 a TFE 0 % fue el característico del monómero de este dominio SH3, siendo el valor promedio de  $R_h=1,68\pm0,06$  nm. Los resultados de este experimento señalan la formación de agregados de elevada masa molecular a concentraciones de TFE mayores al 10 % que podría tratarse de fibras amiloides.

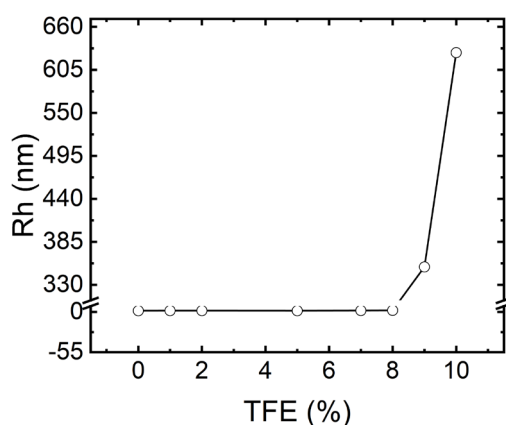


Figura 119. Cambios en el  $R_h$  con el incremento de la concentración de TFE en acetato sódico 50 mM pH 5,0 a 25 °C. El valor medio del  $R_h$  es el característico de este dominio hasta alcanzar una cantidad de TFE del 8-9 %.

### 6.2.3 Formación y cinética de las fibras amiloides en presencia de TFE

Los experimentos de cribado se realizaron con todas las proteínas estudiadas en esta Tesis. En todos los casos se utilizó una concentración de proteína de 2 mg/mL con cantidades de TFE variables del 10 al 40 % en citrato sódico/ácido cítrico 50 mM pH 3,0, acetato sódico/ácido acético 50 mM pH 5,0, fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM pH 7,0 y fosfato trisódico/hidróxido sódico 50 mM pH 12,0. El experimento se realizó a tres temperaturas: 25, 30 y 37 °C. A pH 3,0 todas las muestras precipitaron completamente en todas las temperaturas y a pH neutro y básico, todos los resultados fueron negativos. En la Tabla 41 se muestra de

forma esquemática los resultados obtenidos del experimento para caracterizar la formación de las fibras amiloides en presencia de TFE a pH 5,0. El código de color utilizado es el mismo que en las ocasiones anteriores. Las tres temperaturas estudiadas muestran resultados similares, observando más precipitado a 37 °C. Los resultados positivos se obtuvieron transcurrida una semana de incubación para las muestras con TFE al 10 % y tras 24 h en las muestras con un 20 % de TFE. La presencia de las fibras amiloides se caracterizó mediante tinción con RC observando el desplazamiento batocrómico del espectro UV-Vis, o bien por el aumento de fluorescencia utilizando las sondas fluorescentes ThT y ANS (Figura 120). Para corroborar la presencia de estas fibras amiloides se analizaron mediante TEM.

Tabla 41. Esquema de los resultados obtenidos a distintas concentraciones de TFE y pH 5,0

TFE (%)	25 °C				30 °C				37 °C			
	10%	20%	30%	40%	10%	20%	30%	40%	10%	20%	30%	40%
c-Src WT	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Orange	Red	Red
SF-Src	Blue	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red
SF-Src-Q128E	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
SF-Src-EAR	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
SF-RT	Blue	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red
SF-2X	Blue	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red
Src-Q128E	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Orange	Red	Red
Src-T125S	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Orange	Red	Red
Src-L100I	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Orange	Red	Red
Src-E106D	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Orange	Red	Red
Src-S123T	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Orange	Orange	Red	Red
Src-T126S	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Orange	Red	Red
Fyn WT	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Orange	Orange	Orange
Fyn-E129Q	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Orange	Orange	Orange
FS-Src-LAH	Blue	Blue	Orange	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Orange	Red	Red
FS-Src	Blue	Blue	Orange	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Orange	Red	Red
FS-Src-E129Q	Blue	Blue	Orange	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Orange	Red	Red
FS-RT	Blue	Blue	Orange	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Orange	Red	Red
FS-2X	Blue	Blue	Orange	Red	Blue	Blue	Red	Red	Orange	Orange	Red	Red

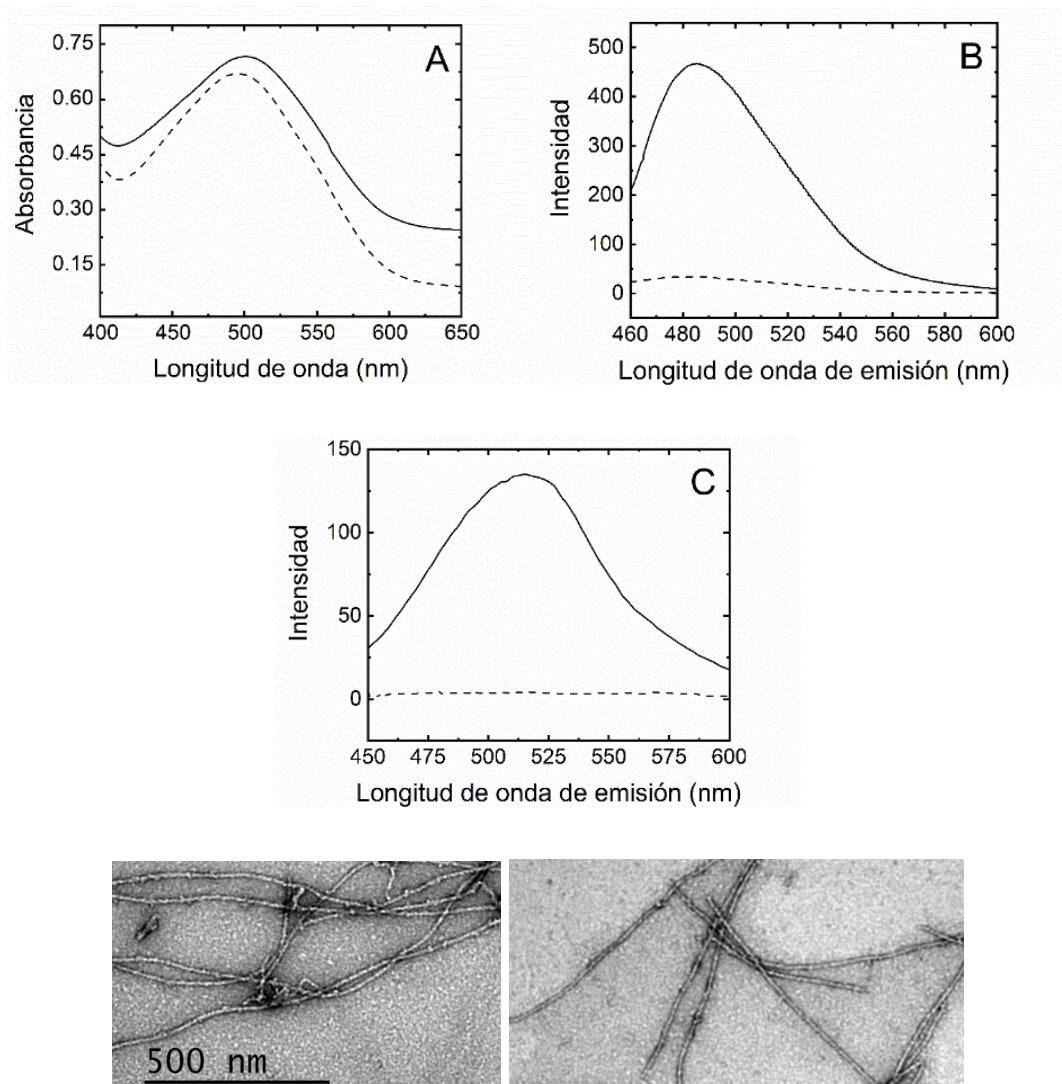


Figura 120. Caracterización de los amiloides de la c-Src-SH3. (A) Espectro de absorbancia de la proteína nativa (línea discontinua) y de la disolución de amiloide (línea sólida) con 20  $\mu\text{M}$  de RC en acetato sódico 50 mM pH 5,0. (B) Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína nativa (línea discontinua) y de la muestra de amiloides (línea sólida) con ThT 12,5  $\mu\text{M}$ . (C) Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína nativa (línea discontinua) y de la muestra de amiloides (línea sólida) con ANS 25  $\mu\text{M}$ . (D) Imágenes de las fibras de la c-Src-SH3 negativamente teñidas y adquiridas con TEM con TFE 10 % a 25 °C en acetato sódico 50 mM pH 5,0 incubadas durante 11 días.

La cinética de formación de las fibras amiloides obtenidas en presencia de TFE de las quimeras y mutantes de la c-Src-SH3 se llevó a cabo a 25 °C midiendo el cambio de fluorescencia con ThT cada 15 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos durante la segunda hora. Las últimas medidas se realizaron cada una hora hasta que el valor de intensidad de fluorescencia en el máximo se mantuvo constante. En el caso de la muestra de amiloide de la c-Src-SH3 con TFE 10 %, la formación se controló midiendo la disolución una vez al día durante 11 días. En el caso de las quimeras SF-Src, SF-RT y SF-2X, la incubación se llevó a cabo a 37 °C con una concentración de TFE del 30 %, mientras que, para el resto de las proteínas

estudiadas, la temperatura se mantuvo a 25 °C y la cantidad de TFE utilizada fue del 20 %. En las Figuras 121 y 122 se muestra la cinética de la formación de amiloides representando la intensidad de fluorescencia normalizada frente al tiempo. Todas las muestras se excitaron a 440 nm y el espectro se recogió entre 450 y 600 nm. Para evitar la saturación, las rendijas de emisión y excitación se mantuvieron durante todo el experimento a una apertura de 5 nm.

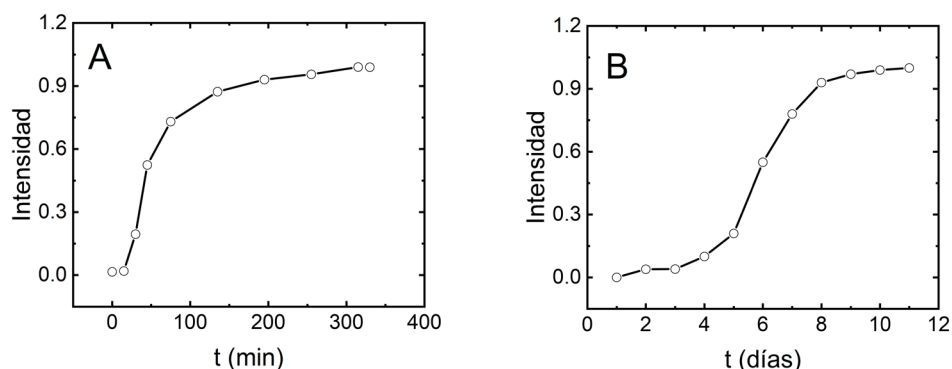


Figura 121. Cinética de amiloides de la c-Src-SH3 en presencia de TFE al 20 % (A) y al 10 % (B). La concentración final de la disolución del amiloide fue de 100  $\mu$ M y la de ThT fue de 12,5  $\mu$ M.

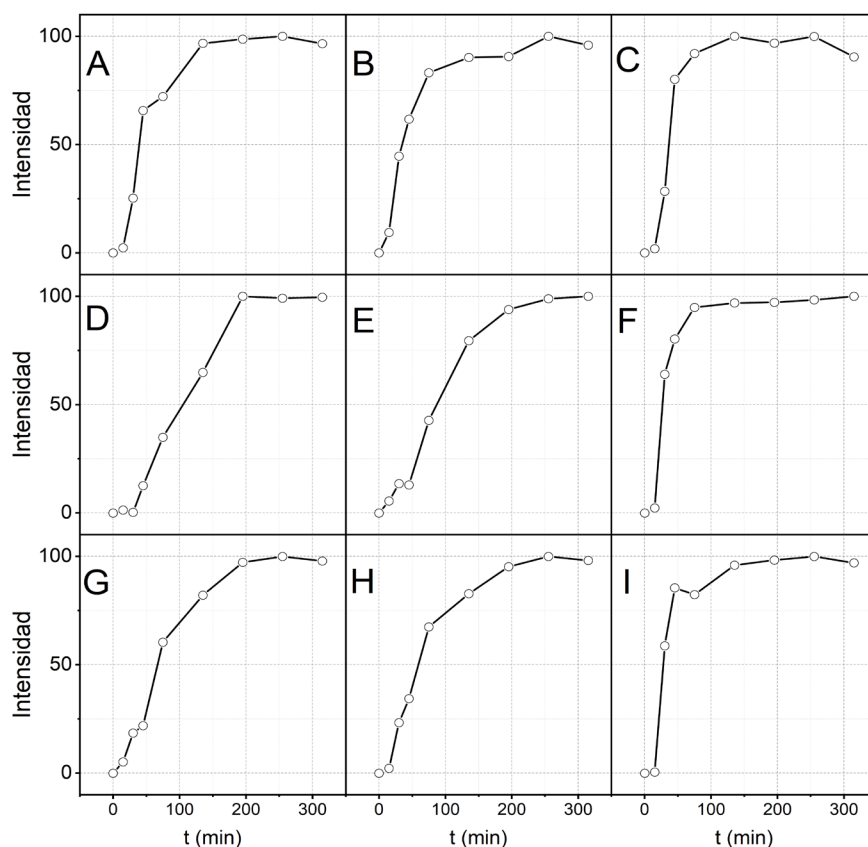


Figura 122. Cinética de amiloides de las proteínas seguida mediante la intensidad de fluorescencia de la ThT: (A) SF-Src, (B) SF-RT, (C) SF-RT, (D) Src-L100I (E) Src-E106D, (F) Src-S123T, (G) Src-T125S, (H) Src-T126S, (I) Src-Q128E. La concentración final de la disolución de amiloide fue de 100  $\mu$ M y la de la Tht 12,5  $\mu$ M. La disolución madre de ThT de la que se partió se encontraba a 2 mM en acetato sódico 0,1 M pH 5,0 guardada en un bote topacio y en oscuridad.

## 6.3 Discusión

En los estudios realizados en esta Tesis elegimos la c-Src-SH3 como proteína modelo para estudiar los plegamientos anómalos o alternativos en proteínas, ya que es una proteína capaz de formar tanto dímeros entrecruzados como fibras amiloides. El mecanismo por el cual se desencadena el proceso de agregación de una proteína para formar las fibras amiloides aún no se conoce con certeza. Información estructural de calidad es sin duda necesaria para ahondar en la resolución de este problema. Los amiloides de proteínas no son cristalizables y solo se ha obtenido la estructura cristalográfica de fragmentos de algunas de las proteínas amiloidogénicas (Balbirnie *et al.*, 2001; Sawaya *et al.*, 2007; Ivanova *et al.*, 2009; Colletier *et al.*, 2011; Saelices *et al.*, 2015). Algunos estudios de las características estructurales de estos agregados se han llevado a cabo a través de cálculos computacionales. Un buen ejemplo son los realizados con algunos dominios SH3 como la c-Src en los que se predice que la proteína forma conformaciones parcialmente desplegadas que compiten entre sí para volver a plegarse o agregar formando oligómeros de mayor orden (Ding *et al.*, 2002; Demakis *et al.*, 2020). Nuestro grupo de investigación fue el primero en demostrar experimentalmente la presencia de los dímeros entrecruzados propuestos computacionalmente por Ding *et al.* (Cámara-Artigas *et al.*, 2009).

Existen hasta la fecha varios dominios SH3 capaces de formar fibras amiloides: la proteína PI3K SH3 (Guijarro *et al.*, 1998A; Guijarro *et al.*, 1998B; Carulla *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2009; Dobson, 2017; Vettore *et al.*, 2019) y su mutante Glu61Lys (Röder *et al.*, 2019), el mutante Asn47Ala de la  $\alpha$ -espectrina (Morel *et al.*, 2006; Castello *et al.*, 2017), la c-Yes SH3 (Martín-García *et al.*, 2007) y el mutante Ala39Val/Asn53Pro/Val55Leu/ $\Delta$ (57-60) de la Fyn-SH3 (Neudecker *et al.*, 2012). Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que la formación de fibras amiloides en la c-Src-SH3 tiene una gran dependencia con el pH y la temperatura, al igual que ocurre con la c-Yes, la  $\alpha$ -espectrina y la PI3K, que son capaces de formar los amiloides a pH ácido y temperaturas moderadas de 25-37 °C. En el caso de la c-Src WT, las fibras se forman a pH ácido y a una concentración >20 mg/mL a 25 °C, mientras que su mutante Gln128Glu los forma a pH neutro, a 10 mg/mL y 37 °C en presencia de NaCl. Esta diferencia observada entre ambas proteínas se ha atribuido a la mutación introducida en la posición 128 (Bacarizo *et al.*, 2014).



En esta Tesis no ha sido posible reproducir las fibras amiloides con la c-Src expresada sin el artefacto de clonación que da lugar al motivo ATCUN. Esto es debido fundamentalmente a que no ha sido posible alcanzar la concentración necesaria para formar las fibras debido a que la ausencia del motivo ATCUN en el extremo amino terminal provoca una disminución significativa de la solubilidad.

Existen diversos aditivos a los cuales se les atribuye un efecto en facilitar la formación de las fibras amiloides. Este es el caso del cosolvente TFE, que es capaz de promover la formación local de enlaces de hidrógeno al disminuir la polaridad del medio, favoreciendo la formación de estructuras en hélice- $\alpha$ . Además, la presencia del TFE en un rango de concentración del 5-40 % induce la agregación de diferentes proteínas globulares, ya que este cosolvente puede formar enlaces de hidrógeno con las proteínas, reduciendo los enlaces intramoleculares de las mismas y favoreciendo la formación de agregados como las fibras amiloides (Srisailam *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2012; Marinelli *et al.*, 2013). Por este motivo, se probó el TFE como agente inductor de las mismas. Previamente a realizar estos experimentos se caracterizó el comportamiento de la proteína en presencia de TFE, tanto de la proteína con el motivo ATCUN como sin los residuos adicionales. Las transiciones conformacionales analizadas por CD y por fluorescencia en presencia de TFE muestran que el proceso de desplegamiento de la proteína sigue un modelo de dos estados, siendo más estable a pH 7,0 que a pH 5,0. Además, la presencia de níquel sigue estabilizando a la ATCUN-SH3, especialmente a pH 7,0. Finalmente para realizar los experimentos de inducción en la formación de las fibras amiloides se eligió la concentración de 5-20 % de TFE y una concentración de proteína de 2 mg/mL. Los resultados muestran una clara dependencia con el pH, ya que se han obtenido amiloides a pH 5,0 y solo para las proteínas relacionadas con la c-Src. Las quimeras SF-Src, SF-RT y SF-2X se han caracterizado por ser más estables que la proteína nativa, siendo capaces de soportar concentraciones de TFE de hasta el 30 % a todas las temperaturas estudiadas. De hecho, las pruebas para la detección de amiloides dieron negativas con una concentración de TFE del 10 %. A diferencia, el mutante Src-S123T que se ha caracterizado por presentar la cinética de formación de amiloides más rápida de todas las proteínas estudiadas, es significativamente más inestable que el resto de las quimeras y mutantes, por lo que nuestros resultados sugieren una relación entre la estabilidad y la tendencia a formar las fibras amiloides. A pesar de la alta homología secuencial entre la c-Src-SH3 y la Fyn-SH3, las quimeras basadas en el dominio

Fyn y su mutante Fyn-E129Q, no forman amiloides en las condiciones estudiadas ni tampoco forman los dímeros entrecruzados, tal y como hemos visto en el capítulo anterior.

Cabe destacar, que de las 10 proteínas que han dado un resultado positivo en la prueba de amiloides, se ha determinado también la estructura del oligómero entrecruzado de 7 de ellas: c-Src WT, SF-Src, SF-Src-Q128E, Src-E106D, Src-T125S, Src-T126S y Src-Q128E. Las estructuras de las especies entrecruzadas obtenidas a través del 3D-DS son conformaciones de baja energía que se pueden estabilizar sobre el monómero mediante la presencia de moléculas pequeñas *in vitro*. Este tipo de oligómeros podrían influir de forma directa en la amiloidogénesis, actuando como precursores de las fibras en determinadas condiciones (Cámara-Artigas, 2016; Dall *et al.*, 2018; Mondal *et al.*, 2019). La relación entre las estructuras entrecruzadas y la formación de los amiloides se ha descrito para varias proteínas relacionadas con enfermedades, como por ejemplo la transtiterina (Laidman *et al.*, 2006), la cistatina C (Janowski *et al.*, 2005) o la microglobulina  $\beta$ -2 (Domanska *et al.*, 2011). A pesar de la coincidencia en la formación de dímeros entrecruzados de muchas proteínas amiloidogénicas, hasta la fecha, no está claro cómo el 3D-DS puede contribuir en la formación de las fibras amiloides.

# **Conclusiones**



De los estudios realizados en esta Tesis hemos alcanzado las siguientes conclusiones:

1. Los estudios comparativos de las proteínas clonadas con y sin el motivo ATCUN muestran que pequeñas trazas de metales divalentes como el níquel o el cobre son capaces de estabilizar a la proteína mediante su unión al motivo ATCUN.

2. El motivo ATCUN aumenta sensiblemente la solubilidad de la proteína y aquellos fenómenos que son dependientes de la concentración, como oligomerización o cristalización, se ven afectados.

3. Se ha estudiado el equilibrio de oligomerización de las proteínas objeto de estudio mediante DLS. La menor solubilidad de la proteína que carece del motivo ATCUN ha impedido alcanzar la concentración de proteína necesaria para formar los dímeros entrecruzados en ausencia de PEG de bajo peso molecular. Sin embargo, la adición de este último favorece la formación de los dímeros a concentraciones de proteína de 5 mg/mL en condiciones ácidas. A pH 7,0 en cambio, el  $R_h$  se mantiene en 1,8 nm, valor característico del monómero del dominio.

4. Tras analizar las estructuras, se ha podido comprobar que no existen prácticamente diferencias entre los dímeros entrecruzados obtenidos y que son muy similares a los descritos previamente para la proteína c-Src-SH3 con el motivo ATCUN (PDB: 4JZ3, Bacarizo *et al.*, 2014). El PEG 300 favorece la formación del dímero entrecruzado, encontrándose en todos los casos en la interfaz de las dos cadenas abiertas de la molécula. En las estructuras de estos dímeros se puede observar que a pesar de los residuos intercambiados en el lazo n-Src se siguen dando las interacciones necesarias para que se forme la especie entrecruzada, por lo que el cambio de estos residuos no afecta de forma significativa a la tendencia de la proteína a formar el dímero. Las mutaciones introducidas en las posiciones 125 y 128 no dan lugar a cambios significativos en la redistribución de los puentes de hidrógeno del sitio de nucleación de las estructuras de los dímeros entrecruzados. Sin embargo, sí que se observan algunas diferencias en el caso del mutante Src-E106D, en el cual se producen cambios en las interacciones con aminoácidos de la cadena generada por simetría. A través del estudio de las estructuras de estas proteínas se ha comprobado que existen residuos indispensables para el 3D-DS en estos dominios, como por ejemplo los aminoácidos Arg95, Glu115 y Asp117.

5. A pesar de todas las condiciones ensayadas, las quimeras de la Fyn-SH3 y el mutante Fyn-E129Q no forman el dímero entrecruzado. Como ejemplo destacado se puede señalar el caso de la FS-Src-LAH, que ha cristalizado a pH ácido y en presencia de PEG 300 al 5 % como un monómero.

6. La FS-Src-LAH se ha caracterizado por cristalizar con gran facilidad tanto sola como en presencia de PEG y del péptido VSL12 y en un rango amplio de pH, desde 3,0 hasta 6,0. También se trata de una de las quimeras más estables. Los cristales de esta proteína producen en general patrones de difracción de alta resolución.

7. Las múltiples estructuras obtenidas en esta Tesis ponen en evidencia la alta flexibilidad del lazo n-Src, ya que prácticamente todas presentan conformaciones distintas de este lazo entre las posiciones 114, 115 y 116. En algunos casos la alta flexibilidad del lazo ha impedido su completo modelado.

8. En las proteínas de las que se ha obtenido la estructura con dos o cuatro cadenas en la unidad asimétrica, se puede observar la existencia de dos poblaciones predominantes que varían principalmente en los lazos n-Src, RT y distal. Estos cambios están asociados también con diferentes conformaciones de las cadenas laterales de ciertos residuos aromáticos que participan en el bolsillo de unión de los motivos ricos en prolina, como los aminoácidos Tyr91, Tyr93, Trp119 y Tyr137. El lazo distal también muestra cambios conformacionales alrededor de los residuos Thr125 y Thr126, provocando un desplazamiento de la cadena principal. De hecho, en algunas estructuras como por ejemplo en la FS-Src-LAH obtenida a pH 5,0 y en presencia del péptido VSL12, ha sido posible modelar el lazo distal en dos conformaciones distintas.

9. Se ha realizado la caracterización biofísica de las proteínas de esta Tesis, estudiando la estabilidad de todas ellas mediante técnicas de fluorescencia y CD. Tras analizar los resultados obtenidos junto con las estructuras determinadas, se ha observado que tanto las quimeras de la c-Src como las de la Fyn se caracterizan por ser bastante estables y que, además, la presencia del lazo RT de la Fyn en la c-Src-SH3 parece estabilizar el monómero de esta. Las proteínas con mutaciones asociadas al residuo 128 sufren cambios en la estabilidad, de manera que, por ejemplo, la SF-Src es más estable que la proteína c-Src nativa, mientras que la proteína SF-Src-Q128E, pierde estabilidad frente a la SF-Src al

introducir la mutación Gln128Glu. Además, las proteínas que presentan la mutación en la posición 128 (o 129 en el caso de la Fyn), sufren una desnaturalización irreversible por acción de la temperatura.

10. Se ha detectado y caracterizado la formación de fibras amiloides. Debido a la menor solubilidad de estos dominios, no se obtuvieron fibras en las condiciones estudiadas previamente ya que las proteínas precipitaban. Sin embargo, la adición del cosolvente TFE actúa como agente inductor del proceso y se han obtenido amiloides para las proteínas c-Src, SF-Src, SF-RT, SF-2X, Src-E106D, Src-L100I, Src-S123T, Src-T125S y Src-T126S a concentraciones de proteína de 2 mg/mL. Al igual que ocurre con los dímeros entrecruzados, en la formación de las fibras también se observa una dependencia con el pH, puesto que en todas las condiciones ensayadas a pHs  $\geq 7,0$  no se observó la presencia de amiloides, mientras que a pH 5,0 sí. En el caso de la Fyn, tanto en sus mutantes como en las proteínas quimeras, todas las pruebas fueron negativas. Estos resultados podrían indicar que la formación de estructuras entrecruzadas, aunque no tengan una contribución directa a la formación de las fibras amiloides, sí pueden compartir los sucesos conformacionales iniciales que conducen a uno u otro proceso de oligomerización anómalo de las proteínas.





## **Bibliografía**



1. Abelein A, Chen G, Kitoka K, Aleksis R, Oleskovs F, Sarr M, Landreh M, Pahnke J, Nordling K, Kronqvist N, Jaudzems K, Rising A, Johansson J, Biverstål H. High-yield Production of Amyloid- $\beta$  Peptide Enabled by a Customized Spider Silk Domain. *Sci Rep.* 2020 Jan 14;10(1):235.
2. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Feb;66(Pt 2):213-21.
3. Afinsen CB, Haber E, Sela M, White FH Jr. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961 Sep 15;47(9):1309-14.
4. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012 Apr;68(Pt 4):352-67.
5. Aghera N, Udgaonkar JB. Stepwise Assembly of  $\beta$ -Sheet Structure during the Folding of an SH3 Domain Revealed by a Pulsed Hydrogen Exchange Mass Spectrometry Study. *Biochemistry.* 2017 Jul 25;56(29):3754-3769.
6. Ahn HC, Le YT, Nagchowdhuri PS, Derose EF, Putnam-Evans C, London RE, Markley JL, Lim KH. NMR characterizations of an amyloidogenic conformational ensemble of the PI3K SH3 domain. *Protein Sci.* 2006 Nov;15(11):2552-7.
7. Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: how and why. *Bioorg Med Chem.* 2005 Sep 1;13(17):5013-20.
8. Amamoto K, Yagi H, Ozawa D, Sasahara K, Naiki H, Goto Y. Thiol compounds inhibit the formation of amyloid fibrils by  $\beta$  2-microglobulin at neutral pH. *J Mol Biol.* 2008 Feb 8;376(1):258-68.
9. Anderson VL, Webb WW. A desolvation model for trifluoroethanol-induced aggregation of enhanced green fluorescent protein. *Biophys J.* 2012 Feb 22;102(4):897-906.
10. Arnold FH, Zhang JH. Metal-mediated protein stabilization. *Trends Biotechnol.* 1994 May;12(5):189-92.
11. Arzensek. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*, 2010.
12. Athanasiadis A, Placido D, Maas S, Brown BA 2nd, Lowenhaupt K, Rich A. The crystal structure of the Zbeta domain of the RNA-editing enzyme ADAR1 reveals distinct conserved surfaces among Z-domains. *J Mol Biol.* 2005 Aug 19;351(3):496-507.
13. avino C, Miele AE, Draghi F, Johnson KA, Sciara G, Brunori M, Vallone B. Pattern of cavities in globins: the case of human hemoglobin. *Biopolymers.* 2009 Dec;91(12):1097-107.
14. Ayala Y, Di Cera E. Molecular recognition by thrombin. Role of the slow-->fast transition, site-specific ion binding energetics and thermodynamic mapping of structural components. *J Mol Biol.* 1994 Jan 14;235(2):733-46.
15. Bacarizo J, Camara-Artigas A. Atomic resolution structures of the c-Src SH3 domain in complex with two high-affinity peptides from classes I and II. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013 May;69(Pt 5):756-66.
16. Bacarizo J, Martínez-Rodríguez S, Cámara-Artigas A. Structure of the c-Src-SH3 domain in complex with a proline-rich motif of NS5A protein from the hepatitis C virus. *J Struct Biol.* 2015 Jan;189(1):67-72.
17. Bacarizo J, Martinez-Rodriguez S, Martin-Garcia JM, Andujar-Sanchez M, Ortiz-Salmeron E, Neira JL, Camara-Artigas A. Electrostatic effects in the folding of the SH3 domain of the

- c-Src tyrosine kinase: pH-dependence in 3D-domain swapping and amyloid formation. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12):e113224.
18. Bagautdinov B. The structures of the CutA1 proteins from *Thermus thermophilus* and *Pyrococcus horikoshii*: characterization of metal-binding sites and metal-induced assembly. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Apr;70(Pt 4):404-13.
  19. Baker MA, Hynson RM, Ganuelas LA, Mohammadi NS, Liew CW, Rey AA, Duff AP, Whitten AE, Jeffries CM, Delalez NJ, Morimoto YV, Stock D, Armitage JP, Turberfield AJ, Namba K, Berry RM, Lee LK. Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Mar;23(3):197-203.
  20. Baker, D., Riddle, D. S., Grantcharova, V. P., Santiago, J. V., Alm, E. & Ruczinski, I. Integrative approaches to protein folding. *Nat Struct Biol*. 1999 Dec;6(12):1079-80.
  21. Balbirnie M, Grothe R, Eisenberg DS. An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated beta-sheet structure for amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2375-80.
  22. Ball LJ, Kühne R, Schneider-Mergener J, Oschkinat H. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005 May 6;44(19):2852-69.
  23. Bart SM, Cohen C, Dye JM, Shorter J, Bates P. Enhancement of Ebola virus infection by seminal amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 10;115(28):7410-7415.
  24. Bennett MJ, Choe S, Eisenberg D. Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci*. 1994 Sep;3(9):1444-63.
  25. Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci*. 1995 Dec;4(12):2455-68.
  26. Benseny-Cases N, Karamanos TK, Hoop CL, Baum J, Radford SE. Extracellular matrix components modulate different stages in  $\beta$ 2-microglobulin amyloid formation. *J Biol Chem*. 2019 Jun 14;294(24):9392-9401.
  27. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, Planté-Bordeneuve V, Barroso FA, Merlini G, Obici L, Scheinberg M, Brannagan TH 3rd, Litchy WJ, Whelan C, Drachman BM, Adams D, Heitner SB, Conceição I, Schmidt HH, Vita G, Campistol JM, Gamez J, Gorevic PD, Gane E, Shah AM, Solomon SD, Monia BP, Hughes SG, Kwoh TJ, McEvoy BW, Jung SW, Baker BF, Ackermann EJ, Gertz MA, Coelho T. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018 Jul 5;379(1):22-31.
  28. Bergdoll M, Remy MH, Cagnon C, Masson JM, Dumas P. Proline-dependent oligomerization with arm exchange. *Structure*. 1997 Mar 15;5(3):391-401.
  29. Berndt S, Gurevich VV, Iverson TM. Crystal structure of the SH3 domain of human Lyn non-receptor tyrosine kinase. *PLoS One*. 2019 Apr 10;14(4):e0215140.
  30. Berne BJ. *Dynamic Light Scattering: With Application to Chemistry, Biology and Physics*. Dover Publications, 3<sup>a</sup> edición. 2000.
  31. Berson JF, Theos AC, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol*. 2003 May 12;161(3):521-33.
  32. Bleem A, Christiansen G, Madsen DJ, Maric H, Strømgaard K, Bryers JD, Daggett V, Meyer RL, Otzen DE. Protein Engineering Reveals Mechanisms of Functional Amyloid Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Mol Biol*. 2018 Oct 12;430(20):3751-3763.
  33. Bleem A, Daggett V. Structural and functional diversity among amyloid proteins: Agents of disease, building blocks of biology, and implications for molecular engineering. *Biotechnol Bioeng*. 2017 Jan;114(1):7-20.
  34. Blommel PG, Fox BG. A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease. *Protein Expr Purif*. 2007 Sep;55(1):53-68.

35. Bohl TE, Shi K, Lee JK, Aihara H. Crystal structure of lipid A disaccharide synthase LpxB from *Escherichia coli*. *Nat Commun*. 2018 Jan 25;9(1):377.
36. Bollati M, Scalone E, Boni F, Mastrangelo E, Giorgino T, Milani M, de Rosa M. High-resolution crystal structure of gelsolin domain 2 in complex with the physiological calcium ion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Oct 8;518(1):94-99.
37. Boni F, Milani M, Barbiroli A, Diomede L, Mastrangelo E, de Rosa M. Gelsolin pathogenic Gly167Arg mutation promotes domain-swap dimerization of the protein. *Hum Mol Genet*. 2018 Jan 1;27(1):53-65.
38. Bonjack-Shterengartz M, Avnir D. The enigma of the near-symmetry of proteins: Domain swapping. *PLoS One*. 2017 Jul 14;12(7):e0180030.
39. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*. 2000;326:245-54.
40. Buck M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q Rev Biophys*. 1998 Aug;31(3):297-355.
41. Cámara-Artigas A, Andújar-Sánchez M, Ortiz-Salmerón E, Cuadri C, Casares S. The effect of a proline residue on the rate of growth and the space group of alpha-spectrin SH3-domain crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2009 Dec;65(Pt 12):1247-52.
42. Cámara-Artigas A, Gavira JA, Casares S, Garcia-Ruiz JM, Conejero-Lara F, Allen JP, Martinez JC. Understanding the polymorphic behaviour of a mutant of the  $\alpha$ -spectrin SH3 domain by means of two 1.1 Å resolution structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011 Mar;67(Pt 3):189-96.
43. Cámara-Artigas A, Martínez-Rodríguez S, Ortiz-Salmerón E, Martín-García JM. 3D domain swapping in a chimeric c-Src SH3 domain takes place through two hinge loops. *J Struct Biol*. 2014 Apr;186(1):195-203.
44. Cámara-Artigas A, Martínez-Rodríguez S, Ortiz-Salmerón E, Martín-García JM. 3D domain swapping in a chimeric c-Src SH3 domain takes place through two hinge loops. *J Struct Biol*. 2014 Apr;186(1):195-203.
45. Cámara-Artigas A, Martín-García JM, Morel B, Ruiz-Sanz J, Luque I. Intertwined dimeric structure for the SH3 domain of the c-Src tyrosine kinase induced by polyethylene glycol binding. *FEBS Lett*. 2009 Feb 18;583(4):749-53.
46. Camara-Artigas A, Ortiz-Salmeron E, Andujar-Sánchez M, Bacarizo J, Martin-Garcia JM. The role of water molecules in the binding of class I and II peptides to the SH3 domain of the Fyn tyrosine kinase. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2016 Sep;72(Pt 9):707-12.
47. Cámara-Artigas A, Palencia A, Martínez JC, Luque I, Gavira JA, García-Ruiz JM. Crystallization by capillary counter-diffusion and structure determination of the N114A mutant of the SH3 domain of Abl tyrosine kinase complexed with a high-affinity peptide ligand. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007 May;63(Pt 5):646-52.
48. Cámara-Artigas A. Crystallographic studies on protein misfolding: Domain swapping and amyloid formation in the SH3 domain. *Arch Biochem Biophys*. 2016 Jul 15;602:116-126.
49. Canals A, Pous J, Guasch A, Benito A, Ribó M, Vilanova M, Coll M. The structure of an engineered domain-swapped ribonuclease dimer and its implications for the evolution of proteins toward oligomerization. *Structure*. 2001 Oct;9(10):967-76.
50. Carulla N, Caddy GL, Hall DR, Zurdo J, Gairí M, Feliz M, Giralt E, Robinson CV, Dobson CM. Molecular recycling within amyloid fibrils. *Nature*. 2005 Jul 28;436(7050):554-8.
51. Casares S, López-Mayorga O, Vega MC, Cámara-Artigas A, Conejero-Lara F. Cooperative propagation of local stability changes from low-stability and high-stability regions in a SH3 domain. *Proteins*. 2007 May 15;67(3):531-47.

52. Casares S, Sadqi M, López-Mayorga O, Conejero-Lara F, van Nuland NA. Detection and characterization of partially unfolded oligomers of the SH3 domain of alpha-spectrin. *Biophys J*. 2004 Apr;86(4):2403-13.
53. Castello F, Paredes JM, Ruedas-Rama MJ, Martin M, Roldan M, Casares S, Orte A. Two-Step Amyloid Aggregation: Sequential Lag Phase Intermediates. *Sci Rep*. 2017 Jan 9;7:40065.
54. Chatani E, Yagi H, Naiki H, Goto Y. Polymorphism of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol. *J Biol Chem*. 2012 Jun 29;287(27):22827-37.
55. Chatani E, Yagi H, Naiki H, Goto Y. Polymorphism of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol. *J Biol Chem*. 2012 Jun 29;287(27):22827-37.
56. Chen H, Tong S, Li X, Wu J, Zhu Z, Niu L, Teng M. Structure of the second PDZ domain from human zonula occludens 2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2009 Apr 1;65(Pt 4):327-30.
57. Chen LY, Huang YC, Huang ST, Hsieh YC, Guan HH, Chen NC, Chuankhayan P, Yoshimura M, Tai MH, Chen CJ. Domain swapping and SMYD1 interactions with the PWWP domain of human hepatoma-derived growth factor. *Sci Rep*. 2018 Jan 10;8(1):287.
58. Chen S, Brier S, Smithgall TE, Engen JR. The Abl SH2-kinase linker naturally adopts a conformation competent for SH3 domain binding. *Protein Sci*. 2007 Apr;16(4):572-81.
59. Chirgadze DY, Demydchuk M, Becker M, Moran S, Paoli M. Snapshot of protein structure evolution reveals conservation of functional dimerization through intertwined folding. *Structure*. 2004 Aug;12(8):1489-94.
60. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86:27-68.
61. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86:27-68.
62. Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3590-4.
63. Chrabaszczewska M, Sieradzan AK, Rodziewicz-Motowidło S, Grubb A, Dobson CM, Kumita JR, Kozak M. Structural Characterization of Covalently Stabilized Human Cystatin C Oligomers. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 15;21(16):5860.
64. Cohen SIA, Cukalevski R, Michaels TCT, Šarić A, Törnquist M, Vendruscolo M, Dobson CM, Buell AK, Knowles TPJ, Linse S. Distinct thermodynamic signatures of oligomer generation in the aggregation of the amyloid- $\beta$  peptide. *Nat Chem*. 2018 May;10(5):523-531.
65. Colletier JP, Laganowsky A, Landau M, Zhao M, Soriaga AB, Goldschmidt L, Flot D, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg D. Molecular basis for amyloid-beta polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 11;108(41):16938-43.
66. Cozza C, Neira JL, Florencio FJ, Muro-Pastor MI, Rizzuti B. Intrinsically disordered inhibitor of glutamine synthetase is a functional protein with random-coil-like pKa values. *Protein Sci*. 2017 Jun;26(6):1105-1115.
67. Crestfield AM, Stein WH, Moore S. On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease. *Arch Biochem Biophys*. 1962 Sep;Suppl 1:217-22..
68. Dai B, Sargent CJ, Gui X, Liu C, Zhang F. Fibril Self-Assembly of Amyloid-Spider Silk Block Polypeptides. *Biomacromolecules*. 2019 May 13;20(5):2015-2023.
69. Dalgarno DC, Botfield MC, Rickles RJ. SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers*. 1997;43(5):383-400.

70. Dang OD, Vindigni A, Di Cera E. An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 20;92(13):5977-81.
71. Dasgupta A, Udgaonkar JB. Four-state folding of a SH3 domain: salt-induced modulation of the stabilities of the intermediates and native state. *Biochemistry*. 2012 Jun 12;51(23):4723-34.
72. Demakis C, Childers MC, Daggett V. Conserved patterns and interactions in the unfolding transition state across SH3 domain structural homologues. *Protein Sci*. 2020 Nov 14;30(2):391-407.
73. Di Carlo MG, Vetri V, Buscarino G, Leone M, Vestergaard B, Foderà V. Trifluoroethanol modulates  $\alpha$ -synuclein amyloid-like aggregate formation, stability and dissolution. *Biophys Chem*. 2016 Sep;216:23-30.
74. Di Cera E, Guinto ER, Vindigni A, Dang QD, Ayala YM, Wuyi M, Tulinsky A. The Na<sup>+</sup> binding site of thrombin. *J Biol Chem*. 1995 Sep 22;270(38):22089-92.
75. Ding F, Dokholyan NV, Buldyrev SV, Stanley HE, Shakhnovich EI. Molecular dynamics simulation of the SH3 domain aggregation suggests a generic amyloidogenesis mechanism. *J Mol Biol*. 2002 Dec 6;324(4):851-7.
76. Dobson CM. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci*. 1999 Sep;24(9):329-32.
77. Dobson CM. Protein-misfolding diseases: Getting out of shape. *Nature*. 2002 Aug 15;418:729-730.
78. Dobson CM. The Amyloid Phenomenon and Its Links with Human Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Jun 1;9(6):a023648.
79. Domanska K, Vanderhaegen S, Srinivasan V, Pardon E, Dupeux F, Marquez JA, Giorgetti S, Stoppini M, Wyns L, Bellotti V, Steyaert J. Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 25;108(4):1314-9.
80. Donaldson LW, Skrynnikov NR, Choy WY, Muhandiram DR, Sarkar B, Forman-Kay JD, Kay LE. Structural characterization of proteins with an attached ATCUN motif by paramagnetic relaxation enhancement NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 2001 Oct 10;123(40):9843-7.
81. Dutta K, Shi H, Cruz-Chu ER, Kami K, Ghose R. Dynamic influences on a high-affinity, high-specificity interaction involving the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Biochemistry*. 2004 Jun 29;43(25):8094-106.
82. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1188-203.
83. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126-32.
84. Esposito L, Daggett V. Insight into ribonuclease A domain swapping by molecular dynamics unfolding simulations. *Biochemistry*. 2005 Mar 8;44(9):3358-68.
85. Esposito L, Donnarumma F, Ruggiero A, Leone S, Vitagliano L, Picone D. Structure, stability and aggregation propensity of a Ribonuclease A-Onconase chimera. *Int J Biol Macromol*. 2019 Jul 15;133:1125-1133.
86. Fagagnini A, Montioli R, Caloiu A, Ribó M, Laurents DV, Gotte G. Extensive deamidation of RNase A inhibits its oligomerization through 3D domain swapping. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2017 Jan;1865(1):76-87.
87. Fagagnini A, Pica A, Fasoli S, Montioli R, Donadelli M, Cordani M, Butturini E, Acquasaliente L, Picone D, Gotte G. Onconase dimerization through 3D domain swapping: structural investigations and increase in the apoptotic effect in cancer cells. *Biochem J*. 2017 Nov 6;474(22):3767-3781.

88. Fang Y, Xue J, Gao S, Lu A, Yang D, Jiang H, He Y, Shi K. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the "PEG dilemma" in efficient drug delivery. *Drug Deliv.* 2017 Dec;24(sup1):22-32.
89. Fanning AS, Lye MF, Anderson JM, Lavie A. Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *J Biol Chem.* 2007 Dec 28;282(52):37710-6.
90. Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science.* 1994 Nov 18;266(5188):1241-7.
91. Feng S, Kasahara C, Rickles RJ, Schreiber SL. Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12408-15.
92. Filimonov D, Poroikov V, Borodina Y, Glorizova T. Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors, *J Chem Inf Comput Sci.* 1999 Jun 10;39(4):666-670.
93. Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 2006 Jan;4(1):e6.
94. Garvey M, Ecroyd H, Ray NJ, Gerrard JA, Carver JA. Functional Amyloid Protection in the Eye Lens: Retention of  $\alpha$ -Crystallin Molecular Chaperone Activity after Modification into Amyloid Fibrils. *Biomolecules.* 2017 Sep 12;7(3):67.
95. Gast K, Zirwer D, Müller-Frohne M, Damaschun G. Trifluoroethanol-induced conformational transitions of proteins: insights gained from the differences between alpha-lactalbumin and ribonuclease A. *Protein Sci.* 1999 Mar;8(3):625-34.
96. Gawronski J, Skowronek P. Electronic circular dichroism for chiral analysis, *Chiral Anal.* 2006;397-459.
97. Geddes AJ, Parker KD, Atkins EDT, Beighton E. "Cross- $\beta$ " conformation in proteins, *J Mol Biol.* 1968 Mar 14; 32(2):343-344.
98. Gertz MA. Hereditary ATTR amyloidosis: burden of illness and diagnostic challenges. *Am J Manag Care.* 2017 Jun;23(7 Suppl):S107-S112.
99. Ghahghaei A, Faridi N. Structure of amyloid fibril in diseases. *J Biomed Eng.* 2009 Jan;2:345-358.
100. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* 1989 Nov 1;182(2):319-26.
101. Gnanakaran S, Garcia AE. Folding of a highly conserved diverging turn motif from the SH3 domain. *Biophys J.* 2003 Mar;84(3):1548-62.
102. Gosser YQ, Zheng J, Overduin M, Mayer BJ, Cowburn D. The solution structure of Abl SH3, and its relationship to SH2 in the SH(32) construct. *Structure.* 1995 Oct 15;3(10):1075-86.
103. Gotte G, Libonati M. Oligomerization of ribonuclease A: two novel three-dimensional domain-swapped tetramers. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36670-9.
104. Grantcharova VP, Baker D. Folding dynamics of the src SH3 domain. *Biochemistry.* 1997 Dec 16;36(50):15685-92.
105. Grantcharova VP, Riddle DS, Baker D. Long-range order in the src SH3 folding transition state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7084-9.
106. Grantcharova VP, Riddle DS, Santiago JV, Baker D. Important role of hydrogen bonds in the structurally polarized transition state for folding of the src SH3 domain. *Nat Struct Biol.* 1998 Aug;5(8):714-20.
107. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell.* 2003 May 2;113(3):343-55.



108. Grohe K, Patel S, Hebrank C, Medina S, Klein A, Rovó P, Vasa SK, Singh H, Vögeli B, Schäfer LV, Linser R. Protein Motional Details Revealed by Complementary Structural Biology Techniques. *Structure*. 2020 Sep 1;28(9):1024-1034.e3.
109. Gronenborn AM. Protein acrobatics in pairs--dimerization via domain swapping. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Feb;19(1):39-49.
110. Guijarro JI, Morton CJ, Plaxco KW, Campbell ID, Dobson CM. Folding kinetics of the SH3 domain of PI3 kinase by real-time NMR combined with optical spectroscopy. *J Mol Biol*. 1998A Feb 27;276(3):657-67.
111. Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID, Dobson CM. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998B Apr 14;95(8):4224-8.
112. Hamada D, Chiti F, Guijarro JI, Kataoka M, Taddei N, Dobson CM. Evidence concerning rate-limiting steps in protein folding from the effects of trifluoroethanol. *Nat Struct Biol*. 2000 Jan;7(1):58-61.
113. Hane F. Are amyloid fibrils molecular spandrels? *FEBS Lett*. 2013 Nov 15;587(22):3617-9.
114. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 Jul 19;297(5580):353-6.
115. Harkiolaki M, Gilbert RJ, Jones EY, Feller SM. The C-terminal SH3 domain of CRKL as a dynamic dimerization module transiently exposing a nuclear export signal. *Structure*. 2006 Dec;14(12):1741-53.
116. Harper DC, Theos AC, Herman KE, Tenza D, Raposo G, Marks MS. Premelanosome amyloid-like fibrils are composed of only golgi-processed forms of Pmel17 that have been proteolytically processed in endosomes. *J Biol Chem*. 2008 Jan 25;283(4):2307-22.
117. Hasecke F, Miti T, Perez C, Barton J, Schölzel D, Gremer L, Grüning CSR, Matthews G, Meisl G, Knowles TPJ, Willbold D, Neudecker P, Heise H, Ullah G, Hoyer W, Muschol M. Origin of metastable oligomers and their effects on amyloid fibril self-assembly. *Chem Sci*. 2018 Jun 13;9(27):5937-5948.
118. Hashimoto S, Hirose M, Hashimoto A, Morishige M, Yamada A, Hosaka H, Akagi K, Ogawa E, Oneyama C, Agatsuma T, Okada M, Kobayashi H, Wada H, Nakano H, Ikegami T, Nakagawa A, Sabe H. Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):7036-41.
119. Higgins MA, Suits MD, Marsters C, Boraston AB. Structural and functional analysis of fucose-processing enzymes from *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol*. 2014 Apr 3;426(7):1469-82.
120. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its oxygen dissociation curve, *J Physiol Paris*. 1910 Jan 22;40:i--vii.
121. Hirota S. Oligomerization of cytochrome c, myoglobin, and related heme proteins by 3D domain swapping. *J Inorg Biochem*. 2019 May;194:170-179.
122. Hosoe Y, Numoto N, Inaba S, Ogawa S, Morii H, Abe R, Ito N, Oda M. Structural and functional properties of Grb2 SH2 dimer in CD28 binding. *Biophys Physicobiol*. 2019 Feb 22;16:80-88.
123. Hu R, Ren B, Zhang M, Chen H, Liu Y, Liu L, Gong X, Jiang B, Ma J, Zheng J. Seed-Induced Heterogeneous Cross-Seeding Self-Assembly of Human and Rat Islet Polypeptides. *ACS Omega*. 2017 Mar 31;2(3):784-792.
124. Huang Y, Gao M, Su Z. Exploring the Roles of Proline in Three-Dimensional Domain Swapping from Structure Analysis and Molecular Dynamics Simulations. *Protein J*. 2018 Feb;37(1):13-20.
125. Huculeci R, Garcia-Pino A, Buts L, Lenaerts T, van Nuland N. Structural insights into the intertwined dimer of fyn SH2. *Protein Sci*. 2015 Dec;24(12):1964-78.

126. Huculeci R, Kieken F, Garcia-Pino A, Buts L, van Nuland N, Lenaerts T. Structural Characterization of Monomeric/Dimeric State of p59fyn SH2 Domain. *Methods Mol Biol.* 2017;1555:257-267.
127. Humenik M, Mohrand M, Scheibel T. Self-Assembly of Spider Silk-Fusion Proteins Comprising Enzymatic and Fluorescence Activity. *Bioconjug Chem.* 2018 Apr 18;29(4):898-904.
128. Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA, Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Dec;19(12):755-773.
129. Ivanov D, Stone JR, Maki JL, Collins T, Wagner G. Mammalian SCAN domain dimer is a domain-swapped homolog of the HIV capsid C-terminal domain. *Mol Cell.* 2005 Jan 7;17(1):137-43.
130. Ivanov D, Tsodikov OV, Kasanov J, Ellenberger T, Wagner G, Collins T. Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4353-8.
131. Ivanova MI, Sievers SA, Sawaya MR, Wall JS, Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 10;106(45):18990-5.
132. Jadoul M, Drüeke TB.  $\beta$ 2 microglobulin amyloidosis: an update 30 years later. *Nephrol Dial Transplant.* 2016 Apr;31(4):507-9.
133. Janowski R, Kozak M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M, Jaskolski M. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol.* 2001 Apr;8(4):316-20.
134. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1993 May 11;32(18):4693-7.
135. Jaskólski M. 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim Pol.* 2001;48(4):807-27.
136. Ji P, Yang G, Zhang J, Wu J, Chen Z, Gong Q, Wu J, Shi Y. Solution structure of the second PDZ domain of Zonula Occludens 1. *Proteins.* 2011 Apr;79(4):1342-6.
137. Jiménez JL, Guijarro JI, Orlova E, Zurdo J, Dobson CM, Sunde M, Saibil HR. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* 1999 Feb 15;18(4):815-21.
138. Johnson WC Jr. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins.* 1990;7(3):205-14.
139. Jozic D, Cárdenes N, Deribe YL, Moncalián G, Hoeller D, Groemping Y, Dikic I, Rittinger K, Bravo J. Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Nov;12(11):972-9.
140. Kamiie J, Aihara N, Uchida Y, Kobayashi D, Yoshida Y, Kuroda T, Sakaue M, Sugihara Y, Rezeli M, Marko-Varga G. Amyloid-specific extraction using organic solvents. *MethodsX.* 2020 Jan 27;7:100770.
141. Karamanos TK, Jackson MP, Calabrese AN, Goodchild SC, Cawood EE, Thompson GS, Kalverda AP, Hewitt EW, Radford SE. Structural mapping of oligomeric intermediates in an amyloid assembly pathway. *Elife.* 2019 Sep 25;8:e46574.
142. Karen M, Louise S. Insights into the Structure of Amyloid Fibrils. *The Open Biology Journal.* 2009 Dec;209:185-192.
143. Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 2000 Feb;14(2):231-41.
144. Kenney JM, Knight D, Wise MJ, Vollrath F. Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur J Biochem.* 2002 Aug;269(16):4159-63.

145. Khan MS, Tabrez S, Bhat SA, Rabbani N, Al-Senaidy AM, Bano B. Effect of trifluoroethanol on  $\alpha$ -crystallin: folding, aggregation, amyloid, and cytotoxicity analysis. *J Mol Recognit*. 2016 Jan;29(1):33-40.
146. Khan MV, Rabbani G, Ahmad E, Khan RH. Fluoroalcohols-induced modulation and amyloid formation in conalbumin. *Int J Biol Macromol*. 2014 Sep;70:606-14.
147. Kilambi KP, Gray JJ. Rapid calculation of protein pKa values using Rosetta. *Biophys J*. 2012 Aug 8;103(3):587-595.
148. Kim Y, Wall JS, Meyer J, Murphy C, Randolph TW, Manning MC, Solomon A, Carpenter JF. Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):1570-4.
149. Kimberlin CR, Meshcheriakova A, Palty R, Raveh A, Karbat I, Reuveny E, Minor DL Jr. SARAF Luminal Domain Structure Reveals a Novel Domain-Swapped  $\beta$ -Sandwich Fold Important for SOCE Modulation. *J Mol Biol*. 2019 Jul 12;431(15):2869-2883.
150. Kishan KV, Newcomer ME, Rhodes TH, Guilliot SD. Effect of pH and salt bridges on structural assembly: molecular structures of the monomer and intertwined dimer of the Eps8 SH3 domain. *Protein Sci*. 2001 May;10(5):1046-55.
151. Kishan KV, Scita G, Wong WT, Di Fiore PP, Newcomer ME. The SH3 domain of Eps8 exists as a novel intertwined dimer. *Nat Struct Biol*. 1997 Sep;4(9):739-43.
152. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jun;15(6):384-96.
153. Koharudin LM, Liu L, Gronenborn AM. Different 3D domain-swapped oligomeric cyanovirin-N structures suggest trapped folding intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 7;110(19):7702-7.
154. Kong LX, Zeng CM. Effects of Seeding on Lysozyme Amyloid Fibrillation in the Presence of Epigallocatechin and Polyethylene Glycol. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Feb;82(2):156-167.
155. Koon N, Squire CJ, Baker EN. Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8295-300.
156. Korzhnev DM, Neudecker P, Zarrine-Afsar A, Davidson AR, Kay LE. Abp1p and Fyn SH3 domains fold through similar low-populated intermediate states. *Biochemistry*. 2006 Aug 29;45(34):10175-83.
157. Korzhnev DM, Salvatella X, Vendruscolo M, Di Nardo AA, Davidson AR, Dobson CM, Kay LE. Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR. *Nature*. 2004 Jul 29;430(6999):586-90.
158. Koyama S, Yu H, Dalgarno DC, Shin TB, Zydowsky LD, Schreiber SL. Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 family. *Cell*. 1993 Mar 26;72(6):945-52.
159. Koyama S, Yu H, Dalgarno DC, Shin TB, Zydowsky LD, Schreiber SL. <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N assignments and secondary structure of the PI3K SH3 domain. *FEBS Lett*. 1993 Jun 7;324(1):93-8.
160. Kulikova AA, Makarov AA, Kozin SA. The role of zinc ions and structural polymorphism of  $\beta$ -amyloid in the Alzheimer's disease initiation. *Mol Biol (Mosk)*. 2015 Mar-Apr;49(2):249-63.
161. Kumar V, Prakash A, Pandey P, Lynn AM, Hassan MI. TFE-induced local unfolding and fibrillation of SOD1: bridging the experiment and simulation studies. *Biochem J*. 2018 May 18;475(10):1701-1719.
162. Kumari P, Bhavesh NS. Human DND1-RRM2 forms a non-canonical domain swapped dimer. *bioRxiv*. 2020 Mar 05.
163. Lafita A, Tian P, Best RB, Bateman A. TADOSS: computational estimation of tandem domain swap stability. *Bioinformatics*. 2019 Jul 15;35(14):2507-2508.

164. Laidman J, Forse GJ, Yeates TO. Conformational change and assembly through edge beta strands in transthyretin and other amyloid proteins. *Acc Chem Res.* 2006 Sep;39(9):576-83.
165. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2<sup>a</sup> edición. 1991.
166. Lawrence PB, Price JL. How PEGylation influences protein conformational stability. *Curr Opin Chem Biol.* 2016 Oct;34:88-94.
167. Lazo ND, Downing DT. Beta-helical fibrils from a model peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 27;235(3):675-9.
168. Lee S, Eisenberg D. Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nat Struct Biol.* 2003 Sep;10(9):725-30.
169. Lenton S, Grimaldo M, Roosen-Runge F, Schreiber F, Nylander T, Clegg R, Holt C, Härtlein M, García Sakai V, Seydel T, Marujo Teixeira SC. Effect of Phosphorylation on a Human-like Osteopontin Peptide. *Biophys J.* 2017 Apr 25;112(8):1586-1596.
170. Li X, Zhao J, Li Q, Wu J, Zhou C, Cao Y, Niu J. Structure-Based Site-Specific PEGylation of Fibroblast Growth Factor 2 Facilitates Rational Selection of Conjugate Sites. *Biotechnol J.* 2020 Feb;15(2):e1900203.
171. Lim KH, Le YT, Collver HH, Putnam-Evans C, Kenney JM. Characterization of amyloidogenic intermediate states through a combined use of CD and NMR spectroscopy. *Biophys Chem.* 2010 Oct;151(3):155-9.
172. Liu Y, Gotte G, Libonati M, Eisenberg D. A domain-swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation. *Nat Struct Biol.* 2001 Mar;8(3):211-4.
173. Liu Y, Gotte G, Libonati M, Eisenberg D. Structures of the two 3D domain-swapped RNase A trimers. *Protein Sci.* 2002 Feb;11(2):371-80.
174. Liu Y, Hart PJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of RNase A at a 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3437-42.
175. Liu Y, Hart PJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of RNase A at a 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3437-42.
176. Liu Z, Reddy G, Thirumalai D. Theory of the molecular transfer model for proteins with applications to the folding of the src-SH3 domain. *J Phys Chem B.* 2012 Jun 14;116(23):6707-16.
177. Llácer JL, Contreras A, Forchhammer K, Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Maldonado R, Fita I, Rubio V. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 6;104(45):17644-9.
178. López-Alonso JP, Bruix M, Font J, Ribó M, Vilanova M, Jiménez MA, Santoro J, González C, Laurents DV. NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: implications for oligomer formation by 3D domain swapping. *J Am Chem Soc.* 2010 Feb 10;132(5):1621-30.
179. Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Döbeli H, Schubert D, Riek R. 3D structure of Alzheimer's amyloid- $\beta$ (1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 29;102(48):17342-7.
180. Macias MJ, Wiesner S, Sudol M. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* 2002 Feb 20;513(1):30-7.
181. Marinelli P, Castillo V, Ventura S. Trifluoroethanol modulates amyloid formation by the all  $\alpha$ -helical URN1 FF domain. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug 30;14(9):17830-44.
182. Marsh JA, Neale C, Jack FE, Choy WY, Lee AY, Crowhurst KA, Forman-Kay JD. Improved structural characterizations of the drkN SH3 domain unfolded state suggest a compact

- ensemble with native-like and non-native structure. *J Mol Biol.* 2007 Apr 13;367(5):1494-510.
183. Martinez JC, Pisabarro MT, Serrano L. Obligatory steps in protein folding and the conformational diversity of the transition state. *Nat Struct Biol.* 1998 Aug;5(8):721-9.
  184. Martínez JC, Serrano L. The folding transition state between SH3 domains is conformationally restricted and evolutionarily conserved. *Nat Struct Biol.* 1999 Nov;6(11):1010-6.
  185. Martínez JC, Viguera AR, Serrano L, Filimonov VV, Mateo PL. The DSC data analysis for small, single-domain proteins. Application to the SH3 domain, *React Funct Polym.* 1998 May;36(3):221-225.
  186. Martín-García JM, Luque I, Mateo PL, Ruiz-Sanz J, Cámara-Artigas A. Crystallographic structure of the SH3 domain of the human c-Yes tyrosine kinase: loop flexibility and amyloid aggregation. *FEBS Lett.* 2007 May 1;581(9):1701-6.
  187. Martín-García JM, Luque I, Ruiz-Sanz J, Cámara-Artigas A. The promiscuous binding of the Fyn SH3 domain to a peptide from the NS5A protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012 Aug;68(Pt 8):1030-40.
  188. Mascarenhas NM, Gosavi S. Understanding protein domain-swapping using structure-based models of protein folding. *Prog Biophys Mol Biol.* 2017 Sep;128:113-120.
  189. Mathiharan YK, Murthy MRN. Molecular dynamics studies on the domain swapped *Salmonella typhimurium* survival protein SurE: insights on the possible reasons for catalytic cooperativity. *J Biomol Struct Dyn.* 2018 Jul;36(9):2303-2311.
  190. Mathiharan YK, Savithri HS, Murthy MR. Insights into stabilizing interactions in the distorted domain-swapped dimer of *Salmonella typhimurium* survival protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2015 Sep;71(Pt 9):1812-23.
  191. Matsumura Y, Shinjo M, Kim SJ, Okishio N, Gruebele M, Kihara H. Transient helical structure during PI3K and Fyn SH3 domain folding. *J Phys Chem B.* 2013 May 2;117(17):4836-43. doi: 10.1021/jp400167s. Epub 2013 Apr 18. Erratum in: *J Phys Chem B.* 2013 Dec 5;117(48):15233.
  192. Maury CP. The emerging concept of functional amyloid. *J Intern Med.* 2009 Mar;265(3):329-34.
  193. Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.* 2001 Apr;114(Pt 7):1253-63.
  194. Mazzarella L, Capasso S, Demasi D, Di Lorenzo G, Mattia CA, Zagari A. Bovine seminal ribonuclease: structure at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*
  195. Mazzini A, Maia A, Parisi M, Sorbi RT, Ramoni R, Grolli S, Favilla R. Reversible unfolding of bovine odorant binding protein induced by guanidinium hydrochloride at neutral pH. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 23;1599(1-2):90-101.
  196. McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2014 Jan;70(Pt 1):2-20.
  197. Merlino A, Avella G, Di Gaetano S, Arciello A, Piccoli R, Mazzarella L, Sica F. Structural features for the mechanism of antitumor action of a dimeric human pancreatic ribonuclease variant. *Protein Sci.* 2009 Jan;18(1):50-7.
  198. Merlino A, Picone D, Ercole C, Balsamo A, Sica F. Chain termini cross-talk in the swapping process of bovine pancreatic ribonuclease. *Biochimie.* 2012 May;94(5):1108-18.
  199. Merlino A, Vitagliano L, Ceruso MA, Mazzarella L. Dynamic properties of the N-terminal swapped dimer of ribonuclease A. *Biophys J.* 2004 Apr;86(4):2383-91.
  200. Michalska K, Kowiel M, Bigelow L, Endres M, Gilski M, Jaskolski M, Joachimiak A. 3D domain swapping in the TIM barrel of the  $\alpha$  subunit of *Streptococcus pneumoniae* tryptophan synthase. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2020 Feb 1;76(Pt 2):166-175.

201. Miller KH, Karr JR, Marqusee S. A hinge region cis-proline in ribonuclease A acts as a conformational gatekeeper for C-terminal domain swapping. *J Mol Biol.* 2010 Jul 16;400(3):567-78.
202. Mital M, Zawisza IA, Wiloch MZ, Wawrzyniak UE, Kenche V, Wróblewski W, Bal W, Drew SC. Copper Exchange and Redox Activity of a Prototypical 8-Hydroxyquinoline: Implications for Therapeutic Chelation. *Inorg Chem.* 2016 Aug 1;55(15):7317-9.
203. Mitrea DM, Kriwacki RW. Regulated unfolding of proteins in signaling. *FEBS Lett.* 2013 Apr 17;587(8):1081-8.
204. Moncalián G, Cárdenes N, Deribe YL, Spínola-Amilibia M, Dikic I, Bravo J. Atypical polyproline recognition by the CMS N-terminal Src homology 3 domain. *J Biol Chem.* 2006 Dec 15;281(50):38845-53.
205. Mondal B, Reddy G. Cosolvent Effects on the Growth of Protein Aggregates Formed by a Single Domain Globular Protein and an Intrinsically Disordered Protein. *J Phys Chem B.* 2019 Mar 7;123(9):1950-1960.
206. Morel B, Casares S, Conejero-Lara F. A single mutation induces amyloid aggregation in the alpha-spectrin SH3 domain: analysis of the early stages of fibril formation. *J Mol Biol.* 2006 Feb 17;356(2):453-68.
207. Morel B, Conejero-Lara F. Early mechanisms of amyloid fibril nucleation in model and disease-related proteins. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019 Nov;1867(11):140264.
208. Morton CJ, Pugh DJ, Brown EL, Kahmann JD, Renzoni DA, Campbell ID. Solution structure and peptide binding of the SH3 domain from human Fyn. *Structure.* 1996 Jun 15;4(6):705-14.
209. Müller P, Köpke S, Sheldrick GM. Is the bond-valence method able to identify metal atoms in protein structures? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003 Jan;59(Pt 1):32-7.
210. Musacchio A, Gibson T, Lehto VP, Saraste M. SH3 an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):55-61.
211. Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R, Saraste M. Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):851-5. *Nature* 359: 851-855.
212. Nagao S, Osuka H, Yamada T, Uni T, Shomura Y, Imai K, Higuchi Y, Hirota S. Structural and oxygen binding properties of dimeric horse myoglobin. *Dalton Trans.* 2012 Oct 7;41(37):11378-85.
213. Nandwani N, Surana P, Negi H, Mascarenhas NM, Udgaonkar JB, Das R, Gosavi S. A five-residue motif for the design of domain swapping in proteins. *Nat Commun.* 2019 Jan 28;10(1):452.
214. Nandwani N, Surana P, Udgaonkar JB, Das R, Gosavi S. Amino-acid composition after loop deletion drives domain swapping. *Protein Sci.* 2017 Oct;26(10):1994-2002.
215. Noyal M, Di Cera E. Valence screening of water in protein crystals reveals potential Na<sup>+</sup> binding sites. *J Mol Biol.* 1996 Feb 23;256(2):228-34.
216. Neira JL, Cámara-Artigas A. Trifluoroethanol-induced conformational transition of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) of human p73. *Arch Biochem Biophys.* 2017 Apr 1;619:1-9.
217. Neira JL, Gómez J. The conformational stability of the *Streptomyces coelicolor* histidine-phosphocarrier protein. Characterization of cold denaturation and urea-protein interactions. *Eur J Biochem.* 2004 Jun;271(11):2165-81.
218. Neudecker P, Robustelli P, Cavalli A, Walsh P, Lundström P, Zarrine-Afsar A, Sharpe S, Vendruscolo M, Kay LE. Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation. *Science.* 2012 Apr 20;336(6079):362-6.
219. Neupane KP, Aldous AR, Kritzer JA. Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *J Inorg Biochem.* 2014 Oct;139:65-76.

220. Newcomer ME. Protein folding and three-dimensional domain swapping: a strained relationship? *Curr Opin Struct Biol.* 2002 Feb;12(1):48-53.
221. Nilsson M, Wang X, Rodziewicz-Motowidlo S, Janowski R, Lindström V, Onnerfjord P, Westermark G, Grzonka Z, Jaskolski M, Grubb A. Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24236-45.
222. Northey JG, Maxwell KL, Davidson AR. Protein folding kinetics beyond the phi value: using multiple amino acid substitutions to investigate the structure of the SH3 domain folding transition state. *J Mol Biol.* 2002 Jul 5;320(2):389-402.
223. Ollerenshaw JE, Kaya H, Chan HS, Kay LE. Sparsely populated folding intermediates of the Fyn SH3 domain: matching native-centric essential dynamics and experiment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 12;101(41):14748-53.
224. Olsson MH, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J Chem Theory Comput.* 2011 Feb 8;7(2):525-37.
225. O'Nuallain B, Williams AD, Westermark P, Wetzel R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17490-9.
226. Orlikowska M, Jankowska E, Kołodziejczyk R, Jaskólski M, Szymańska A. Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C. *J Struct Biol.* 2011 Feb;173(2):406-13.
227. Pace CN. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 1986;131:266-80.
228. Palencia A, Camara-Artigas A, Pisabarro MT, Martinez JC, Luque I. Role of interfacial water molecules in proline-rich ligand recognition by the Src homology 3 domain of Abl. *J Biol Chem.* 2010 Jan 22;285(4):2823-33.
229. Pallarès I, Vendrell J, Avilés FX, Ventura S. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of alpha-chymotrypsin. *J Mol Biol.* 2004 Sep 3;342(1):321-31.
230. Pande M, Srivastava R. Molecular and clinical insights into protein misfolding and associated amyloidosis. *Eur J Med Chem.* 2019 Dec 15;184:111753.
231. Park CK, Joshi HK, Agrawal A, Ghare MI, Little EJ, Dunten PW, Bitinaite J, Horton NC. Domain swapping in allosteric modulation of DNA specificity. *PLoS Biol.* 2010 Dec 7;8(12):e1000554.
232. Park HH. Domain swapping of death domain superfamily: Alternative strategy for dimerization. *Int J Biol Macromol.* 2019 Oct 1;138:565-572.
233. Parker MJ, Dempsey CE, Hosszu LL, Waltho JP, Clarke AR. Topology, sequence evolution and folding dynamics of an immunoglobulin domain. *Nat Struct Biol.* 1998 Mar;5(3):194-8.
234. Parks TD, Howard ED, Wolpert TJ, Arp DJ, Dougherty WG. Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology.* 1995 Jun 20;210(1):194-201.
235. Pepys MB. Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Feb 28;356(1406):203-10; discussion 210-1.
236. Perlenfein TJ, Mehlhoff JD, Murphy RM. Insights into the mechanism of cystatin C oligomer and amyloid formation and its interaction with  $\beta$ -amyloid. *J Biol Chem.* 2017A Jul 7;292(27):11485-11498.
237. Perlenfein TJ, Murphy RM. A mechanistic model to predict effects of cathepsin B and cystatin C on  $\beta$ -amyloid aggregation and degradation. *J Biol Chem.* 2017B Dec 22;292(51):21071-21082.

238. Perumal K, Dirr HW, Fanucchi S. A Single Amino Acid in the Hinge Loop Region of the FOXP Forkhead Domain is Significant for Dimerisation. *Protein J.* 2015 Apr;34(2):111-21.
239. Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R. Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Fibrils. *Science.* 2005 Jan 14;307(5707):262-265.
240. Pias S, Peterson TA, Johnson DL, Lyons BA. The intertwining of structure and function: proposed helix-swapping of the SH2 domain of Grb7, a regulatory protein implicated in cancer progression and inflammation. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(3):299-304.
241. Piccoli R, Di Donato A, D'Alessio G. Co-operativity in seminal ribonuclease function: binding studies. *Biochem J.* 1987 Jan 15;241(2):435-40.
242. Pichlo C, Juetten L, Wojtalla F, Schacherl M, Diaz D, Baumann U. Molecular determinants of the mechanism and substrate specificity of *Clostridium difficile* proline-proline endopeptidase-1. *J Biol Chem.* 2019 Jul 26;294(30):11525-11535.
243. Picone D, Di Fiore A, Ercole C, Franzese M, Sica F, Tomaselli S, Mazzarella L. The role of the hinge loop in domain swapping. The special case of bovine seminal ribonuclease. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13771-8.
244. Pisabarro MT, Serrano L. Rational design of specific high-affinity peptide ligands for the Abl-SH3 domain. *Biochemistry.* 1996 Aug 20;35(33):10634-40.
245. Plaxco KW, Guijarro JI, Morton CJ, Pitkeathly M, Campbell ID, Dobson CM. The folding kinetics and thermodynamics of the Fyn-SH3 domain. *Biochemistry.* 1998 Feb 24;37(8):2529-37.
246. Plaza-Garrido M, Salinas-Garcia MC, Alba-Elena D, Martínez JC, Camara-Artigas A. Lysozyme crystals dyed with bromophenol blue: where has the dye gone? *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2020 Sep 1;76(Pt 9):845-856.
247. Plaza-Garrido M, Salinas-Garcia MC, Camara-Artigas A. Orthorhombic lysozyme crystallization at acidic pH values driven by phosphate binding. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2018 May 1;74(Pt 5):480-489.
248. Plaza-Garrido M, Salinas-García MC, Martínez JC, Cámara-Artigas A. The effect of an engineered ATCUN motif on the structure and biophysical properties of the SH3 domain of c-Src tyrosine kinase. *J Biol Inorg Chem.* 2020 Jun;25(4):621-634.
249. Qiang W, Yau WM, Lu JX, Collinge J, Tycko R. Structural variation in amyloid- $\beta$  fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature.* 2017 Jan 12;541(7636):217-221.
250. Qiang W, Yau WM, Luo Y, Mattson MP, Tycko R. Antiparallel  $\beta$ -sheet architecture in Iowa-mutant  $\beta$ -amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 20;109(12):4443-8.
251. Rambaran RN, Serpell LC. Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion.* 2008 Jul-Sep;2(3):112-7.
252. Ramirez-Alvarado M, Merkel JS, Regan L. A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):8979-84.
253. Reddy G, Muttathukattil AN, Mondal B. Cosolvent effects on the growth of amyloid fibrils. *Curr Opin Struct Biol.* 2020 Feb;60:101-109.
254. Rehman AA, Zaman M, Zia MK, Ahsan H, Khan RH, Khan FH. Conformational behavior of alpha-2-macroglobulin: Aggregation and inhibition induced by TFE. *Int J Biol Macromol.* 2017 Nov;104(Pt A):539-546.
255. Richter K, Rufer AC, Muller M, Burger D, Casagrande F, Grossenbacher T, Huber S, Hug MN, Koldewey P, D'Oswaldo A, Schlatter D, Stoll T, Rudolph MG. Small molecule AX-024 reduces T cell proliferation independently of CD3 $\epsilon$ /Nck1 interaction, which is governed by a domain swap in the Nck1-SH3.1 domain. *J Biol Chem.* 2020 Jun 5;295(23):7849-7864.



256. Riddle DS, Grantcharova VP, Santiago JV, Alm E, Ruczinski I, Baker D. Experiment and theory highlight role of native state topology in SH3 folding. *Nat Struct Biol.* 1999 Nov;6(11):1016-24.
257. Röder C, Vettore N, Mangels LN, Gremer L, Ravelli RBG, Willbold D, Hoyer W, Buell AK, Schröder GF. Atomic structure of PI3-kinase SH3 amyloid fibrils by cryo-electron microscopy. *Nat Commun.* 2019 Aug 21;10(1):3754.
258. Rousseau F, Schymkowitz J, Itzhaki LS. Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function. *Adv Exp Med Biol.* 2012;747:137-52.
259. Rousseau F, Schymkowitz JW, Itzhaki LS. The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure.* 2003 Mar;11(3):243-51.
260. Rousseau F, Schymkowitz JW, Wilkinson HR, Itzhaki LS. Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 8;98(10):5596-601.
261. Royer CA. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem Rev.* 2006 May;106(5):1769-84.
262. Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Applications to Structural Biology.* 1st. Ed. Garland Science; 2010.
263. Sadqi M, Casares S, Abril MA, López-Mayorga O, Conejero-Lara F, Freire E. The native state conformational ensemble of the SH3 domain from alpha-spectrin. *Biochemistry.* 1999 Jul 13;38(28):8899-906.
264. Saelices L, Johnson LM, Liang WY, Sawaya MR, Cascio D, Ruchala P, Whitelegge J, Jiang L, Riek R, Eisenberg DS. Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human Transthyretin. *J Biol Chem.* 2015 Nov 27;290(48):28932-43.
265. Salinas-García MC, Plaza-Garrido M, Alba-Elena D, Camara-Artigas A. Major conformational changes in the structure of lysozyme obtained from a crystal with a very low solvent content. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2019 Nov 1;75(Pt 11):687-696.
266. Salinas-García MC, Plaza-Garrido M, Cámara-Artigas A. Oncogenic mutations at the RT loop of the SH3 domain of the c-Src tyrosine kinase affects its structure and stability. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2021;D77:854-866.
267. Sato A, Yokotani S, Tadokoro T, Tanaka S, Angkawidjaja C, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Crystal structure of stable protein CutA1 from psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp. SIB1. *J Synchrotron Radiat.* 2011 Jan;18(1):6-10.
268. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, Madsen AØ, Riek C, Eisenberg D. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature.* 2007 May 24;447(7143):453-7.
269. Schiering N, Casale E, Caccia P, Giordano P, Battistini C. Dimer formation through domain swapping in the crystal structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV complex. *Biochemistry.* 2000 Nov 7;39(44):13376-82.
270. Schmit JD, Ghosh K, Dill K. What drives amyloid molecules to assemble into oligomers and fibrils? *Biophys J.* 2011 Jan 19;100(2):450-8.
271. Schweimer K, Hoffmann S, Bauer F, Friedrich U, Kardinal C, Feller SM, Biesinger B, Sticht H. Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck. *Biochemistry.* 2002 Apr 23;41(16):5120-30.
272. Seeliger MA, Schymkowitz JW, Rousseau F, Wilkinson HR, Itzhaki LS. Folding and association of the human cell cycle regulatory proteins ckshs1 and ckshs2. *Biochemistry.* 2002 Jan 29;41(4):1202-10.
273. Sekhar A, Udgaonkar JB. Fluoroalcohol-induced modulation of the pathway of amyloid protofibril formation by barstar. *Biochemistry.* 2011 Feb 8;50(5):805-19.

274. Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PE. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol.* 2000 Jul 28;300(5):1033-9.
275. Shea JE, Onuchic JN, Brooks CL 3rd. Probing the folding free energy landscape of the Src-SH3 protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16064-8.
276. Shelton H, Harris M. Hepatitis C virus NS5A protein binds the SH3 domain of the Fyn tyrosine kinase with high affinity: mutagenic analysis of residues within the SH3 domain that contribute to the interaction. *Virology.* 2008 Feb 11;5:24.
277. Shoshana JS, Malevanets A, MacKinnon SS. The Landscape of Intertwined Associations in Homooligomeric Proteins. *Biophys J.* 2015 Sep 15;109(6):1087-100.
278. Siang-Yang O, Dunstan DE. The effect of concentration, temperature and stirring on hen egg white lysozyme amyloid formation. *Soft Matter.* 2013 Oct 28;9(40):9692-701.
279. Sicheri F, Kuriyan J. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):777-85.
280. Slotta U, Hess S, Spiess K, Stromer T, Serpell L, Scheibel T. Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol Biosci.* 2007 Feb 12;7(2):183-8.
281. Song W, Zhao H, Cui Z, Ma X, Zhang W, Wang D, Liu A, Yuan L. Creation of an apoptin-derived peptide that interacts with SH3 domains and inhibits glioma cell migration and invasion. *Tumour Biol.* 2016 Nov;37(11):15229-15240.
282. Sönnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S., and Sykes, B. D. (1992) *Biochemistry* 31, 8790-8798.
283. Srinivasan E, Sethumadhavan R, Rajasekaran R. A theoretical study on Zn binding loop mutants instigating destabilization and metal binding loss in human SOD1 protein. *J Mol Model.* 2017 Apr;23(4):103.
284. Srisailam S, Kumar TK, Rajalingam D, Kathir KM, Sheu HS, Jan FJ, Chao PC, Yu C. Amyloid-like fibril formation in an all beta-barrel protein. Partially structured intermediate state(s) is a precursor for fibril formation. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):17701-9.
285. Stadmiller SS, Pielak GJ. Enthalpic stabilization of an SH3 domain by D2 O. *Protein Sci.* 2018 Sep;27(9):1710-1716.
286. Stanyon HF, Cong X, Chen Y, Shahidullah N, Rossetti G, Dreyer J, Papamokos G, Carloni P, Viles JH. Developing predictive rules for coordination geometry from visible circular dichroism of copper(II) and nickel(II) ions in histidine and amide main-chain complexes. *FEBS J.* 2014 Sep;281(17):3945-54.
287. Stroud JC, Liu C, Teng PK, Eisenberg D. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- $\beta$  have cross- $\beta$  structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 15;109(20):7717-22. doi: 10.1073/pnas.1203193109.
288. Stroud JC, Wu Y, Bates DL, Han A, Nowick K, Paabo S, Tong H, Chen L. Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure.* 2006 Jan;14(1):159-66.
289. Suelter CH. Enzymes activated by monovalent cations. *Science.* 1970 May 15;168(3933):789-95.
290. Taube M, Pietralik Z, Szymanska A, Szutkowski K, Clemens D, Grubb A, Kozak M. The domain swapping of human cystatin C induced by synchrotron radiation. *Sci Rep.* 2019 Jun 12;9(1):8548.
291. Tegoni M, Ramoni R, Bignetti E, Spinelli S, Cambillau C. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat Struct Biol.* 1996 Oct;3(10):863-7.
292. Tenorio CA, Longo LM, Parker JB, Lee J, Blaber M. Ab initio folding of a trefoil-fold motif reveals structural similarity with a  $\beta$ -propeller blade motif. *Protein Sci.* 2020 May;29(5):1172-1185..

293. Teyra J, Huang H, Jain S, Guan X, Dong A, Liu Y, Tempel W, Min J, Tong Y, Kim PM, Bader GD, Sidhu SS. Comprehensive Analysis of the Human SH3 Domain Family Reveals a Wide Variety of Non-canonical Specificities. *Structure*. 2017 Oct 3;25(10):1598-1610.e3.
294. Tian P, Best RB. Structural Determinants of Misfolding in Multidomain Proteins. *PLoS Comput Biol*. 2016 May 10;12(5):e1004933.
295. Török M, Milton S, Kaye R, Wu P, McIntire T, Glabe CG, Langen R. Structural and dynamic features of Alzheimer's A $\beta$  peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40810-5.
296. Toyama BH, Weissman JS. Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:557-85.
297. Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. Measuring and increasing protein solubility. *J Pharm Sci*. 2008 Oct;97(10):4155-66.
298. Troilo F, Bonetti D, Camilloni C, Toto A, Longhi S, Brunori M, Gianni S. Folding Mechanism of the SH3 Domain from Grb2. *J Phys Chem B*. 2018 Dec 13;122(49):11166-11173.
299. Upadhyay AK, Sowdhamini R. Genome-Wide Prediction and Analysis of 3D-Domain Swapped Proteins in the Human Genome from Sequence Information. *PLoS One*. 2016 Jul 28;11(7):e0159627.
300. Varela L, Morel B, Azuaga AI, Conejero-Lara F. A single mutation in an SH3 domain increases amyloid aggregation by accelerating nucleation, but not by destabilizing thermodynamically the native state. *FEBS Lett*. 2009 Feb 18;583(4):801-6.
301. Vernaglia BA, Huang J, Clark ED. Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme. *Biomacromolecules*. 2004 Jul-Aug;5(4):1362-70.
302. Vettore N, Buell AK. Thermodynamics of amyloid fibril formation from chemical depolymerization. *Phys Chem Chem Phys*. 2019 Dec 4;21(47):26184-26194.
303. Viguera AR, Jiménez MA, Rico M, Serrano L. Conformational analysis of peptides corresponding to beta-hairpins and a beta-sheet that represent the entire sequence of the alpha-spectrin SH3 domain. *J Mol Biol*. 1996 Jan 26;255(3):507-21.
304. Vitagliano L, Adinolfi S, Sica F, Merlino A, Zagari A, Mazzarella L. A potential allosteric subsite generated by domain swapping in bovine seminal ribonuclease. *J Mol Biol*. 1999 Oct 29;293(3):569-77.
305. Walgers R, Lee TC, Cammers-Goodwin A. An Indirect Chaotropic Mechanism for the Stabilization of Helix Conformation of Peptides in Aqueous Trifluoroethanol and Hexafluoro-2-propanol. *J Am Chem Soc*. 1998 May 6;120(20):5073-5079.
306. Wang W, Lim WA, Jakalian A, Wang J, Wang J, Luo R, Bayly CI, Kollman PA. An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamics, free energy calculations, and sequence analysis. *J Am Chem Soc*. 2001 May 2;123(17):3986-94.
307. Warren JL, Gordon JA. On the Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea. *J Phys Chem*. 1966 Jan 1;70(1):297-300.
308. Weber PC. Physical principles of protein crystallization. *Adv Protein Chem*. 1991;41:1-36.
309. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*. 1999;112:531-52.
310. Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD, Wishart DS. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3316-9.
311. Williams JC, Weijland A, Gonfloni S, Thompson A, Courtneidge SA, Superti-Furga G, Wierenga RK. The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol*. 1997 Dec 19;274(5):757-75.

312. Wittekind M, Mapelli C, Lee V, Goldfarb V, Friedrichs MS, Meyers CA, Mueller L. Solution structure of the Grb2 N-terminal SH3 domain complexed with a ten-residue peptide derived from SOS: direct refinement against NOEs, J-couplings and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts. *J Mol Biol.* 1997 Apr 11;267(4):933-52.
313. Wu J, Chen G, Zhang Z, Zhang P, Chen T. The low populated folding intermediate of a mutant of the Fyn SH3 domain identified by a simple model. *Phys Chem Chem Phys.* 2017 Aug 23;19(33):22321-22328.
314. Wu J, Yang Y, Zhang J, Ji P, Du W, Jiang P, Xie D, Huang H, Wu M, Zhang G, Wu J, Shi Y. Domain-swapped dimerization of the second PDZ domain of ZO2 may provide a structural basis for the polymerization of claudins. *J Biol Chem.* 2007 Dec 7;282(49):35988-99.
315. Xiao R, Xi XD, Chen Z, Chen SJ, Meng G. Structural framework of c-Src activation by integrin  $\beta$ 3. *Blood.* 2013 Jan 24;121(4):700-6.
316. Yadid I, Tawfik DS. Functional  $\beta$ -propeller lectins by tandem duplications of repetitive units. *Protein Eng Des Sel.* 2011 Jan;24(1-2):185-95.
317. Yadid I, Tawfik DS. Reconstruction of functional  $\beta$ -propeller lectins via homo-oligomeric assembly of shorter fragments. *J Mol Biol.* 2007 Jan 5;365(1):10-7.
318. Yamaguchi K, Takahashi S, Kawai T, Naiki H, Goto Y. Seeding-dependent propagation and maturation of amyloid fibril conformation. *J Mol Biol.* 2005 Sep 30;352(4):952-60.
319. Yamamoto K, Yagi H, Ozawa D, Sasahara K, Naiki H, Goto Y. Thiol compounds inhibit the formation of amyloid fibrils by beta 2-microglobulin at neutral pH. *J Mol Biol.* 2008 Feb 8;376(1):258-68.
320. Yang S, Levine H, Onuchic JN. Protein oligomerization through domain swapping: role of inter-molecular interactions and protein concentration. *J Mol Biol.* 2005 Sep 9;352(1):202-11.
321. Yaniv O, Halfon Y, Shimon LJ, Bayer EA, Lamed R, Frolow F. Structure of CBM3b of the major cellulosomal scaffoldin subunit ScaA from *Acetivibrio cellulolyticus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2012 Jan 1;68(Pt 1):8-13.
322. Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells.* 2004 May;9(5):443-56.
323. Zalar M, Golovanov AP. New Disulphide Bond in Cystatin-Based Protein Scaffold Prevents Domain-Swap-Mediated Oligomerization and Stabilizes the Functionally Active Form. *ACS Omega.* 2019 Oct 24;4(19):18248-18256.
324. Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA. The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE.* 2003 Apr 22;2003(179):RE8.
325. Zarrinpar A, Lim WA. Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol.*
326. Zarrinpar A, Park SH, Lim WA. Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection. *Nature.* 2003 Dec 11;426(6967):676-80.
327. Zerovnik E. The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *Bioessays.* 2009 Jun;31(6):597-9.
328. Zhao J, Du Y, Horton JR, Upadhyay AK, Lou B, Bai Y, Zhang X, Du L, Li M, Wang B, Zhang L, Barbieri JT, Khuri FR, Cheng X, Fu H. Discovery and structural characterization of a small molecule 14-3-3 protein-protein interaction inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 27;108(39):16212-6.
329. Zhao K, Lim YJ, Liu Z, Long H, Sun Y, Hu JJ, Zhao C, Tao Y, Zhang X, Li D, Li YM, Liu C. Parkinson's disease-related phosphorylation at Tyr39 rearranges  $\alpha$ -synuclein amyloid fibril structure revealed by cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Aug 18;117(33):20305-20315.

330. Zheng H, Chordia MD, Cooper DR, Chruszcz M, Müller P, Sheldrick GM, Minor W. Validation of metal-binding sites in macromolecular structures with the CheckMyMetal web server. *Nat Protoc.* 2014 Jan;9(1):156-70.
331. Zheng H, Chruszcz M, Lasota P, Lebioda L, Minor W. Data mining of metal ion environments present in protein structures. *J Inorg Biochem.* 2008 Sep;102(9):1765-76.
332. Zurdo J, Guijarro JI, Jiménez JL, Saibil HR, Dobson CM. Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain. *J Mol Biol.* 2001 Aug 10;311(2):325-40.



# Apéndice





# Apéndice 1

## Reactivos

- 2-mercaptoetanol (MERCK, 8.05740.02500).
- 2-Methyl-2,4-pentanediol (MERCK, 8.20819.0100).
- Acetato amónico (MERCK, 1.01116.1000).
- Acetato sódico (MERCK, 1.06268.1000).
- Acetato sódico (Sigma Aldrich, 58750).
- Ácido 8-Anilino-1-naftalensulfónico (Sigma Aldrich, A-1028).
- Ácido acético glacial (Panreac Applichem, 131008.1611).
- Ácido cítrico (MERCK, 47H0379).
- Ácido clorhídrico (Panreac Applichem, 131020.1611).
- Ácido etilendiaminotetraacético (MERCK, 84.180.250).
- Acrilamida (Nzytech, MB15601).
- Ampicilina (Sigma Aldrich, A9518)
- Azul de bromofenol (Panreac Applichem, 31165).
- Blue Safe (Nzytech, MB15201).
- Carbonato sódico anhidro (Panreac Applichem, A3900.1000).
- Células competentes BL21(DE3) y NZY5 $\alpha$  (NzyTech, MB006 y MB004, respectivamente).
- Cloruro de guanidinio (Panreac Applichem, A1499.100).
- Cloruro sódico (NzyTech, MB15901).
- Di-hidrógeno fosfato sódico monohidratado (MERCK, A629346).
- Ditiotreitól (NzyTech, MB03101).
- Etanol (Panreac Applichem, 141085.1211).
- Etanol HPLC (Panreac Applichem, 361085.1611).
- Extracto de levadura (NzyTech, MB16401).
- Formiato amónico (Fluka, 09739).
- Glicerol (Panreac Applichem, 131339.1211).
- Hampton Research: Crystal Screen I (HR2-110) y Crystal Screen II (HR2-112).
- HEPES (Sigma Aldrich, H3375).
- Hidrógeno fosfato de di-sodio (MERCK, 106.580.10).
- Hidróxido sódico (Panreac Applichem, 141687.1211).
- IPTG (NzyTech, MB02603).
- Kanamicina (Panreac Applichem, A1493,0010).
- LB Agar (NzyTech, MB11802).
- Loading buffer SDS-PAGE (Nzytech, MB11701).
- Marcador low molecular weight protein marker (Nzytech, MB082).
- MES (Sigma Aldrich, M-8250).

- Structure Screen I, Structure Screen II, ProPlex™, y Additive Screen (Molecular Dimensions, MD1-01, MD1-02, MD1-38, MD1-11, respectivamente). Las disoluciones presentes en cada uno de los productos se muestran en el Apéndice X.
- Plasmid miniprep kit (QIAGEN, 27104).
- Polietilenglicol 300 (Sigma Aldrich, 90878).
- Polietilenglicol 4000 (Sigma Aldrich, 95904).
- Polietilenglicol 6000 (Panreac Applichem, 162439).
- Polietilenglicol 8000, polietilenglicol 400, polietilenglicol 200 (Fluka, 89510, 91893, 88440, respectivamente).
- Rojo congo (Sigma Aldrich, 32651).
- SOC Broth (NzyTech, MB28001).
- Sulfato amónico (MERCK, 1.01217.1000).
- Sulfato de cobre (Panreac Applichem, A3880.0500).
- TEMED (Applichem Panreac, A1148,0025).
- Tioflavina T (Sigma Aldrich, T-3516).
- Triptona (CONDA, 1612.05).
- Tris base (Nzytech, MB01601).
- Trombina de suero bovino (Sigma Aldrich, T4648).
- Urea (Panreac Applichem, 131754.1211).

## Instrumentación

- Agitador Orbital Agimatic-S (J.P. Selecta).
- Agitador orbital modelo 3005 (Gesellschaft für Labortechnik)
- Agitador rotativo Movil Rod (Gesellschaft für Labortechnik).
- Autoclave Presoclave 75 (JP Selecta).
- Bandejas para cristalografía de 24 y 48 pocillos (MRC).
- Bloque térmico AccuBlock Mini (Labnet).
- Bloque térmico Tembloc (JP Selecta).
- Cabeza para baño Digiterm S-150 (JP Selecta) y un sistema de recirculación de agua.
- Centrífuga modelo 5804R (Eppendorf).
- Centrífuga Zentrifugen Rotanda 460R, con un rotor 5645 (Hettich).
- Columna de cromatografía Econo-Pac (Bio-rad).
- Columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex (volumen de 319-330 mL y límite de presión de 0,5 MPa) y un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences).
- Cubeta modelo Mini PROTEAN Tetra Cell de BioRad con una fuente modelo Electrophoresis Power Supply - EPS 3500 (Farmacia Biotech).
- Cubre objetos de 22 mm de diámetro, modelo Menzel-Gläser (Thermo Scientific).
- DLS (Dinamic Light Scattering) Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern) y una cubeta (Hellma Analytics) con un paso de luz de 3 mm.
- Espectrofluorímetro modelo LS55 (PERKIN ELMER).

- Espectrofotómetro de Perkin Elmer de doble haz, modelo Lambda 25, para llevar a cabo la obtención de los espectros UV-vis de las proteínas objeto de estudio. Las cubetas utilizadas son de cuarzo con 1 cm de paso de luz de Hellma Analytics.
- Espectropolarímetro Jasco J810.
- Estufa bacteriológica Incudigit serie 2000 (J.P Selecta).
- Filtros Ultra-Milipore de 3 kDa ó 10 kDa (Amicon).
- Incubador ThermoMixer C con un bloque térmico de 1,5 mL (Eppendorf).
- LithoLoops de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 nm (Molecular Dimensions).
- Liofilizador LyoQuest (Telstar).
- Medilow-LG (J.P Selecta).
- Membranas para diálisis (Spectra/Por) modelo Dialysis Membrane (MWCO: 3500) (Thermo Scientific), modelo SnakeSkin Dialysis Tubing (MWCO:3500).
- Microcentrífuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Scientific).
- Microscopio Leica modelo M205 C con el programa informático LAS EZ de Leica para Windows, versión 3.8.
- Resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA: His60 Ni Superflow Resin (Clontech).
- pH-metro modelo GLP 21, de sensibilidad 0,01 unidades (CRISON). Los electrodos utilizados con este pH-metro son: modelo 50 27 con un diámetro de bulbo de 12 mm para volúmenes grandes y modelo 52 09 con un diámetro de bulbo de 6 mm para volúmenes más pequeños. La calibración se realizó con los patrones a pH 4,00 y 7,02 (CRISON) a 25 °C.
- pH-metro modelo HI 5221 (Hanna) con un electrodo HI 1131 de la misma marca. Para calibrarlo de forma sistemática se utilizaron patrones a pH 4,01 y 7,01 (Hanna).
- Refractómetro de mano R5000 (Atago).
- Sonicador (GmbH)-UP 200S Ultraschall-prozessor (Grepütfe Sicherheit dr.Hielscher).
- Termómetro digital CheckTemp 1 (Hanna).

## Apéndice 2

### Disoluciones para el cribado de condiciones de cristalización

#### Structure Screen 1 – Molecular Dimensions

Conc	Units	Salt	Conc	Units	Buffer	pH	Conc	Units	Precipitant
0,02	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium acetate	4,6	30	% v/v	MPD
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Sodium acetate	4,6	30	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate	4,6	25	% w/v	PEG 4000
2,0	M	Sodium formate	0,1	M	Sodium acetate	4,6			
2,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate	4,6			
			0,1	M	Sodium acetate	4,6	8	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Sodium citrate	5,6	30	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Sodium citrate	5,6	30	% v/v	MPD
			0,1	M	Sodium citrate	5,6	20	% w/v	PEG 4000
1,0	M	Ammonium phosphate monobasic	0,1	M	Sodium citrate	5,6			
0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium acetate	4,6	20	% v/v	
1,4	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5			
0,2	M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	30	% v/v	
0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	30	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	20	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	30	% v/v	MPD
1,0	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Imidazole	6,5			
0,2	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	30	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Zinc acetate dihydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	18	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Calcium acetate hydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	18	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	30	% v/v	MPD
0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	30	% v/v	
0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	28	% v/v	PEG 400
0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	30	% v/v	PEG 400
0,2	M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	20	% v/v	
0,8	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5			
1,5	M	Lithium sulfate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5			
0,8	M	Sodium phosphate monobasic monohydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5			
1,4	M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5			
2,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	2	% v/v	PEG 400
			0,1	M	Sodium HEPES	7,5	20	% w/v	PEG 4000
2,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,5			
0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Tris	8,5	30	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	M	Tris	8,5	30	% v/v	PEG 400
0,2	M	Lithium sulfate	0,1	M	Tris	8,5	30	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Tris	8,5	30	% v/v	
0,2	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Tris	8,5	30	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Tris	8,5	8	% w/v	PEG 8000
2,0	M	Ammonium phosphate monobasic Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1	M	Tris	8,5			
0,4	M	Ammonium phosphate monobasic tetrahydrate							
0,4	M	Ammonium phosphate monobasic							
0,2	M	Ammonium sulfate					30	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Ammonium sulfate					30	% w/v	PEG 4000
2,0	M	Ammonium sulfate							
4,0	M	Sodium formate							
0,05	M	Potassium phosphate monobasic							
							30	% w/v	PEG 1500
0,2	M	Magnesium formate dihydrate							
1,0	M	Lithium sulfate					2	% w/v	PEG 8000
0,5	M	Lithium sulfate					15	% w/v	PEG 8000

## Structure Screen 2 – Molecular Dimensions

Conc		Salt	Conc	Units	Salt	Buffer	pH	Conc	Units	Precipitant
0,1	M	Sodium chloride				BICINE	9,0	30	% v/v	PEG 500 MME
2,0	M	Magnesium chloride hexahydrate				BICINE	9,0			
						BICINE	9,0	10	% w/v	PEG 20000
0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate				Tris	8,5	3,4	M	1,6-Hexanediol
						Tris	8,5	25	% v/v	tert-Butanol
			0,01	M	Nickel(II) chloride hexahydrate					
1,0	M	Lithium sulfate				Tris	8,5			
1,5	M	Ammonium sulfate				Tris	8,5	12	% v/v	Glycerol
0,2	M	Ammonium phosphate monobasic				Tris	8,5	50	% v/v	MPD
						Tris	8,5	20	% v/v	Ethanol
0,01	M	Nickel(II) chloride hexahydrate				Tris	8,5	20	% w/v	PEG 2000 MME
0,5	M	Ammonium sulfate				Sodium HEPES	7,5	30	% v/v	MPD
						Sodium HEPES	7,5	10	% w/v	PEG 6000
						Sodium HEPES	7,5	20	% v/v	Jeffamine® M-600
1,6	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium chloride	Sodium HEPES	7,5			
2,0	M	Ammonium formate				Sodium HEPES	7,5			
			0,05	M	Cadmium sulfate 8/3-hydrate					
1,0	M	Sodium acetate trihydrate				Sodium HEPES	7,5			
						Sodium HEPES	7,5	70	% v/v	MPD
4,3	M	Sodium chloride				Sodium HEPES	7,5			
						Sodium HEPES	7,5	10	% w/v	PEG 8000
1,6	M	Magnesium sulfate heptahydrate								
			0,1	M	Potassium phosphate monobasic					
2,0	M	Sodium chloride				MES	6,5			
						MES	6,5	12	% w/v	PEG 20000
1,6	M	Ammonium sulfate				MES	6,5	10	% v/v	1,4-Dioxane
0,05	M	Cesium chloride				MES	6,5	30	% v/v	Jeffamine® M-600
0,01	M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	1,8	M	Ammonium sulfate	MES	6,5			
0,2	M	Ammonium sulfate				MES	6,5	30	% w/v	PEG 5000 MME
0,01	M	Zinc sulfate heptahydrate				MES	6,5	25	% v/v	PEG 500 MME
						Sodium HEPES	7,5	20	% w/v	PEG 10000
			0,2	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate					
2,0	M	Ammonium sulfate				Sodium citrate	5,6			
1,0	M	Lithium sulfate	0,5	M	Ammonium sulfate	Sodium citrate	5,6			
0,5	M	Sodium chloride				Sodium citrate	5,6	4	% v/v	Polyethyleneimine
						Sodium citrate	5,6	35	% v/v	tert-Butanol
0,01	M	Iron(III) chloride hexahydrate				Sodium citrate	5,6	10	% v/v	Jeffamine® M-600
0,01	M	Manganese(II) chloride tetrahydrate				Sodium citrate	5,6	2,5	M	1,6-Hexanediol
2,0	M	Sodium chloride				Sodium acetate	4,6			
0,2	M	Sodium chloride				Sodium acetate	4,6	30	% v/v	MPD
0,01	M	Cobalt(II) chloride hexahydrate				Sodium acetate	4,6	1,0	M	1,6-Hexanediol
0,1	M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)				Sodium acetate	4,6	30	% v/v	PEG 400
0,2	M	Ammonium sulfate				Sodium acetate	4,6	30	% w/v	PEG 2000 MME
2,0	M	Sodium chloride						10	% w/v	PEG 6000
0,5	M	Sodium chloride	0,1	M	Magnesium chloride hexahydrate					
								25	% v/v	Ethylene glycol
								35	% v/v	1,4-Dioxane
2,0	M	Ammonium sulfate						5	% v/v	2-Propanol
						Imidazole	7,0			
								10	% w/v	PEG 1000
1,5	M	Sodium chloride						10	% v/v	Ethanol
						Sodium citrate	6,5			
								15	% w/v	Polyvinylpyrrolidone

## ProPlex 1™

Conc	Units	Salt	Conc	Units	Buffer	pH	Conc	Units	Precipitant
			0,1	M	Tris	8,0	25	% v/v	PEG 350 MME
0,1	M	Calcium acetate hydrate	0,1	M	MES	6,0	15	% v/v	PEG 400
0,1	M	Lithium chloride	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	20	% v/v	PEG 400
			0,1	M	Tris	8,0	25	% v/v	PEG 400
			0,1	M	MES	6,5	15	% v/v	PEG 500 MME
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	Sodium/potassium phosphate	6,5	25	% w/v	PEG 1000
0,1	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	7,5	20	% w/v	PEG 1500
0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate	5,5	10	% w/v	PEG 2000 MME
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	MES	6,0	20	% w/v	PEG 2000 MME
0,1	M	Potassium chloride	0,1	M	Tris	8,0	15	% w/v	PEG 2000 MME
			0,1	M	Sodium HEPES	7,5	25	% w/v	PEG 2000 MME
0,2	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Sodium citrate	5,5	5	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Lithium sulfate	0,1	M	Tris	7,5	5	% w/v	PEG 4000
0,1	M	Calcium acetate hydrate	0,1	M	Sodium acetate	4,5	10	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Sodium citrate	5,5	10	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	MES	6,5	10	% w/v	PEG 4000
0,1	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	10	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium HEPES	7,0	10	% w/v	PEG 4000
						10	% v/v	2-Propanol	
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Sodium acetate	4,0	15	% w/v	PEG 4000
0,1	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Sodium citrate	5,0	15	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium cacodylate	6,0	15	% w/v	PEG 4000
0,15	M	Ammonium sulfate	0,1	M	MES	6,0	15	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium HEPES	7,0	15	% w/v	PEG 4000
0,1	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,0	15	% w/v	PEG 4000
0,15	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,0	15	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium citrate	4,5	20	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Sodium acetate	5,0	20	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Lithium sulfate	0,1	M	MES	6,0	20	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Tris	8,0	20	% w/v	PEG 4000
0,15	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium HEPES	7,0	20	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium citrate	5,6	20	% w/v	PEG 4000
						20	% v/v	2-Propanol	
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	Tris	8,0	20	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium cacodylate	5,5	25	% w/v	PEG 4000
0,15	M	Ammonium sulfate	0,1	M	MES	5,5	25	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	25	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Potassium iodide	0,1	M	MES	6,5	25	% w/v	PEG 4000
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	25	% w/v	PEG 4000
			0,1	M	MES	6,5	10	% w/v	PEG 5000 MME
						12	% v/v	1-Propanol	
0,1	M	Potassium chloride	0,1	M	Sodium HEPES	7,0	15	% w/v	PEG 5000 MME
0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	7,5	20	% w/v	PEG 5000 MME
0,1	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	MES	6,0	8	% w/v	PEG 6000
0,15	M	Sodium chloride	0,1	M	Tris	8,0	8	% w/v	PEG 6000
			0,1	M	Sodium citrate	5,5	15	% w/v	PEG 6000
0,1	M	Magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,5	15	% w/v	PEG 6000
			0,1	M	MES	6,5	15	% w/v	PEG 6000
						5	% v/v	MPD	
0,1	M	Potassium chloride	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	15	% w/v	PEG 6000
			0,1	M	Tris	8,5	15	% w/v	PEG 6000
			0,1	M	Tris	8,5	20	% w/v	PEG 6000
0,1	M	Magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	Sodium acetate	4,5	8	% w/v	PEG 8000
			0,1	M	Sodium citrate	5,0	8	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	Sodium cacodylate	6,0	8	% w/v	PEG 8000

## ProPlex 2™

Conc	Units	Salt	Conc	Units	Buffer	pH	Conc	Units	Precipitant
			0,1	M	Sodium HEPES	7,0	8	% w/v	PEG 8000
			0,1	M	Tris	8,0	8	% w/v	PEG 8000
0,1	M	Calcium acetate hydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	5,5	12	% w/v	PEG 8000
			0,1	M	Sodium phosphate	6,5	12	% w/v	PEG 8000
		Magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	MOPS	7,5	12	% w/v	PEG 8000
0,1	M		0,1	M	Sodium HEPES	7,5	12	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Sodium chloride	0,1	M					
0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,5	12	% w/v	PEG 8000
			0,1	M	Sodium citrate	5,0	20	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	MES	6,5	20	% w/v	PEG 8000
			0,1	M	Sodium HEPES	7,0	20	% w/v	PEG 8000
0,2	M	Lithium chloride	0,1	M	Tris	8,0	20	% w/v	PEG 8000
		Magnesium acetate tetrahydrate	0,1	M	MES	6,5	10	% w/v	PEG 10,000
0,1	M		0,1	M	Sodium HEPES	7,0	18	% w/v	PEG 12,000
0,1	M	Sodium chloride	0,1	M	Tris	8,0	8	% w/v	PEG 20,000
			0,1	M	Sodium HEPES	7,0	15	% w/v	PEG 20,000
0,5	M	Ammonium sulfate	0,1	M	MES	6,5			
1,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate	5,0			
1,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	MES	6,5			
1,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,0			
1,5	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate	5,0			
1,5	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium HEPES	7,0			
1,5	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,0			
2,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium acetate	5,0			
2,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium HEPES	7,0			
2,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,0			
1,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Sodium HEPES	7,0			
1,0	M	Potassium chloride							
2,0	M	Sodium formate	0,1	M	Sodium acetate	5,0			
3,0	M	Sodium formate	0,1	M	Tris	7,5			
			0,8	M	Sodium/potassium phosphate	7,5			
			1,3	M	Sodium/potassium phosphate	7,0			
			1,6	M	Sodium/potassium phosphate	6,5			
1,0	M	Sodium acetate trihydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5			
		Sodium citrate tribasic dihydrate	0,1	M	Sodium HEPES	7,0			
2,0	M	Sodium chloride	0,1	M	Sodium citrate	6,0			
1,0	M	Lithium sulfate	0,1	M	MES	6,5			
1,6	M	Lithium sulfate	0,1	M	Tris	8,0			
			1,4	M	Sodium malonate dibasic monohydrate	6,0			
1,2	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1	M	Tris	8,0			
1,6	M	Magnesium sulfate heptahydrate	0,1	M	MES	6,5			
			0,1	M	Sodium acetate	5,0	2	% w/v	PEG 4000
							15	% v/v	MPD
0,05	M	Calcium acetate hydrate	0,1	M	Sodium cacodylate	6,0	25	% v/v	MPD
			0,1	M	Imidazole	7,0	50	% v/v	MPD
		Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	MES	6,5	5	% w/v	PEG 4000
0,05	M						10	% v/v	2-Propanol
0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Sodium HEPES	7,5	25	% v/v	2-Propanol
0,1	M	Sodium chloride	0,1	M	Tris	8,0	15	% v/v	Ethanol
							5	% v/v	MPD

## Additive Screen

Tube ID	Conc.	Units	Additive
1	0,5	M	Glycine
2	0,1	M	L-Glutamine
3	0,1	M	Spermine tetrahydrochloride
4	0,1	M	Spermidine
5	0,05	M	EDTA
6	0,05	M	DL-Dithiothreitol
7	0,1	M	Sodium thiocyanate
8	0,1	M	Taurine
9	0,1	M	Betaine monohydrate
10	100	%	Dimethyl sulfoxide
11	5	% w/v	Octyl glucoside
12	0,2	M	Xylitol
13	1,0	M	Potassium iodide
14	100	%	Thymol
15	0,5	M	Sodium malonate dibasic monohydrate
16	1,0	M	Ethylenediamine
17	0,1	M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)
18	0,1	M	Cobalt(II) chloride hexahydrate
19	0,1	M	Magnesium chloride hexahydrate
20	0,1	M	Zinc chloride
21	100	%	1,4-Dioxane
22	0,2	M	Phenol
23	60	% v/v	2-Propanol
24	20	% v/v	Glycerol



## Apéndice 3

### Estadísticas de refinado de las estructuras obtenidas

Tabla 1. Colección de datos y estadísticas de refinado de la c-Src-SH3

	<b>c-Src-SH3 monómero</b>	<b>c-Src-SH3 monómero</b>	<b>c-Src-SH3 dímero</b>
<b>Código PDB</b>	6XVN	6XVM	6XVO
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of c-Src SH3 domain without ATCUN motif: monomer 1	Crystal structure of c-Src SH3 domain without ATCUN motif: monomer 2	Crystal structure of the intertwined dimer of the c-Src SH3 domain without ATCUN motif
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,5 M, Tris 0,1 M pH 8,0	Sulfato amónico 3,0 M, MES 0,1 M pH 6,0	Sulfato amónico 2,5 M, acetato sódico 0,1 M pH 5,0, PEG 300 5 %.
<b>Longitud de onda</b>	0,97910	0,97926	0,97898
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,13–1,70 (1,73–1,70)	40,61–0,90 (0,92–0,90)	19,37–1,70 (1,73–1,70)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>s</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub>
<b>Celda unidad</b>	28,30 40,52 43,45 90,00 104,25 90,00	40,61 52,52 45,59 90,00 90,01 90,00	47,01 47,01 126,19 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	23671 (535)	515376 (4619)	72254 (4036)
<b>Reflexiones únicas</b>	8735 (225)	130757 (2811)	9762 (506)
<b>Multiplicidad</b>	2,7 (2,4)	3,9 (1,6)	7,4 (8,0)
<b>Completitud (%)</b>	82,7 (42,0)	92,5 (40,2)	99,8 (100)
<b>I/sigma(I) medio</b>	12,8 (4,1)	16,1 (6,5)	26,1 (2,6)
<b>Wilson B-factor</b>	12,79	7,39	31,92
<b>R-merge</b>	0,047 (0,196)	0,037 (0,138)	0,031 (0,663)
<b>CC1/2</b>	0,996 (0,963)	0,998 (0,913)	0,999 (0,804)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	8716 (471)	130,549 (6672)	9506 (919)
<b>R-work</b>	0,157 (0,195)	0,1408 (0,4057)	0,2049 (0,2789)
<b>R-free</b>	0,180 (0,209)	0,1506 (0,4022)	0,2141 (0,3729)
<b>CC(work)</b>	0,958 (0,954)	0,966 (0,717)	0,960 (0,867)
<b>CC(free)</b>	0,959 (0,976)	0,965 (0,666)	0,936 (0,770)
<b>Macromoléculas</b>	910	1916	466
<b>Ligandos</b>		12	24
<b>Solvente</b>	125	337	27
<b>Residuos de proteína</b>	116	237	57
<b>RMS(enlaces)</b>	0,004	0,007	0,010
<b>RMS(ángulos)</b>	0,78	1,14	1,12
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	97,22	96,00	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	2,78	4,00	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	16,67	11,39	51,17
<b>Macromoléculas</b>	15,51	9,33	50,28
<b>Ligandos</b>	-	12,94	66,84
<b>Solvente</b>	25,11	23,36	52,61

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 2. Colección de datos y estadísticas de refinado de la Fyn-SH3

	<b>Fyn-SH3</b>	<b>Fyn-SH3</b>
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain in space group <i>C21</i> at pH 7,5	Crystal structure of the Fyn SH3 domain in space group <i>P1</i> at pH 7,5
<b>Código PDB</b>	7A2J	7A2K
<b>Condición de cristalización</b>	Formiato sódico 4,5 M, Hepes 0,1 M pH 7,5	Formiato sódico 4,5 M, Hepes 0,1 M pH 7,5
<b>Longitud de onda</b>	0,97879	0,97879
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,49-1,50 (1,55-1,50)	19,49-1,50 (1,55-1,50)
<b>Grupo espacial</b>	<i>C121</i>	<i>P1</i>
<b>Celda unidad</b>	73,01 46,74 42,81 90,00 97,83 90,00	42,81 43,33 43,34 65,26 83,41 83,38
<b>Reflexiones totales</b>	43750 (4312)	66932
<b>Reflexiones únicas</b>	22754 (2261)	41648 (4009)
<b>Multiplicidad</b>	1,90 (1,90)	1,90 (1,90)
<b>Completitud (%)</b>	98,67 (98,04)	92,58 (88,52)
<b>I/sigma(I) medio</b>	17,51 (2,40)	17,70 (1,30)
<b>Wilson B-factor</b>	25,01	25,09
<b>R-merge</b>	0,0156 (0,2803)	0,0143 (0,3921)
<b>CC1/2</b>	0,999 (0,957)	0,999 (0,884)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	22699 (2252)	41573 (4003)
<b>R-work</b>	0,212 (0,397)	0,201 (0,324)
<b>R-free</b>	0,246 (0,347)	0,235 (0,383)
<b>CC(work)</b>	0,958 (0,954)	0,978 (0,968)
<b>CC(free)</b>	0,967 (0,895)	0,971 (0,901)
<b>Macromoléculas</b>	924	1886
<b>Ligandos</b>	1	4
<b>Solvente</b>	78	131
<b>Residuos de proteína</b>	116	233
<b>RMS(enlaces)</b>	0,010	0,010
<b>RMS(ángulos)</b>	1,10	1,01
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	99,11	98,67
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,89	1,33
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	43,29	40,64
<b>Macromoléculas</b>	43,11	40,51
<b>Ligandos</b>	68,00	69,48
<b>Solvente</b>	45,11	41,59

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 3. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante Fyn-E129Q

<b>Fyn-E129Q</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain mutant E129Q in space group C21 at pH 4,0
<b>Código PDB</b>	7A2L
<b>Condición de cristalización</b>	Formiato sódico 3,5 M, acetato sódico pH 4,0
<b>Longitud de onda</b>	0,97625
<b>Línea</b>	ESRF BEAMLINE ID23-1
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,43-1,90 (1,96-1,90)
<b>Grupo espacial</b>	C121
<b>Celda unidad</b>	73,58 45,89 42,93 90,00 97,11 90,00
<b>Reflexiones totales</b>	21758 (2116)
<b>Reflexiones únicas</b>	11267 (1121)
<b>Multiplicidad</b>	1,9 (1,9)
<b>Completitud (%)</b>	99,31 (99,03)
<b>I/sigma(I) medio</b>	7,28 (1,36)
<b>Wilson B-factor</b>	33,07
<b>R-merge</b>	0,0420 (0,5024)
<b>CC1/2</b>	0,997 (0,753)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	11255 (1118)
<b>R-work</b>	0,207 (0,340)
<b>R-free</b>	0,260 (0,379)
<b>CC(work)</b>	0,960 (0,871)
<b>CC(free)</b>	0,945 (0,831)
<b>Macromoléculas</b>	919
<b>Ligandos</b>	7
<b>Solvente</b>	44
<b>Residuos de proteína</b>	116
<b>RMS(enlaces)</b>	0,010
<b>RMS(ángulos)</b>	1,14
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	48,42
<b>Macromoléculas</b>	48,42
<b>Ligandos</b>	59,25
<b>Solvente</b>	46,56

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 4. Colección de datos y estadísticas de refinado de la FS-RT

	FS-RT	FS-RT
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain A95S-D99T mutant in C21 space group	Crystal structure of the Fyn SH3 domain A95S-D99T mutant in space group P21
<b>Código PDB</b>	7A2M	7A2N
<b>Condición de cristalización</b>	Formiato sódico 4,5 M, acetato sódico pH 4,0	Formiato sódico 4,5 M, acetato sódico pH 4,0
<b>Longitud de onda</b>	0,976251	0,976251
<b>Línea</b>	ESRF BEAMLINE ID30B	ESRF BEAMLINE ID30B
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,70-1,50 (1,55-1,50)	19,94-1,40 (1,45-1,40)
<b>Grupo espacial</b>	C2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
<b>Celda unidad</b>	72,69 47,05 42,71 90,00 97,42 90,00	42,17 47,79 73,08 90,00 98,35 90,00
<b>Reflexiones totales</b>	38991 (3153)	106391 (10794)
<b>Reflexiones únicas</b>	22268 (1989)	56102 (5643)
<b>Multiplicidad</b>	1,8 (1,6)	1,9 (1,9)
<b>Completitud (%)</b>	96,43 (86,51)	98,64 (99,28)
<b>I/sigma(I) medio</b>	9,17 (1,09)	8,62 (1,54)
<b>Wilson B-factor</b>	23,09	13,01
<b>R-merge</b>	0,0293 (0,3946)	0,04593 (0,5065)
<b>CC1/2</b>	1 (0,96)	1 (0,9)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	22193 (1982)	56079 (5643)
<b>R-work</b>	0,2126 (0,3975)	0,1709 (0,2851)
<b>R-free</b>	0,2549 (0,4427)	0,2044 (0,3148)
<b>CC(work)</b>	0,964 (0,841)	0,972 (0,860)
<b>CC(free)</b>	0,954 (0,884)	0,966 (0,838)
<b>Macromoléculas</b>	948	1900
<b>Ligandos</b>	11	39
<b>Solvente</b>	91	243
<b>Residuos de proteína</b>	118	235
<b>RMS(enlaces)</b>	0,009	0,007
<b>RMS(ángulos)</b>	0,99	0,97
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00	99,56
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00	0,44
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,49
<b>B-factor medio</b>	39,47	17,71
<b>Macromoléculas</b>	38,96	16,07
<b>Ligandos</b>	60,79	22,47
<b>Solvente</b>	42,20	29,82

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 5. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante FS-Src

<b>FS-Src</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T at pH 4,5
<b>Código PDB</b>	7A2U
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 1,5 M, acetato sódico pH 4,5
<b>Longitud de onda</b>	0,97910
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,94-1,70 (1,76-1,70)
<b>Grupo espacial</b>	$P6_1$
<b>Celda unidad</b>	46,03 46,03 58,89 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	15122 (1237)
<b>Reflexiones únicas</b>	7739 (708)
<b>Multiplicidad</b>	2,0 (1,7)
<b>Completitud (%)</b>	98,30 (90,65)
<b>I/sigma(I) medio</b>	14,15 (1,69)
<b>Wilson B-factor</b>	19,70
<b>R-merge</b>	0,0286 (0,4127)
<b>CC1/2</b>	0,999 (0,694)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	7703 (708)
<b>R-work</b>	0,1668 (0,2879)
<b>R-free</b>	0,2062 (0,3044)
<b>CC(work)</b>	0,972 (0,805)
<b>CC(free)</b>	0,945 (0,690)
<b>Macromoléculas</b>	478
<b>Ligandos</b>	4
<b>Solvente</b>	55
<b>Residuos de proteína</b>	61
<b>RMS(enlaces)</b>	0,009
<b>RMS(ángulos)</b>	1,04
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	96,61
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	3,39
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	23,84
<b>Macromoléculas</b>	22,93
<b>Ligandos</b>	34,39
<b>Solvente</b>	30,99
<b>Número de grupos de TLS</b>	6

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 6. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante FS-Src-E129Q

<b>FS-Src-E129Q</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E129Q at pH 4,0
<b>Código PDB</b>	7A2V
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 1,5 M, acetato sódico pH 4,0
<b>Longitud de onda</b>	0,97910
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	18,69-1,81 (1,87-1,81)
<b>Grupo espacial</b>	$P6_1$
<b>Celda unidad</b>	45,54 45,54 58,59 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	11418 (1187)
<b>Reflexiones únicas</b>	5862 (595)
<b>Multiplidad</b>	1,9 (2,0)
<b>Compleitud (%)</b>	92,62 (95,35)
<b>I/sigma(I) medio</b>	13,79 (2,83)
<b>Wilson B-factor</b>	22,71
<b>R-merge</b>	0,03875 (0,3536)
<b>CC1/2</b>	0,998 (0,616)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	5861 (595)
<b>R-work</b>	0,2111 (0,3214)
<b>R-free</b>	0,2195 (0,3854)
<b>CC(work)</b>	0,958 (0,736)
<b>CC(free)</b>	0,952 (0,762)
<b>Macromoléculas</b>	484
<b>Ligandos</b>	37
<b>Solvente</b>	60
<b>Residuos de proteína</b>	60
<b>RMS(enlaces)</b>	0,014
<b>RMS(ángulos)</b>	1,07
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	98,28
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	1,72
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	30,78
<b>Macromoléculas</b>	29,97
<b>Solvente</b>	41,34

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 7. Colección de datos y estadísticas de refinado de la FS-*Src*-LAH

	FS- <i>Src</i> -LAH	FS- <i>Src</i> -LAH	FS- <i>Src</i> -LAH
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant at pH 4,0	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant at pH 5,0	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant at pH 6,0
<b>Código PDB</b>	7A2T	7A2R	7A2S
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 1,0 M, acetato sódico pH 4,0	Sulfato amónico 2,0 M, acetato sódico pH 5,0	Sulfato amónico 1,5 M, MES pH 6,0
<b>Longitud de onda</b>	0,96600	0,96600	0,96600
<b>Línea</b>	ESRF BEAMLINE ID30A	ESRF BEAMLINE ID30A	ESRF BEAMLINE ID30A
<b>Rango de resolución (Å)</b>	17,40-1,22 (1,26-1,22)	17,05-1,02 (1,05-1,02)	17,08-1,05 (1,08-1,05)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Celda unidad</b>	28,03 32,52 60,67 90,00 90,00 90,00	28,13 32,36 60,19 90,00 90,00 90,00	28,20 32,43 60,27 90,00 90,00 90,00
<b>Reflexiones totales</b>	31993 (3142)	55429 (4782)	51253 (5217)
<b>Reflexiones únicas</b>	16535 (1639)	28084 (2509)	26330 (2592)
<b>Multiplicidad</b>	1,9 (1,9)	2,0 (1,9)	3,1 (2,9)
<b>Completitud (%)</b>	98,67 (98,50)	97,74 (89,22)	99,24 (99,20)
<b>I/sigma(I) medio</b>	20,67 (2,71)	16,19 (2,69)	11,20 (2,70)
<b>Wilson B-factor</b>	12,51	9,66	9,14
<b>R-merge</b>	0,01572 (0,3044)	0,01747 (0,2156)	0,0340 (0,0390)
<b>CC1/2</b>	0,995 (0,785)	1 (0,889)	0,999 (0,822)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	16788 (1639)	28081 (2508)	26324 (2590)
<b>R-work</b>	0,1703 (0,2330)	0,1592 (0,2413)	0,1614 (0,1784)
<b>R-free</b>	0,2025 (0,2722)	0,1748 (0,2461)	0,1731 (0,2240)
<b>CC(work)</b>	0,961 (0,885)	0,964 (0,916)	0,945 (0,929)
<b>CC(free)</b>	0,957 (0,869)	0,944 (0,912)	0,951 (0,902)
<b>Macromoléculas</b>	492	504	502
<b>Ligandos</b>	4		
<b>Solvente</b>	100	117	120
<b>Residuos de proteína</b>	60	60	61
<b>RMS(enlaces)</b>	0,004	0,008	0,016
<b>RMS(ángulos)</b>	0,80	1,04	1,45
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00	100,00	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	16,64	12,53	12,66
<b>Macromoléculas</b>	14,80	10,69	10,45
<b>Ligandos</b>	30,04		
<b>Solvente</b>	25,13	20,49	21,89

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 8. Colección de datos y estadísticas de refinado de la FS-Src-LAH con PEG 300

	FS-Src-LAH + PEG	FS-Src-LAH + PEG	FS-Src-LAH + PEG
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant at pH 3,0 with PEG	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant at pH 4,5 with PEG	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant at pH 5,0 with PEG
<b>Código PDB</b>	7A2Q	7A2O	7A2P
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5 %, betaciclodextrina 5 mM, citrato sódico pH 3,0	Sulfato amónico 1,5 M, PEG 300 5 %, acetato sódico pH 4,5	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5 %, acetato sódico pH 5,0
<b>Longitud de onda</b>	0,97900	0,97879	0,97920
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	21,81-0,94 (0,97- 0,94)	21,86-0,94 (0,97-0,94)	16,94-0,90 (0,93-0,90)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>
<b>Celda unidad</b>	29,12 32,03 59,57 90,00 90,00 90,00	29,13 32,12 59,65 90,00 90,00 90,00	29,31 32,03 59,89 90,00 90,00 90,00
<b>Reflexiones totales</b>	210801 (12536)	72287 (5825)	78021 (4345)
<b>Reflexiones únicas</b>	36381 (3428)	36813 (3320)	39108 (2219)
<b>Multiplicidad</b>	5,8 (3,7)	2,0 (1,8)	2,0 (2,0)
<b>Completitud (%)</b>	99,10 (95,22)	98,94 (90,88)	91,81 (53,06)
<b>I/sigma(I) medio</b>	24,50 (1,68)	17,16 (2,27)	31,65 (2,22)
<b>Wilson B-factor</b>	11,93	10,33	9,42
<b>R-merge</b>	0,03728 (0,6162)	0,02098 (0,3001)	0,01068 (0,29)
<b>CC1/2</b>	0,998 (0,693)	0,998 (0,779)	0,999 (0,821)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	36379 (3428)	36813 (3320)	39108 (2219)
<b>R-work</b>	0,1563 (0,2381)	0,1508 (0,2554)	0,1306 (0,2440)
<b>R-free</b>	0,1580 (0,2395)	0,1750 (0,2632)	0,1494 (0,2509)
<b>CC(work)</b>	0,958 (0,857)	0,964 (0,873)	0,960 (0,881)
<b>CC(free)</b>	0,956 (0,825)	0,968 (0,882)	0,954 (0,896)
<b>Macromoléculas</b>	512	513	495
<b>Ligandos</b>	18	10	10
<b>Solvente</b>	74	85	66
<b>Residuos de proteína</b>	58	60	59
<b>RMS(enlaces)</b>	0,008	0,006	0,008
<b>RMS(ángulos)</b>	1,13	0,94	1,02
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00	100,00	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	17,19	14,43	13,33
<b>Macromoléculas</b>	14,23	12,19	11,89
<b>Ligandos</b>	44,45	27,36	17,68
<b>Solvente</b>	31,01	26,47	23,45

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis



Tabla 9. Colección de datos y estadísticas de refinado de la FS-Src-LAH con el péptido VSL12

	FS-Src-LAH + VSL12	FS-Src-LAH + VSL12	FS-Src-LAH + VSL12	FS-Src-LAH + VSL12
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant in complex with VSL12 at pH 3,0	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant in complex with VSL12 at pH 4,0	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant in complex with VSL12 at pH 5,0	Crystal structure of the Fyn SH3 domain L112V-S114N-S115T-E121L-R123H mutant in complex with VSL12 at pH 6,0
<b>Código PDB</b>	7A2W	7A2Y	7A2X	7A2Z
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 0,5 M, citrato sódico pH 3,0	Sulfato amónico 0,5 M, acetato sódico pH 4,0	Sulfato amónico 0,5 M, acetato sódico pH 5,0	Sulfato amónico 1,0 M, acetato sódico pH 6,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9792	0,9792	0,9792	0,9792
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	17,66-0,99 (1,02-0,99)	17,63-0,974 (1,00-0,97)	17,66-0,92 (0,95-0,92)	29,56-1,14 (1,18-1,14)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>
<b>Celda unidad</b>	32,90 32,88 62,79 90,00 90,00 90,00	32,87 32,91 62,65 90,00 90,00 90,00	32,89 33,10 62,62 90,00 90,00 90,00	32,54 33,62 61,98 90,00 90,00 90,00
<b>Reflexiones totales</b>	538104 (51050)	243331 (20939)	1048563 (27718)	149602 (14755)
<b>Reflexiones únicas</b>	38631 (3739)	37837 (3535)	46823 (4052)	24445 (2379)
<b>Multiplicidad</b>	13,9 (13,6)	6,4 (5,9)	22,4 (6,8)	6,1 (6,2)
<b>Complejitud (%)</b>	97,87 (98,45)	93,20 (88,46)	98,04 (86,25)	95,72 (94,93)
<b>I/sigma(I) medio</b>	19,71 (2,58)	21,24 (2,57)	33,07 (4,59)	19,72 (2,37)
<b>Wilson B-factor</b>	10,74	10,38	10,39	14,25
<b>R-merge</b>	0,08135 (0,5699)	0,03156 (0,4543)	0,06675 (0,5158)	0,03335 (0,5404)
<b>CC1/2</b>	0,992 (0,923)	1 (0,906)	0,999 (0,857)	1 (0,865)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	37885 (3739)	37828 (3534)	46818 (4051)	24429 (2379)
<b>R-work</b>	0,1312 (0,2050)	0,1318 (0,1970)	0,1299 (0,1899)	0,1629 (0,1993)
<b>R-free</b>	0,1515 (0,2235)	0,1461 (0,2292)	0,1485 (0,1814)	0,1946 (0,1883)
<b>CC(work)</b>	0,455 (0,068)	0,977 (0,947)	0,969 (0,927)	0,959 (0,928)
<b>CC(free)</b>	0,641 (0,040)	0,974 (0,944)	0,946 (0,925)	0,920 (0,931)
<b>Macromoléculas</b>	634	607	674	581
<b>Ligandos</b>	16	3	3	
<b>Solvente</b>	119	137	150	97
<b>Residuos de proteína</b>	74	73	73	71
<b>RMS(enlaces)</b>	0,009	0,010	0,009	0,011
<b>RMS(ángulos)</b>	1,18	1,12	1,08	1,28
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00	100,00	100,00	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	14,67	14,65	15,21	18,19
<b>Macromoléculas</b>	12,70	12,01	12,17	16,25
<b>Ligandos</b>	13,97	12,07	15,13	
<b>Solvente</b>	25,26	26,39	28,85	29,81

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 10. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante Src-Q128E

<b>Src-Q128E</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Intertwined dimer of the c-Src SH3 domain mutant Q128E
<b>Código PDB</b>	7A30
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5 %, acetato sódico pH 5,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9677
<b>Línea</b>	ESRF BEAMLINe MASSIF-3
<b>Rango de resolución (Å)</b>	18,86-1,67 (1,73-1,67)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>5</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub>
<b>Celda unidad</b>	46,97 46,97 126,60 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	20441 (1998)
<b>Reflexiones únicas</b>	10223 (999)
<b>Multiplicidad</b>	2,0 (2,0)
<b>Complejidad (%)</b>	99,43 (100,00)
<b>I/sigma(I) medio</b>	35,13 (3,86)
<b>Wilson B-factor</b>	28,20
<b>R-merge</b>	0,0064 (0,1541)
<b>CC1/2</b>	1 (0,941)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	10216 (999)
<b>R-work</b>	0,1994 (0,2584)
<b>R-free</b>	0,2366 (0,2181)
<b>CC(work)</b>	0,953 (0,859)
<b>CC(free)</b>	0,900 (0,901)
<b>Macromoléculas</b>	474
<b>Ligandos</b>	22
<b>Solvente</b>	43
<b>Residuos de proteína</b>	59
<b>RMS(enlaces)</b>	0,018
<b>RMS(ángulos)</b>	1,64
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	42,57
<b>Macromoléculas</b>	41,54
<b>Ligandos</b>	54,81
<b>Solvente</b>	47,65

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 11. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera SF-2X

	SF-2X	SF-2X	SF-2X
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the c-Src SH3 domain mutant S94A-T98D-V111L-N113S-T114S at pH 3,0	Crystal structure of the c-Src SH3 domain mutant S94A-T98D-V111L-N113S-T114S at pH 4,5	Crystal structure of the c-Src SH3 domain mutant S94A-T98D-V111L-N113S-T114S at pH 7,0
<b>Código PDB</b>	7A33	7A31	7A32
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 1,5 M, betaciclodextrina 5 mM, citrato sódico 0,1 M pH 3,0	Sulfato amónico 1,5 M, acetato sódico 0,1 M pH 4,5	Sulfato amónico 1,5 M, Hepes 0,1 M pH 7,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9790	0,9793	0,9793
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,22-0,96 (0,99-0,96)	18,73-0,94 (0,97-0,94)	19,75-1,15 (1,19-1,15)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 12 <sub>1</sub>	<i>P</i> 12 <sub>1</sub>	<i>P</i> 3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Celda unidad</b>	23,20 63,26 30,07 90,00 95,65 90,00	23,27 63,93 30,23 90,00 96,76 90,00	87,85 87,85 56,02 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	91513 (7310)	95724 (6541)	176872 (17537)
<b>Reflexiones únicas</b>	49755 (4503)	52399 (4164)	88479 (8792)
<b>Multiplicidad</b>	1,8 (1,6)	1,8 (1,6)	2,0 (2,0)
<b>Completitud (%)</b>	94,61 (86,51)	92,28 (73,32)	99,96 (99,98)
<b>I/sigma(I) medio</b>	16,08 (3,52)	12,47 (1,68)	24,91 (2,23)
<b>Wilson B-factor</b>	6,49	7,70	15,06
<b>R-merge</b>	0,03079 (0,3439)	0,02526 (0,4296)	0,01102 (0,2833)
<b>CC1/2</b>	0,998 (0,653)	0,999 (0,673)	1 (0,796)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	49732 (4501)	52380 (4160)	88472 (8794)
<b>R-work</b>	0,1180 (0,2572)	0,1557 (0,3119)	0,1529 (0,2353)
<b>R-free</b>	0,1334 (0,2567)	0,1667 (0,3245)	0,1733 (0,2613)
<b>CC(work)</b>	0,981 (0,882)	0,959 (0,688)	0,974 (0,902)
<b>CC(free)</b>	0,970 (0,889)	0,970 (0,681)	0,968 (0,880)
<b>Macromoléculas</b>	1080	966	1870
<b>Ligandos</b>	10		21
<b>Solvente</b>	150	137	342
<b>Residuos de proteína</b>	120	117	232
<b>RMS(enlaces)</b>	0,009	0,007	0,007
<b>RMS(ángulos)</b>	1,15	1,08	0,98
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	99,12	98,23	99,11
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,88	1,77	0,89
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,87	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	9,51	11,50	21,77
<b>Macromoléculas</b>	7,96	10,10	19,83
<b>Ligandos</b>	7,76		27,61
<b>Solvente</b>	20,79	21,37	31,98

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 12. Colección de datos y estadísticas de refinado de la SF-Src

	<b>SF-Src monómero</b>	<b>SF-Src dímero</b>
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the c-Src SH3 domain mutant V111L-N113S-T114S at pH 7,0	Intertwined dimer of the c-Src SH3 domain mutant V111L-N113S-T114S
<b>Código PDB</b>	7A35	7A34
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 1,5 M, Hepes 0,1 M pH 7,0	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5 %, acetato sódico 0,1 M pH 5,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9792	0,9792
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	27,69-1,31 (1,36-1,31)	18,85-1,85 (1,91-1,85)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1	<i>P</i> 6 <sub>3</sub> 22
<b>Celda unidad</b>	28,54 40,47 43,21 90,00 104,05 90,00	47,24 47,24 125,16 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	35688 (3938)	15135 (1443)
<b>Reflexiones únicas</b>	19183 (2103)	7582 (652)
<b>Multiplicidad</b>	1,9 (1,9)	2,0 (2,0)
<b>Completitud (%)</b>	83,76 (92,84)	95,74 (87,77)
<b>I/sigma(I) medio</b>	11,32 (2,46)	25,79 (2,66)
<b>Wilson B-factor</b>	10,80	30,15
<b>R-merge</b>	0,03435 (0,3297)	0,01049 (0,3171)
<b>CC1/2</b>	0,99 (0,81)	1 (0,86)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	19172 (2101)	7327 (646)
<b>R-work</b>	0,1545 (0,2279)	0,2012 (0,3476)
<b>R-free</b>	0,2026 (0,3027)	0,2295 (0,3379)
<b>CC(work)</b>	0,971 (0,914)	0,945 (0,641)
<b>CC(free)</b>	0,952 (0,798)	0,972 (0,774)
<b>Macromoléculas</b>	949	422
<b>Ligandos</b>	5	24
<b>Solvente</b>	158	20
<b>Residuos de proteína</b>	120	55
<b>RMS(enlaces)</b>	0,005	0,011
<b>RMS(ángulos)</b>	0,87	1,05
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	97,41	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	2,59	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	14,47	40,24
<b>Macromoléculas</b>	12,80	39,76
<b>Ligandos</b>	25,71	46,17
<b>Solvente</b>	24,13	43,20
<b>Número de grupos de TLS</b>		5

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 13. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera SF-*Src*-Q128E

	SF- <i>Src</i> -Q128E monómero	SF- <i>Src</i> -Q128E monómero	SF- <i>Src</i> -Q128E dímero
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the c- <i>Src</i> SH3 domain mutant V111L-N113S-T114S-Q128E at pH 6,0	Crystal structure of the c- <i>Src</i> SH3 domain mutant V111L-N113S-T114S-Q128E at pH 7,0	Intertwined dimer of the c- <i>Src</i> SH3 domain mutant V111L-N113S-T114S-Q128E at pH 6,0
<b>Código PDB</b>	7A38	7A39	7A3A
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 1,5 M, glicerol 10 %, MES 0,1 M pH 6,0	Sulfato amónico 2,0 M, Hepes 0,1 M pH 7,0	Sulfato amónico 1,5 M, PEG 300 5 %, MES 0,1 M pH 6,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9793	0,9793	0,9793
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	37,98-1,62 (1,67-1,62)	19,44-1,65 (1,70-1,65)	20,00-1,80 (1,86-1,80)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1	<i>P</i> 6 <sub>5</sub> 22
<b>Celda unidad</b>	32,27 40,43 38,60 90,00 100,35 90,00	31,50 40,54 36,18 90,00 97,50 90,00	46,77 46,77 126,49 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	24960 (2448)	20619 (1667)	16255 (1550)
<b>Reflexiones únicas</b>	12512 (1217)	10821 (968)	8136 (775)
<b>Multiplicidad</b>	2,0 (2,0)	1,9 (1,7)	2,0 (2,0)
<b>Completitud (%)</b>	99,33 (98,06)	98,43 (89,29)	99,28 (99,36)
<b>I/sigma(I) medio</b>	10,93 (2,22)	9,44 (1,60)	23,49 (3,64)
<b>Wilson B-factor</b>	15,76	21,33	31,74
<b>R-merge</b>	0,03527 (0,2979)	0,02419 (0,3629)	0,008981 (0,1571)
<b>CC1/2</b>	0,999 (0,907)	0,999 (0,844)	1 (0,948)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	634 (61)	533 (47)	401 (40)
<b>R-work</b>	0,1707 (0,2255)	0,2034 (0,3542)	0,1893 (0,2632)
<b>R-free</b>	0,1974 (0,2527)	0,2196 (0,3029)	0,2047 (0,3119)
<b>CC(work)</b>	0,966 (0,941)	0,971 (0,894)	0,965 (0,890)
<b>CC(free)</b>	0,938 (0,902)	0,960 (0,831)	0,825 (0,759)
<b>Macromoléculas</b>	933	918	454
<b>Ligandos</b>	17	5	31
<b>Solvente</b>	91	51	28
<b>Residuos de proteína</b>	116	117	59
<b>RMS(enlaces)</b>	0,016	0,017	0,005
<b>RMS(ángulos)</b>	1,28	1,42	0,73
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	98,18	100,00	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	1,82	0,00	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00	0,00	0,00
<b>B-factor medio</b>	24,59	31,55	43,77
<b>Macromoléculas</b>	23,78	31,10	42,58
<b>Ligandos</b>	35,48	69,32	57,26
<b>Solvente</b>	30,86	35,85	48,24
<b>Número de grupos de TLS</b>			6

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 14. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante Src-L100I

<b>Src-L100I</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Crystal structure of the c-Src SH3 domain mutant L100I at pH 3,0
<b>Código PDB</b>	7A3C
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,0 M, MES 0,1 M pH 6,0, PEG 300 5 %, LiCl 40 mM, glicerol 10 %
<b>Longitud de onda</b>	0,9790
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,56-1,80 (1,86-1,80)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1
<b>Celda unidad</b>	37,47 92,39 37,59 90,00 102,16 90,00
<b>Reflexiones totales</b>	33919 (2065)
<b>Reflexiones únicas</b>	20572 (1366)
<b>Multiplicidad</b>	1,6 (1,5)
<b>Compleitud (%)</b>	88,74 (58,90)
<b>I/sigma(I) medio</b>	7,23 (1,16)
<b>Wilson B-factor</b>	25,27
<b>R-merge</b>	0,0292 (0,3088)
<b>CC1/2</b>	0,999 (0,848)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	20568 (1366)
<b>R-work</b>	0,1904 (0,2858)
<b>R-free</b>	0,2278 (0,3053)
<b>CC(work)</b>	0,956 (0,806)
<b>CC(free)</b>	0,928 (0,767)
<b>Macromoléculas</b>	1852
<b>Ligandos</b>	34
<b>Solvente</b>	125
<b>Residuos de proteína</b>	245
<b>RMS(enlaces)</b>	0,008
<b>RMS(ángulos)</b>	0,71
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	98,72
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	1,28
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	30,72
<b>Macromoléculas</b>	20,04
<b>Ligandos</b>	43,84
<b>Solvente</b>	37,20

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 15. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante Src-E106D

<b>Src-E106D</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Intertwined dimer of the c-Src SH3 domain mutant E106D
<b>Código PDB</b>	7A3B
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,4 M, MES 0,1 M pH 6,0, PEG 300 5 %, LiCl 40 mM, glicerol 10 %
<b>Longitud de onda</b>	0,9793
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,34-1,91 (1,97-1,91)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 6 <sub>5</sub> 22
<b>Celda unidad</b>	46,94 46,94 125,67 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	12782 (1340)
<b>Reflexiones únicas</b>	6396 (670)
<b>Multiplicidad</b>	2,0 (2,0)
<b>Completitud (%)</b>	92,28 (100,00)
<b>I/sigma(I) medio</b>	25,72 (3,30)
<b>Wilson B-factor</b>	38,45
<b>R-merge</b>	0,008055 (0,1779)
<b>CC1/2</b>	1 (0,923)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	6396 (670)
<b>R-work</b>	0,2038 (0,2621)
<b>R-free</b>	0,2168 (0,2778)
<b>CC(work)</b>	0,958 (0,890)
<b>CC(free)</b>	0,915 (0,834)
<b>Macromoléculas</b>	447
<b>Ligandos</b>	22
<b>Solvente</b>	11
<b>Residuos de proteína</b>	58
<b>RMS(enlaces)</b>	0,018
<b>RMS(ángulos)</b>	1,54
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	52,07
<b>Macromoléculas</b>	51,79
<b>Ligandos</b>	61,49
<b>Solvente</b>	44,54
<b>Número de grupos de TLS</b>	4

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

Tabla 16. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante Src-T125S

<b>Src-T125S</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Intertwined dimer of the c-Src SH3 domain mutant T125S
<b>Código PDB</b>	7A3D
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5 %, acetato sódico 0,1 M pH 5,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9793
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	19,46-2,20 (2,27-2,20)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> <sub>65</sub>
<b>Celda unidad</b>	47,232 47,232 126,413 90 90 120
<b>Reflexiones totales</b>	15342 (1152)
<b>Reflexiones únicas</b>	7859 (607)
<b>Multiplicidad</b>	2,0 (1,9)
<b>Completitud (%)</b>	96,66 (73,31)
<b>I/sigma(I) medio</b>	8,69 (1,39)
<b>Wilson B-factor</b>	48,16
<b>R-merge</b>	0,043 (0,523)
<b>CC1/2</b>	0,988 (0,629)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	7851 (607)
<b>R-work</b>	0,2155 (0,3227)
<b>R-free</b>	0,2096 (0,3217)
<b>CC(work)</b>	0,964 (0,739)
<b>CC(free)</b>	0,932 (0,769)
<b>Macromoléculas</b>	892
<b>Ligandos</b>	39
<b>Solvente</b>	15
<b>Residuos de proteína</b>	114
<b>RMS(enlaces)</b>	0,019
<b>RMS(ángulos)</b>	1,53
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	99,09
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,91
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	56,65
<b>Macromoléculas</b>	56,19
<b>Ligandos</b>	68,49
<b>Solvente</b>	53,60
<b>Número de grupos de TLS</b>	1

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis



Tabla 17. Colección de datos y estadísticas de refinado del mutante Src-T126S

<b>Src-T126S</b>	
<b>Título de la estructura</b>	Intertwined dimer of the c-Src SH3 domain mutant T126S
<b>Código PDB</b>	7A3E
<b>Condición de cristalización</b>	Sulfato amónico 2,5 M, PEG 300 5 %, MES 0,1 M pH 6,0
<b>Longitud de onda</b>	0,9793
<b>Línea</b>	ALBA BL13-XALOC
<b>Rango de resolución (Å)</b>	18,66-1,52 (1,57-1,52)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>5</sub> <sub>2</sub> <sup>2</sup>
<b>Celda unidad</b>	46,98 46,98 125,98 90,00 90,00 120,00
<b>Reflexiones totales</b>	26485 (2571)
<b>Reflexiones únicas</b>	13331 (1287)
<b>Multiplicidad</b>	2,0 (2,0)
<b>Completitud (%)</b>	99,26 (99,08)
<b>I/sigma(I) medio</b>	33,06 (2,33)
<b>Wilson B-factor</b>	27,47
<b>R-merge</b>	0,006001 (0,2904)
<b>CC1/2</b>	1 (0,857)
<b>Reflexiones usadas en el refinado</b>	13328 (1287)
<b>R-work</b>	0,2083 (0,3325)
<b>R-free</b>	0,2255 (0,3423)
<b>CC(work)</b>	0,951 (0,834)
<b>CC(free)</b>	0,922 (0,779)
<b>Macromoléculas</b>	447
<b>Ligandos</b>	29
<b>Solvente</b>	23
<b>Residuos de proteína</b>	58
<b>RMS(enlaces)</b>	0,018
<b>RMS(ángulos)</b>	1,65
<b>Ramachandran favorecido (%)</b>	100,00
<b>Ramachandran prohibido (%)</b>	0,00
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotámeros outlier</b>	0,00
<b>B-factor medio</b>	43,47
<b>Macromoléculas</b>	42,23
<b>Ligandos</b>	61,81
<b>Solvente</b>	44,47

Las estadísticas para el shell de mayor resolución se muestran entre paréntesis

## Apéndice 4

### Publicaciones

De la presente Tesis doctoral deriva la publicación: *The effect of an engineered ATCUN motif on the structure and biophysical properties of the SH3 domain of c-Src tyrosine kinase*, obteniendo las estructuras depositadas en el PDB con los códigos: 6XVM, 6XVN y 6XVO.

Otras publicaciones resultantes de los capítulos 4, 5 y 6 se encuentran en redacción.



# The effect of an engineered ATCUN motif on the structure and biophysical properties of the SH3 domain of c-Src tyrosine kinase

Marina Plaza-Garrido<sup>1</sup> · M<sup>a</sup> Carmen Salinas-García<sup>1</sup> · José C. Martínez<sup>2</sup> · Ana Cámara-Artigas<sup>1</sup>

Received: 10 February 2020 / Accepted: 22 March 2020 / Published online: 11 April 2020  
© Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC) 2020

## Abstract

Metal binding to sites engineered in proteins can provide an increase in their stability and facilitate new functions. Besides the sites introduced in purpose, sometimes they are present accidentally as a consequence of the expression system used to produce the protein. This happens with the copper- and nickel-binding (ATCUN) motif generated by the amino-terminal residues Gly-Ser-His. This ATCUN motif is fortuitously present in many proteins, but how it affects the structural and biophysical characterization of the proteins has not been studied. In this work, we have compared the structure and biophysical properties of a small modular domain, the SH3 domain of the c-Src tyrosine kinase, cloned with and without an ATCUN motif at the N terminus. At pH 7.0, the SH3 domain with the ATCUN motif binds nickel with a binding constant  $K_a = 28.0 \pm 3.0 \text{ mM}^{-1}$ . The formation of the nickel complex increases the thermal and chemical stability of the SH3 domain. A comparison of the crystal structures of the SH3 domain with and without the ATCUN motif shows that the binding of nickel does not affect the overall structure of the SH3 domain. In all crystal structures analyzed, residues Gly-Ser-His in complex with  $\text{Ni}^{2+}$  show a square planar geometry. The CD visible spectrum of the nickel complex shows that this geometry is also present in the solution. Therefore, our results not only show that the ATCUN motif might influence the biophysical properties of the protein, but also points to an advantageous stabilization of the protein with potential biotechnological applications.

**Keywords** SH3 domain · ATCUN motif · Nickel binding · Circular dichroism · Fluorescence · Crystal structure

## Abbreviations

CD	Circular dichroism
DLS	Dynamic light scattering
$R_h$	Hydrodynamic radius
MW	Molecular weight
GdnHCl	Guanidine hydrochloride
PDB	Protein Data Bank

## Introduction

In the last 3 decades, the number of protein structures deposited at the PDB has experienced a considerable growth and several factors contributed to this outcome [1]. Among them, the overexpression in heterologous systems has boosted the availability of many proteins. These expression systems allow the inclusion of affinity tags in the amino or carboxyl-terminal of the cloned protein and make possible its purification in a single chromatographic step. As a consequence, the success in the crystallization step is higher, and so the number of protein structures. These affinity tags play a key role in the purification of the proteins, but once purified, it is convenient to remove the unencoded added sequence with a highly specific protease. These proteases need a specific sequence, cleavage site, that is encoded in the expressed protein to remove the affinity tag. One of the most popular proteases for this purpose is thrombin (EC 3.4.21.5), which recognizes the consensus sequence LVPRGS and cleaves the peptide bond between Arg and Gly. The proteolysis of the tagged protein can produce a fortuitous metal-binding site composed by

✉ Ana Cámara-Artigas  
acamara@ual.es

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Physics, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3 and CIAMBITAL, 04120 Almería, Spain

<sup>2</sup> Department of Physical Chemistry and Institute of Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

## Otras publicaciones

En este Apéndice se muestran los artículos que se han obtenido a lo largo de esta etapa formativa pero que no se relacionan de forma directa con la Tesis doctoral. El primero de ellos se titula *New crystal form of human ubiquitin in the presence of magnesium* y está relacionado con mi Trabajo Fin de Máster. De este trabajo se obtuvo la estructura cristalográfica de la ubiquitina con código PDB: 5DK8. También se han publicado varios artículos relacionados con la lisozima, proteína que utilizamos en nuestro laboratorio como modelo para mejorar la calidad de los cristales.

Estos estudios resultaron en tres publicaciones:

- *Orthorhombic lysozyme crystallization at acidic pH values driven by phosphate binding.*
- *Major conformational changes in the structure of lysozyme obtained from a crystal with a very low solvent content.*
- *Lysozyme crystals dyed with bromophenol blue: where has the dye gone?*

Y en varias estructuras depositadas en el PDB: 6S7N, 6F9Y, 6F9X, 6F9Z, 6FA0, 6F9Y, 6F9X, 6F9Z, 6FA0, 6SYC, 6SYD y 6SYE.

# New crystal form of human ubiquitin in the presence of magnesium

Ana Camara-Artigas,<sup>a</sup> Marina Plaza-Garrido,<sup>a</sup> Sergio Martinez-Rodriguez<sup>b</sup> and Julio Bacarizo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry and Physics, University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Carretera de Sacramento (s/n), 04120 Almeria, Spain, and <sup>b</sup>Department of Physical Chemistry, University of Granada, Avdenida de Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain. \*Correspondence e-mail: juliobacarizo@hotmail.com

Received 5 October 2015

Accepted 5 December 2015

Edited by N. Sträter, University of Leipzig, Germany

**Keywords:** packing; crystal contacts; magnesium chloride hexahydrate; human ubiquitin; high resolution; hexa-aquo coordination.

**PDB reference:** human ubiquitin in space group *P*1, 5dk8

**Supporting information:** this article has supporting information at journals.iucr.org/f

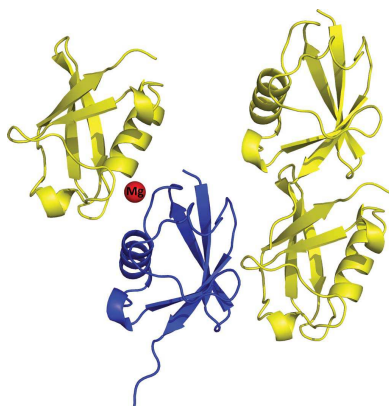
Ubiquitin is a small globular protein that has a considerable number of lysine residues on its surface. This results in a high surface entropy that precludes the formation of crystal-packing interactions. To date, only a few structures of the native form of ubiquitin have been solved, and most of the crystals that led to these structures were obtained in the presence of different divalent metal cations. In this work, a new crystallographic structure of human ubiquitin solved from crystals grown in the presence of magnesium is presented. The crystals belonged to a triclinic space group, with unit-cell parameters  $a = 29.96$ ,  $b = 30.18$ ,  $c = 41.41$  Å,  $\alpha = 88.52$ ,  $\beta = 79.12$ ,  $\gamma = 67.37^\circ$ . The crystal lattice is composed of stacked layers of human ubiquitin molecules with a large hydrophobic interface and a smaller polar interface in which the magnesium ion lies at the junction between adjacent layers in the crystal. The metal ion appears in a hexa-aquo coordination, which is key to facilitating the crystallization of the protein.

## 1. Introduction

Ubiquitin (Ub) is a small protein of 76 amino acids (molecular weight 8565 Da), the polypeptide sequence of which is highly conserved among different organisms. The ubiquitin–proteasome system (UPS) is involved in the destruction of proteins for the maintenance of protein homeostasis in cells, where Ub acts by tagging and targeting proteins to the large proteolytic chamber of the proteasome, causing their elimination. Ubiquitination also occurs in a wide range of other cellular processes, including translation, transcription, cytokine, protein kinase and DNA-damage signalling, intracellular trafficking and most forms of protein degradation. Imbalances in the ubiquitin system can lead to disease, as many proteins involved in the assembly, binding or disassembly of ubiquitin conjugates are mutated in human disorders (Glickman & Ciechanover, 2002).

As of October 2015, 34 crystallographic structures of ubiquitin had been deposited in the Protein Data Bank (PDB; Berman *et al.*, 2000). Most of the structures are of modified ubiquitin constructs and only 14 structures are of monomeric wild-type human ubiquitin (HUb). Interestingly, ten of these structures were obtained in the presence of divalent metal cations such as Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Pt<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> (Falini *et al.*, 2008; Arnesano *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015). These metals are mainly located at the crystal contacts and may facilitate the growth of the crystals.

The likelihood of obtaining HUb crystals has been reported to be dependent to the presence of seven lysine residues located on the protein surface (9.2% of the residues of the





ISSN: 2059-7983  
journals.iucr.org/d

## Orthorhombic lysozyme crystallization at acidic pH values driven by phosphate binding

**Marina Plaza-Garrido, M. Carmen Salinas-Garcia and Ana Camara-Artigas**

*Acta Cryst.* (2018). **D74**, 480–489



**IUCr Journals**  
CRYSTALLOGRAPHY JOURNALS ONLINE

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>

# Major conformational changes in the structure of lysozyme obtained from a crystal with a very low solvent content

M. Carmen Salinas-García, Marina Plaza-Garrido, Daniel Alba-Elena and Ana Camara-Artigas\*

Received 31 July 2019  
Accepted 25 September 2019

Edited by M. J. van Raaij, Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, Spain

**Keywords:** low solvent content; lysozyme; folding intermediate.

**PDB reference:** orthorhombic lysozyme grown at pH 5.5 with 26% solvent content, 6s7n

**Supporting information:** this article has supporting information at journals.iucr.org/f

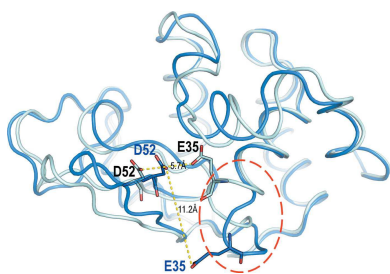
Department of Chemistry and Physics, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) and CIAMBITAL, University of Almería, Carretera de Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain. \*Correspondence e-mail: acamara@ual.es

A new crystal form of lysozyme with a very low solvent content (26.35%) has been obtained in the orthorhombic space group  $P2_12_12_1$  (with unit-cell parameters  $a = 30.04$ ,  $b = 51.68$ ,  $c = 61.53$  Å). The lysozyme structure obtained from these crystals does not show the typical overall fold. Instead, major conformational changes take place in some elements of the secondary structure and in the hydrophobic core of the protein. At the end of the central  $\alpha$ -helix ( $\alpha 2$ ), Glu35 is usually buried in the catalytic site and shows an abnormally high  $pK_a$  value, which is key to the activity of the enzyme. The high  $pK_a$  value of this glutamate residue is favoured by the hydrophobic environment, particularly by its neighbour Trp108, which is important for structural stability and saccharide binding. In this new structure, Trp108 shows a  $90^\circ$  rotation of its side chain, which results in the rearrangement of the hydrophobic core. Conformational changes also result in the exposure of Glu35 to the solvent, which impairs the catalytic site by increasing the distance between Glu35 and Asp52 and lowering the  $pK_a$  value of the glutamate. Altogether, this new lysozyme structure reveals major conformational changes in the hydrophobic core and catalytic site that might play a role in the folding and bactericidal function of the protein.

## 1. Introduction

Hen egg-white lysozyme (HEWL) has been widely used as a model protein to study protein crystallization, protein folding, aggregation and amyloid formation (Gavira, 2016; Swaminathan *et al.*, 2011; Dobson *et al.*, 1994). HEWL crystals have also been used to study structural changes in the presence of extreme conditions, such as, for example, low humidity and high pressure (Asai *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2015; Sukumar *et al.*, 1999). Biswal *et al.* (2000) compared 20 crystal structures of HEWL obtained in different environments in terms of pH, crystal packing, solvent content and its composition, pressure and temperature to identify protein regions with differential flexibility. Considering the backbone residues, the loops 67–73 and 99–103 were classified as highly flexible regions, while the residues implied to be in the catalytic site were classified in the rigid region. In the crystals measured under extreme conditions, although the backbone conformation of the catalytic site was conserved, some relevant changes in the side-chain conformation and hydration were observed. In general, all of these changes do not affect the secondary-structure elements, and the overall fold of HEWL is well conserved.

Lysozyme exerts its function in two ways: by catalysis of the hydrolysis of the  $\beta$ -(1,4)-glycosidic linkage between



# Lysozyme crystals dyed with bromophenol blue: where has the dye gone?

Marina Plaza-Garrido,<sup>a</sup> M. Carmen Salinas-García,<sup>a</sup> Daniel Alba-Elena,<sup>a</sup> Jose C. Martínez<sup>b</sup> and Ana Camara-Artigas<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry and Physics, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) and CIAMBITAL, University of Almería, Carretera de Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain, and <sup>b</sup>Department of Physical Chemistry and Institute of Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain. \*Correspondence e-mail: acamara@ual.es

Received 25 February 2020

Accepted 30 June 2020

Edited by Q. Hao, University of Hong Kong

**Keywords:** X-ray structure; solvent channels; lysozyme; bromophenol blue; dye binding.

**PDB references:** tetragonal lysozyme in the presence of bromophenol blue at pH 6.5, 6syc; tetragonal lysozyme in the presence of bromophenol blue at pH 5.5, 6syd; orthorhombic lysozyme in the presence of bromophenol blue at pH 7.0, 6sye

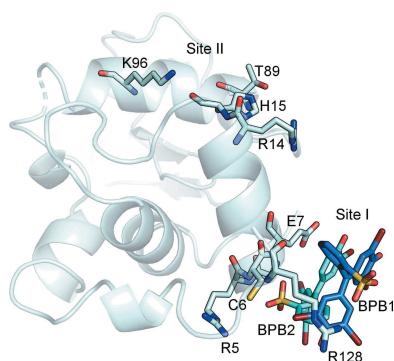
**Supporting information:** this article has supporting information at journals.iucr.org/d

Protein crystals can easily be coloured by adding dyes to their mother liquor, but most structures of these protein–dye complexes remain unsolved. Here, structures of lysozyme in complex with bromophenol blue obtained by soaking orthorhombic and tetragonal crystals in a saturated solution of the dye at different pH values from 5.0 to 7.5 are reported. Two different binding sites can be found in the lysozyme–bromophenol blue crystals: binding site I is located near the amino- and carboxyl-termini, while binding site II is located adjacent to helices  $\alpha 1$  (residues 4–15) and  $\alpha 3$  (residues 88–100). In the orthorhombic crystals soaked at pH 7.0, binding of the dye takes place in both sites without significant changes in the unit cell. However, soaking tetragonal crystals with bromophenol blue results in two different complexes. Crystals soaked at pH 5.5 (HEWL-T1) show a single dye molecule bound to site II, and the crystals belong to space group  $P4_32_12$  without significant changes in the unit cell ( $a = b = 78.50$ ,  $c = 37.34$  Å). On the other hand, crystals soaked at pH 6.5 in the presence of imidazole (HEWL-T2) show up to eight molecules of the dye bound to site II, and display changes in space group ( $P2_12_12_1$ ) and unit cell ( $a = 38.00$ ,  $b = 76.65$ ,  $c = 84.86$  Å). In all of the structures, the dye molecules are placed at the surface of the protein near to positively charged residues accessible through the main solvent channels of the crystal. Differences in the arrangement of the dye molecules at the surface of the protein suggest that the binding is not specific and is mainly driven by electrostatic interactions.

## 1. Introduction

Protein crystals can be coloured by adding various dyes to their mother liquor and it is easy to distinguish between protein and salt crystals using this procedure (Raghunathan *et al.*, 2010). Studies performed with model proteins and several dyes have shown that the dye is incorporated into the crystals in a few hours. Interestingly, although protein crystals can easily be stained with dyes, most of the time these crystals did not show electron density in the difference maps that could be used to model the dye molecules (McPherson, 2019; McPherson & Larson, 2018).

Lysozyme has been used as a model protein to study protein crystallization, protein folding, aggregation and amyloid formation (Gavira, 2016; Swaminathan *et al.*, 2011; Dobson *et al.*, 1994). Indeed, the binding of dyes to lysozyme has been studied in solution using various techniques (Baugher *et al.*, 1974; Nishikimi & Yoshino, 1972; Krishnamoorthy & Prabhanda, 1982*a,b*; Wang *et al.*, 2011; Paramaguru *et al.*, 2010). Interestingly, although lysozyme is used as a model protein in



© 2020 International Union of Crystallography