

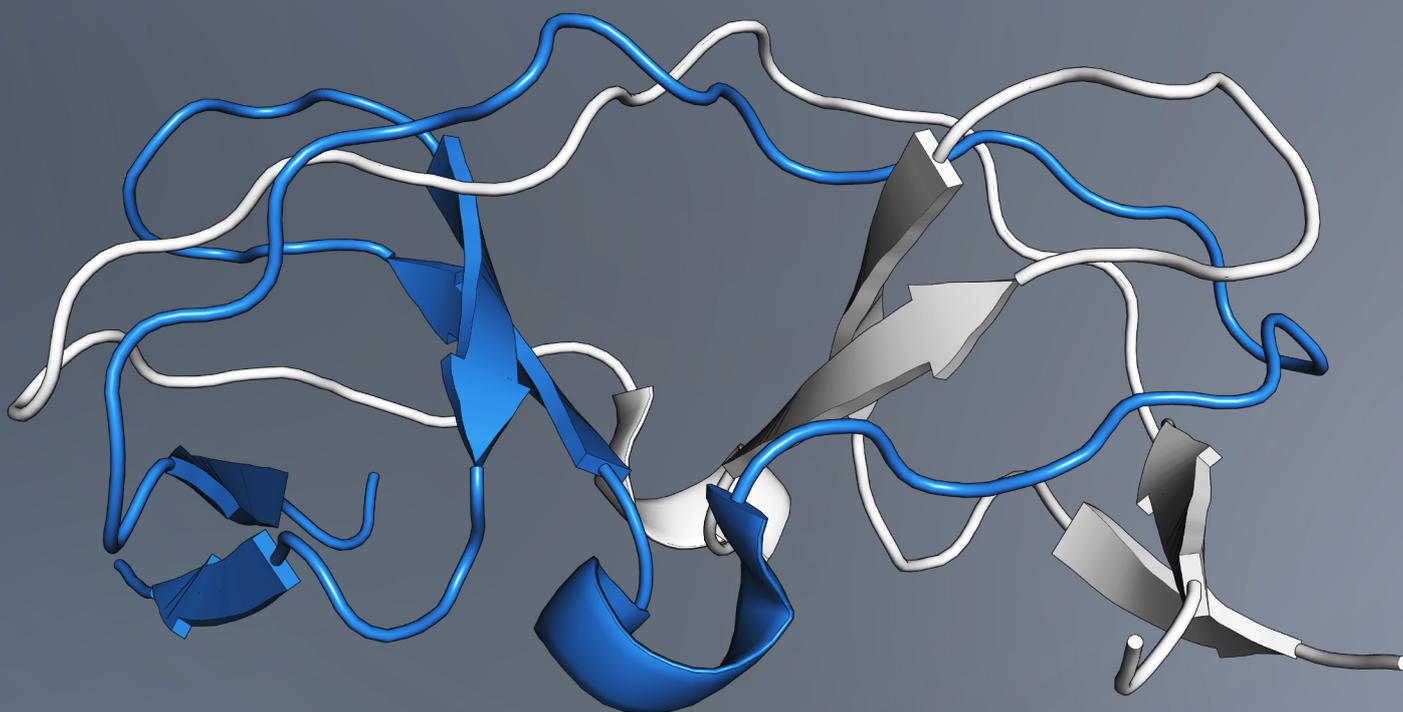


**PROTEÍNAS QUIMERA DE LOS DOMINIOS SH3 DE LA
C-SRC Y ABL TIROSINA QUINASA: UN ESTUDIO DE LAS
BASES MOLECULARES DEL ENTRECruzAMIENTO
TRIDIMENSIONAL DE DOMINIOS**

TESIS DOCTORAL

María del Carmen Salinas García

Departamento de Química y Física
Área de Química-Física
Universidad de Almería



Almería, abril 2022



Departamento de Química y Física

Área de Química-física

Universidad de Almería

Proteínas quimera de los dominios SH3 de la c-Src y Abl 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 Abl 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: María del Carmen Salinas García

Directora: Ana María Cámara Artigas

Doctorado en Química Avanzada. Investigación en Química-Física

Almería, abril 2022

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 Abl 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 **María del Carmen Salinas García**, autorizando su presentación para su calificación como Tesis Doctoral.

Almería, abril 2022

Fdo: María del Carmen Salinas García

Fdo: Ana María Cámara Artigas

Agradecimientos

Estos últimos años han estado cargados de emociones y nuevas experiencias que me han hecho crecer tanto en el ámbito personal como profesional. Por ello, me gustaría agradecer a las personas que me han acompañado en este camino.

En primer lugar, a mi directora de tesis, Ana. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por tu paciencia y comprensión. Por los consejos que nos has ofrecido a lo largo de estos años y por tu compromiso con nuestro trabajo. Gracias por no solo ser una buena jefa, sino también, una buena líder. Sin duda, eres mi ejemplo a seguir.

A la que empezó siendo mi compañera de laboratorio, pero que ahora, sin lugar a duda es mi amiga, Marina. Gracias por escucharme, comprenderme y darme ánimos. Por nuestras aventuras, algunas de las cuales empezaron siendo problemas, pero que ya quedan como anécdotas de las que nos reímos juntas, sin ti nada de esto hubiera sido igual.

A Emilia y Montse, con ellas empecé en el mundo de las proteínas, y aquí sigo. Siempre dispuestas a echar una mano. Gracias por todo vuestro apoyo a lo largo de estos años.

A todas las personas que han pasado por el laboratorio, con las que he compartido desayunos, charlas y horas de trabajo. Gracias a Marina y a Mari Carmen por hacer los días más amenos.

A Gavi y Sergio, nunca imaginé que trabajando de madrugada podría divertirme tanto. Gracias por las risas en esos días largos de sincrotrón, pero también por vuestras ganas de enseñar, y vuestros consejos y recomendaciones. Gracias por abrirme las puertas del LEC, donde estuve de maravilla. A toda la gente del LEC, en especial a Carmen y Sara, por hacerme sentir como en casa, por vuestras sugerencias de Granada y por enseñarme a limpiar capilares, muy útil allá donde vaya.

A José Martínez, que estuvo conmigo en la facultad de ciencias de Granada, por la ayuda recibida y por todas las recomendaciones que me ha dado. Es un placer trabajar con expertos como tú.

To Dr. Fernando Rocha, Dra. Filipa Castro and Dra Joana Pereira. It is not easy to travel abroad and change your routine. But your kindness and comprehension make it easier. Thanks for your patient, your help and all the advice that you gave to me. I had a really good experience because of you. Muito obrigada!

A mi familia, en especial a mis padres y mis hermanos, por vuestro apoyo incondicional y por ofrecerme siempre vuestro consejo. Por estar conmigo y animarme en mis decisiones. Es una suerte poder contar con todos vosotros.

A todos mis amigos, los del pueblo y los de la universidad, por ayudarme a desconectar y recargar pilas. Gracias por escucharme y darme ánimos.

A Dima, mi pareja. Gracias por creer en mi cuando yo dejo de hacerlo, y por recordarme que los errores se cometen para aprender de ellos. Por ser mi pilar de apoyo, en especial durante estos últimos meses, y por animarme a perseguir mis sueños.

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) en el que se enmarca esta Tesis doctoral. Y a la Universidad de Almería por ofrecerme una beca predoctoral que me ha permitido trabajar en lo que me gusta.

Resumen

El principal objetivo de esta Tesis doctoral es el estudio de procesos de plegamiento alternativo que sufren algunas proteínas. Entre estos se encuentran el entrecruzamiento de dominios y la formación de fibras amiloides. En esta Tesis nos hemos centrado en una proteína modelo para poder desarrollar estos estudios como es el dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa. Nuestros estudios se han centrado principalmente en el papel del llamado lazo bisagra en la apertura de los dominios para formar los oligómeros entrecruzados. Se han intercambiado dos de los lazos del dominio SH3 que, además de realizar un papel clave en la función del dominio, son susceptibles de sufrir la apertura. De esta forma, se han construido proteínas quimeras del dominio c-Src-SH3 y Abl-SH3 en los que se han intercambiado los lazos RT y n-Src de forma independiente o simultánea. Se ha seleccionado el dominio SH3 de la Abl porque en este no se ha descrito la formación de fibras amiloides ni la de oligómeros entrecruzados y, además, presenta una composición de los lazos con cambios en residuos importantes para la estabilización del dímero entrecruzado del dominio c-Src SH3. También se ha estudiado el efecto de las mutaciones oncogénicas del dominio SH3 de la variante viral de la c-Src tirosina quinasa, la v-Src, que aparecen precisamente en los lazos intercambiados.

Se ha llevado a cabo un estudio estructural y la caracterización biofísica de todas las proteínas objeto de estudio. Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que, al menos en el caso del dominio c-Src SH3, existen otros factores que facilitan la formación de dímeros entrecruzados, más allá de la composición del lazo. En efecto, la sustitución de los lazos RT y n-Src del dominio Abl da lugar a un dímero entrecruzado en el cual los dos lazos actúan como lazo bisagra. En todas las condiciones estudiadas no se ha logrado la formación de dímeros entrecruzados de las quimeras Abl con los lazos del dominio c-Src. La caracterización biofísica demuestra que mientras la sustitución de los lazos de la Abl en el dominio c-Src apenas producen cambios en la estabilidad del dominio, el efecto es mucho más notable en las quimeras del dominio Abl en la que se han introducido los lazos del dominio c-Src-SH3. En cuanto a la formación de fibras amiloides, hemos corroborado la presencia de estos en aquellos dominios que se han obtenido como dímeros entrecruzados.

Son de especial interés los resultados obtenidos con la variante oncogénica del dominio c-Src SH3. La formación del dímero entrecruzado solo se ha obtenido en la proteína que contiene las mutaciones en el lazo n-Src, pero no en el lazo RT. Se han obtenido las estructuras de tres variantes de este dominio que permiten analizar la pérdida de estabilidad de este dominio

mientras conserva la capacidad de unir secuencias ricas en prolina. En este dominio la mutación de Arg95Trp conduce a la pérdida de un puente salino que es clave para estabilizar el dímero entrecruzado. Además, la presencia del Trp95 en el lazo hace la proteína más inestable y susceptible de agregarse formando fibras amiloides.

Abstract

This doctoral thesis investigates the molecular principles of protein misfolding, like three-dimensional domain-swapping or amyloid formation. For this purpose, we have used a model protein as it is the SH3 domain of the c-Src tyrosine kinase.

Our studies were mainly focused on the role of the so-called hinge loop, which is the region of the protein susceptible to opening to facilitate the formation of the intertwined oligomers. Two of the loops, the RT and n-Src loops, have been interchanged between c-Src-SH3 and Abl-SH3 domains. Abl has been selected because neither formation of amyloid fibres nor intertwined oligomers have been described in its SH3 domain. In addition, these loops play a key role in the domain function, and their composition is different in crucial residues in stabilising the intertwined dimer of the c-Src-SH3. In this way, chimeric proteins of the c-Src-SH3 and Abl-SH3 domains have been constructed, introducing the RT or the n-Src loops, or both loops simultaneously. We have also studied the effect of oncogenic mutations in the SH3 domain of the viral variant of c-Src tyrosine kinase, v-Src. These mutations appear precisely in the exchanged loops.

We have carried out a structural study and biophysical characterisation of all the designed chimeric proteins and the v-Src mutants. The results obtained in this thesis show that, at least in the case of the c-Src SH3 domain, other factors beyond the composition of the hinge loop facilitate the formation of intertwined dimers. Indeed, the substitution of the RT and n-Src loops of the Abl domain gives rise to an intertwined dimer in which the two loops act as hinge loops. In all the conditions studied, Abl chimeras with the loops of the c-Src domain do not form intertwined dimers. The biophysical characterisation shows that the substitution of the Abl loops in the c-Src-SH3 domain barely produces any changes in the stability of the domain. This effect is much more notable in the chimeras of the Abl domain in which the c-Src domain loops have been introduced. Regarding the formation of amyloid fibres, these are formed by those chimeras obtained as intertwined dimers.

The results obtained with the oncogenic variant of the c-Src SH3 domain are quite interesting. Formation of the intertwined dimer takes only place in the protein that contains the mutations in the n-Src and distal loops, but not in the RT loop. The structures of three variants of this domain have been obtained. These structures show that although the viral SH3 domain is less stable, this domain can bind sequences rich in proline. In this domain, the mutation of Arg95Trp

leads to the loss of a salt bridge that is key to stabilising the intertwined dimer. Furthermore, the presence of Trp95 in the loop makes the protein more unstable and susceptible to aggregation forming amyloid fibres.

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	21
1.1 Introducción.....	23
1.2 Entrecruzamiento de dominios	25
1.2.1 Conceptos básicos	25
1.2.2 Importancia biológica.....	27
1.2.3 Los primeros descubrimientos: desde la ribonucleasa A hasta los dominios SH3 ..	29
1.3 Formación de fibras amiloides	31
1.3.1 Descripción y estabilidad	31
1.3.2 Formación y cinética de fibras amiloides.....	33
1.3.3 Importancia biológica.....	36
1.3.3.1 Papel de los amiloides en enfermedades.....	36
1.3.3.2 Amiloides funcionales	36
1.3.4 Formación de fibras amiloides en dominios SH3	37
1.4 Relación entre entrecruzamiento de dominios y formación de fibras amiloides.....	39
1.5 Dominios SH3 como proteínas modelo para el estudio de 3D-DS y formación de fibras amiloides.....	41
1.5.1 Descripción básica de los dominios SH3: función y estructura	41
1.5.2 Importancia biológica de los dominios SH3	43
1.5.3 Dominios SH3: Abl, c-Src, v-Src.....	44
1.5.3.1 Dominios SH3: Familia de Src tirosina quinasa	44
1.5.3.2 v-Src, el primer oncogén.....	47
1.5.3.3 Abl tirosina quinasa	48
1.6 Objetivos.....	50
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1. Materiales	55
2.2. Métodos	55
2.2.1. Clonado, expresión y purificación de proteínas	55
2.2.1.1. Dominios Src-Abl-SH3, Abl-Src-SH3 y mutantes del dominio v-Src-SH3 clonados en el vector pHTP1	55
2.2.1.2 Expresión y purificación de la proteasa TEV	59
2.2.2 Preparación de disoluciones tampón	60
2.2.3. Medida de la concentración de proteína.....	60
2.2.4. Determinación del límite de solubilidad de la proteína.....	60

2.2.5. Fluorescencia.....	61
2.2.6 Dicroísmo circular.....	63
2.2.7. Dispersión dinámica de la luz	65
2.2.8 Caracterización de la presencia de fibras amiloides.....	66
2.2.9 Cristalización de proteínas	68
2.2.10 Difracción de rayos X y resolución estructural.....	70
2.2.11 Análisis estructural.....	72
CAPÍTULO 3: IMPACTO DE LAS MUTACIONES ONCOGÉNICAS DE LA QUINASA V-SRC SOBRE LA ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD DEL DOMINIO SH3.....	73
3.1. Resultados.....	76
3.1.2. Expresión y purificación de los mutantes v-Src-SH3	76
3.2.2. Caracterización biofísica de los mutantes v-Src-SH3	77
3.2.1.1 <i>Estabilidad de los mutantes v-Src-SH3 en función del pH</i>	77
3.2.1.2 <i>Estabilidad de los mutantes v-Src en presencia de cloruro de guanidinio</i>	79
3.2.1.3 <i>Estabilidad térmica de los mutantes v-Src</i>	80
3.2.2. Cristalización y determinación estructural de los mutantes del dominio v-Src-SH3	82
3.2.2.1 <i>Cristalización y determinación estructural de los mutantes del dominio v-Src-SH3</i>	83
3.2.2.2 <i>Cristalización y determinación estructural de los mutantes del dominio v-Src-SH3 en complejo con péptidos de alta afinidad</i>	91
3.3. Discusión	97
3.3.1. Estructuras de los mutantes del dominio v-Src-SH3.....	97
3.3.2. Interacciones del dominio SH3 en la tirosina quinasa y en complejo con los MRPs	100
CAPÍTULO 4: PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y ESTRUCTURALES DE LAS QUIMERAS SRC-ABL Y ABL-SRC.....	105
4.1 Resultados.....	107
4.1.1. Expresión y purificación de las quimeras Src-Abl-SH3 y Abl-Src-SH3	107
4.1.2. Caracterización biofísica de las quimeras Src-Abl-SH3 y Abl-Src-SH3	109
4.1.2.1 <i>Solubilidad de las quimeras</i>	109
4.1.2.2 <i>Estabilidad de las quimeras en función del pH</i>	109
4.1.2.3 <i>Estabilidad de las quimeras en presencia de cloruro de guanidinio</i>	111
4.1.2.4 <i>Estabilidad térmica de las quimeras</i>	113

4.1.2.5 Caracterización del estado de oligomerización de las quimeras Src-Abl-SH3 y Abl-Src-SH3	117
4.1.3. Cristalización y determinación estructural de las quimeras Src-Abl-SH3 y Abl-Src-SH3	118
4.1.3.1 Estructura de la quimera SA-RT	122
4.1.3.2 Estructura de la quimera SA-Src	130
4.1.3.3 Estructura de la quimera SA-2X	133
4.1.3.4 Estructura de la quimera AS-RT	143
4.1.3.5 Estructura de la quimera AS-Src	146
4.1.3.6 Estructura de la quimera AS-2X	148
4.1.4 Estudios para caracterizar la formación de fibras amiloides en las quimeras Src-Abl-SH3 y Abl-Src-SH3	154
4.2 Discusión	157
4.2.1. Efecto en la estabilidad de las quimeras de la sustitución de los lazos RT y Src .	159
4.2.2. ¿Está la apertura de los protómeros condicionada por la secuencia del lazo?	163
4.2.3. Qué demuestran las estructuras acerca del papel del lazo bisagra	165
4.2.4. ¿Hay un papel en el 3D-DS de otros residuos más allá de los del lazo bisagra? ..	168
4.2.5. ¿Está relacionado el 3D-DS con la formación de amiloides?	173
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	183
APÉNDICES	201
Apéndice 1: Reactivos e instrumentación	203
Apéndice 2: Disoluciones para el cribado de las condiciones de cristalización	207
Apéndice 3: Estadísticas de refinado de las estructuras obtenidas	211
Apéndice 4: Publicaciones	219

Abreviaturas

[D]	Concentración de agente desnaturalizante
[GdnHCl]	Concentración de cloruro de guanidinio
[L]	Concentración de ligando libre
ΔC_p	Cambio de capacidad calorífica de desnaturalización a presión constante
ΔG_w	Cambio de energía libre de Gibbs de desplegamiento
ΔG_{int}	Ganancia de energía libre de solvatación en la formación del oligómero
ΔH_m	Cambio de entalpía a la temperatura T_m
Δn	Diferencia entre el índice de refracción del agente caotrópico y el índice de refracción de la disolución tamponante en la que está disuelto
3D-DS	Entrecruzamiento tridimensional de dominios
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ANS	Ácido 8-Anilinaftalén-sulfónico
ASA	Área superficial accesible
CD	Dicroísmo circular
C_p	Capacidad calorífica molar parcial de una proteína
CR	Rojo Congo
$D_{1/2}$	Concentración media de desnaturalización
D_0	Coefficiente de difusión traslacional
Da	Dalton
DLS	Dispersión dinámica de la luz
F (0)	Intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia de ligando
F (∞)	Intensidad de fluorescencia de la proteína saturada por el ligando
F(L)	Intensidad de fluorescencia de la proteína a una determinada concentración de ligando
FSTQ	Familia de la Src tirosina quinasa
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
K_B	Constante de Boltzmann
K_d	Constante de equilibrio de disociación
LB	Medio de cultivo Lysogeny Broth
m_N	Pendiente de la región desplegada
m_N	Pendiente de la región plegada

MRP	Motivos ricos en prolina
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
PDB	Protein Data Bank
PDZ	Post synaptic density protein – Discs Large-4 – Zonula Occludens I
PEG	Polietilenglicol
Pell	Pellet, restos celulares
pK_a	Menos logaritmo de la constante de acidez
PM	Peso molecular de la proteína
RC	Rojo congo
R_h	Radio hidrodinámico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
RSV	Virus del sarcoma de Rous
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SH3	Src Homology-3
MRP	Motivos ricos en prolina
T	Temperatura
t	Tiempo
TEC	Tampón de equilibrado de columna
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEV	Proteasa Tobacco Etch Virus
ThT	Tioflavina T
T_m	Temperatura de la transición a la que $\Delta G=0$
TQ	Tirosina quinasa
WT	Proteína nativa
Y	Energía espectral media de emisión y fracción de saturación
Y_a	Energía espectral media de emisión de la parte ácida
Y_b	Energía espectral media de emisión de la parte básica
Y_d	Energía espectral media de emisión de la proteína desnaturalizada
Y_n	Energía espectral media de emisión de la proteína nativa

ζ	Coeficiente de fricción
η	Viscosidad
θ	Elipticidad
θ_N	Elipticidad de la proteína plegada
θ_U	Elipticidad de la proteína desplegada

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1 Introducción

Las proteínas además de ejercer papeles vitales en los organismos vivos, en los últimos años han surgido como un recurso biotecnológico de gran valor. Los procesos biológicos en los que intervienen las proteínas son diversos, desde su implicación en reacciones químicas hasta las meramente estructurales. Son, sin duda, las moléculas más complejas que existen. Partiendo de solo 20 aminoácidos, las cadenas polipeptídicas formadas por estos son capaces de realizar funciones muy diversas que en general están asociadas a las estructuras tridimensionales específicas que adoptan. Durante más de 50 años, desde que Anfinsen propuso que la estructura tridimensional de las proteínas estaba codificada en su secuencia (Anfinsen *et al.*, 1961), los investigadores han invertido gran cantidad de tiempo y esfuerzo en intentar predecir estas estructuras a partir de las secuencias. A finales del año 2020 se alcanzó el gran hito de desarrollar un programa informático capaz de lograr esto: Alpha Fold 2 (Callaway, 2020; Jumper *et al.*, 2021). En principio, este programa es capaz de alcanzar una fiabilidad en los modelos que predice tan alta como la de los modelos experimentales obtenidos por cristalografía de rayos X o criomicroscopía electrónica (Callaway, 2020). ¿Pero realmente se pueden predecir todas las estructuras de las proteínas a partir de sus secuencias?

La secuencia de las proteínas constituye su estructura primaria, pero para que sean funcionalmente activas deben adquirir no solo una estructura tridimensional específica, estructura terciaria, también en muchos casos formar oligómeros que son lo que se considera la estructura cuaternaria de las proteínas. De esta forma, algunas proteínas están formadas por una sola cadena, pero otras están compuestas por varias cadenas iguales, homooligómeros, o distintas, heterooligómeros. La oligomerización aporta a las proteínas una ventaja evolutiva ya que puede incorporar mecanismos más complejos de regulación de su función como el alosterismo (Vitagliano *et al.*, 1999; Schymkowitz *et al.*, 2001; Mathiharan *et al.*, 2015). Es por ello, por lo que el interés en la oligomerización de proteínas ha ido creciendo en los últimos años gracias al aumento del conocimiento en dichos procesos. La oligomerización abre posibles aplicaciones en el campo de la biotecnología y en la fabricación de nuevos materiales, además de poder estudiar sus implicaciones en procesos biológicos y enfermedades.

Los experimentos pioneros de Anfinsen demostraron que el proceso de plegamiento de las proteínas es espontáneo, y en él, la proteína adquiere su estructura nativa mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der

Waals (Dill, 1990; Pace *et al.*, 1996). A pesar de los numerosos trabajos realizados para entender el proceso de plegamiento, todavía quedan muchas cuestiones por aclarar. Por ejemplo, por qué en algunos casos las proteínas adquieren conformaciones alternativas al supuesto plegamiento nativo (funcional) de la proteína. Estos supuestos fallos dan lugar a proteínas parcial o totalmente desplegadas, que pueden constituir el origen de la aparición de ciertas enfermedades o tener un papel distinto al de la proteína original.

Si la proteína está incorrecta o parcialmente plegada puede exponer sus residuos hidrofóbicos al medio acuoso. Esto constituye una situación energéticamente desfavorable que puede evolucionar hacia la formación de agregados amorfos o constituir agregados de mayor orden, denominados fibras amiloides. La acumulación de estos últimos agregados ha sido vinculada a gran número de enfermedades humanas entre las que destacan enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades del Alzheimer y de Parkinson (Chiti & Dobson, 2006). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se forman estos agregados y su papel en la enfermedad, aún se desconoce. Por ello el interés de su estudio estructural, pero hasta la fecha la información a nivel atómico de estos agregados es escasa. Su gran tamaño y las dificultades para obtener cristales de fibras amiloides dificulta el uso de las dos principales técnicas de alta resolución estructural, RMN y cristalografía de rayos X. Una estrategia para abordar tales estudios es mediante la caracterización de procesos de plegamiento alternativo, como es el entrecruzamiento de dominios. A diferencia de los amiloides, estos oligómeros pueden ser cristalizados, lo que permite obtener información estructural mediante difracción de rayos X (Cámara-Artigas, 2016). Además, se ha propuesto que este proceso puede estar detrás de los primeros estadios que dan lugar a la formación de fibras amiloides (Ding *et al.*, 2002). Esta propuesta cobra validez si tenemos en cuenta que la mayoría de las proteínas que forman oligómeros entrecruzados son a su vez propensas a formar fibras amiloides (Bennet *et al.*, 2006; Van der Wel, 2012; Bacarizo *et al.*, 2014). El análisis estructural de estos oligómeros entrecruzados podría ser la clave para entender las condiciones moleculares e interacciones que dan lugar a plegamientos alternativos de las proteínas, ya sea a la formación de agregados fibrilares o al entrecruzamiento de dominios.

Para avanzar en el conocimiento de los procesos que dan lugar a plegamientos alternativos es conveniente elegir una proteína que pueda usarse de modelo. Esta, además de sufrir formación de fibras amiloides y entrecruzamiento de dominios, debe ser fácil de

purificar y caracterizar. Una proteína que cumple estos requisitos es el dominio SH3 de la c-Src tirosina quinasa (Bacarizo *et al.*, 2014). Este dominio ha sido ampliamente estudiado tanto experimental como teóricamente en procesos de plegamiento/desplegamiento. Su pequeño tamaño junto a otras de sus propiedades, lo hace perfecto como modelo para llevar a cabo dichas investigaciones (Cámara-Artigas, 2016).

Estudiar los primeros pasos en la formación de estos fenómenos de agregación proteica, así como un mayor conocimiento estructural de los mismos, es imprescindible para el diseño de fármacos y tratamientos que posibiliten bloquear el mecanismo por el cual las proteínas adquieren un plegamiento anómalo, y así poder combatir las enfermedades relacionadas con estos procesos.

1.2 Entrecruzamiento de dominios

1.2.1 Conceptos básicos

El entrecruzamiento de dominios, también conocido como 3D-DS, por sus siglas en inglés *3D domain swapping* es un proceso de oligomerización que se produce en las proteínas, y que consiste en el intercambio de dominios o de elementos de la estructura secundaria entre monómeros distintos de la proteína, dando lugar a dímeros u oligómeros de mayor orden (Bennet *et al.*, 1994; Bennet *et al.*, 1995; Mascarenhas *et al.*, 2016). El término 3D se usa para aclarar que este proceso no se produce en términos genéticos sino de forma tridimensional (Hirota *et al.*, 2019). Generalmente, se suele producir en los extremos N- y C- terminal, aunque puede originarse en cualquier lugar de la cadena polipeptídica (Rousseau *et al.*, 2012). El lazo bisagra es el determinante del entrecruzamiento de dominios, ya que es la única región de la proteína que adopta una conformación totalmente diferente en el monómero y la forma entrecruzada, y por ello, debe tener cierta flexibilidad (Liu & Eisenberg, 2002; Rousseau *et al.*, 2012).

El fenómeno de entrecruzamiento de dominios fue descrito por primera vez por Eisenberg y colaboradores en 1994 (Bennet *et al.*, 1994; Bennet *et al.*, 1995; Liu & Eisenberg, 2002). Ellos fueron quienes establecieron una clasificación basándose en la disponibilidad estructural de las formas entrecruzada y no entrecruzada, distinguiéndose tres tipos de entrecruzamiento entre dominios:

- a) *Bona fide domain swapping*: Se conocen las estructuras del monómero cerrado y del dímero entrecruzado.
- b) *Quasi domain swapping*: La estructura del entrecruzado se conoce, pero la monomérica no, aunque existe una estructura monomérica homóloga.
- c) Candidato para *domain swapping*: En este caso no existe la forma monomérica ni ninguna homóloga.

El mecanismo por el cual se produce el 3D-DS no está claro. Eisenberg y colaboradores propusieron un mecanismo simple para explicar el proceso de 3D-DS donde, las unidades monoméricas de una proteína se “abren” para entrelazarse con la unidad correspondiente de otra molécula de la proteína. Este estado del monómero se conoce como “estado monomérico abierto”, mientras que el estado monomérico, que no está acoplado con la otra molécula se conoce como “estado monomérico cerrado”, siendo este último más compacto e independiente (Figura 1.1). La transformación entre las formas monoméricas abierta y cerrada es clave en el proceso de entrecruzamiento de dominios. En términos de energía, la diferencia de energía para la conversión de un estado en el otro es la llamada energía de activación. La diferencia de energía libre entre el estado monomérico cerrado y el oligómero entrecruzado es baja ya que ambos comparten la misma estructura excepto en el lazo bisagra. Sin embargo, la barrera energética entre ambos estados es elevada, y puede ser reducida mediante cambios en las condiciones del medio, como cambios de temperatura, pH, presencia de ligandos o agentes desnaturizantes, o cambios en la secuencia, entre otros (Liu & Eisenberg, 2002).

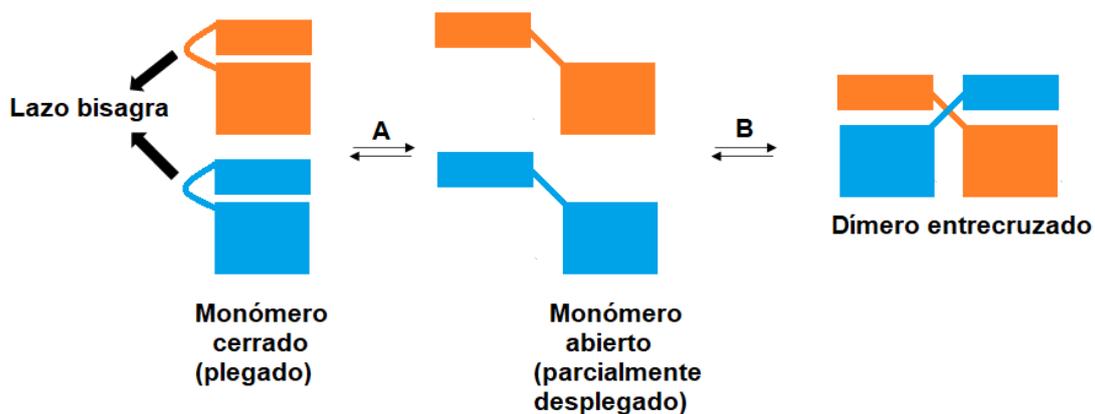


Figura 1.1. Representación gráfica del entrecruzamiento de dominios. (A) Un monómero cerrado puede dar lugar a su homólogo abierto bajo las condiciones adecuadas del medio. (B) Dos monómeros abiertos pueden interactuar dando lugar a un dímero entrecruzado. El lazo bisagra es el conector entre las estructuras intercambiadas, su conformación es diferente en el monómero y el oligómero entrecruzado.

Cuando se produce algún cambio en las condiciones del medio la barrera energética que separa al monómero cerrado del oligómero se reduce, dando lugar a la formación de oligómeros entrecruzados. En este proceso dos o más monómeros abiertos pueden agregar dando lugar al oligómero entrecruzado. Mediante ingeniería genética se pueden introducir cambios en los aminoácidos del lazo bisagra los cuales pueden afectar al proceso de 3D-DS mediante cambios en el equilibrio monómero-oligómero entrecruzado (Liu & Eisenberg, 2002). No está claro que todas las proteínas que sufren procesos de intercambio de dominios lo hagan mediante la misma vía. Sin embargo, todas requieren un cambio en la interfaz cerrada, lo que contribuye a la alta energía de activación (Liu & Eisenberg, 2002).

El 3D-DS pone de manifiesto que no siempre la secuencia de aminoácidos da lugar a un único plegamiento tridimensional, sino que éste depende de las condiciones fisiológicas del medio, incumplándose así el dogma de Anfinsen (Anfinsen *et al.*, 1961). De esta forma una única secuencia de aminoácidos puede dar lugar a más de un plegamiento tridimensional.

1.2.2 Importancia biológica

Durante algún tiempo el fenómeno 3D-DS fue considerado como un artefacto del tratamiento *in vitro* de algunas proteínas y hasta hace poco no se han propuesto posibles papeles funcionales de estas estructuras entrecruzadas. Algunas proteínas requieren del entrecruzamiento de dominios para llevar a cabo su función, mientras que, en otras, este proceso parece ser más bien un artefacto del aislamiento de la molécula completa (Liu & Eisenberg, 2002). Además, se cree que podría estar relacionado con los mecanismos evolutivos de la formación de oligómeros de algunas proteínas (Schlunegger *et al.*, 1997; Liu & Eisenberg, 2002; Kundu & Jernigan, 2004).

La oligomerización de proteínas presenta ciertas ventajas en comparación con sus homólogos monoméricos. Algunas de estas ventajas incluyen un mayor control alostérico, la disponibilidad de una mayor superficie de unión, y un aumento en el número de sitios activos (Liu & Eisenberg, 2002). Schymkowitz y colaboradores en 2001 proporcionaron evidencias de que el 3D-DS está implicado en la regulación de las funciones biológicas de algunas proteínas, participando en su mecanismo alostérico y de señalización (Schymkowitz *et al.*, 2001).

El entrecruzamiento de dominios también se relaciona con la regulación de la actividad de las proteínas. Por ejemplo, el dímero entrecruzado de la glioxilasa I de *Pseudomonas putida* contiene dos sitios de unión a metales, mientras que su forma monomérica, menos activa, contiene un solo sitio de unión (Saint-Jean *et al.*, 1998). También juega un papel fundamental en la RNasa seminal bovina, en la que el dímero entrecruzado presenta toxicidad selectiva para las células tumorales, mientras que el monómero no lo hace (Di Donato *et al.*, 1995; Rosseau *et al.*, 2012). Además, se ha sugerido que el 3D-DS está implicado en el mecanismo de evolución del plegamiento de grandes complejos cuando es seguido de duplicación y fusión génica y en el ensamblado de proteínas (Bennett *et al.*, 1995, Baker *et al.*, 2016). Otro ejemplo es el dominio PDZ2 de las proteínas *Zonula Occludens* (ZO) 1 y 2 que ha sido caracterizado solo en su forma entrecruzada, por lo que se cree que ésta está estrechamente relacionada con su función (Fanning *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008).

Hay evidencias de que la dimerización también podría jugar un papel clave impidiendo la formación de agregados citotóxicos de algunas proteínas. Ding y colaboradores describieron mediante estudios de dinámica molecular que el dominio c-Src-SH3 forma dos tipos de estados diméricos, uno de ellos es un dímero entrecruzado y el otro es un estado propenso a la agregación capaz de formar fibras amiloides (Ding *et al.*, 2002). La formación competitiva de dímeros entrecruzados en este dominio, reduce la probabilidad de la amiloidogénesis. La evidencia estructural también relaciona el 3D-DS con la formación de agregados moleculares presentes en las cápsidas de algunos virus (Ivanov *et al.*, 2007).

La gran variedad en cuanto a secuencia y estructura de las proteínas que forman 3D-DS sugiere que cualquier proteína puede sufrir estos procesos bajo las condiciones adecuadas. Un elemento crítico en este proceso es el lazo bisagra, su longitud y secuencia se creen críticos en la formación de 3D-DS (Liu & Eisenberg, 2002). Por ejemplo, la presencia de prolina en el lazo bisagra ha sido descrita como un elemento crítico en la formación de oligómeros entrecruzados (Rousseau *et al.*, 2001). Se cree que dichas condiciones deben producir cierta desestabilización de la proteína, lo que la lleva a una alteración estructural o un desplegamiento parcial (Schlunegger *et al.*, 1997; Liu & Eisenberg, 2002; Rousseau *et al.*, 2012). Sin embargo, una de las consecuencias de la desestabilización de estas proteínas es su agregación, que ha sido asociada con varias

enfermedades humanas como la enfermedad del Parkinson y de Huntington (Chiti & Dobson, 2006).

1.2.3 Los primeros descubrimientos: desde la ribonucleasa A hasta los dominios SH3

El término 3D-DS fue usado por primera vez para describir la estructura dimérica de la toxina diftérica (Bennet *et al.*, 1994). Aunque en realidad, la primera evidencia del proceso de entrecruzamiento de dominios se atribuye a la ribonucleasa A bovina, que forma dímeros al ser liofilizada en ácido acético (Figura 1.2) (Crestfield *et al.*, 1962; Liu & Eisenberg, 2002; Cahyono *et al.*, 2019). En este caso, el 3D-DS se puede producir tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal o en ambos a la vez (Liu & Eisenberg, 2002; Ding *et al.*, 2006). Desde entonces, el proceso de entrecruzamiento de dominios ha sido observado en gran cantidad de proteínas. Sin embargo, no existe un claro patrón entre las proteínas en las que se produce (Liu & Eisenberg, 2002).

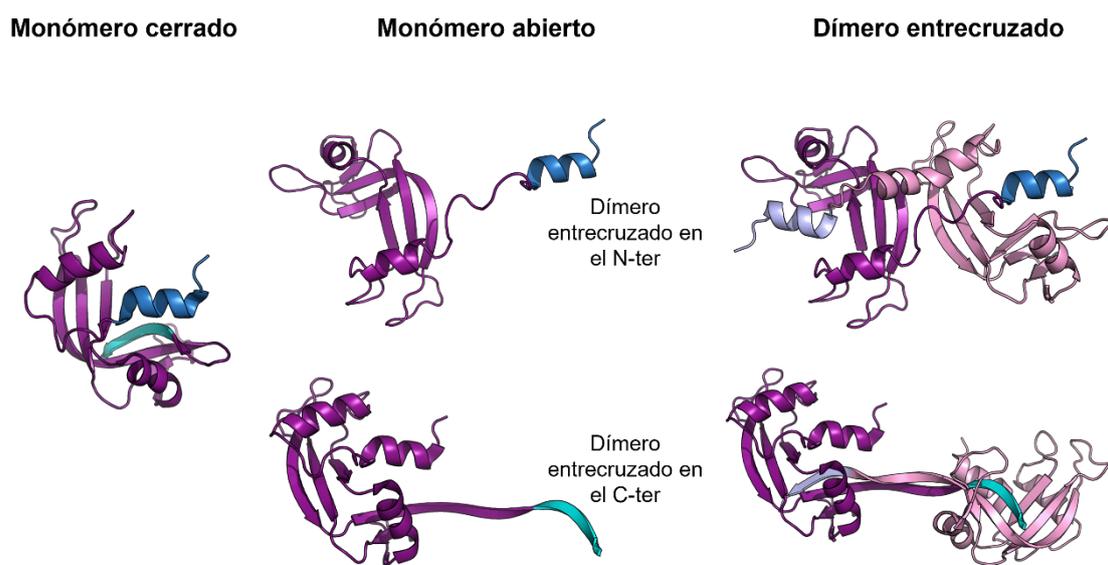


Figura 1.2. Representación gráfica de los dímeros entrecruzados de la RNasa A bovina (código PDB de la forma monomérica: 2E3W; código PDB del dímero entrecruzado en el extremo N-terminal: 1A2W; código PDB del dímero entrecruzado en el extremo C-terminal: 1F0V). En azul y cian se muestran el dominio o los elementos de estructura secundaria intercambiados. En el dímero entrecruzado, la cadena complementaria se muestra en rosa, y los elementos intercambiados en azul claro (Cámara-Artigas, 2016).

Algunos de los dominios proteicos usados para el estudio de procesos de plegamiento y reconocimiento molecular han sido cristalizados como dominios entrecruzados, de entre los que cabe destacar el dominio SH3 (Rousseau *et al.*, 2012, Cámara-Artigas, 2016). Hasta la fecha los dominios SH3 que sufren procesos de entrecruzamiento de dominios son Eps8 (Kishan *et al.*, 1997, Kishan *et al.*, 2001), p47phox (Goemping *et al.*, 2003;

Yuzawa *et al.*, 2004), el dominio SH3 del extremo C-terminal de la CRKL (Harkiolaki *et al.*, 2006), c-Src (Cámara-Artigas *et al.*, 2009) y Nck1 (Richter *et al.*, 2020). El entrecruzado resultante de cada uno de estos dominios depende de la región intercambiada. En principio, los tres lazos del dominio, RT, n-Src y distal pueden servir como lazo bisagra (Richter *et al.*, 2020). El lazo n-Src es el que actúa de lazo bisagra en los dominios Eps8-SH3, c-Src-SH3 y Nck1-SH3.1, mientras que el lazo bisagra en el dímero entrecruzado del dominio p47phox-SH3 es el lazo distal y, en CRKL es el lazo RT el que desempeña esta función (Kishan *et al.*, 1997; Goemping *et al.*, 2003; Yuzawa *et al.*, 2004; Harkiolaki *et al.*, 2006; Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2020). De entre todos estos dominios, el dominio c-Src-SH3 es especialmente interesante, ya que es el único que hasta la fecha es capaz de formar dímeros entrecruzados y fibras amiloides (Cámara-Artigas, 2016; Richter *et al.*, 2020). Cámara-Artigas y colaboradores describieron la formación de dímeros entrecruzados en el dominio c-Src-SH3 (Figura 1.3). Éstos son obtenidos a pH ácido y en presencia de moléculas de polietilenglicol de bajo peso molecular, que ayudan a estabilizar la formación del entrecruzado. Los cambios conformacionales que se producen van acompañados de una redistribución en los puentes de hidrógeno y salinos que se forman en los lazos RT y n-Src, los cuales juegan un papel fundamental en la estabilidad del dímero (Cámara-Artigas *et al.*, 2009).

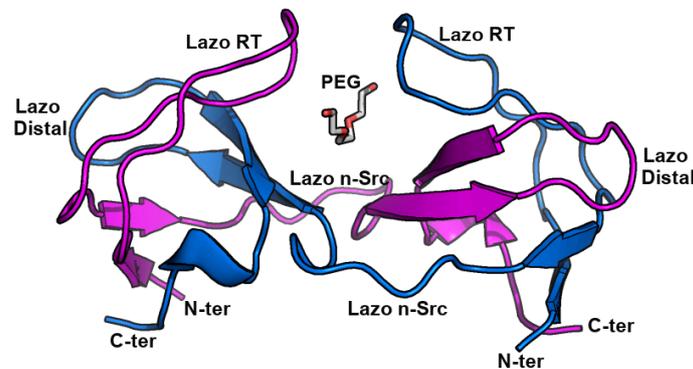


Figura 1.3. Representación gráfica del dímero entrecruzado del dominio c-Src SH3 (código PDB:6XVO) (Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

La diversidad de los dominios SH3 que presentan este tipo de comportamiento indica una predisposición general del dominio SH3 a formar 3D-DS, y sugiere la posibilidad de que otros dominios SH3 pudieran sufrir procesos de entrecruzamiento bajo las condiciones adecuadas.

1.3 Formación de fibras amiloides

1.3.1 Descripción y estabilidad

El término amiloide procede de la palabra griega *amylon* y del latín *amylum*, que significa almidón. En principio, se determinó que su naturaleza era polisacárida. Sin embargo, Virchow y colaboradores fueron los que describieron su naturaleza proteica (Cohen, 1986). Fueron estos mismos investigadores los primeros en usarla en contexto médico para describir los depósitos patogénicos en humanos que se teñían de azul violáceo al reaccionar con una disolución de yodo y ácido sulfúrico (Cohen, 1986; Sipe & Cohen, 2000; Fändrich, 2007). Sin embargo, este fenómeno no atrajo la atención de la comunidad científica hasta que hace unos años se encontró que su aparición está relacionada, principalmente, con enfermedades neurodegenerativas (Ross & Poirier, 2004; Chiti & Dobson, 2006).

En condiciones fisiológicas, las proteínas se pliegan en su estado nativo. Sin embargo, bajo condiciones desnaturalizantes, algunas proteínas sufren procesos alternativos de plegamiento dando lugar a estructuras fibrilares conocidas como fibras amiloides (Dobson, 2003; Stefani, 2004; Yang & Dunstan, 2014). Una de las características más importantes de estas estructuras es su alto contenido en lámina β dispuestas de forma característica en una conformación cruzada β (Rambaran & Serpell, 2008).

Estas fibras poseen una estructura interna característica, de forma que las fibras de diferentes proteínas dan lugar a una disposición estructural similar. Sin embargo, la obtención de información a nivel estructural no es sencilla debido a su naturaleza unidimensional, que junto con su baja solubilidad hace difícil su cristalización para posteriormente obtener información mediante difracción de rayos X, y su gran tamaño dificulta el uso de RMN. Por ello, la microscopía electrónica, la microscopía de fuerza atómica, la resonancia paramagnética electrónica, el RMN de estado sólido, el dicroísmo circular y la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier constituyen los principales métodos para llevar a cabo estudios estructurales de amiloides (Toyama & Weissman, 2011; Cámara-Artigas, 2016). Eisenberg y colaboradores fueron los primeros en obtener un patrón de difracción de las fibras amiloides mediante rayos X (Balbirnie *et al.*, 2001; Diaz-Avalos *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2005). Estos estudios demostraron que estas fibras están formadas por protofilamentos cuyo núcleo está compuesto por láminas

β cruzadas, en el cual las láminas β están formadas por hebras β que se disponen de forma perpendicular a lo largo del eje de las fibras, además, algunas láminas β interactúan entre sí mediante sus cadenas laterales (Balbirnie *et al.*, 2001; Diaz-Avalos *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2007; Adamcik & Mezzenga, 2018). A su vez, los protofilamentos se asocian mediante interacciones de los residuos superficiales dando lugar a las fibras amiloides. La morfología de estas dependerá en gran medida del tipo de interacciones que se produzcan entre los protofilamentos (Gomes & Faisca, 2019). La separación entre las láminas β es de 10-12 Å, mientras que la distancia entre las hebras es de 4,7-4,8 Å. En general, las fibras amiloides están formadas desde 2 a 6 protofilamentos de entre 2 a 5 nm asociados entre sí de manera retorcida o lateral dando lugar a fibras maduras de 4 a 13 nm de diámetro y 1 μ m o más de longitud. Las fibras maduras pueden ser fotografiadas mediante técnicas como la microscopía de transmisión electrónica (TEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM) (Figura 1.4) (Chiti & Dobson, 2006; Adamcik & Mezzenga, 2011).

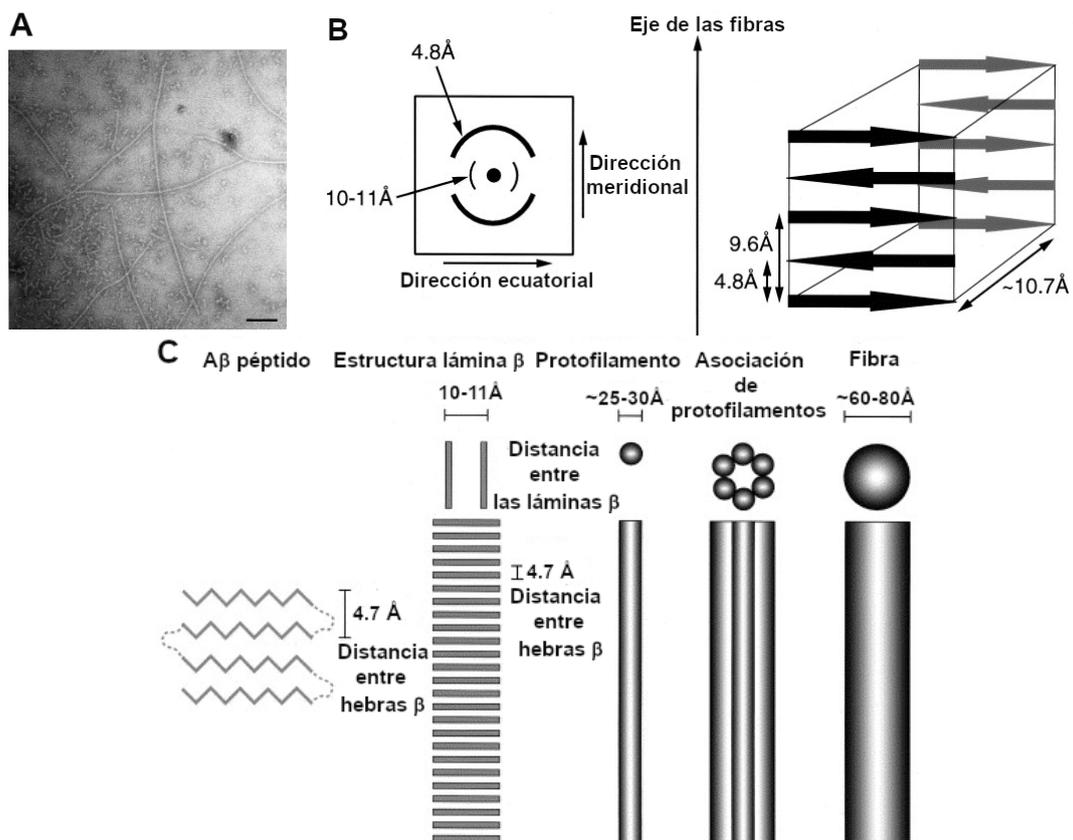


Figura 1.4. Diferentes niveles estructurales de las fibras amiloides. (A) Fotografía mediante TEM de fibras amiloides A β 1-42 entrecruzadas (Bar=1000 Å). (B) Representación esquemática del espaciado característico de las estructuras β -cruzada obtenido del patrón de difracción de rayos X. (C) Representación de la jerarquía estructural del péptido A β desde la lámina β plegada hasta la formación de protofilamentos y fibras (Serpell, 2000).

La estabilización de las fibras amiloides se produce gracias a las interacciones moleculares que existen entre las láminas y las hebras β . Una de las más importantes son los puentes de hidrógeno que actúan de fijador entre las capas, lo que confiere una alta estabilidad mecánica a las fibras (Knowles *et al.*, 2007; Keten & Buehler, 2008; Adamcik & Mezzenga, 2018). También se han descrito interacciones de tipo hidrofóbico y puentes salinos que contribuyen a su alta estabilidad. En las proteínas con gran cantidad de residuos aromáticos las interacciones π - π también intervienen en la unión de los monómeros que dan lugar a las fibras amiloides (Makin *et al.*, 2005; Yang & Dunstan, 2014). Este entramado de interacciones origina propiedades mecánicas y físicas inusuales con fuerzas comparables a la del acero y rigidez mecánica comparable a la de la seda. Además, se han descrito capacidades termorresistentes (con temperaturas de fusión mayores de 130°C) y de resistencia a la proteólisis (Knauer *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2006). Estas características hacen de las fibras amiloides las candidatas perfectas para el desarrollo de nuevos materiales. La morfología de los amiloides, así como su tamaño, puede variar en función de factores fisicoquímicos del medio, tales como fuerza iónica, temperatura, pH, presión, agitación mecánica, la presencia de codisolventes y cambios en las condiciones de crecimiento de estas (Yang & Dunstan, 2014; Cámara-Artigas, 2016; Mondal & Reddy, 2019). Estos últimos pueden afectar a la toxicidad de las fibras formadas (Petkova *et al.*, 2005). Por su parte, algunos codisolventes de pequeño tamaño y origen orgánico producen cambios en el equilibrio entre los estados plegado y desplegado de la proteína, afectando a la agregación de esta (Arakawa & Timasheff, 1985; Canchi & García, 2013; Mondal & Reddy, 2019).

1.3.2 Formación y cinética de fibras amiloides

Para que una proteína en su estado nativo de lugar a la formación de fibras amiloides debe producirse un cambio en las condiciones del medio hacia condiciones desnaturizantes suaves, que den lugar a un estado parcialmente desnaturizado de la proteína. De esta forma, cuando la proteína se vuelve a plegar en las nuevas condiciones del entorno, lo hace mediante una forma de plegamiento alternativa de auto-ensamblado, que es capaz de evolucionar y formar fibras amiloides (Chiti *et al.*, 1999; Stefani & Dobson, 2003). Bajo esta forma estructural la proteína se estabiliza en el nuevo entorno. En general, la estructura amiloide es más estable termodinámicamente que el estado nativo de la proteína y su formación es un proceso irreversible en condiciones fisiológicas (Stefani & Dobson, 2003; Meersman & Dobson, 2006; Yang & Dunstan, 2014).

Aparentemente, no existe correlación secuencial, estructural o funcional entre las proteínas que forman este tipo de agregados (Almeida & Brito, 2020). Por lo que se cree que cualquier proteína es capaz de formar amiloides bajo las condiciones adecuadas (Yang & Dunstan, 2014).

La formación de fibras amiloides es un proceso de varias etapas que requiere de una fase inicial de auto-ensamblado para formar oligómeros solubles de pequeño tamaño y protofilamentos que dan lugar a fibras maduras (Hill *et al.*, 2011). Dichos oligómeros pueden variar en tamaño y forma, desde dímeros hasta grandes agregados anulares, esféricos o fibrilares (Harper *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Chiti & Dobson, 2006; Härd & Lendel, 2011). El modelo más aceptado es el denominado modelo de polimerización-nucleación, en el que el proceso cinético da lugar a una curva sigmoideal, medido mediante el aumento de fluorescencia de Tioflavina T en presencia de amiloides (Adamcik & Mezzenga, 2018). La cinética de formación de las fibras se divide en tres fases (Figura 1.5); la fase de latencia, donde predominan los monómeros y se produce la formación de núcleos; seguida de una fase de elongación o crecimiento exponencial, donde los monómeros interaccionan con los núcleos (nucleación secundaria) dando lugar a especies de mayor tamaño, oligómeros y protofilamentos, y estas últimas originan las fibras amiloides maduras. Por último, existe la fase de saturación, donde mayoritariamente existen fibras maduras de diferentes morfologías (Jarrett & Lansbury, 1992; Chiti & Dobson, 2006; Adamcik & Mezzenga, 2018). La presencia de fragmentos o semillas de fibras amiloides que actúan como núcleo da lugar a un proceso de formación donde la nucleación primaria es despreciable, pasando directamente a la fase de crecimiento. Se cree que este proceso es un factor fundamental en la propagación de la patogénesis en las enfermedades amiloidogénicas (Cohen *et al.*, 2011; Almeida & Brito, 2020).

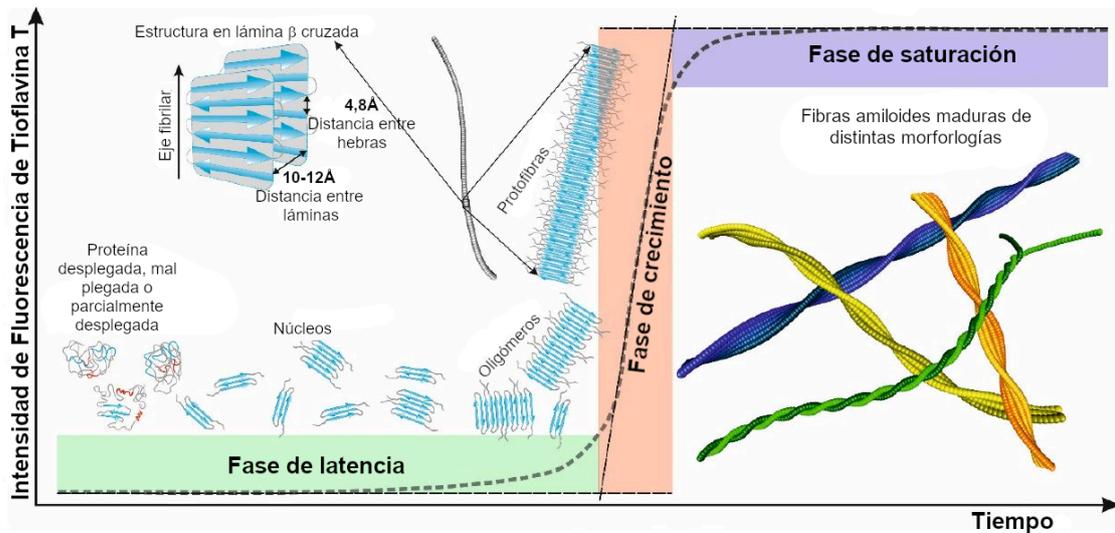


Figura 1.5. Proceso de formación de fibras amiloides maduras. Este proceso da lugar a una sigmoide que se divide en tres fases diferenciadas: fase de latencia, fase de crecimiento exponencial y fase de saturación (Adamcik & Mezzenga, 2018).

Durante años se ha pensado que las fibras amiloides son especies tóxicas, pero recientemente ha surgido la idea de que estas especies son inertes o incluso protectoras, siendo sus precursores los realmente citotóxicos. Esta hipótesis se fundamenta en el hecho de que estos oligómeros precursores tienen la capacidad de desestabilizar la permeabilidad de las membranas celulares (Figura 1.6), pudiendo producir la muerte celular (Lansbury, 1999; Sirangelo *et al.*, 2004; Stefani, 2012; Bucciantini *et al.*, 2014; Yang & Dunstan, 2014).

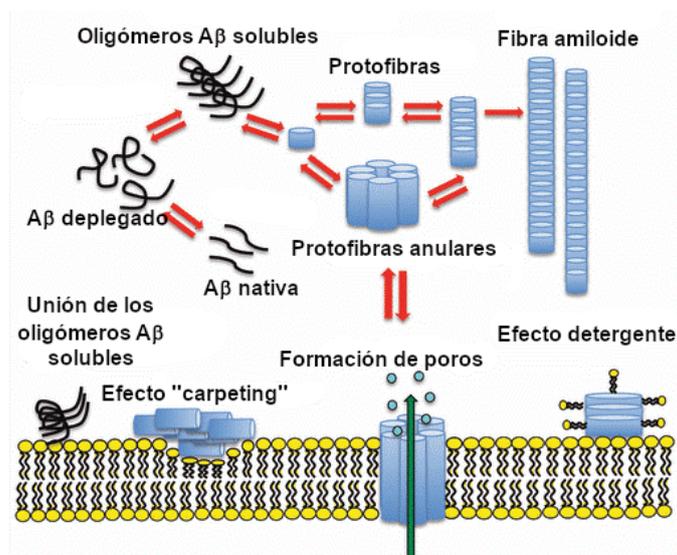


Figura 1.6. Representación gráfica de los diversos efectos tóxicos causados por los oligómeros amiloides en las membranas plasmáticas de las células. Los efectos aquí representados son interacciones inespecíficas: la formación de poros, efecto alfombrado, y el efecto detergente con bicapas de fosfolípidos celulares que provocan fugas a través de las membranas celulares (Yang & Dunstan, 2014).

1.3.3 Importancia biológica

1.3.3.1 Papel de los amiloides en enfermedades

La formación de fibras amiloides es sin duda un plegamiento alternativo al que tradicionalmente se conoce para una proteína funcionalmente activa, y es precisamente esa pérdida de su funcionalidad lo que hace que este tipo de formación sea considerada un plegamiento erróneo (del inglés, *protein misfolding*). El plegamiento erróneo de algunas proteínas y péptidos que da lugar a fibras amiloides, así a como sus precursores han sido asociadas con más de 50 trastornos en humanos (Chiti & Dobson, 2017; Almeida & Brito, 2020). La agregación y posterior acumulación de agregados proteicos insolubles en los tejidos celulares parece ser la característica principal de muchas enfermedades conocidas como amiloidosis (Almeida & Brito, 2020). Entre estas se incluyen enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades del Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como otras patologías entre las que se encuentran la diabetes tipo II, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la encefalopatía espongiiforme bovina (conocida comúnmente como la enfermedad de las vacas locas) y algunos tipos de cánceres (Chiti & Dobson, 2017; Iadanza *et al.*, 2018; Almeida & Brito, 2020). El tratamiento de estas enfermedades es complicado y se limita a paliar los síntomas, aunque en algunas ocasiones se recurre al trasplante de órganos, o, si la masa de amiloide tiene el tamaño adecuado, puede extirparse (Pepys, 2006; Yang & Dunstan, 2014).

La formación de fibras amiloides en las proteínas también supone un problema en la producción industrial de estas macromoléculas (Yang & Dunstan, 2014). Este es el caso de la producción de insulina (Nielsen *et al.*, 2001; Uversky *et al.*, 2003) y de la industria láctea (Navarra *et al.*, 2007). En ocasiones, las condiciones en las que se generan estos productos favorecen la formación de amiloides. La presencia de estos agregados reduce la calidad del producto, limita su vida media, genera residuos indeseables que quedan en la maquinaria de producción y provocan la contaminación de todo el proceso (Uversky *et al.*, 2003; Navarra *et al.*, 2007; Yang & Dunstan, 2014).

1.3.3.2 Amiloides funcionales

Sin embargo, las fibras amiloides no siempre están relacionadas con enfermedades y toxicidad, en algunos casos aparecen en la naturaleza los denominados *amiloides funcionales* que dan lugar a materiales de alta persistencia y elasticidad y que pueden ser encontrados tanto en bacterias y hongos como en insectos y mamíferos (Fändrich, 2007;

Fowler *et al.*, 2007). Algunos microorganismos utilizan este tipo de estructuras en materiales extracelulares, es el caso del curli, que está implicado en la formación de colonias y en la adhesión celular en bacterias (Chapman *et al.*, 2002; Fowler *et al.*, 2007). Los amiloides también son usados con fines protectores, debido a su alta fuerza y resistencia proteolítica, este es el caso de las hidrofobinas producidas por hongos, que son proteínas anfipáticas que juegan un papel protector en estructuras fúngicas como los cuerpos fructíferos y las esporas (Sunde *et al.*, 2007; Rambaran & Serpell, 2008). Con esta misma función, se pueden encontrar amiloides en los oocitos y embriones de insectos y peces (Iconomidou *et al.*, 2000). También poseen un papel funcional los priones de levadura, que forman ensamblados fibrilares en el citoplasma y que se asocian con fenómenos de transferencia de información (Uptain & Lindquist, 2002; Rambaran & Serpell, 2008). Además, algunos priones en levaduras parecen estar asociados con cambios fenotípicos sin alterar el genotipo, lo que permite al organismo adaptarse fácil y rápidamente a los cambios del medio. En mamíferos, aparecen proteínas tipo amiloides en las células de las fibras del cristalino, en el ojo (Frederikse, 2000; Yang & Dunstan, 2014). También, se pueden encontrar amiloides funcionales en humanos, algunas hormonas de origen proteico y peptídico son almacenadas en estructuras fibrilares e intervienen en la producción de melanina a partir de la polimerización de pequeñas moléculas (Fowler *et al.*, 2005; Maji *et al.*, 2010). Se cree que los amiloides forman depósitos en capilares y arterias para sellarlas, y que podría tener una función importante conservando la integridad vascular (Atwood *et al.*, 2003; Yang & Dunstan, 2014).

En los últimos años, el interés por las fibras amiloides ha aumentado, no solo por su implicación en enfermedades, sino por su prometedor uso en aplicaciones biotecnológicas. La alta fuerza y resistencia de estas fibras, descrita anteriormente, junto con la posibilidad de ensamblaje con otras proteínas o su uso como plantillas para su unión con metales y sus distintas morfologías hacen de estas fibras una opción atractiva para su aplicación en nanotecnología (Reches & Gazit, 2003; Scheibel *et al.*, 2003; Baldwin & Bader, 2006; Barrau *et al.*, 2008).

1.3.4 Formación de fibras amiloides en dominios SH3

Los dominios SH3 han sido ampliamente usados como modelos en estudios, tanto experimentales como computacionales, de plegamiento y desplegamiento de proteínas (Morel *et al.*, 2015). El amplio conocimiento de estos dominios, junto con su capacidad

para formar amiloides bajo ciertas condiciones de fuerza iónica, pH y temperatura, los hace perfectos para llevar a cabo estudios de formación de fibras amiloides (Castello *et al.*, 2017).

Hasta la fecha, son cinco, los dominios SH3 que forman agregados fibrilares: PI3K-SH3, α -Spc-SH3, Fyn-SH3, c-Src-SH3 y c-Yes-SH3 (Cámara-Artigas, 2016). El dominio PI3-SH3 fue el primer dominio SH3 en ser relacionado con la formación de fibras amiloides. Guijarro y colaboradores en 1998 describieron la formación de un gel a pHs ácidos del dominio SH3 de la subunidad bovina p85 α de la fosfatidilinositol 3-quinasa. Los ensayos con Rojo Congo, microscopía electrónica y la difracción de rayos X demostraron que el gel formado correspondía a fibras amiloides (Guijarro *et al.*, 1998). Estos amiloides se formaron al incubar la proteína a 10 mg/mL en tampón pH 2,0 durante varios días a temperatura ambiente y a 4 °C. A este pH el dominio PI3K-SH3 se desestabiliza dando lugar a la formación de varios intermedios que están parcialmente plegados, y que polimerizan dando lugar a fibras amiloides (Ventura *et al.*, 2002). Mientras que a pH neutro la proteína existe en una conformación que impide la formación del intermedio que da lugar a amiloides (Guijarro *et al.*, 1998). En el caso de la α -Spc-SH3, Morel y colaboradores demostraron que, con una sola mutación, Asn47Ala, este dominio era capaz de formar agregados fibrilares en condiciones ligeramente ácidas. Esta mutación en el lazo distal desestabiliza el dominio y da lugar a la formación de amiloides cuando la proteína es incubada durante varios días a altas concentraciones (30 mg/mL), a pH 3,0 a una temperatura de 37 °C (Morel *et al.*, 2005). El dominio nativo de la α -Spc-SH3 también forma fibras amiloides bajo condiciones similares a las descritas para el mutante N47A. Sin embargo, la formación de fibras amiloides en α -Spc-SH3-N47A es más rápida que en la variante nativa, que presenta una fase de latencia más larga (Varela *et al.*, 2009).

Otro de los dominios SH3 que forma fibras amiloides es el de la proteína c-Yes. Martín-García y colaboradores describieron la formación de geles a bajas concentraciones de proteína, del orden de 1mg/mL, a pH 3,0 y temperatura ambiente. En estas condiciones, se encontraron fibras de hasta 8 nm. Los ensayos con Rojo Congo y Tioflavina T corroboraron la presencia de estos agregados (Martín-García *et al.*, 2007). La formación de amiloides en este dominio es dependiente del pH, no produciéndose este fenómeno a pH mayor de 3,0. Estudios basados en dinámicas moleculares relacionan la formación de fibras amiloides con la alta flexibilidad del lazo RT del dominio c-Src-SH3. Estas

simulaciones proponen un mecanismo que implica el entrecruzamiento de los lazos RT en los diferentes dominios SH3, que acaba produciendo la formación de los agregados. Los lazos RT de los dominios c-Yes-SH3 y c-Src-SH3 son homólogos en secuencia (Martín-García *et al.*, 2007). La formación de fibras amiloides del dominio c-Src-SH3 fue demostrada experimentalmente por Bacarizo y colaboradores (Bacarizo *et al.*, 2014). En los estudios que llevaron a cabo, describieron la formación de fibras amiloides en la forma nativa del dominio y en el mutante Q128E. En el dominio nativo los agregados fibrilares aparecían tras haber sido incubado durante una hora a altas concentraciones de proteína, mayores de 20 mg/mL, a pH 5,0 y 25 °C. Sin embargo, el mutante c-Src-SH3 Q128E formaba fibras amiloides tras dos semanas de incubación a 10 mg/mL, a pH neutro, a una temperatura de 37 °C y en presencia de 0,1 M de cloruro sódico. La formación de amiloides también ha sido descrita para el mutante A39V-N53P-V55L del dominio Fyn-SH3, que carece del carboxilo terminal. Esta proteína forma amiloides a pH neutro y temperatura ambiente (Neudecker *et al.*, 2012). En el caso del dominio Abl SH3 estudios de dinámicas moleculares sugieren la posibilidad de formación de fibras amiloides, sin embargo, hasta la fecha no se dispone de ninguna evidencia experimental (Lapidus *et al.*, 2012).

1.4 Relación entre entrecruzamiento de dominios y formación de fibras amiloides

En algunas proteínas se ha observado cierta correlación entre su tendencia a sufrir procesos de entrecruzamiento de dominios y su habilidad para formar fibras amiloides (Van der Wel, 2012). En ambos procesos, las proteínas nativas deben sufrir cierta desestabilización que acaba dando lugar a la formación de oligómeros entrecruzados o fibras amiloides. Así, la tendencia al entrecruzamiento de dominios podría jugar un papel esencial en los primeros pasos del proceso de nucleación de la formación de fibras (Van der Wel, 2012). Sin embargo, no en todas las proteínas parece haber una relación positiva entre ambos procesos. En algunas, la formación del oligómero entrecruzado parece estabilizar la proteína, impidiendo la formación del amiloide. De esta forma se han propuesto dos tipos de modelos; el modelo *runaway domain swapping* o entrecruzamiento de dominios incontrolado (Guo & Eisenberg, 2006) y el modelo *off pathway folding* o plegamiento alternativo (Pallito & Murphy, 2001; Mondal & Reddy, 2019). En el primero, las proteínas vecinas intercambian sus dominios dando lugar a largas cadenas que continúan creciendo, formando el amiloide. En este caso, el

entrecruzamiento de dominios es de propagación. Un ejemplo es la cistatina C humana en la que la supresión de la formación del dímero evita la formación del amiloide (Nilsson *et al.*, 2004; Kolodziejczyk *et al.*, 2010; Mondal & Reddy, 2019), otros ejemplos son la proteína prion humana y la β 2-microglobulina (Eisenberg, 2006). El segundo modelo propone que las proteínas vecinas intercambian sus dominios de forma cerrada, sin dejar ningún extremo abierto, de forma que el proceso de entrecruzamiento de dominios solo produce oligómeros de tamaño definido. En este caso, el entrecruzamiento de dominios es recíproco y el oligómero entrecruzado es el producto final, no pudiendo evolucionar en el proceso de formación del amiloide y ralentizando el mismo (Mondal & Reddy, 2019). Un ejemplo es la RNasa A, la cual se entrecruza de forma recíproca dando lugar a un entrecruzado cerrado formado por dímeros, trímeros o tetrameros (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Gotte & Libonati, 2004).

En algunas ocasiones, ambos modelos pueden aplicarse a la misma proteína. Por ejemplo, se ha descrito mediante dinámicas moleculares que el dominio c-Src-SH3 forma dos tipos de dímero: un dímero entrecruzado cerrado y otro abierto. En el dímero entrecruzado cerrado, los residuos hidrófobos quedan enterrados en el interior de la estructura, por lo que no es posible que siga interaccionando con dominios vecinos, de manera que el proceso de elongación junto con la posible formación de fibras amiloides no se produce. Mientras que, el dímero entrecruzado abierto permite la propagación del entrecruzamiento con dominios vecinos dando lugar a los primeros estadios para la formación de fibras amiloides (Figura 1.7) (Ding *et al.*, 2002). Hasta la fecha, y que esté en nuestro conocimiento, el único dominio SH3 que es capaz de formar dímeros entrecruzados y fibras amiloides es el dominio c-Src-SH3 (Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara -Artigas, 2016).

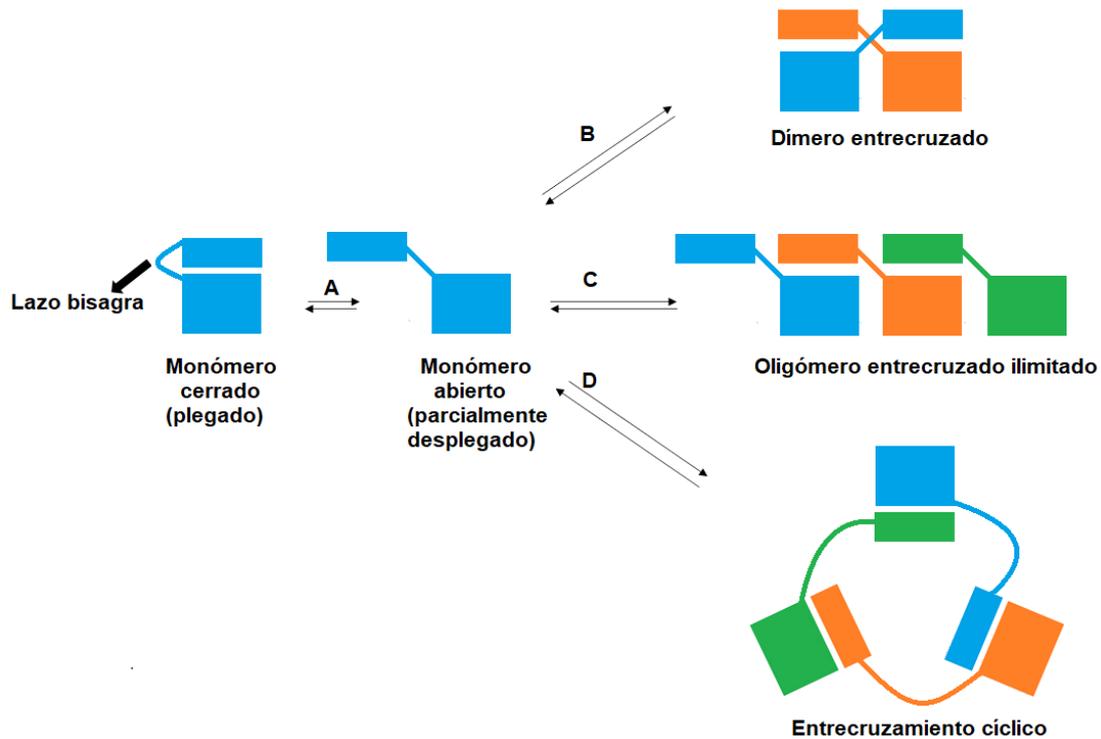


Figura 1.7. Esquema del mecanismo de intercambio de dominios y su posible papel en el proceso de agregación de proteínas. Algunas proteínas, experimentan un despliegue parcial o total bajo determinadas condiciones del medio (A) En estas condiciones, las proteínas parcialmente desplegadas pueden sufrir procesos de entrecruzamiento de dominios, dando lugar a oligómeros entrecruzados de manera recíproca. (B) Modelo “*Off pathway folding*”, o plegamiento alternativo. (C, D) Modelo “*Runaway domain swapping*” o entrecruzamiento de dominios incontrolado (Mascarenhas *et al.*, 2017, Mondal & Reddy, 2019).

1.5 Dominios SH3 como proteínas modelo para el estudio de 3D-DS y formación de fibras amiloides

1.5.1 Descripción básica de los dominios SH3: función y estructura

Los dominios SH3 (Src homology 3) son pequeños dominios modulares constituidos por aproximadamente 60 aminoácidos. Se encuentran formando parte de gran variedad de proteínas de organismos eucariotas y virus (Musacchio *et al.*, 1992; Pisabarro *et al.*, 1996; Kay, 2012; Kurochkina & Guha, 2012). Algunas de sus características, como la falta de puentes disulfuro y grupos prostéticos, junto con su facilidad para ser expresados, purificados y cristalizados de forma independiente, los convierte en los modelos perfectos para el estudio de procesos de plegamiento/desplegamiento, estabilidad e interacciones proteína-proteína o proteína-ligando (Musacchio *et al.*, 1992; Pisabarro *et al.*, 1996; Cámara-Artigas, 2016). Por ello, la familia de dominios SH3 es una de las mejor caracterizadas, disponiéndose de numerosa información tanto experimental como

computacional, a nivel cinético, termodinámico y estructural (Cámara-Artigas, 2016). En humanos, se ha identificado el dominio SH3 hasta en aproximadamente 530 proteínas (Lipsick, 2019). En general, los dominios SH3 poseen diversas funciones, entre las que se incluyen el ensamblaje molecular y el reconocimiento de ligandos (Larson & Davidson, 2000; Ihara *et al.*, 2019). Además, participan en procesos de señalización, como la endocitosis, el control del citoesqueleto y el crecimiento celular (Mayer & Gupta, 1998). La regulación de estos dominios se produce por la asociación de los mismos a otras proteínas y/o mediante procesos de fosforilación, dimerización o isomerización (Sarkar *et al.*, 2011).

La estructura tridimensional de los dominios SH3 está altamente conservada, incluso en los casos en los que la similitud entre la cadena aminoacídica de algunos de estos dominios no es mayor del 25%. La estructura de este dominio se compone de cinco cadenas β dispuestas en dos láminas β antiparalelas o en un barril β . Estas láminas β quedan conectadas mediante varios giros β y lazos. El lazo RT (residuos 89-99, numeración c-Src de pollo) es el primero y también el más largo y flexible, y se une a la cadena β_2 mediante un giro β divergente tipo II (residuos 103-106). Otros lazos importantes son el llamado n-Src (residuos 113-116) y el distal (residuos 123-127). De este modo el lazo RT conecta las láminas β_1 y β_2 , el lazo n-Src conecta las láminas β_2 y β_3 , el lazo distal conecta las láminas β_3 y β_4 , y las láminas β_4 y β_5 quedan conectadas por una hélice 3_{10} . Los extremos N- y C- terminal se sitúan el uno junto al otro (Figura 1.8) (Yu *et al.*, 1992; Musacchio *et al.*, 1992; Musacchio *et al.*, 1994; Kurochkina & Guha, 2012). Algunos dominios SH3 también puede tener características estructurales adicionales, habitualmente situados en las regiones terminales o en los lazos (Demakis *et al.*, 2020). La comparación de varios dominios SH3 pone de manifiesto la conservación del núcleo hidrofóbico, en contraste con la variabilidad en cuanto a secuencia y conformación observable en los lazos, los cuales constituyen un porcentaje importante de la secuencia del dominio (Cámara-Artigas, 2016; Arbesú & Pons, 2019). A este respecto, la conservación es menor en los lazos RT y n-Src, pudiendo deberse esta variabilidad al papel que juegan estos lazos en la especificidad y afinidad del proceso de unión de los dominios SH3 a secuencias ricas en prolina (Arbesú & Pons, 2019).

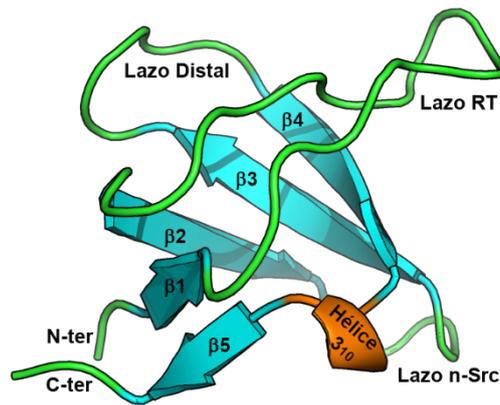


Figura 1.8. Representación gráfica del plegamiento general del dominio SH3 (código PDB: 4RTY) donde se indican los nombres de los lazos y los diferentes elementos estructurales del dominio.

Los dominios SH3 llevan a cabo su función mediante el reconocimiento de secuencias ricas en prolina, especialmente aquellas que contienen el motivo PxxP (Musacchio, 2002; Ihara *et al.*, 2019). La orientación con la que se unen estas secuencias ricas en prolina depende de la interacción con un residuo con carga negativa en la superficie de unión del dominio al ligando. Esta se encuentra es el llamado sitio de especificidad que es una región próxima al sitio de unión del motivo PxxP, constituida por la superficie hidrofóbica comprendida entre los lazos RT y n-Src (Noble *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1994). De esta forma, son los residuos con carga positiva, lisina y arginina, los que juegan un papel crucial en la unión del dominio proporcionando no solo la orientación, también contribuyendo a la energía de unión a través de interacciones electrostáticas con residuos en el bolsillo de especificidad (Feng *et al.*, 1994; Shawn *et al.*, 2005).

1.5.2 Importancia biológica de los dominios SH3

En general, los dominios SH3 juegan un papel clave en la regulación de ciertos procesos críticos como por ejemplo la regulación dependiente de la adhesión mediante la fosforilación de tirosinas, la reparación del ADN, la apoptosis mediada por p53, en la estimulación de la migración de células madre mesenquimales (proceso relacionado con el desarrollo de algunos tumores) y con la maduración de los osteoblastos seguida de la formación de huesos (Jiang *et al.*, 2001; Moore & Winder, 2010; Levaot *et al.*, 2011; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011).

Durante las últimas décadas, el objetivo para el diseño y síntesis de fármacos se ha enfocado en las interacciones proteína-proteína y proteína-ligando. Es en este punto

donde los dominios SH2 y SH3 han obtenido gran interés por parte de la comunidad científica para su uso como agentes anti-proliferativos. Así, estos dominios se han convertido en importantes candidatos para el diseño de fármacos antitumorales debido a su función como módulos de reconocimiento en proteínas adaptadoras y con actividad catalítica, y su presencia en oncoproteínas (Kurochkina & Guha, 2012).

1.5.3 Dominios SH3: Abl, c-Src, v-Src

1.5.3.1 Dominios SH3: Familia de Src tirosina quinasa

Las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de fosfato a las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. La mayoría de las quinasas que se encuentran en eucariotas son del tipo serina/treonina quinasas o tirosina quinasas. Las tirosinas quinasas son aquellas que se encargan de fosforilar residuos de tirosina. La familia de la Src tirosina quinasa incluye nueve tirosinas quinasas: c-Src, Yes, Fyn (en tejidos celulares), BLK, FGR, HCK, Lck, Lyn (presentes en células hematopoyéticas y neuronas) y Yrk (Thomas & Brugge, 1997; Parsons & Parsons, 2004; Rupniewska *et al.*, 2018; Alcalá *et al.*, 2020). Estas proteínas juegan un papel clave en la señalización celular interviniendo en procesos de crecimiento, proliferación, migración, adhesión, invasión, angiogénesis y supervivencia celular (Alcalá *et al.*, 2020). Además, interaccionan con diversos receptores de esteroides, de tirosina quinasas y acoplados a proteínas G (Parsons & Parsons, 2004; Broman *et al.*, 2004). La familia Src tirosina quinasa puede responder a señales extracelulares, interaccionar con diversas proteínas citoplasmáticas e intervenir en la activación de factores nucleares y sus procesos de transcripción (Alcalá *et al.*, 2020).

Las proteínas de esta familia están organizadas en cuatro dominios, donde cada uno de ellos se designa con las letras SH (*Src-homology*). El extremo N-terminal incluye el dominio SH4, que interviene en la unión de la proteína a la membrana celular y en procesos de miristoilación, que viene seguido de un dominio único, que comprende unos 50-70 aminoácidos y que no muestra una similitud concreta entre los miembros de la familia. Los dominios SH2 y SH3 intervienen en procesos de interacción proteína-proteína. Así, el dominio SH2 lleva a cabo esta función mediante su unión a segmentos polipéptidicos que contienen fosfotirosina, mientras que el dominio SH3 interacciona con motivos ricos en prolina. El dominio SH1 es el que posee actividad catalítica, y, por último, también poseen un extremo C-terminal regulador, generalmente corto, que contiene una tirosina (Tyr527 en la secuencia de la c-Src TK de pollo) cuya fosforilación

es fundamental en la regulación negativa de la actividad quinasa (Xu *et al.*, 1997). Los dominios SH2 y SH1 quedan unidos entre sí mediante un conector (Figura 1.9).

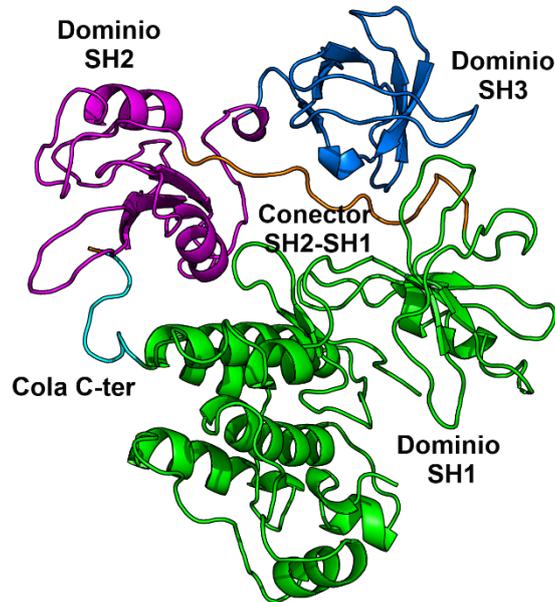


Figura 1.9. Representación gráfica de los dominios de la proteína c-Src tirosina quinasa (PDB: 2PTK).

La actividad quinasa está regulada a través de interacciones entre los dominios SH1, SH2 y SH3, en un proceso que comprende varios pasos y que es regulado por el estado de fosforilación de la propia proteína (Sicheri & Kuriyan, 1997; Vihinen & Smith, 1997; Berndt *et al.*, 2019). De forma específica, la fosforilación del residuo Tyr416 (numeración de c-Src de pollo) que se localiza en el lazo de activación de la actividad quinasa estabiliza su forma funcional en la que los dominios SH2 y SH3 interaccionan con los sustratos dando lugar a una conformación abierta de la quinasa y permitiendo que el dominio catalítico lleve a cabo su función (Xu *et al.*, 1997; Bogon, 2004; Berndt *et al.*, 2019) (Figura 1.10). Así mismo, la desactivación de la quinasa se produce por la fosforilación del residuo Tyr527 (numeración de c-Src de pollo), que se localiza en el extremo C-terminal, y que junto a la introducción del dominio SH3 entre los dominios SH1 y SH2 origina una conformación cerrada de la quinasa dando lugar a su estado inactivo (Xu *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2001; Cowan-Jacob *et al.*, 2005; Berndt *et al.*, 2019; Lipsick, 2019). En esta forma, los dominios SH2 y SH3 no son accesibles para sus sustratos (Figura 1.10).

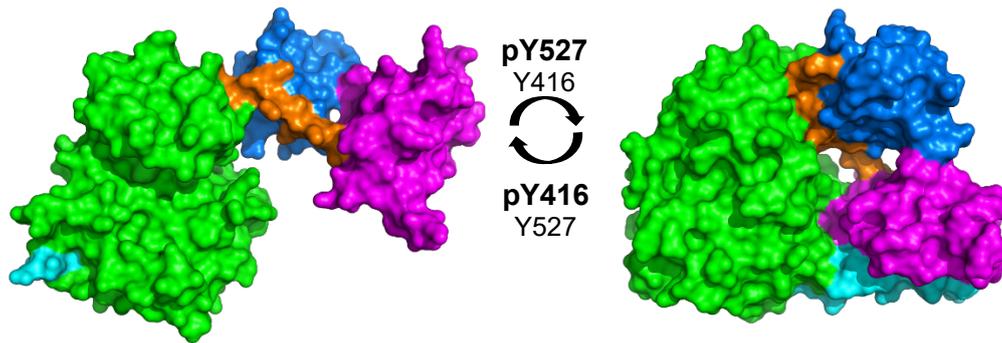


Figura 1.10. Representación gráfica de la c-Src tirosina quinasa en su conformación abierta o funcional (PDB: 1Y57) y cerrada o afuncional (PDB: 2SRC). Cada dominio se representa con distinto color; en azul el dominio SH3, en magenta el dominio SH2 y en verde, el dominio catalítico. La cola c-terminal se representa en cian, y el conector que une los dominios SH2 y catalítico, en naranja. Nótese que el conector es inaccesible en la forma cerrada, y accesible en la forma abierta (Agius *et al.*, 2019).

Las tirosinas quinasa llevan a cabo gran variedad de funciones, entre las que destacan aquellas que son claves en procesos de señalización y regulación celular. Por ello, no es de extrañar que errores en su funcionamiento y regulación estén relacionados con numerosas patologías, entre las que se incluyen las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer. Es por esta razón, que este tipo de enzimas constituyen una diana farmacológica para el tratamiento de muchas enfermedades (Corbi-Verge *et al.*, 2013).

Uno de los miembros de esta familia, la tirosina quinasa c-Src se expresa en varios tipos de células y tejidos (Thomas & Brugge, 1997; Honda *et al.*, 2018). Esta proteína interviene en el mantenimiento de la homeostasis en células normales, mediante la regulación de múltiples procesos, entre los que se encuentran el crecimiento, proliferación, adhesión, diferenciación, movilidad y migración celular (Brown & Cooper, 1996; Thomas & Brugge, 1997; Wang *et al.*, 2020). Sus niveles de expresión y actividad están altamente regulados mediante varios mecanismos (Simatou *et al.*, 2020). En células normales está regulada como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, una desregulación en su actividad puede producir tumorigénesis y dar lugar al desarrollo de fenotipos relacionados con procesos oncogénicos entre los que se incluyen la proliferación celular descontrolada, mejora de la supervivencia o la invasividad celular (Ishizawa & Parsons, 2004; Honda *et al.*, 2018; Simatou *et al.*, 2020; Sirvent *et al.*, 2020). En particular, la proteína v-Src, uno de los primeros oncogenes identificados como responsables del virus del sarcoma de Rous (RSV), se caracteriza por su actividad quinasa descontrolada (Levinson *et al.*, 1978; Honda *et al.*, 2018).

1.5.3.2 *v-Src*, el primer oncogén

La sobreexpresión y una actividad anormal de la enzima c-Src han sido descritas en algunas células cancerígenas. Además, la actividad quinasa de esta enzima ha sido relacionada con la proliferación de algunos cánceres en humanos. Aunque la actividad de esta enzima está regulada, un desequilibrio en este mecanismo podría dar lugar a la aparición de tumores. En concreto, el oncogen *v-Src* fue uno de los primeros oncogenes en ser identificados (Brugge & Erikson, 1977; Levinson *et al.*, 1978; Vogt, 2012). La proteína oncogénica *v-Src*, codificada por dicho oncogén, es una tirosina quinasa altamente homóloga de la quinasa c-Src (ambas comparten hasta un 95% de la secuencia) y es la responsable de la aparición de sarcomas en pollos infectados por el RSV (Levinson *et al.*, 1978; Falsone *et al.*, 2004). Su virulencia es debida a su actividad incontrolada, producto de numerosas mutaciones puntuales y de la falta de la cola reguladora de su extremo C-terminal (Reynolds *et al.*, 1987; Jove *et al.*, 1989; Miyazaki *et al.*, 1999; Falsone *et al.*, 2004). Este extremo contiene la tirosina reguladora Tyr527, que tiene un papel fundamental en la inactivación de la quinasa. La falta de este segmento en la proteína *v-Src* provoca que no pueda adoptar su forma inactiva, por lo que siempre está activa, incluso en ausencia de estímulos activadores (Cooper *et al.*, 1986; Kuriyan, 2001; Lipsick, 2019). Además, se ha descrito que las mutaciones Arg95Trp y Asp117Asn juegan un papel crucial haciendo que la enzima escape a la regulación negativa mediada por la quinasa Csk (Superti-Furga *et al.*, 1993; Agius *et al.*, 2019). Estudios previos demostraron que las mutaciones Arg95Trp, Thr96Ile (en el lazo RT), Asp117Asn (en el lazo n-Src) y Arg318Gln (en el extremo N-terminal) introducidas en la proteína c-Src daban lugar a células con fenotipos similares a aquellos que presentaban las células del RSV (Jove *et al.*, 1989; Miyazaki *et al.*, 1999). Las principales mutaciones de esta proteína se localizan en los lazos, siendo posiciones críticas en las interacciones entre los dominios quinasa y SH3, que probablemente contribuyen a la regulación de la propia quinasa. La mutación Arg95Trp que tiene lugar en el dominio SH3 parece adquirir gran importancia, ya que está directamente implicada en la interacción del dominio SH3 con el conector que une el dominio SH2 con el dominio quinasa, que interviene también en la regulación de la actividad enzimática y que podría debilitar la interacción del dominio SH3 con su sustrato (Sicheri & Kuriyan, 1997; Xu *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1999; Falsone *et al.*, 2004; Berndt *et al.*, 2019).

Los estudios llevados a cabo por Falsone y colaboradores demostraron que, además de su actividad incontrolada, la enzima v-Src es menos estable que su homóloga c-Src. Por ejemplo, es menos estable frente al agente caotrópico urea y agrega con mayor facilidad que la c-Src. Así mismo, determinaron que la proteína oncogénica no era activa a temperaturas cercanas a la temperatura fisiológica. Además, en su estado nativo los residuos hidrófobos quedan más expuestos que en el caso de la c-Src lo que explicaría su mayor facilidad para formar agregados (Falsone *et al.*, 2004). Se ha descrito que la proteína oncogénica v-Src es capaz de inducir tumores en modelos animales, así como otros parámetros que promueven el crecimiento oncogénico, como el factor de crecimiento celular, aumento en la independencia del anclaje y pérdida de inhibición por contacto, entre otros (Jove & Hanafusa, 1987; Frame *et al.*, 2002; Moissoglu *et al.*, 2005).

En esta tesis se ha trabajado con la variante Schmidt Ruppin E Strain, (Swiss-Prot entry P00524). Esta variante, además de la ausencia del extremo C-terminal, contiene once mutaciones puntuales, de las cuales cuatro se encuentran en el dominio SH3, en los lazos RT (Arg95Trp/Thr96Ile), n-Src (Asp117Asn) y distal (Leu124Val) (Figura 1.11).

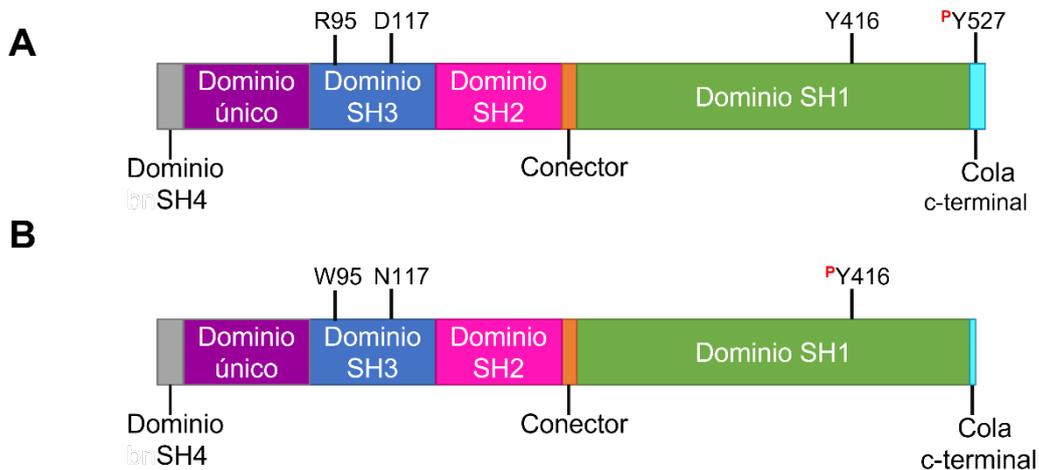


Figura 1.11. (A) Representación esquemática de la estructura de la (A) c-Src tirosina quinasa comparada con (B) su homólogo oncogénico v-Src tirosina quinasa.

1.5.3.3 Abl tirosina quinasa

La familia de la Abl tirosina quinasa interviene en procesos de proliferación, adhesión, migración y muerte celular, y participa también en respuestas frente al estrés celular y reparación del ADN (Van Etten, 1999; Pluk *et al.*, 2002; Deville *et al.*, 2020). Uno de los miembros de esta familia es la Abl tirosina quinasa (Abelson tirosina quinasa) que fusionada con la proteína Bcr (“*breakpoint cluster region*”) son las responsables de

la leucemia en humanos, así como su variante oncogénica, v-Abl (Ben-Neriah *et al.*, 1986; Van Etten *et al.*, 1989; Colicelli, 2010). La Abl comparte un 47% de homología secuencial con la c-Src y al igual que esta, está compuesta por varios dominios modulares (Nagar *et al.*, 2002). La mitad del N-terminal es homóloga a c-Src, y cuenta con los dominios SH2 y SH3, que al igual que en la familia Src tirosina quinasa, se unen a segmentos polipeptídicos que contienen fosfotirosina y a motivos ricos en prolina, respectivamente, y el dominio quinasa (Van Etten, 1999; Nagar *et al.*, 2006). La excepción a esta homología viene dada por la región cap, que comprende los 80 primeros residuos del extremo N-terminal y es única de la Abl y su paróloga (Pluk *et al.*, 2002; Nagar *et al.*, 2003; Sirvent *et al.*, 2008). Mientras que la mitad del C-terminal no es homólogo a la c-Src tirosina quinasa, y contiene un dominio de unión a actina, un dominio de unión a ADN, y varios motivos de reconocimiento cortos, además carece de la cola C-terminal que sí aparece en las tirosinas quinasas de la familia Src (Van Etten, 1999; Pluk *et al.*, 2002; Nagar *et al.*, 2006). La inactivación de la actividad quinasa viene regulada por las interacciones que se producen entre los dominios SH2 y SH3 y el conector del dominio SH2 con el dominio quinasa, de manera similar a lo ocurrido en la regulación de las tirosinas quinasas de la familia Src (Chen *et al.*, 2006). Además, la interacción del dominio SH2 con la región cap y el sitio de miristoilación también parece formar parte del mecanismo de auto-inhibición de esta quinasa (Pluk *et al.*, 2002; Sirvent *et al.*, 2008). De esta forma, el dominio SH3 posee un papel fundamental en la regulación de la actividad quinasa y las mutaciones o deleciones en este dominio pueden dar lugar a una activación descontrolada de la misma (Van Etten, 1995; Van Etten, 1999; Brasher & Van Etten, 2000; Brasher *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2006; Blakes *et al.*, 2020). La activación de la Abl se produce mediante la fosforilación de algunos residuos como la Tyr245 y Tyr412, así como de residuos de serina y treonina, implicados en la regulación catalítica (Van Etten, 1999; Hantschel & Superti-Furga, 2004; Sirvent *et al.*, 2008).

La proteína Abl lleva a cabo su función en múltiples compartimentos celulares, ya que ha sido encontrada en regiones tan diversas como en la membrana celular, el citoesqueleto, el citosol y el núcleo (Van Etten *et al.*, 1989; Van Etten, 1999; Sirvent *et al.*, 2008). Una de las funciones biológicas más importante de la familia Abl es su interacción con dominios de unión al ADN y a proteínas del citoesqueleto, lo que le confiere capacidades de señalización únicas (Colicelli *et al.*, 2010). Esta quinasa está implicada en la recombinación y replicación del ADN y ha sido relacionada con

respuestas celulares al daño del ADN, como reparación del ADN, inhibición del crecimiento celular y apoptosis (Sirvent *et al.*, 2008; Colicelli *et al.*, 2010; Yildirim & Yaba, 2020). Además, la Abl tirosina quinasa está implicada en gran variedad de funciones celulares como la adhesión, diferenciación, crecimiento, desarrollo y proliferación celular, pudiendo ejercer un papel clave en la división celular meiótica (Kharbanda *et al.*, 1998; Van Etten, 1999; Pluk *et al.*, 2002; Deville *et al.*, 2020; Yildirim & Yaba, 2020). En algunos tipos de cánceres estas funciones podrían estar desreguladas, por ello esta quinasa ha sido considerada como un objetivo potencial en algunos tipos de tumores como el melanoma y algunos tipos de carcinomas (Hodi *et al.*, 2013; Hoehler *et al.*, 2013; Maass *et al.*, 2014). También, se ha descrito su implicación en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer o Parkinson, y algunos estudios demuestran que su inhibición podría ser una opción en el tratamiento de estos trastornos (Cancino *et al.*, 2008; Hebron *et al.*, 2013; Estrada *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2020).

1.6 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral, respaldada por estudios previos de nuestro grupo de investigación (Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2014), es el estudio de procesos de plegamiento alternativo y su relación con agregados de mayor orden como fibras amiloides, mediante su estudio en proteínas modelo como son los dominios SH3 de las proteínas c-Src y Abl. Con el propósito de esclarecer los determinantes estructurales claves que dan lugar a la formación de oligómeros entrecruzados, y si estos guardan o no relación con la capacidad de formar fibras amiloides, hemos construido una serie de proteínas quimera a partir de los dominios c-Src-SH3 y Abl-SH3. El primero es capaz de formar dímeros entrecruzados y fibras amiloides, mientras que, hasta la fecha, ninguno de estos fenómenos ha sido descrito para el segundo dominio. Para ello, hemos intercambiado los lazos RT, n-Src o ambos del dominio c-Src-SH3 por aquellos presentes en el dominio Abl-SH3, obteniendo las quimeras SA-RT, SA-Src y SA-2X, respectivamente. De igual forma, hemos intercambiado los lazos RT, n-Src o ambos del dominio SH3 de la Abl tirosina quinasa por aquellos presentes en la proteína c-Src SH3, dando lugar a los dominios quimeras AS-RT, AS-Src y AS-2X, respectivamente.

Por otra parte, el dominio SH3 de la v-Src tirosina presenta precisamente mutaciones clave en los lazos RT y n-Src, por lo que consideramos de interés estudiar el efecto de

estas mutaciones en la formación de dímeros entrecruzados y amiloides. Así, los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son:

1. Establecer los determinantes estructurales que favorecen la formación de 3D-DS mediante el uso de proteínas quimeras de los dominios SH3 de las proteínas c-Src y Abl.
2. Analizar el efecto de las mutaciones del dominio v-Src-SH3, basado en la variante de Schmidt Ruppin E, en la formación de 3D-DS.
3. Llevar a cabo la caracterización biofísica de las quimeras y mutantes que son objeto de estudio, determinando su estabilidad y relacionándola con la formación de 3D-DS y agregados de mayor orden.
4. Cristalizar las quimeras y mutantes para determinar su estructura mediante difracción de rayos X, a ser posible tanto en su forma monomérica como de dímero entrecruzado. El análisis de las diferencias entre estas estructuras podría ser clave para entender la formación de procesos de plegamiento alternativos.
5. Definir los factores que afectan a la formación de las fibras amiloides del dominio de las quimeras y mutantes estudiados.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para llevar a cabo los estudios propuestos en esta Tesis hemos diseñado una serie de proteínas quimera a partir de los dominios c-Src-SH3 y Abl-SH3 en las cuales intercambiamos los lazos RT, n-Src o ambos de cada dominio SH3. De esta forma obtenemos las quimeras SA-RT, SA-Src y SA-2X, en las que se ha intercambiado los lazos del dominio Abl en el dominio c-Src, y AS-RT, AS-Src y AS-2X en las que los lazos del dominio Abl se han intercambiado por los del dominio c-Src. También hemos estudiado la variante oncogénica del dominio c-Src SH3, la v-Src SH3, basada en la variante Schmidt Ruppin E (P00524) y sus mutantes, Q128R, N117D-V124L y W95R-I96T (Figura 2.1).

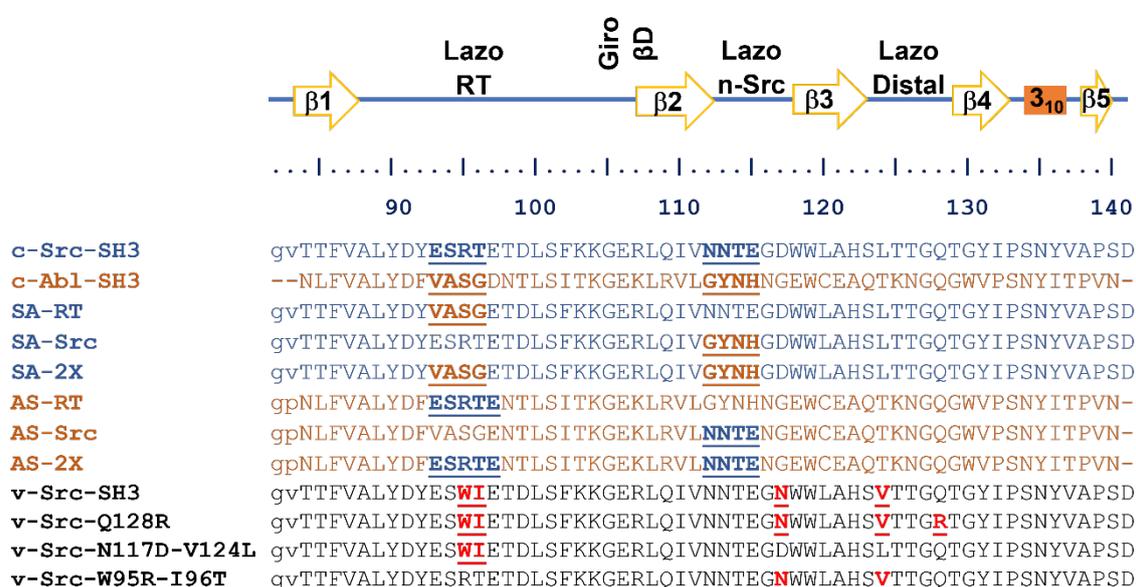


Figura 2.1. Secuencias de las proteínas objeto de estudio. En azul se representan la secuencia del dominio c-Src-SH3 y en naranja la del dominio Abl-SH3. Los residuos mutados se han señalado en negrita y han sido subrayados. Las secuencias del dominio v-Src-SH3 y sus mutantes han sido representadas en negro, señalando en rojo los residuos mutados respecto del dominio nativo. En la parte superior se representa la estructura secundaria de los dominios. La numeración utilizada corresponde al dominio c-Src-SH3.

2.2 Métodos

2.2.1 Clonado, expresión y purificación de proteínas

2.2.1.1 Dominios Src-Abl-SH3, Abl-Src-SH3 y mutantes del dominio v-Src-SH3 clonados en el vector pHTP1

El ADN que codifica las secuencias de las proteínas objeto de estudio se sintetizaron y clonaron en el vector pHTP0 por la empresa NZYTech (Lisboa, Portugal). Para la purificación de las proteínas se introdujeron estas secuencias en el vector pHTP1 con resistencia a kanamicina (Figura 2.2). Este vector contiene una etiqueta de 6 histidinas

en el extremo N-terminal para facilitar la purificación de la proteína en una columna de níquel, seguido de un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV (EC 3.4.22.44).

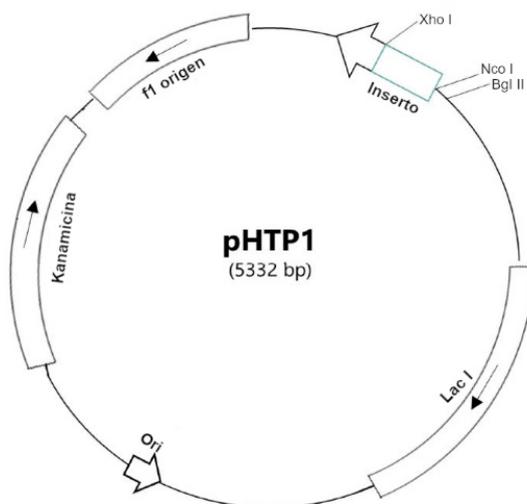


Figura 2.2. Representación gráfica del vector de expresión pHTP1 de la empresa NZYTech (Lisboa, Portugal).

Todas las proteínas fueron expresadas en *E. Coli* BL21-DE3 (NZYTech, Lisboa, Portugal). Inicialmente se llevaron a cabo pruebas de inducción con el fin de obtener información acerca de las condiciones más favorables para la expresión. Los parámetros estudiados fueron:

- Temperatura de inducción: se ensayó el intervalo 20 °C - 37 °C
- Tiempo de inducción: se ensayaron tiempos entre 0 y 5 horas, y durante toda la noche

En general, las proteínas estudiadas en esta Tesis formaban cuerpos de inclusión, por lo que una vez realizadas las pruebas de expresión se optó por crecer las células a 37 °C hasta una densidad óptica a 600 nm del cultivo en el intervalo 0,6-0,8, e inducir la expresión de la proteína por adición de IPTG 0,1 mM a 20 °C durante toda la noche. Una vez expresada la proteína, las células fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Hettich. Seguidamente el precipitado de células se resuspendió en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, cloruro sódico 300 mM, pH 8,0. Una vez resuspendidas las células se congelaron a -20 °C hasta su procesado.

Para purificar las proteínas las células fueron sonicadas en un baño de hielo en ciclos de 0,5 segundos con una amplitud del 60%, y posteriormente fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 60 minutos a 4 °C en una centrífuga Eppendorf. Una vez clarificado,

el sobrenadante se pasó por una columna con 5 mL de Ni-NTA (Clontech) equilibrada previamente con tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, cloruro sódico 300 mM, pH 8,0 (tampón de equilibrado de columna, TEC). A continuación, se llevaron a cabo sucesivos lavados de 5-10 volúmenes de columna con TEC y TEC más imidazol 20 mM. Finalmente, la proteína fue eluida con 5-10 volúmenes de columna de TEC más imidazol 250 mM. Se midió la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones para comprobar la presencia de proteína. Finalmente, las fracciones que contenían la proteína se juntaron y se dializaron frente a TEC a 4 °C, con el objetivo de eliminar el imidazol. Posteriormente, se realizó el corte de la cola de histidinas en la posición N-terminal mediante incubación con la proteasa TEV a 20 °C durante toda la noche en una relación aproximada de 100:1 de proteína:TEV. Para completar la proteólisis total de la proteína se adicionó TEV al menos tres veces con tiempos de incubación de 3 horas a 20 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación, se pasó la mezcla proteína-proteasa por una columna Ni-NTA. De este modo, tanto la cola de histidinas, como la proteína no hidrolizada y la proteasa TEV, que presenta una cola de histidinas, quedan retenidas en la columna, mientras que la proteína sin cola de histidinas no es retenida.

Para alcanzar un mayor grado de pureza todas las fracciones de proteína fueron concentradas hasta 1-3 mg/mL y pasadas por columna de exclusión molecular Hi-Load 26/60 Superdex-75 (GE-Healthcare) conectada a un sistema AKTA-FPLC (GE-Healthcare). Esta columna posee una longitud de 60 cm y un diámetro interno de 26 mm, con un volumen de lecho de 320 mL, y el límite de presión es de 0,5 MPa. Se equilibró la columna en el tampón TEC. La cromatografía se llevó a cabo usando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y un límite de presión de 0,4 MPa. Las fracciones que contenían la proteína pura se juntaron y se concentró hasta 1-3mg/mL, y se almacenaron a -20 °C en TEC en fracciones de 1-2 mL.

Para comprobar las diferentes etapas de la purificación, así como la pureza final se realizó la electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 16% en una Protean-Mini Tetra Cell (BioRad). Para poder visualizar correctamente las muestras extraídas de los medios de cultivo durante las pruebas de expresión fue necesario eliminar las sales de la muestra mediante la precipitación de las proteínas con TCA (ácido tricloro acético). Para ello se siguió el protocolo de Simpsons y colaboradores que consiste en añadir dos volúmenes de 10% de TCA en acetona a un volumen de muestra.

Seguidamente esta mezcla se dejó un mínimo de dos horas a -20 °C. A continuación, se descongelaron las muestras y fueron centrifugadas a 13000 rpm a una temperatura de 4 °C durante 30 min. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue secado y resuspendido en tampón de carga (Simpdom *et al.*, 2009).

La concentración final de proteína fue determinada usando el coeficiente de extinción molar calculado mediante el servidor ProtParam ExpASy (Tablas 2.1 y 2.2) (<https://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger *et al.*, 2005).

Tabla 2.1. Coeficientes de extinción molar de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	SA-RT	SA-Src	SA-2X	AS-RT	AS-Src	AS-2X
ϵ ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)	16960	18450	18450	15470	13980	13980

Tabla 2.2. Coeficientes de extinción molar del dominio v-Src-SH3 y sus mutantes.

Proteína	v-Src	v-Src-W95R-I96T	v-Src-N117D-V124L	v-Src-Q128R
ϵ ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)	22460	16960	22460	22460

Este protocolo de purificación produjo rendimientos de proteína aceptables con las proteínas quimeras y los mutantes del dominio v-Src-SH3, pero no proporcionó buenos rendimientos en el caso del dominio v-Src-SH3. En este caso, tras el sonicado de las células la proteína estaba presente mayoritariamente en el precipitado. Para optimizar esta purificación, se llevó a cabo un protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión. Brevemente, este protocolo consistía en que una vez centrifugadas las células a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Hettich, el precipitado fue congelado. Una vez descongeladas, el precipitado fue resuspendido en TEC conteniendo 0,5-1,0% de Tritón X-100 y las células fueron sonicadas con el protocolo descrito anteriormente y, posteriormente, fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 60 minutos a 4 °C. En este caso el precipitado obtenido fue resuspendido en TEC conteniendo 1,0-2,0% Tritón X-100, se volvió a sonicar en baño de hielo y centrifugar a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se llevaron a cabo lavados del precipitado con tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, cloruro sódico 1,0 M, pH 8,0 y TEC

alternando con la centrifugación de la muestra a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, el precipitado obtenido fue resuspendido en TEC conteniendo 8 M urea y dejado durante toda la noche a 4 °C. Tras dicho tiempo, la muestra fue centrifugada a 10000 rpm durante 60 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue dializado dos veces en 5 L de TEC a 4 °C durante toda la noche para asegurar la eliminación de la urea y favorecer la renaturalización de la proteína. Posteriormente, se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA, tal como se ha descrito anteriormente.

2.2.1.2 Expresión y purificación de la proteasa TEV

Para llevar a cabo el corte de la cola de histidinas de los dominios objeto de estudio se ha usado el mutante TEV S219V unido a la MBP (proteína de unión a maltosa) codificado en el plásmido pRK793, con resistencia a ampicilina y cloranfenicol. La presencia de la MBP aumenta la solubilidad de la proteína, y gracias a la mutación S219V se evita su autoinhibición y se produce un aumento en su actividad catalítica respecto de la variante nativa (Doyle, 2009). La proteína fue expresada tal como se ha descrito previamente y la inducción con IPTG 0,1 mM se llevó a cabo durante toda la noche a 25 °C. En este caso las células se resuspendieron en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, cloruro sódico 100 mM, imidazol 20 mM, 10% glicerol, pH 8,0, y fueron congeladas a -20 °C. El paso por columna Ni-NTA se llevó a cabo con el tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, cloruro sódico 100 mM, 10% glicerol, pH 8,0 (tampón TECT). A continuación, se llevaron a cabo sucesivos lavados de 5-10 volúmenes de columna con TECT, y TECT más imidazol 20 mM. Finalmente, la proteína fue eluida con 5-10 volúmenes de columna de TECT más imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y fueron dializadas frente a tampón Tris 50 mM, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM pH 8,0 a 4 °C, para eliminar el imidazol. La proteína fue concentrada hasta 2-3 mg/mL, y almacenada a -20 °C en tampón Tris 50 mM, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1mM pH 8,0, 50% glicerol. La concentración final de proteína fue determinada usando un coeficiente de extinción molar de 31970 M⁻¹ cm⁻¹ (Blommel *et al.*, 2007).

2.2.2 Preparación de disoluciones tampón

Las disoluciones tampón utilizadas durante esta tesis fueron preparadas mediante pesada de las formas ácida y básica del sistema tampón. Para el cálculo de las cantidades a pesar para obtener el correspondiente tampón se usó el servidor <https://www.liverpool.ac.uk/pfg/Research/Tools/BufferCalc/Buffer.html>. El precipitado se disolvió en aproximadamente un 70% del volumen requerido, y se comprobó el pH con la ayuda de un pHmetro (HANNA), ajustando el pH deseado si fuera necesario. Finalmente, las disoluciones fueron enrasadas hasta el volumen final y filtradas mediante vacío con un filtro de tamaño de poro 0,45 μm (Millipore, Merk).

2.2.3 Medida de la concentración de proteína

Todos los dominios SH3 estudiados en este trabajo presentan dos triptófanos, a excepción del dominio v-Src-SH3 y sus mutantes v-Src-Q128R y v-Src-N117D-V124L que presentan tres. Por ello, una vez purificada la proteína, se determinó su concentración mediante medidas espectrofotométricas en UV-Vis a 280 nm en un espectrofotómetro Lambda 25 Perkin-Elmer, y usando los coeficientes de extinción molar calculados mediante la herramienta PotParam ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger *et al.*, 2005) para cada proteína (Tablas 2.1 y 2.2). Como blanco se utilizó el tampón en el cual se encontraban disueltas las proteínas.

2.2.4 Determinación del límite de solubilidad de la proteína

Para la determinación del límite de solubilidad de cada dominio SH3 estudiado se ha aplicado el método de adición de proteína liofilizada descrito por Trevino y colaboradores (Trevino *et al.*, 2008). Previamente, la proteína fue dializada en agua destilada durante al menos 24 horas para eliminar totalmente las sales presentes, y posteriormente fue liofilizada en un liofilizador LyoQuest (Telstar) a una temperatura de $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de 0,3 mBar. El liofilizado resultante fue pesado y diluido en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM pH 7,0 y tampón ácido acético/acetato sódico 50 mM pH 5,0 a distintas concentraciones. Tras ser incubadas durante una hora a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, las muestras fueron centrifugadas a 12000 xg durante 30 minutos para eliminar cualquier resto de proteína precipitada. Finalmente, se determinó la concentración de cada muestra midiendo la absorbancia del sobrenadante a 280 nm.

2.2.5 Fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50 en una microcubeta de cuarzo de 3 mm de paso de luz. En todos los experimentos, la concentración de proteína fue de 2 μM . Las muestras de proteína fueron excitadas a 280 nm, y el espectro de emisión fue recogido entre 300 y 500 nm, con rendijas de excitación y emisión entre 4 y 8.

Estabilidad frente al pH. La determinación de la estabilidad de la proteína en función del pH se llevó a cabo en tampón 50 mM en un rango de pH de 1-14 a 25 °C. Las sales y ácidos usados en la preparación de los tampones fueron pH 1,0-1,5, HCl; pH 2,0-3,5, H_3PO_4 ; pH 4,0-5,5, $\text{CH}_3\text{-COOH}$; pH 6,0-7,0, NaH_2PO_4 ; pH 7,5-9,0, Tris-HCl; pH 9,5-11,0, Na_2CO_3 ; pH 11,5-13,0, Na_3PO_4 ; pH 13,5-13,9, NaOH. El pH final de las muestras fue comprobado tras realizar la medida de fluorescencia con un pHmetro (HANNA). Asumiendo que ambas especies, protonada y desprotonada contribuyen al espectro de fluorescencia, se calcularon los valores del pK_a de las transiciones ácida y básica ajustando los datos obtenidos a la ecuación 2.1:

$$Y = \frac{Y_a + Y_b 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde Y es la intensidad de fluorescencia observada, Y_a e Y_b corresponden a la intensidad de fluorescencia en los valores de pH más bajo y alto, respectivamente. El ajuste de los datos obtenidos mediante la ecuación 2.1 se llevó a cabo en dos pasos; ajustando primero la parte ácida (pH 1,0-7,0), y posteriormente, ajustando la parte básica (pH 7,0-14,0), de forma independiente.

Estabilidad de la proteína en presencia de cloruro de guanidinio. Para determinar la estabilidad de la proteína en presencia de cloruro de guanidinio se determinó la curva de desplegamiento para cada uno de los dominios a 25 °C mediante la medida de la fluorescencia intrínseca de la proteína. Para ello se prepararon distintas muestras de proteína a una concentración final de 2 μM y distintas concentraciones de cloruro de guanidinio desde 0 a 7,5 M. Las muestras fueron preparadas en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM pH 7,0 y tampón ácido acético/acetato sódico 50 mM pH 5,0. La concentración de la disolución madre de cloruro de guanidinio fue comprobada mediante la medida de su índice de refracción con un refractómetro manual

(Atago) y se calculó la concentración real mediante el servidor “Denaturant concentration calculator” (<http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>). La curva de desnaturalización resultante fue analizada usando un modelo de dos estados según la ecuación 2.2:

$$Y = \frac{(Y_n + m_n[D]) + (Y_d + m_d[D]) \cdot \exp \left[-\frac{\Delta G_w - m[D]}{RT} \right]}{1 + \exp \left[-\frac{\Delta G_w - m[D]}{RT} \right]} \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde Y es la intensidad de fluorescencia de cada muestra, [D] es la concentración del agente desnaturalizante, y Y_n e Y_d corresponden a la intensidad de fluorescencia de la proteína nativa y desnaturalizada, respectivamente. El valor de la concentración de agente al cual la mitad de la población de proteína se encuentra desnaturalizada, D_{1/2}, puede ser calculado mediante la ecuación 2.3:

$$\Delta G^\circ = \Delta G_w^0 - m \cdot D_{1/2} \quad \text{Ec. 2.3}$$

En algunos casos, debido al desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia conforme se produce el desplegamiento de la proteína fue necesario llevar a cabo la corrección de este fenómeno mediante el cálculo del centro de masas según la ecuación 2.4 (Royer, 1995):

$$\langle 1/\lambda \rangle = \frac{\sum_1^n \frac{1}{\lambda} I_i}{\sum_1^n I_i} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde I_i es la intensidad a una determinada longitud de onda, λ_i.

Determinación de la unión de péptidos ricos en prolina a los dominios SH3. Para determinar los parámetros de unión de los péptidos de alta afinidad a las quimeras de los dominios Src-Abl y a los mutantes oncogénicos de la v-Src-SH3 se siguió la fluorescencia intrínseca de la proteína a diferentes concentraciones de péptido. Para ello las muestras fueron preparadas en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM pH 7,0 a una concentración final de proteína de 2 μM e incubadas durante toda la noche a 25 °C para facilitar el equilibrio. La constante de equilibrio fue calculada mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 2.5:

$$\alpha = \frac{P_1[\text{Ligando}]_{\text{libre}}}{P_2 + [\text{Ligando}]_{\text{libre}}} \quad \text{Ec. 2.5}$$

donde $[\text{Ligando}]_{\text{libre}}$ es la concentración de ligando libre, P_1 es la constante de equilibrio, y α es la fracción de saturación de la proteína calculada mediante los cambios en la intensidad de fluorescencia, que vienen dados por la ecuación 2.6:

$$\alpha = \frac{I - I_0}{I_\infty - I_0} \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde I corresponde a la intensidad de fluorescencia de cada medida, I_0 es la intensidad de fluorescencia de la proteína libre e I_∞ es la intensidad de fluorescencia de la proteína saturada. A su vez, la concentración de ligando libre viene dada por la ecuación 2.7:

$$[\text{Ligando}]_{\text{libre}} = [\text{Ligando}]_{\text{total}} - nY[\text{Proteína}]_{\text{total}} \quad \text{Ec. 2.7}$$

donde $[\text{Ligando}]_{\text{total}}$ es la concentración total del ligando, n es el número de sitios activos y $[\text{Proteína}]_{\text{total}}$ es la concentración total de proteína.

2.2.6 Dicroísmo circular (CD)

El dicroísmo circular (CD) es una técnica espectroscópica ampliamente usada en la caracterización de las proteínas. Se basa en la interacción de moléculas quirales con la luz circularmente polarizada. En ausencia de campo magnético las moléculas quirales interaccionan con la luz circularmente polarizada dando lugar a una diferencia de absorción, hacia la derecha o la izquierda de esta (Woody, 1995; Sreerama & Woody, 2004). El espectro de CD de las proteínas se divide en tres rangos de longitud de onda en función de la energía de las transiciones electrónicas que dominan en cada rango. De esta forma podemos distinguir entre UV-lejano donde predominan las contribuciones peptídicas y aporta información sobre la estructura secundaria, y que comprende longitudes de onda de 250 nm y menores. En la región del UV-cercano, que comprende el intervalo 250-300 nm, contribuyen los residuos aromáticos de las cadenas laterales y aporta información sobre la estructura terciaria. Por último, es en el UV-cercano y región del visible, comprendido en el intervalo 300-700 nm, donde contribuyen los cromóforos extrínsecos y aporta información sobre la unión de ligandos (Sreerama & Woody, 2004).

Esta técnica es muy sensible a las características tridimensionales de las moléculas, y por lo tanto a su conformación, por lo que puede ser usada para detectar cambios conformacionales (Wu *et al.*, 1991). Por ejemplo, las hélices α poseen tres bandas características en el intervalo 185-240 nm, correspondientes a un doble mínimo en 222 nm y 208-210 nm y un máximo cerca de 190 nm, mientras que, las láminas β suelen presentar una banda negativa a 216-218 nm, una banda positiva cerca de los 195 nm y otra banda negativa cerca de 180 nm (Wu *et al.*, 1991; Woody, 1995) (Figura 2.3).

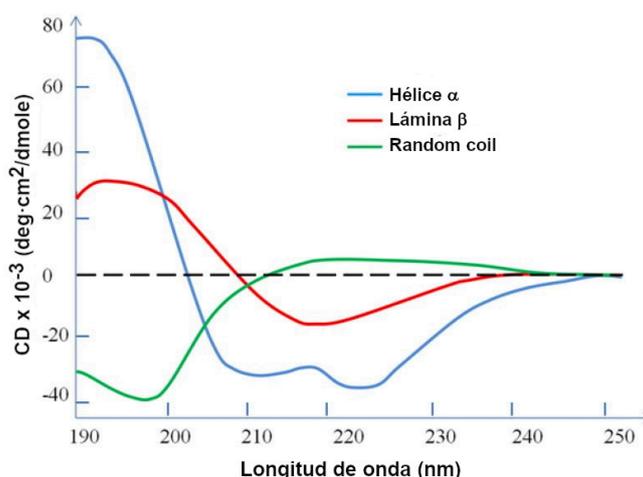


Figura 2.3. Espectro de CD de los tipos de estructuras secundarias más comunes (Wei *et al.*, 2014).

En esta Tesis hemos utilizado esta técnica para caracterizar la desnaturalización térmica de las proteínas estudiadas. Las medidas se llevaron a en un espectropolarímetro Jasco J810. Antes de realizar las medidas, las proteínas se dializaron en ácido acético/acetato sódico 10 mM a pH 5,0 y fosfato sódico monobásico/ fosfato sódico dibásico 10 mM a pH 7,0. Las proteínas a una concentración de 30 μ M fueron medidas en una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso de luz, con un volumen de muestra de 300 μ L. Se utilizó una rampa de temperatura en el intervalo 10-95 $^{\circ}$ C, a una velocidad de 2 $^{\circ}$ C/min. Para seguir la desnaturalización térmica se midió la elipticidad a 223 nm para las quimeras Src-Abl y 230 nm para las quimeras Abl-Src y mutantes de la v-Src-SH3. Estas longitudes de onda fueron seleccionadas para maximizar las diferencias de elipticidad observadas entre las formas nativa y desnaturalizada. Las curvas obtenidas al representar la elipticidad a dichas longitudes en función de la temperatura se ajustaron según un modelo de dos estados con la ecuación 2.8:

$$\theta = \frac{(\theta_N + m_n \cdot T) + (\theta_U + m_U \cdot T) \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)}} \quad \text{Ec. 2.8}$$

donde θ_N corresponde a la elipticidad de la proteína en su estado nativo, θ_U corresponde a la elipticidad de la proteína en su estado desplegado, y m_N y m_U corresponden a las regiones plegada y desplegada, respectivamente. A su vez, la energía libre de desplegamiento, ΔG , viene dada por la ecuación 2.9:

$$\Delta G = \Delta H_m \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot ((T_m - T) + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)) \quad \text{Ec. 2.9}$$

donde T_m es la temperatura del punto medio de transición entre las formas plegada y desplegada, ΔH_m es la entalpía de la transición de desplegamiento y ΔC_p es la capacidad calorífica. La reversibilidad del proceso fue comprobada mediante la comparación de los espectros de CD de la proteína nativa, desnaturalizada y tras la desnaturalización térmica a una temperatura de 25 °C.

2.2.7 Dispersión dinámica de la luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS) permite la determinación del tamaño de las partículas presentes en la disolución y su distribución, así como su morfología. Esta técnica se basa en la medida de las fluctuaciones dependientes del tiempo de la intensidad dispersada por las partículas en movimiento browniano y el cambio Doppler que se origina (Arzensek, 2010). Brevemente, cuando una suspensión de partículas en movimiento browniano es excitada mediante el uso de un rayo láser monocromático, la longitud de onda del haz entrante cambia al impactar con las partículas en movimiento, lo que origina un pequeño cambio en la frecuencia de la luz dispersada, que es conocido como efecto Doppler. Dicho cambio aporta información sobre el tamaño y su distribución, la estructura y la forma de las partículas. Así, cuanto mayor sea el tamaño de la partícula, más lento será su movimiento browniano, y la luz dispersada por éstas se propagará lentamente, dando lugar a un gran efecto Doppler, mientras que, la dispersada por partículas pequeñas fluctúa rápidamente originando un efecto Doppler menor (Mamour Sakho *et al.*, 2017).

A su vez, la luz dispersa fluctúa de manera dependiente del tiempo debido a que las distancias entre las partículas cambian de forma continua, lo que da lugar a interferencias destructivas y constructivas. Durante un análisis mediante DLS, la fluctuación de la

intensidad medida contiene información sobre el movimiento de los dispersores en función del tiempo. Dicha fluctuación puede representarse mediante una función de autocorrelación. La velocidad en la decadencia exponencial de la señal de correlación depende del coeficiente de difusión traslacional de las partículas (D_0) (Mamour Sakho *et al.*, 2017). La velocidad del movimiento browniano viene dada por este coeficiente, que puede ser relacionado con el radio hidrodinámico de las partículas mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 2.10):

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad de la disolución y D_0 es el coeficiente de difusión traslacional.

Las medidas de DLS incluidas en esta Tesis se realizaron en un instrumento Zetasizer nano (Malvern Instrument Ltd, Reino Unido) equipado con un láser de helio-neón de 10 mW ($\lambda = 632,8$ nm) y un controlador de temperatura termoeléctrico. Todos los experimentos se realizaron en un ángulo fijo ($\Theta = 173^\circ$) a 298 K y se analizaron con el software Zetasizer V7.12 (Malvern Instrument Ltd.). Antes de cada medida, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 13000 xg y se filtraron con un filtro de corte de 0,22 μm (Macherey Nagel) para eliminar los grandes agregados y el polvo. Una vez en la cubeta, las muestras se sonicaron durante 1 minuto para eliminar las posibles burbujas. Cada muestra se midió diez veces con diez carreras de 30 s cada una. Las medidas se llevaron a cabo a dos pHs, 5,0 y 7,0 y en presencia y ausencia de PEG 300 al 5 %. Para las medidas a pH 5,0 se utilizó el tampón ácido acético/acetato sódico 50 mM y para las medidas a pH 7,0 el tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM.

2.2.8 Caracterización de la presencia de fibras amiloides

Para la detección de la presencia de fibras amiloides en una muestra se utilizó la afinidad que poseen algunos colorantes por estos agregados. Estas medidas consisten en los cambios espectrofotométricos que experimentan dichos compuestos, generalmente heterociclos aromáticos, unidos a las fibras amiloides (Almeida & Brito, 2020). Los colorantes más utilizados son el Rojo Congo (RC) y la Tioflavina T (ThT).

Cuando el RC se une a las fibras amiloides muestra birrefringencia verde bajo luz polarizada, lo que está asociado a un desplazamiento rojo característico en el máximo de absorbancia, de 490 a 512 nm. Aunque es uno de los colorantes más comunes en este tipo

de estudios, es menos sensible en comparación con la ThT. Por su parte, la ThT, muestra un aumento de intensidad de fluorescencia al interactuar con estos agregados. Cuando el colorante se encuentra libre, es excitado a 385 nm dando lugar a un máximo de emisión a 445 nm, mientras que cuando está unido a agregados amiloides emite un máximo a 482 nm mediante la excitación previa a 450-455 nm (Hill *et al.*, 2011; Almeida & Brito, 2020). Existen otros fluoróforos que se utilizan para la detección de fibras amiloides y otros estados prefibrilares u oligoméricos, como es el caso del ANS (Ácido 8-Anilino-1-naftalensulfónico). Al igual que ocurre con la ThT, se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia del ANS en presencia de estos agregados. Este incremento en el rendimiento cuántico de fluorescencia del ANS se produce por la unión del colorante a las zonas hidrófobas de las fibras (Younan & Viles, 2015; Sulatsky *et al.*, 2020). En este caso se utiliza una longitud de onda de excitación de 370 nm y se obtiene el espectro de emisión entre 400 y 600 nm.

Desplazamiento del máximo de absorción del RC por la unión a amiloides. Para evaluar la formación de amiloides, se llevaron a cabo medidas de espectrofotometría en ultravioleta-visible en presencia de RC en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 (UV-Vis). Para ello se preparó una disolución de RC mediante pesada a una concentración de 100 μM en agua destilada. Para cada medida la concentración final de RC fue de 20 μM y la de proteína fue de 50 μM en el tampón correspondiente. El espectro de cada muestra fue recogido en un rango de 400-600 nm usando el tampón de muestra como blanco (Hill *et al.*, 2011).

Aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia de la ThT y del ANS. La formación de amiloides en las proteínas objeto de estudio se determinó mediante el aumento de la fluorescencia de la ThT. Los espectros de fluorescencia se recogieron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50 usando una microcubeta de cuarzo Hellma de 3 mm de longitud de trayectoria. La disolución madre de ThT se preparó mediante pesada a una concentración de 2 mM en agua destilada. Para cada medida la concentración final de ThT fue de 10 μM y la de proteína fue de 15 μM en el tampón correspondiente. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron recogidos en el rango de 450-600 nm tras la excitación a 445 nm, con un máximo de emisión a la longitud de onda de 482 nm. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 5 y 10 nm, respectivamente (Hill *et al.*, 2011).

Para caracterizar la presencia de agregados mediante el colorante ANS, se preparó una disolución de ANS mediante pesada a una concentración de 10 mM en agua destilada. Para cada medida la concentración final de ANS fue de 200 μ M y la de proteína fue de 2 μ M en el tampón correspondiente. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron recogidos en el rango de 400-600 nm tras la excitación de la muestra a 370 nm. Las rendijas de excitación y emisión se fijaron a 10 nm. Los espectros de fluorescencia se recogieron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50 usando una microcubeta de cuarzo Hellma de 3 mm de longitud de trayectoria a una velocidad de escáner de 500 nm/min.

2.2.9 Cristalización de proteínas

La cristalización de proteínas es un proceso gobernado por factores tanto cinéticos como termodinámicos, en el cual las moléculas se reorganizan entre sí para formar un motivo que se repite de manera tridimensional, que da lugar al denominado cristal. Generalmente, este proceso puede ser dividido en tres etapas: nucleación, crecimiento y cese de crecimiento (Gavira, 2016). Durante la etapa de nucleación, las moléculas se ordenan de manera definida y periódica, de forma que las moléculas dispersas en la disolución comienzan a interactuar entre sí, dando lugar a pequeños grupos. Dichos grupos constituyen núcleos, sobre los que se van añadiendo más moléculas. Estos deben alcanzar un tamaño mínimo para ser considerados estables en las condiciones del medio. La etapa de crecimiento consiste en la adición de moléculas a los núcleos estables, que dan lugar a grupos cada vez más grandes, hasta formar el cristal (McPherson & Gavira, 2013; Gavira, 2016). Para que se produzcan estos fenómenos son fundamentales tanto parámetros químicos, como el pH, fuerza iónica, la presencia o no de detergentes y otros compuestos en el medio, como físicos entre los que se incluyen la temperatura o vibraciones. Estas distintas etapas son las que determinarán el tamaño y número de los cristales de proteína, así como su calidad, y todas ellas vienen controladas por la sobresaturación, que es la fuerza impulsora de este proceso (Figura 2.4) (Gavira, 2016).

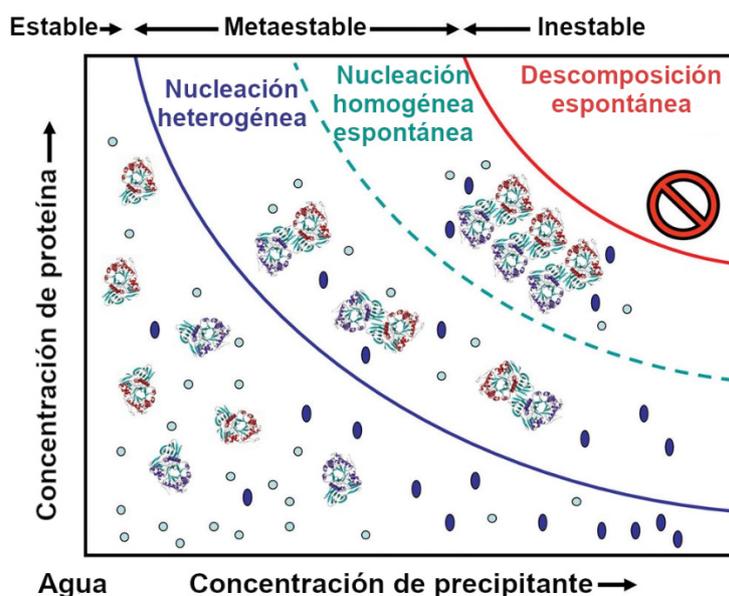


Figura 2.4. Diagrama de fases en el proceso de cristalización de proteínas. "Reproducido con permiso de Biomolecular Crystallography by Bernhard Rupp, © 2009-2014 Garland Science/Taylor & Francis LLC."

De manera general, el experimento de cristalización se lleva a cabo mediante la mezcla de la disolución de proteína, a una determinada concentración, con una disolución de reactivo, que actúa como agente precipitante, con el objetivo de disminuir la solubilidad de la muestra y generar una precipitación controlada. Mediante el incremento gradual de la concentración de la proteína y el control adecuado de las condiciones del medio, pueden obtenerse núcleos cristalinos, que al crecer darán lugar a cristales adecuados para ser difractados por rayos X (Russo Krauss *et al.*, 2013; McPherson, 2017).

En este trabajo se ha usado fundamentalmente la técnica de cristalización por difusión de vapor en gota sentada. Brevemente, una gota que contiene agente precipitante y proteína, generalmente en una proporción 1:1, es equilibrada frente a un reservorio que contiene el agente precipitante. De esta forma la concentración del agente precipitante en la gota es la mitad que en el reservorio lo que promueve la difusión del vapor de agua desde la gota al reservorio hasta alcanzar el equilibrio. Durante este proceso la muestra de proteína se concentra, lo que provoca un aumento en la sobresaturación de la misma mediante la concurrencia de la concentración del agente precipitante y la proteína (Gavira, 2016).

Una vez purificados los dominios Src-Abl-SH3, Abl-Src-SH3 y v-Src-SH3 se dializaron en tampón Tris 10 mM, pH 8,0 y se concentraron con concentradores Amicon (Merck Millipore) hasta alcanzar una concentración de 4-10 mg/mL que fue verificada mediante su absorbancia a 280 nm. La identificación inicial de las condiciones de

cristalización se llevó a cabo mediante el uso de disoluciones de cribado comerciales. Se utilizaron fundamentalmente las proporcionadas por Molecular Dimension “*Structure Screen I*”, “*Structure Screen II*” y “*Additive Screen*” (para ver detalles de la composición, ver apéndice 2) y la técnica de difusión de vapor a temperaturas comprendidas entre 4 °C y 25 °C en bandejas de 48 o 144 pocillos (MRC). Para ello, se mezclaron 2 µL de la muestra de proteína de una concentración de 4-10 mg/mL en tampón Tris 10 mM, pH 8,0 con 2 µL del agente precipitante del reservorio, la gota resultante fue equilibrada frente a 200-100 µL del agente precipitante. Las condiciones en las que aparecieron cristales fueron optimizadas mediante cambios en el pH, fuerza iónica, adición de metales y otros compuestos, como polietilenglicoles y glicerol, y temperatura. También se optimizó la concentración de proteína para la obtención de cristales más grandes y de mejor calidad.

En algunos casos fue necesario utilizar la técnica de sembrado o *seeding* para mejorar los cristales o aumentar su tamaño, tanto en su versión *microseeding* como *macroseeding*. En el caso de la técnica de *microseeding*, se mezclaron 2 µL de la muestra de proteína de una concentración de 4-6 mg/mL en tampón Tris 10 mM, pH 8,0 con 2 µL del agente precipitante del reservorio, la gota resultante fue equilibrada frente a 200-100 µL del agente precipitante. Pasado el tiempo de equilibrio, que puede variar desde unas horas hasta una semana, se procedió a añadir en la gota 1 µL de semillas. Estas semillas fueron obtenidas al triturar, agitar en un vórtex, centrifugar y concentrar los microcristales previamente obtenidos, para posteriormente diluir las semillas obtenidas en ratios 1:10, 1:100 y 1:1000 (Darcy *et al.*, 2014). En el caso del *macroseeding*, se procedió de la misma manera, pero en lugar de añadir microcristales, se añadieron cristales de proteína con las caras bien formadas, pero de tamaño insuficiente para obtener datos de difracción de la calidad adecuada (Bergfors, 2007). El seguimiento de la evolución de la aparición de cristales, así como de su crecimiento fue seguido mediante un microscopio Leica (modelo M205C con el programa informático LAZ EX de Leica para Windows, versión 3.8).

2.2.10 Difracción de rayos X y resolución estructural

Los cristales de proteína fueron recogidos de la gota de cristalización usando Litholoops (Molecular Dimension, Shelfield, UK) con un rango de tamaño de 0,02-0,2 mm y se enfriaron rápidamente en nitrógeno líquido. En algunos casos, según la composición del agente precipitante, para evitar la formación de hielo durante el proceso

de enfriamiento fue necesario el uso de crioprotectores, como glicerol o PEG de bajo peso molecular. De esta forma se evita la aparición de anillos de hielo en el patrón de difracción que pueden interferir en la calidad final de los datos, o en algunos casos la destrucción del cristal en el proceso de enfriamiento.

Los cristales de proteína fueron medidos en una corriente de nitrógeno sobreenfriado a 100 K en la línea BL13-XALOC en el sincrotrón ALBA (Barcelona, España) y en las líneas ID30A-1, ID30A-3 y ID30B en el sincrotrón europeo ESRF (Grenoble, Francia). El indexado y procesado de los datos se llevó a cabo con los programas XDS (Kabsch, 2010) y autoPROC (Vonrhein *et al.*, 2011), y el escalado se realizó con el programa del CCP4 Aimless (Evans, 2011; Winn *et al.*, 2011). Los modelos finales de las estructuras se obtuvieron usando los programas de Phenix (Program Suite, versión 1.19), CCP4 (Program Suite, versión 7.0.066) y Coot (versión 0.8.9 para Windows) (Emsley *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2010; Emsley *et al.*, 2010; Alfonine *et al.*, 2012). El cálculo de las fases se llevó a cabo mediante reemplazamiento molecular usando la interfaz simple de Phaser incluida en Phenix con los modelos de los monómeros de c-Src-SH3 (código PDB 4JZ4 y 6XVN) y Abl-SH3 (código PDB 3EG3 y 4JJC) y con el modelo del dímero entrecruzado del dominio c-Src (código PDB 4JZ3 y 6XVO). En el caso de la quimera SA-2X, en la cual se da la apertura del dominio por ambos lazos, se usaron las coordenadas de la quimera SA-2X-Q128R (PDB: 4LE9). Tras varios ciclos de refinado, los mapas de diferencia de densidad electrónica 2Fo-Fc y Fo-Fc fueron inspeccionados de manera manual y el modelo se modificó de acuerdo a ellos. Una vez minimizado los valores de los coeficientes residuales por debajo del 30% se modelaron de manera automática las moléculas de agua con la opción disponible en phenix.refine de Phenix. Estas fueron posteriormente inspeccionadas manualmente en Coot. En algunos casos, tras modelar la proteína y las moléculas de agua, aparecía alguna densidad electrónica adicional en los mapas de diferencia en las cuales se modelaron algunas moléculas de disolvente, como por ejemplo moléculas de PEG de bajo peso molecular o iones sulfato. Los modelos finales fueron inspeccionados con el servidor PDB-REDO (<https://pdb-redo.eu/>, Joosten *et al.*, 2014) y validados mediante MolProbity (Chen *et al.*, 2010) en la interfaz de Phenix. Finalmente, antes del depósito en el Protein Data Bank (PDB) los archivos cif de las coordenadas y los factores de estructura se procesaron en la aplicación web pdb-extract (<https://pdb-extract.wwpdb.org/>, Yang *et al.*, 2004) y el servidor de validación del PDB (<https://validate-pdbe.wwpdb.org/>).

2.2.11 Análisis estructural

Para comparar las estructuras se calculó de RMSD (*root mean square deviation* o desviación cuadrática media) tras la superposición de las estructuras utilizando el programa *Superpose* perteneciente a la suite CCP4 (Krissinel & Henrick, 2004). La comparación de las estructuras monoméricas y de dímero entrecruzado se ha realizado de manera sistemática ignorando los residuos correspondientes al lazo bisagra. Para ello se superpuso los residuos del extremo amino terminal (85-111) y carboxilo terminal (118-140) del monómero con las posiciones equivalentes del protómero abierto de la forma dimérica. En aquellos casos en los que no se disponía de la forma monomérica del dominio estudiado, se ha usado la del dominio nativo, c-Src-SH3 (PDB: 6XVN).

Para la caracterización de la interfaz de la proteína en el cristal se utilizó el servidor PISA (Krissinel, 2011). El área accesible (ASA) y la distancia entre aminoácidos se calculó mediante los programas *Areaimol* y *Contact*, respectivamente, ambos de CCP4 (Collaborative Computational Project N, 2011). El análisis de los puentes de hidrógeno se llevó a cabo mediante el servidor VADAR (Willard, 2003). Los factores B se analizaron mediante el programa *Baverage* incluido en CCP4 (Dobson, 1991). El análisis de los factores B es útil para detectar las regiones más flexibles en la estructura de la proteína, de manera que, factores B altos indican una alta flexibilidad, mientras que los factores B bajos están asociados a posiciones algo más rígidas (Dobson, 1991; Sun *et al.*, 2018). Las figuras estructurales han sido generadas con el programa PyMol versión 2.0 (distribuido por Schrödinger).

Capítulo 3

Impacto de las mutaciones oncogénicas de la quinasa v-Src sobre la estructura y estabilidad del dominio SH3

La quinasa viral v-Src fue descrita por primera vez en pollos infectados por el RSV (virus del sarcoma de Rous). Aunque las secuencias de v-Src y c-Src son idénticas en un 95%, esta quinasa muestra una actividad no controlada debido a la falta de la cola reguladora C-terminal, así como a varias mutaciones puntuales en su secuencia de aminoácidos (Levinson *et al.*, 1978). El dominio SH3 de la v-Src (v-Src SH3) acumula un porcentaje significativo de estas mutaciones, que son potencialmente críticas para la función del dominio y, en consecuencia, la actividad quinasa. Dos de las mutaciones están ubicadas en el llamado lazo RT, cuyo nombre viene dado por los residuos Arg95 y Thr96, ya que son aminoácidos generalmente conservados entre los miembros de la familia Src tirosina quinasa (FSTQ). Precisamente estos dos aminoácidos están mutados a triptófano (Arg95Trp) e isoleucina (Thr96Ile). Estos cambios resultan en la sustitución de aminoácidos polares por aminoácidos hidrofóbicos. Además, algunos residuos en este lazo son responsables de la especificidad de la unión de los motivos ricos en prolina (MRP) y proporcionan contactos intramoleculares para facilitar la forma inactiva o cerrada de la quinasa (Salinas-García *et al.*, 2021). Varios estudios han demostrado que cuando las mutaciones oncogénicas presentes en el dominio SH3 de la quinasa v-Src se introducen individualmente, la variante de la quinasa permanece inactiva en la transformación celular (Kato *et al.*, 1986; Miyazaki *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando las mutaciones en los lazos n-Src (Asp117Asn) y RT (Arg95Trp, Thr96Ile) se combinan, la quinasa se transforma en una proteína altamente oncogénica. Por último, el residuo Val124 está presente en el lazo distal y reemplaza a una leucina flanqueada por la Ser123 y la Thr125. El enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de la Ser123 y el Glu106 juega un papel crítico en el estado de transición de plegamiento del dominio SH3, donde el núcleo de plegamiento se define por una red de interacciones entre un subconjunto de residuos ubicados en el lazo distal (Klimov y Thirumalai, 2002).

En esta Tesis hemos clonado varios mutantes del dominio v-Src-SH3 con el objetivo de facilitar su caracterización estructural. Además del dominio v-Src-SH3 con las cuatro mutaciones mencionadas, hemos clonado los dominios con: i) solo las mutaciones oncogénicas en el lazo RT (v-Src-SH3-N117D-V124L), y; ii) en el lazo n-Src y distal (v-Src-SH3-W95R-I96T). Como se verá en el apartado de resultados, el dominio v-Src-SH3 con todas las mutaciones era muy inestable y propenso a la agregación, lo que dificultaba drásticamente su purificación y caracterización. Estudios previos demostraron que introduciendo un residuo cargado positivamente en el lugar de la glutamina en la posición

128, por ejemplo, una arginina proporciona una mayor estabilidad en los dominios c-Src SH3 (Bacarizo *et al.*, 2014). De esta forma, con el objetivo de estabilizar el dominio y poder cristalizar la proteína, se introdujo la mutación Gln128Arg en el lazo distal (v-Src-SH3-Q128R). En este capítulo discutimos cómo los datos estructurales pueden explicar el comportamiento de este dominio y podrían justificar la falta de control de la tirosina quinasa oncogénica v-Src.

3.1 Resultados

3.1.2 Expresión y purificación de los mutantes v-Src-SH3

Todos los mutantes fueron clonados en un vector de expresión pHTP1 que contiene resistencia a kanamicina y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal seguido de un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV. En la tabla 3.1 se indica la temperatura de inducción utilizada y un valor promedio del rendimiento de la purificación de cada mutante del dominio v-Src-SH3.

Tabla 3.1. Rendimiento obtenido en la purificación de los mutantes v-Src-SH3.

Proteína	Rendimiento (mg/ L de cultivo)
v-Src-SH3-Q128R	4
v-Src-SH3-N117D-V124L	10
v-Src-SH3-W95R-I96T	10

La temperatura de inducción fue de 20 °C.

La presencia de proteína y su pureza fue comprobada en cada etapa de la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE con geles al 16%. La figura 3.1 muestra un gel de electroforesis de uno de estos mutantes. Estas proteínas fueron pasados por columna de exclusión molecular Hi-Load 26/60 Superdex-75 conectada a un sistema AKTA-FPLC para eliminar agregados y así alcanzar un mayor grado de pureza. Una vez puras, las proteínas se alicuotaron en volúmenes de 1-2 mL a una concentración de 1-3 mg/mL en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, cloruro sódico 300 mM pH 8,0, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

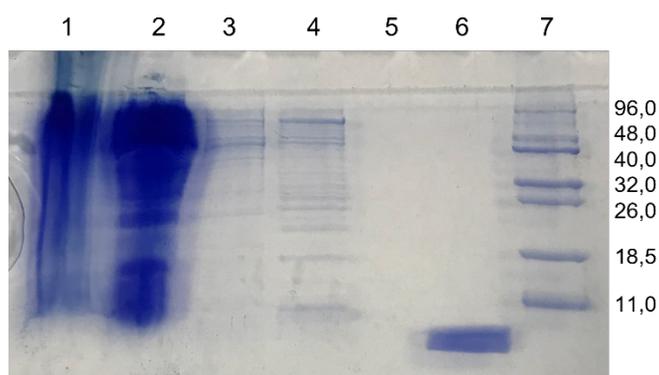


Figura 3.1. Gel de electroforesis PAGE-SDS del mutante v-Src-Q128R. Calles: 1: Pellet, 2: Fracción del sobrenadante saliente de la columna de afinidad, 3: Lavado con TEC, 4: Lavado con TEC más imidazol 20 mM, 6: v-Src-SH3-Q128R tras pasar por SEC, 7: Patrón molecular.

3.2.2 Caracterización biofísica de los mutantes v-Src-SH3

3.2.1.1 Estabilidad de los mutantes v-Src-SH3 en función del pH

Hemos determinado la estabilidad de los mutantes v-Src-SH3 en función del pH mediante la medida de la fluorescencia intrínseca de la proteína en un rango de pH de 1-14. La figura 3.2 muestra la intensidad de fluorescencia de emisión normalizada y la tabla 3.2 recopila los valores obtenidos del pK_a aparente para la desnaturalización ácida y básica de cada dominio, calculados mediante la ecuación 2.1.

Tabla 3.2. Valores del pK_a aparente de la desnaturalización ácida y básica.

Proteína	pK_a (ácido)	pK_a (básico)	Número de residuos ionizables					
			Asp	Glu	His	Tyr	Lys	Arg
v-Src-SH3-Q128R	$4,8 \pm 0,1^2$	$10,6 \pm 0,1$	3	4	1	4	2	2
v-Src-SH3-N117D-V124L	$4,9 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,1$	4	4	1	4	2	1
v-Src-SH3-W95R-I96T	$3,2 \pm 0,1$	$10,4 \pm 0,1$	3	4	1	4	2	2
c-Src-SH3-WT ¹	$4,0 \pm 0,1$	$10,8 \pm 0,1$	4	4	1	4	2	2

¹Datos de Plaza-Garrido *et al.* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). ² Desviación estándar del pK_a

La estabilidad de estos mutantes en función del pH muestra la típica curva en forma de campana. En la región ácida, la transición puede ser atribuida a la protonación de los residuos glutámico y aspártico. Los resultados muestran que el mutante v-Src-SH3 W95R-I96T, con las mutaciones en el lazo n-Src y distal, es el más estable comparado con el dominio SH3 que contiene los residuos Trp95 y Ile96 en el lazo RT. Además, la mutación Asp117Asn en el lazo n-Src parece producir cierta estabilización de este dominio en la región ácida si lo comparamos con la variante nativa, c-Src-SH3. El aminoácido Asn117 forma un puente de hidrógeno con la Ser134 en la hélice 3₁₀, que no es dependiente del pH, y podría ser la causa de la mayor estabilidad del mutante en la región ácida. Sin embargo, en el caso de los mutantes v-Src-SH3-Q128R y N117D-

V124L el rango de estabilidad es menor (pH 5,5-10,0), posiblemente debido a la facilidad de estos mutantes a agregar en medio ácido. En el rango de pH básico, todos los mutantes del dominio v-Src-SH3 muestran el mismo comportamiento con un pK_a aparente de $\sim 10,6 \pm 0,2$, que es similar al que presenta la variante nativa c-Src-SH3 (Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

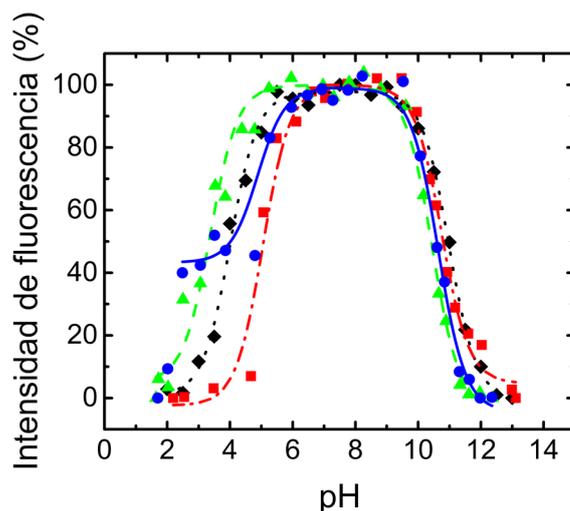


Figura 3.2. Porcentaje de la intensidad de fluorescencia de los mutantes v-Src-SH3 frente al pH a 25 °C: v-Src-SH3-Q128R (azul, -●-), v-Src-SH3-N117D-V124L (rojo, -■-), v-Src-SH3-W95R-I96T (verde, ---▲---). Para la comparación, también se han incluido los datos del dominio c-Src-SH3 (negro, ...◆...).

Además, hemos calculado los valores del pK_a aparente de los residuos ionizables usando el servidor Rosetta (Kilambi & Gray, 2012), mostrados en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Valores del pK_a aparente de los residuos ionizables calculados con Rosetta.

Residuo	v-Src-SH3 Q128R	v-Src-SH3 N117D-V124L	v-Src-SH3 W95R-I96T	6XVN A/B	6XVO A/B
Tyr90	9,8	9,8	9,8	9,5/9,8	9,8/9,8
Asp91	3,0	3,3	3,1	3,1/3,1	3,2/3,2
Tyr92	10,5	10,2	10,8	10,5/11,1	10,5/10,4
Glu93	4,0	4,5	4,6	3,9/4,1	4,5/4,5
Glu97	4,5	4,4	4,5	4,4/4,3	4,4/4,4
Asp99	1,3	2,8	3,1	2,7/2,7	3,1/2,9
Lys103	11,7	10,5	10,6	10,7/10,7	11,6/11,8
Lys104	10,6	10,6	10,7	10,6/10,6	10,6/10,6
Glu106	4,0	4,3	3,3	4,3/4,3	3,7/4,1
Glu115	4,5	4,4	4,0	4,6/NM	4,5/4,5
Asp117	NP	3,7	NP	3,9/3,7	4,1/4,1
His122	6,7	4,4	6,7	5,4/6,4	6,6/6,4
Tyr131	9,8	9,8	10,4	9,8/9,6	9,7/9,7
Tyr136	9,6	9,8	9,8	9,4/9,9	9,7/9,7

NM-no modelado; NP-no presente.

En todas las estructuras de los mutantes v-Src-SH3, el Asp99 presenta un valor de pK_a considerablemente más bajo que su pK_a intrínseco (4,0), y además se trata del residuo con los cambios más importantes en todas las estructuras analizadas. Este residuo juega un papel fundamental en la unión de los MRPs mediante la formación de un puente salino con el residuo cargado positivamente que flanquea la secuencia canónica PxxP (Bacarizo & Camara-Artigas, 2013). El lazo RT debe tener cierta flexibilidad para que le sea posible llevar a cabo su función reconociendo MRPs, por lo que las interacciones entre los residuos en este lazo determinarán su conformación final. De esta manera, en la forma libre del dominio SH3 el Asp99 puede establecer hasta cinco puentes de hidrógeno a través de su cadena lateral carboxilada, lo que indica junto con el bajo valor de ASA de su cadena lateral ($<10 \text{ \AA}^2$) que el residuo está totalmente enterrado (Figura 3.8). Una posible explicación del bajo valor del pK_a calculado para el aminoácido Asp99 puede hallarse en que el residuo encaja mejor en su forma desprotonada en una conformación del lazo RT que da lugar a una estabilización del mismo (Kilambi & Gray, 2012). Una vez unido el MRP, la red de interacciones de puentes de hidrógeno alrededor del residuo Asp99 se modifica para facilitar el puente salino entre este aminoácido y el residuo positivo que flanquea el MRP (Bacarizo *et al.*, 2015). Curiosamente, aunque Asp99 forme un puente salino en la estructura del complejo c-Src-SH3 con MRP, este residuo no participa en las interacciones entre dominios de la forma inactiva/cerrada de la quinasa tal como se puede comprobar en las estructuras de la quinasa completa (PDB quinasa cerrada: 2SRC y PDB quinasa abierta: 1Y57) (Williams *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997).

3.2.1.2 Estabilidad de los mutantes v-Src en presencia de cloruro de guanidinio

La desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio (GdnHCl) en los mutantes del dominio v-Src-SH3 fue medida mediante el descenso de la fluorescencia intrínseca de la proteína a 25 °C. Las curvas de desplegamiento (Figura 3.3) fueron analizadas mediante un modelo de dos estados según la ecuación 2.2. En la tabla 3.4 se recopilan los parámetros termodinámicos obtenidos para cada mutante.

Tabla 3.4. Parámetros termodinámicos obtenidos de la desnaturalización química con GdnHCl.

Proteína	$m_{1/2}$ (M)	ΔG_w (kJ/mol)
v-Src-SH3-Q128R	1,74±0,02	9,78±1,04
v-Src-SH3-N117D-V124L	2,18±0,02	11,68±1,40
v-Src-SH3-W95R-I96T	2,27±0,02	11,43±2,26
c-Src-SH3-WT ¹	2,76±0,03	17,11±2,00

¹Datos de Plaza-Garrido *et al.* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

El punto medio de transición y la energía libre de desplegamiento son muy similares en los mutantes N117D-V124L y W95R-I96T, pero ambos valores son más bajos que los obtenidos para el dominio c-Src-SH3 (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). El dominio que contiene todas las mutaciones oncogénicas, v-Src-SH3-Q128R, es el que muestra una menor estabilidad comparada con los dominios anteriores.

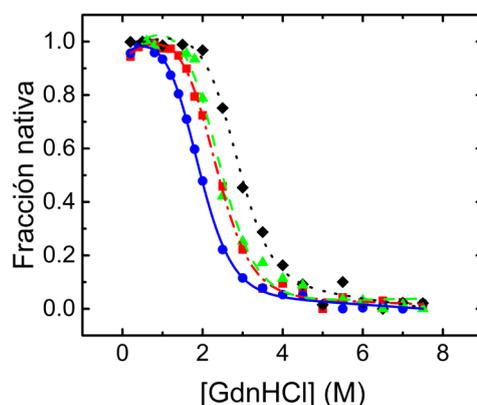


Figura 3.3. Fracción nativa de los mutantes del dominio v-Src-SH3 frente a la concentración de GdnHCl a pH 7,0 y 25 °C: v-Src-SH3-Q128R (azul, -●-), v-Src-SH3-N117D-V124L (rojo, -■-), v-Src-SH3-W95R-I96T (verde, ---▲---). Para la comparación, también se ha incluido la curva de desnaturalización del dominio c-Src-SH3 (negro, ...◆...).

3.2.1.3 Estabilidad térmica de los mutantes v-Src-SH3

La estabilidad térmica de los mutantes del dominio v-Src-SH3 se determinó mediante el cambio de elipticidad a 230 nm a pH 7,0. Las curvas de desplegamiento (Figura 3.4) fueron analizadas mediante un modelo de dos estados según la ecuación 2.8. En la tabla 3.5 se recopilan los parámetros termodinámicos obtenidos, T_m y ΔH , para cada mutante. La desnaturalización térmica del dominio v-Src-SH3-W95R-I96T fue reversible, mientras que la de los mutantes v-Src-SH3-N117D-V124L y v-Src-SH3-Q128R fue irreversible.

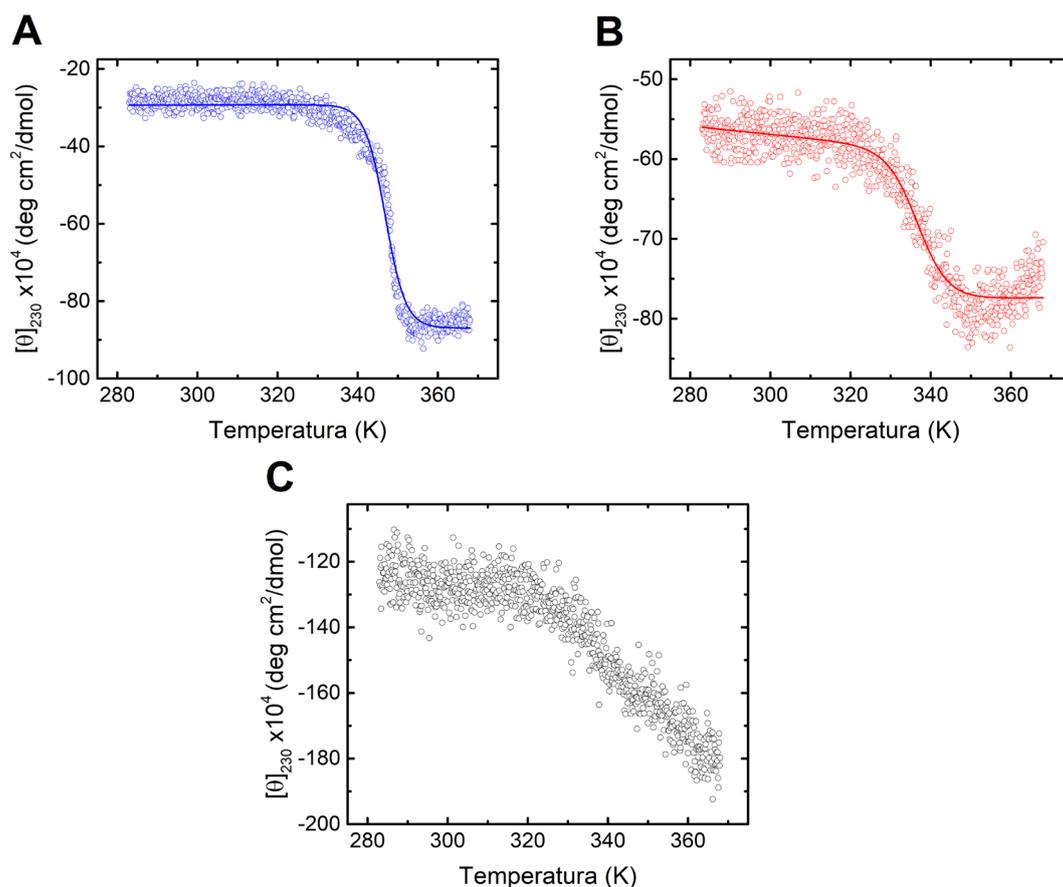


Figura 3.4. Elipticidad molar a 230 nm de los mutantes v-Src-SH3 frente a la temperatura a pH 7,0: (A) v-Src-SH3-Q128R, (B) v-Src-SH3-N117D-V124L, (C) v-Src-SH3-W95R-I96T.

Tabla 3.5. Parámetros termodinámicos obtenidos de la desnaturalización térmica de los mutantes v-Src-SH3 obtenidos a pH 7,0.

Proteína	T_m (K)	ΔH_m (kJ/mol)
v-Src-SH3-Q128R	348,0±0,2	345±8
v-Src-SH3-N117D-V124L	336,8±0,3	248±15
v-Src-SH3-W95R-I96T ²	-	-
c-Src-SH3-WT ¹	348,6±0,5	321±32

¹Datos de Plaza-Garrido *et al.* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). ² Los datos no han podido ser ajustados por la falta de línea base en el estado desplegado.

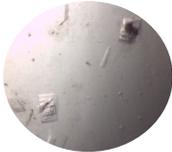
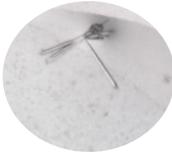
Los resultados muestran que el mutante v-Src-Q128R poseen una T_m similar a la obtenida para la variante nativa (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). Sin embargo, el mutante v-Src-SH3-N117D-V124L muestra una T_m menor que la observada en el mutante v-Src-Q128R y el dominio c-Src-SH3. Además, su curva muestra una línea base inclinada, debida probablemente a la aparición de una conformación alternativa, que probablemente corresponda a la formación de agregados fibrilares (Lee *et al.*, 2003). No ha sido posible determinar los parámetros de desnaturalización térmica para el mutante v-Src-W95R-I96T debido a la falta de línea base en la zona desplegada. Estos resultados sugieren que

las mutaciones en el lazo RT parecen desestabilizar el dominio, mientras que las mutaciones introducidas en los lazos n-Src y distal producen cierta estabilización. En el mutante v-Src-Q128R se observa un efecto compensatorio.

3.2.2 Cristalización y determinación estructural de los mutantes del dominio v-Src-SH3

Debido a la baja estabilidad de la proteína y su gran tendencia a agregar, los cribados de cristalización se realizaron siempre con proteína recién purificada para preservar la homogeneidad de las muestras. Los mutantes del dominio v-Src-SH3 se cristalizaron usando la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Se obtuvieron gotas de 6 μ l mezclando 3 μ l de proteína (5-10 mg / ml en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) con 3 μ l de la disolución del reservorio y se equilibraron frente a 200 μ l de esta última. Debido a la baja estabilidad de las proteínas, el cribado se realizó a diferentes temperaturas: 4, 10, 15 y 25 °C. Para mejorar la calidad de los cristales obtenidos se utilizaron técnicas de micro-siembra, en particular para las proteínas que contienen las mutaciones oncogénicas en el lazo RT. Las condiciones de cristalización de los mutantes del dominio v-Src-SH3 se describen en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Condiciones de cristalización de los mutantes del dominio v-Src-SH3

Proteína	v-Src-SH3-Q128R	v-Src-SH3-Q128R-VSL12	v-Src-SH3-W95R-I96T	v-Src-SH3-N117D-V124L
Grupo espacial	<i>P2₁</i>	<i>P3₂</i>	<i>P6₅</i>	<i>P3₂21</i>
Método	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor
Tipo de bandeja	Gota sentada	Gota sentada	Gota sentada	Gota sentada
Temperatura (°C)	10	10	25	15
Concentración de proteína (mg/mL)	5	10	10	10
Composición del tampón de la proteína	Tris 10 mM pH 8.0	Tris 10 mM pH 8.0	Tris 10 mM pH 8.0	Tris 10 mM pH 8.0
Composición de la disolución del reservorio	Sulfato amónico 2,1 M, PEG 200 5%, glicerol 10%, cloruro de litio 40 mM y ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 5,5	Sulfato amónico 2,4 M, PEG 300 5%, glicerol 10%, cloruro de litio 40 mM y MES 0,1 M pH 6,0	Sulfato amónico 2,0 M, PEG 300 5%, glicerol 10%, cloruro de litio 40 mM y MES 0,1 M pH 6,5	2,8 M sulfato amónico, Hepes 0,1 M pH 7,0
Volumen y ratio de la gota (µL)	6, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	6, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	6, ratio 2:1 proteína a disolución de reservorio	6, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio
Volumen del reservorio (µL)	200	200	200	200
Observaciones	1 µL de semillas fue añadido a la gota de cristalización	Proteína en complejo con VSL12 en proporción 1:2		1 µL de 0,5 M glicina fue añadido a la gota de cristalización
Imagen				

3.2.2.1 Cristalización y determinación estructural de los mutantes del dominio v-Src-SH3

Las estructuras obtenidas de estos dominios son:

- *Estructura del dímero entrecruzado del mutante v-Src-SH3-W95R-I96T*. Fue cristalizado en presencia de sulfato amónico 2,0 M y 5% de PEG 300 a pH 6,5, en tampón Mes 0,1 M. Para mejorar la nucleación de los cristales se añadió 10 % de glicerol y cloruro de litio 40 mM. El grupo espacial resultante fue *P6₅* con

parámetros de celdilla unidad $a=b= 46,7 \text{ \AA}$, $c=128,0 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta= 90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$ (PDB:7NET).

- *Estructura del monómero del mutante v-Src-SH3-N117D-V124L*. Fue cristalizado en presencia de sulfato amónico 2,8 M a pH 7,0 en tampón Hepes 0,1 M, en el grupo espacial $P3_221$ con parámetros de celdilla unidad $a=b= 37,2 \text{ \AA}$, $c=65,8 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta= 90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$ y una molécula en la unidad asimétrica (PDB:7NES).
- *Estructura del monómero del mutante v-Src-SH3-Q128*. Fue cristalizado en presencia de sulfato amónico 2,1 M y 5 % de PEG 200 a pH 5,5, en tampón ácido acético/acetato sódico 0,1 M. Para mejorar la nucleación se añadió 10 % de glicerol y cloruro de litio 40 mM. El grupo espacial fue $P2_1$ con parámetros de celdilla unidad $a=22,3 \text{ \AA}$, $b= 35,0 \text{ \AA}$, $c=31,1 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=96^\circ$, $\gamma= 90^\circ$, y una molécula en la unidad asimétrica (PDB:7NER).

La tabla 1 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de la recogida de datos de difracción de los cristales y la estadística de los modelos finales de estas estructuras.

La estructura del mutante v-Src-SH3-W95R-I96T se obtuvo a partir de cristales que se podían indexar en el grupo espacial $P6_522$ con dimensiones de la celda unidad similares a las obtenidas en el dímero entrecruzado de la variante nativa del dominio (Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2009). Sin embargo, el modelo final resultaba en valores residuales más altos que los obtenidos para el modelo obtenido a partir de los datos indexados en el grupo espacial $P6_5$. Para el reemplazamiento molecular se usaron las coordenadas del protómero del dominio c-Src-SH3 (PDB 6XVO), que dio como solución la ubicación de dos cadenas del protómero abierto en la unidad asimétrica. La comparación de este dímero con el descrito previamente no mostró diferencias significativas, demostrando que las mutaciones, Asp117Asn y Leu124Val, no producen cambios significativos en la cadena principal de la proteína (Figura 3.5). Al igual que en la estructura de la variante nativa, se modeló una molécula de PEG de bajo peso molecular en la interfaz del dímero. Esta molécula establece un conjunto de interacciones en la interfaz del dímero que estabilizan la forma entrecruzada del dominio (Cámara-Artigas *et al.*, 2009). Entre las interacciones más relevantes se encuentran un puente salino formado entre las cadenas de los residuos Arg95 y Glu115 y un conjunto de enlaces de hidrógeno donde la Thr96 participa en interacciones dentro de la propia cadena polipeptídica y entre las cadenas presentes en el dímero.

La comparación de la estructura del dímero v-Src-SH3-W95R-I96T con la estructura monomérica del c-Src-SH3 muestra un escenario diferente. En el lazo distal, la Leu124 se encuentra entre los residuos Ser123 y Thr125-Thr126. Estos residuos forman una red de puentes de hidrógeno con sus cadenas laterales y la del Glu106 que se encuentra en el giro β -divergente que juega un papel crítico en el plegamiento del dominio c-Src-SH3 (Grantcharova *et al.*, 1998). Las estructuras de la forma monomérica del dominio c-Src-SH3 pertenecen al grupo espacial monoclinico $P2_1$ con dos (PDB 6XVN) o cuatro moléculas (entrada PDB 6XVM) en la unidad asimétrica (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). Estas cadenas muestran el plegamiento característico de los SH3 con diferentes conformaciones en el lazo distal, donde la principal diferencia es la red de enlaces de hidrógeno que involucra los residuos Glu106, Ser123 y los residuos vecinos Thr125 y Thr126 (Bacarizo *et al.*, 2014). En estas conformaciones, la cadena lateral de la Leu124 adopta diferentes disposiciones, facilitando el reordenamiento de los puentes de hidrógeno. En esta posición se produce el cambio de leucina por valina, que tiene una cadena lateral más corta, por lo que no presenta la posibilidad de adoptar las conformaciones que adopta la leucina como facilitadora de los diferentes ordenamientos de puentes salinos presentes en las conformaciones alternativas del lazo distal (Figura 3.5 C).

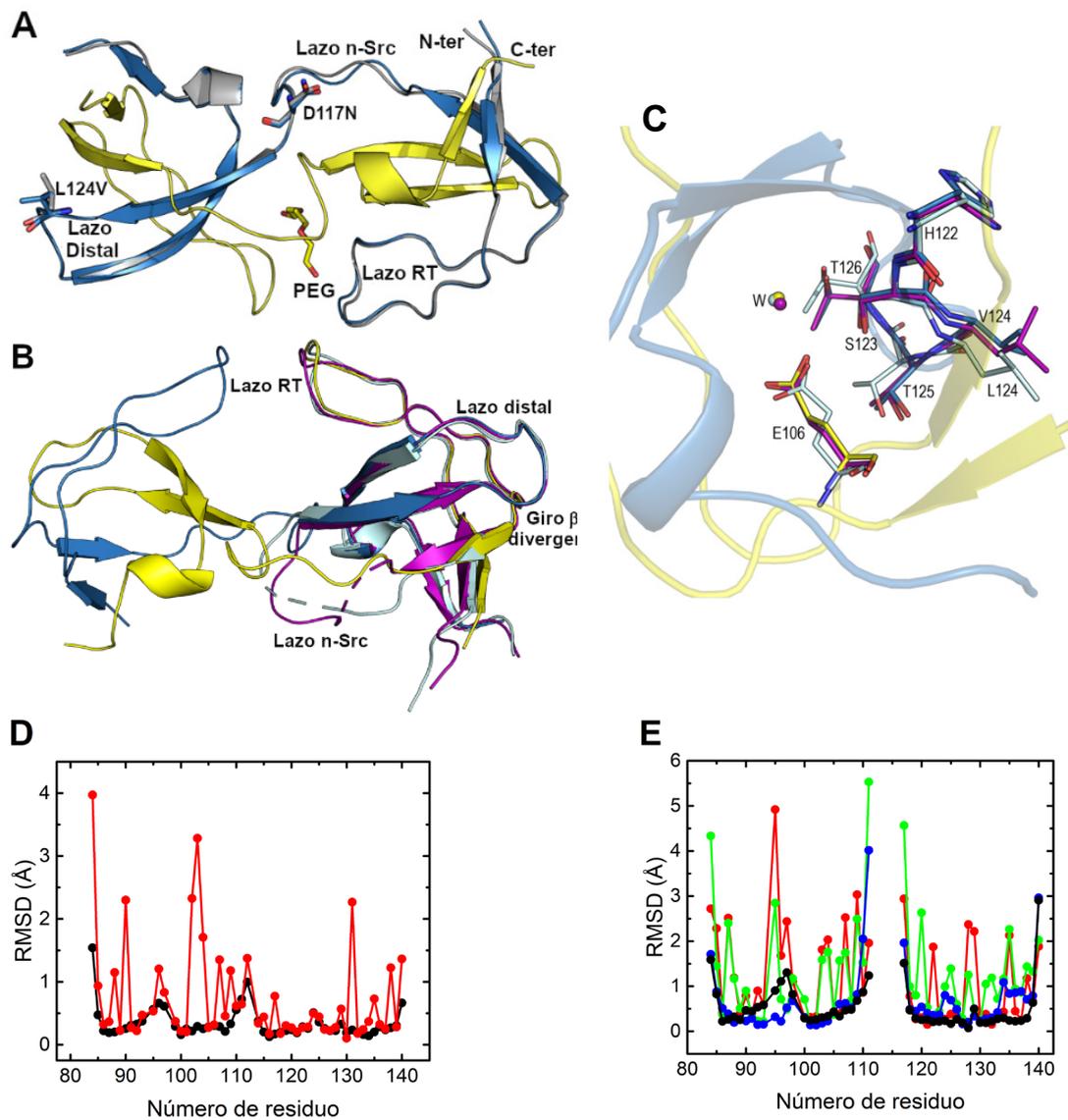


Figure 3.5. (A) Dímero entrecruzado del mutante v-Src-SH3-W95R-I96T (PDB: 7NET), (la cadena A se representa en azul y la cadena B en amarillo) superpuesta en el protómero abierto de la c-Src SH3 (la cadena A se muestra en gris; PDB 6XVO). El valor RMSD medio de la cadena principal es 0,28 Å. Los residuos mutados en los lazos n-Src y distal se muestran con bastones (cadena A). (B) Superposición del dímero entrecruzado del mutante v-Src-SH3-W95R-I96T (cadena A, azul; cadena B, amarillo) y el monómero c-Src SH3 (cadena A púrpura y cadena B cian; PDB 6XVO). (C) Los residuos en el lazo distal se muestran con bastones. RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro/azul) y laterales (rojo/verde) de (D) de los protómeros abiertos del dominio nativo (PDB: 6XVO) y v-Src-SH3-W95R-I96T (NET) y (E) las cadenas A (negro y rojo) y B (azul y verde) de la forma monomérica del dominio c-Src-SH3 (PDB: 6XVN) con el dímero entrecruzado v-Src-SH3-W95R-I96T.

Los cristales de la v-Src-SH3 con las mutaciones oncogénicas en el lazo RT, v-Src-SH3-N117D-V124L y Q128R, han sido más difíciles de cristalizar porque estas proteínas son muy propensas a formar agregados de alto peso molecular. En el análisis del radio hidrodinámico mediante DLS, el dominio v-Src-SH3-W95R-I96T muestra una sola población (99,9%) con el radio hidrodinámico característico del monómero ($R_h = 1,8$ nm) y forma dímeros en presencia de PEG 300 ($R_h = 2,4$ nm) (Figura 3.6 A). Sin embargo, las proteínas que portan las mutaciones en el lazo RT muestran un proceso de agregación

dependiente de la temperatura, dando un solo pico con un $R_h = 1.8$ nm cuando se mantiene a temperaturas inferiores a 15 °C. Al exponerse durante un día a 20 y 25 °C, las medidas de DLS muestran una disminución del pico correspondiente al monómero y el aumento de los picos de los agregados (Figura 3.6 B). Los ensayos con ThT y RC mostraron que ambas proteínas forman amiloides en unos pocos días a 25 °C a pH neutro y ligeramente ácido. Por este motivo, todos los ensayos de cristalización se realizaron entre 4 y 15 °C.

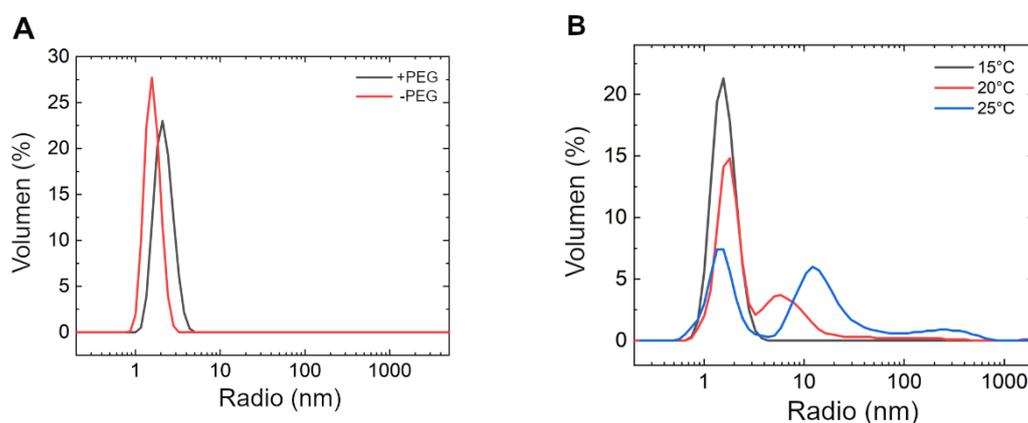


Figure 3.6. Medidas de DLS de los mutantes v-Src-SH3. (A) v-Src-SH3-W95R-I96T a 5 mg/ml en tampón acético/ acetato sódico 50 mM, pH 5,0 en ausencia (línea roja) y presencia (línea negra) de PEG 300 al 5% a 25 °C. En ausencia de PEG, la proteína es un monómero con un $R_h = 1,8 \pm 0,3$ nm. Después de añadir un 5% de PEG 300, el radio hidrodinámico aumenta hasta un valor de $R_h = 2,4 \pm 0,5$ nm. (B) Agregación dependiente de la temperatura del mutante v-Src-SH3-N117D-V124L. Después de la incubación durante 24 horas a tres temperaturas diferentes, se midió la proteína a 5 mg/ml en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM, pH 7,0. A baja temperatura (≤ 15 °C) el 99,9% de la proteína es un monómero con un $R_h = 1,8 \pm 0,4$ nm. A temperaturas más altas, la proteína agrega formando oligómeros de alto peso molecular, y después de un día de incubación a 20 °C y 25 °C, la población de monómeros disminuye (66%) y (39%), respectivamente. Estos oligómeros dieron positivo en agregados amiloides utilizando los ensayos ThT y RC.

Los cristales de v-Src-SH3-N117D-V124L pertenecen al grupo espacial trigonal $P3_221$, con una sola molécula del dominio en la unidad asimétrica, donde el plegamiento total corresponde a la forma del monómero cerrado del dominio SH3. La superposición de la cadena v-Src-SH3-N117D-V124L en ambas cadenas presentes en la forma monomérica de la c-Src-SH3 (PDB 6XVN) muestra un valor RMSD de la cadena principal de 0,84 y 1,01 Å para la cadena A y B, respectivamente. En este mutante, la conformación del lazo n-Src es similar a la que se encuentra en la cadena A del dominio c-Src SH3. Mientras que, la conformación del lazo distal es diferente de la presente en ambas cadenas de la c-Src-SH3 (Figura 3.7). Como era de esperar, las diferencias más significativas se encuentran en el lazo RT, donde se localizan las mutaciones oncogénicas Arg95Trp y Thr96Ile. En la variante nativa, el puente de hidrógeno que se produce en el giro β tipo I tiene lugar entre los aminoácidos Thr96-Asp99 a través de sus átomos de las

cadena lateral y principal, respectivamente. Sin embargo, en el dominio v-Src-SH3, la sustitución de treonina por isoleucina impide la formación de enlaces de hidrógeno por su cadena lateral y, en este caso, el giro β tipo I muestra un enlace de hidrógeno entre los átomos de la cadena principal de los residuos Ile96(O) y Asp99(N) (Figura 3.8).

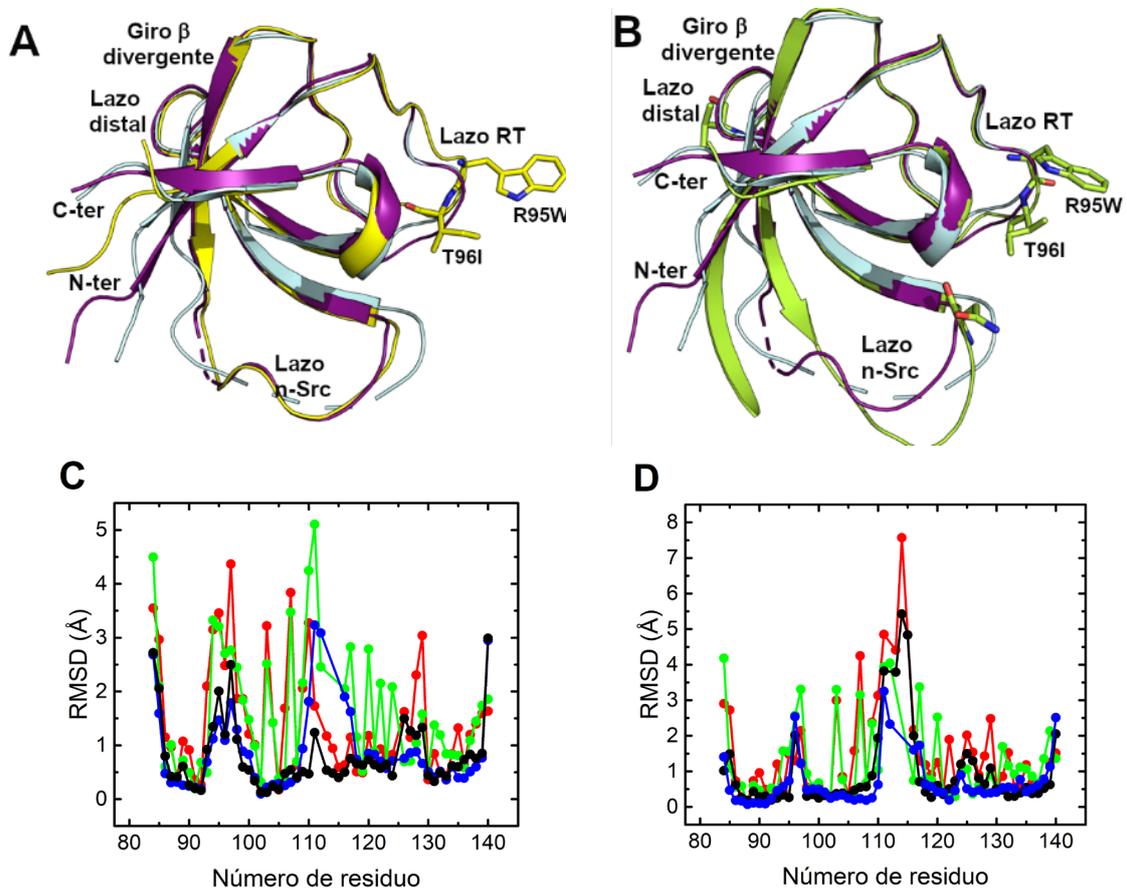


Figura 3.7. Representación gráfica de la superposición del dominio c-Src SH3 (PDB 6XVN: la cadena A se muestra en púrpura y la cadena B en cian) (A) al mutante v-Src-SH3-N117D-V124L (PDB 7NES) y (B) al mutante v-Src-SH3-Q128R (PDB 7NER). En ambas cadenas del dominio c-Src-SH3, el lazo n-Src se ha modelado parcialmente y los residuos no modelados se representan con una línea discontinua. RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro/azul) y laterales (rojo/verde) de (C) v-Src-SH3-N117D-V124L (PDB 7NES) y (D) v-Src-Q128R con las cadenas A (negro y rojo) y B (azul y verde) del dominio c-Src-SH3 (PDB: 6XVN).

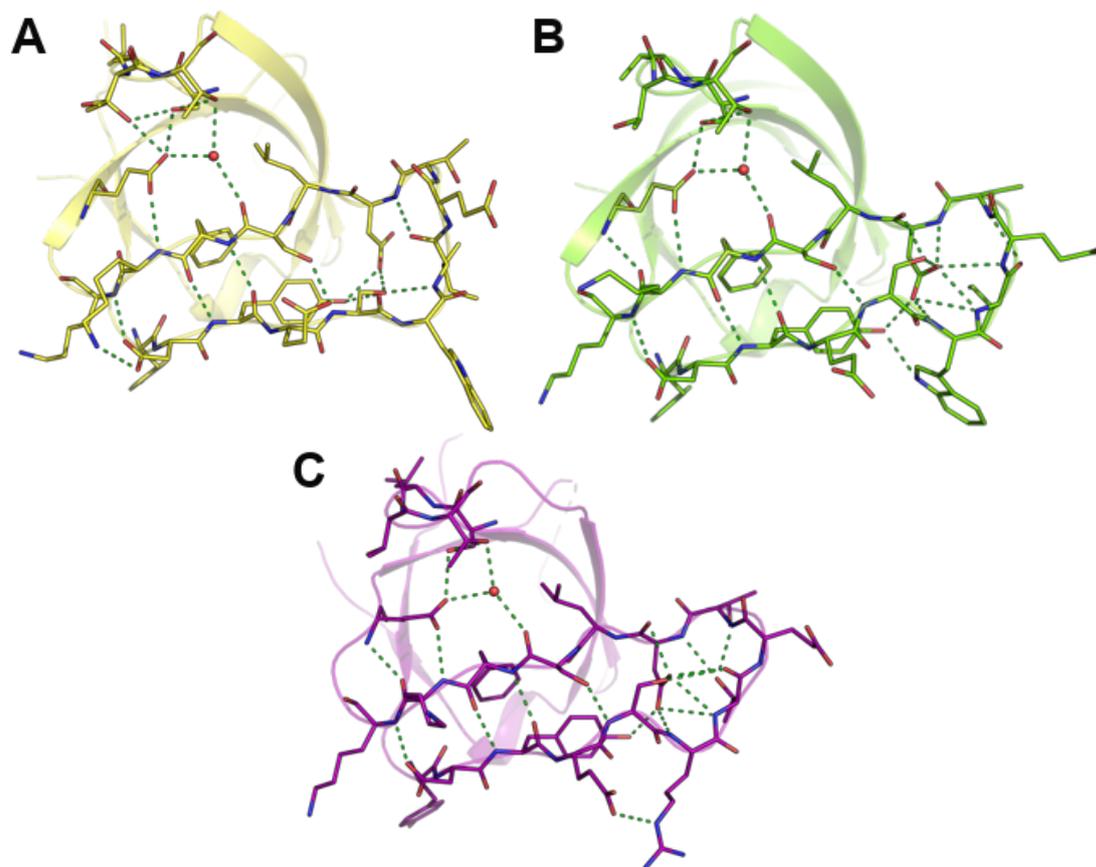


Figura 3.8. Enlaces de hidrógeno en el lazo RT de los mutantes (A) v-Src-SH3-N117D-V124L y (B) v-Src-SH3-Q128R y (C) del dominio c-Src-SH3 (cadena A).

Aunque intentamos purificar la proteína que portaba todas las mutaciones oncogénicas, v-Src-SH3, esta proteína era muy propensa a formar agregados, lo que dificultaba su purificación y cristalización. Para analizar el efecto de las mutaciones oncogénicas en la estructura general de este dominio, introdujimos la mutación Gln128Arg en el lazo distal. Estudios previos llevados a cabo por Bacarizo y colaboradores demostraron un aumento en la estabilidad del dominio c-Src SH3 tras introducir una arginina en la posición 128 (Bacarizo *et al.*, 2014). El mutante v-Src-SH3-Q128R era lo suficientemente estable como para permitir estudios biofísicos y poder cristalizar la proteína. Incluso con esta mutación estabilizadora, la proteína seguía siendo muy propensa a agregar, formando agregados de tipo amiloide. Todos los ensayos de cristalización se realizaron a 4 y 10 °C utilizando proteína recién purificada. Los cristales obtenidos inicialmente no tenían la calidad adecuada para ser medidos, y se utilizaron como microsemillas. La calidad de los cristales que crecieron a partir de ellas mejoró significativamente (Bergfors, 2003). Estos cristales pertenecen al grupo espacial monoclinico $P2_1$ con una sola molécula del dominio SH3 en su forma monomérica en la

unidad asimétrica. La comparación de la cadena principal de ésta con las cadenas principales de la estructura monomérica de la c-Src-SH3 (PDB 6XVN) muestra un valor de RMSD medio de 0,68 y 1,11 Å para la cadena A y B, respectivamente. Las diferencias más significativas se encuentran en las conformaciones de los lazos RT, n-Src y distal. El giro β tipo I ubicado en el lazo RT también es diferente del que se encuentra en el dominio v-Src-SH3-N117D-V124L. En este caso, los residuos Ile96 y Asp99 forman un giro β tipo IV con un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral Ile96 (N) y Asp99 (OD1 y OD2) (Figura 3.8). Hay que destacar que en esta estructura los residuos Trp95 y Glu97 están en las regiones desfavorables, pero permitidas, del gráfico de Ramachandran.

Además de las mutaciones del lazo RT, el dominio v-Src-SH3-Q128R también presenta las mutaciones oncogénicas en el lazo n-Src y distal, Asn117 y Val124, respectivamente. La conformación de su lazo n-Src es diferente de las que se encuentran en la c-Src-SH3 y la v-Src-SH3-N117D-V124L. En el dominio c-Src-SH3 el lazo n-Src suele ser muy flexible, lo que en ocasiones dificulta su modelado. En este caso todos los residuos de este lazo han sido modelados, los responsables de esta flexibilidad reducida son varios enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales y principales de los residuos Asn117 (OD1, O) con la Ser134 (OG, N) en la hélice 3_{10} , y un enlace de hidrógeno que se establece entre los aminoácidos Asn112 (O) y Gly81 (N) lo que reduce la flexibilidad. En el dominio c-Src SH3, la región amino-terminal suele estar desordenada, pero en el dominio v-SH3-Q128R los residuos Gly81-Leu89 forman una cadena $\beta 1$ extendida. La comparación de las variantes v-Src-SH3-Q128R y N117D-V124L también muestra diferencias en la red de enlaces de hidrógeno alrededor del Glu106. En el mutante Gln128Arg, la Thr125 muestra una única conformación y no forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral del Glu106 (Figura 3.8).

Finalmente, el análisis de la interfaz cristalina de las estructuras monoméricas y dimerica de las variantes v-Src-SH3 utilizando el servidor PISA no muestra correlación cristalográfica entre estas estructuras cristalinas. La estructura del dímero entrecruzado cristaliza en el mismo grupo espacial que otros dímeros entrecruzados del dominio c-Src SH3 descritos anteriormente, y las interfaces cristalográficas son prácticamente las mismas (Cámara-Artigas *et al.*, 2009). Sin embargo, las estructuras monoméricas de los mutantes v-Src-SH3 pertenecen a cristales que son diferentes de las estructuras previas del dominio c-Src SH3. Además, ambos cristales muestran un contenido de solvente inusualmente bajo (v-Src-SH3-Q128R y v-Src-SH3-N117D-V124L tienen

respectivamente un 29 y 35%). v-*Src*-SH3-Q128R muestra hasta seis interfaces cristalográficas, mientras que v-*Src*-SH3-N117D-V124L muestra solo tres. Además del bajo contenido de disolvente, en v-*Src*-SH3-Q128R, una molécula de PEG y un ion sulfato facilitan el empaquetamiento entre las moléculas de proteína en el cristal. En ambas formas cristalinas, los residuos Trp95 e Ile96 participan en las interfaces cristalográficas, pero el empaquetamiento alrededor de estos residuos es diferente en cada estructura, lo que da como resultado diferentes rotámeros de sus cadenas laterales y el desplazamiento de los átomos de la cadena principal (siendo el RMSD de los átomos de la cadena principal aproximadamente 2 Å). En el lazo n-*Src*, algunos residuos también participan en las interfaces cristalográficas, y el empaquetamiento compacto en el cristal reduce la flexibilidad de este lazo que ha sido completamente modelado, como ya hemos mencionado. La conformación de este lazo es diferente en cada estructura monomérica, lo que también está relacionado con los contactos entre los elementos de la estructura secundaria en la variante v-*Src*-SH3-Q128R, como se explicó anteriormente.

3.2.2.2 *Cristalización y determinación estructural de los dominios v-*Src* en complejo con péptidos de alta afinidad.*

Con el objetivo de demostrar que las mutaciones de la forma vírica no afectan al reconocimiento de motivos ricos en prolina en el dominio SH3, se han intentado cristalizar estos en presencia de péptidos de alta afinidad. La estructura obtenida es:

- *Estructura del monómero del mutante v-*Src*-SH3-Q128 en complejo con VSL12 (VSLARRPLPLP).* Fue cristalizado en presencia de sulfato amónico 2,4 M y 5 % de PEG 300 a pH 6,0, en tampón Mes 0,1 M. Para mejorar la nucleación se añadió 10 % de glicerol y cloruro de litio 40 mM. El grupo espacial fue $P3_2$ con parámetros de celdilla unidad $a=b= 51,2 \text{ \AA}$, $c=46,3 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$, con dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB:7PVT). La tabla 1 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de esta estructura.

Se han comparado las cadenas principal y lateral de las cadenas A y C presentes en la unidad asimétrica de la v-*Src*-Q128R-VSL12 (Figura 3.9), obteniendo un RMSD para la cadena principal de 0,22 Å. Aunque no existen grandes diferencias en la disposición de sus cadenas principales, no ha sido posible modelar el lazo n-*Src* en la cadena A, mientras que, en la cadena C, se ha modelado completamente. Este lazo es muy flexible, tal y como indican sus valores de factor B (Figura 3.9 C).

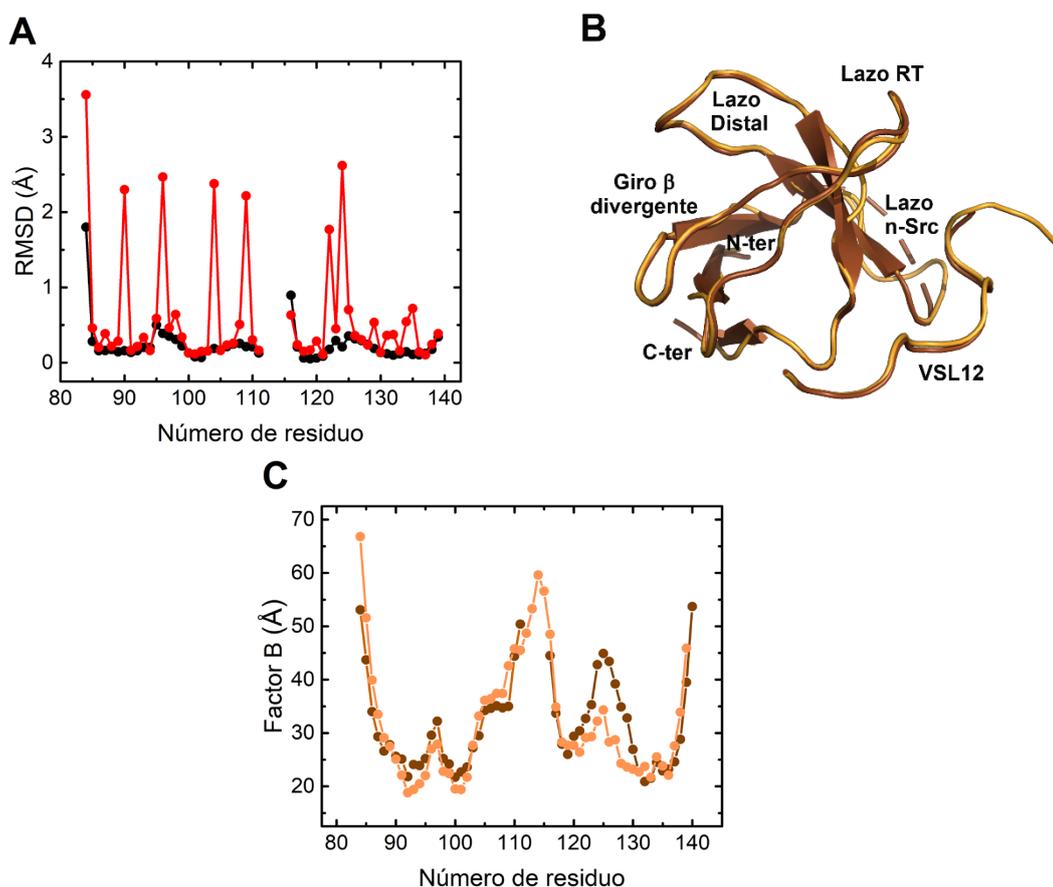


Figura 3.9. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena A y C presentes en la unidad asimétrica del monómero de la v-Src-Q128R en complejo con el péptido VSL12 (PDB:7PVT). (B) Superposición de las cadenas A (marrón) y C (naranja claro) presentes en la unidad asimétrica de la v-Src-Q128R en complejo con VSL12. (C) Factores B de los residuos de la cadena principal de las cadenas A (marrón) y C (naranja claro) del dominio v-Src-Q128 en complejo con VSL12 (PDB:7PVT). En la cadena A el lazo n-Src se ha modelado parcialmente y los residuos no modelados se representan con una línea discontinua.

También se han comparado las estructuras del dominio v-Src-Q128R libre, donde solo aparece una cadena en la unidad asimétrica, con las dos cadenas presentes en complejo con VSL12 (Figura 3.10). Los RMSD obtenidos para las cadenas principales A y C son 0,85 y 1,02 Å, respectivamente. Las mayores diferencias se encuentran en los lazos RT y n-Src. El lazo n-Src suele presentar una alta flexibilidad, por lo que es común encontrar diferentes disposiciones de este entre estructuras. Además, estos lazos juegan un papel fundamental en el reconocimiento del ligando, por lo que no es inusual encontrarlos en una conformación distinta respecto del dominio libre.

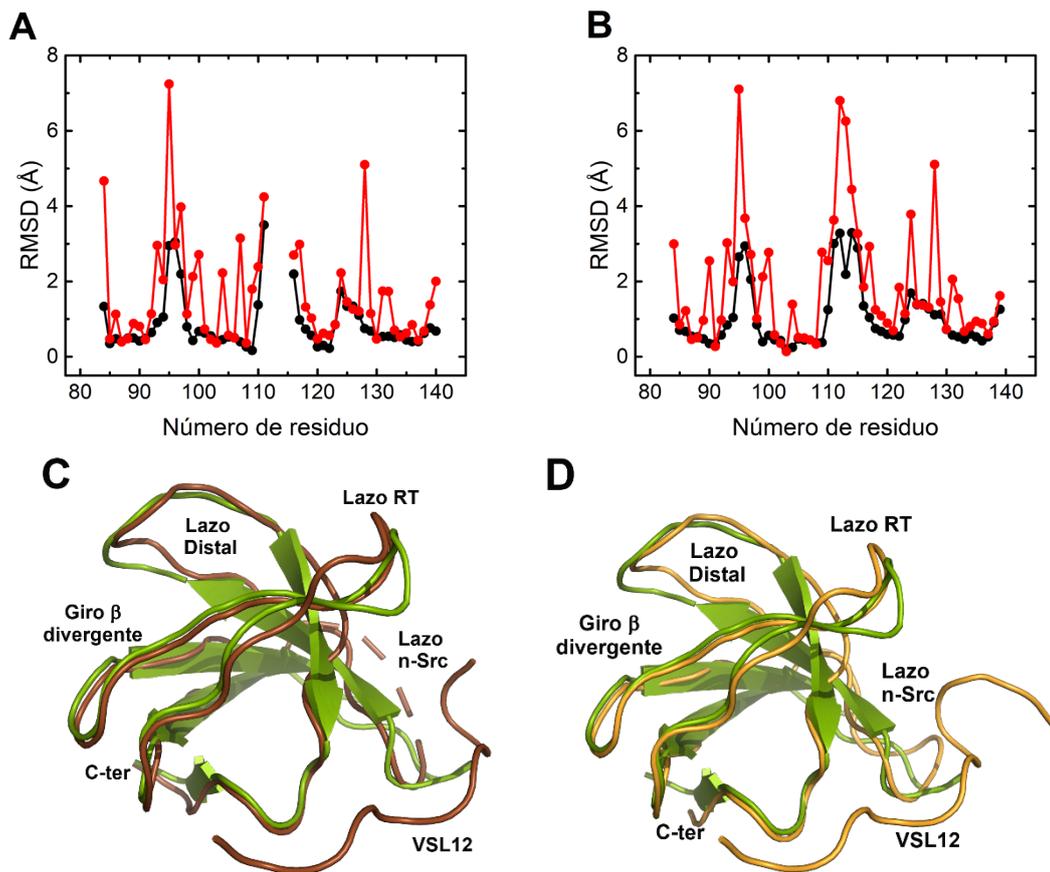


Figura 3.10. RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena (A) A y (B) C presentes en la unidad asimétrica del complejo v-Src-Q128R-VSL12 (PDB:7PVT) con la cadena A del dominio libre (PDB:7NER). Superposición de las cadenas (C) A (marrón) y (D) C (naranja claro) presentes en la unidad asimétrica de la v-Src-Q128R en complejo con VSL12 con la cadena A del dominio libre (verde lima) (PDB:7NER).

Así mismo, se han comparado las cadenas A y C del complejo v-Src-Q128R-VLS12 con la cadena del dominio nativo presente en el complejo c-Src-SH3 con VSL12 (Figura 3.11). El valor medio de RMSD obtenido al comparar la cadena de la c-Src-SH3 con las cadenas principales A y C es 0,82 y 0,85 Å, respectivamente.

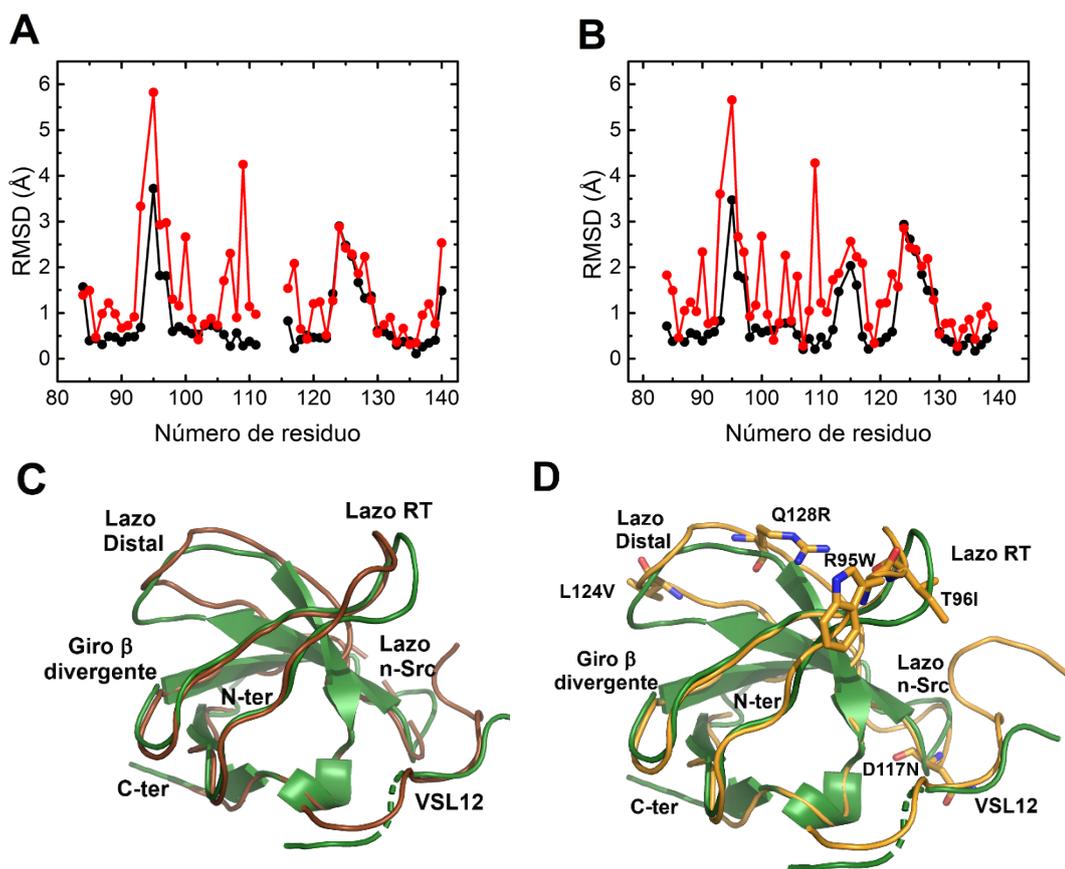


Figura 3.11. RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena (A) y (B) C presentes en la unidad asimétrica del complejo v-Src-Q128R-VSL12 (PDB:7PVT) con la cadena A de la c-Src-WT en complejo con VSL12 (PDB:4RTZ), respectivamente. Superposición de las cadenas (C) A (marrón), y (D) C (naranja claro), donde las mutaciones del dominio han sido representadas en bastones, presentes en la unidad asimétrica de la v-Src-Q128R en complejo con VSL12 con la cadena A de la c-Src-VSL12 (verde oscuro) (PDB:4RTZ). Nótese que de los residuos mutados presentes en el dominio v-Src-Q128R el único que se encuentra en la interfaz del complejo es el residuo 117.

La mayor parte de las interacciones que se producen entre el dominio v-Src-Q128R con el péptido VSL12 han sido descritas para c-Src-T98E-SH3-VSL12 (Bacarizo & Cámara-Artigas, 2013). En el sitio de unión, los residuos Leu11-Pro12 y Leu8-Pro9 interactúan con el primer (Tyr90-Tyr136) y segundo bolsillo hidrofóbico (Tyr92-Tyr136-Trp118), respectivamente. En el tercer bolsillo hidrofóbico, al igual que ocurre en el dominio nativo, se observa un puente salino entre los residuos Arg6-Asp99, que es el que determina la orientación del péptido, en este caso, de clase I. Además, se pueden observar otras interacciones como la interacción catión π entre los residuos Arg6 y Trp118 y numerosos puentes de hidrógeno entre los residuos Ala4(O) y Asn117(H), Pro7(O) y Trp118 (NE1), Pro9(O) y Asn135 (ND2), y Pro10 (O) y Tyr136 (OH), previamente descritos (Bacarizo & Cámara-Artigas, 2013). Sin embargo, también aparecen otras interacciones no descritas en estructuras previas como la que se produce entre los residuos Asn117 (ND2) y Arg6 (O), y Pro12 (N) y Tyr136 (OH) (Figura 3.12).

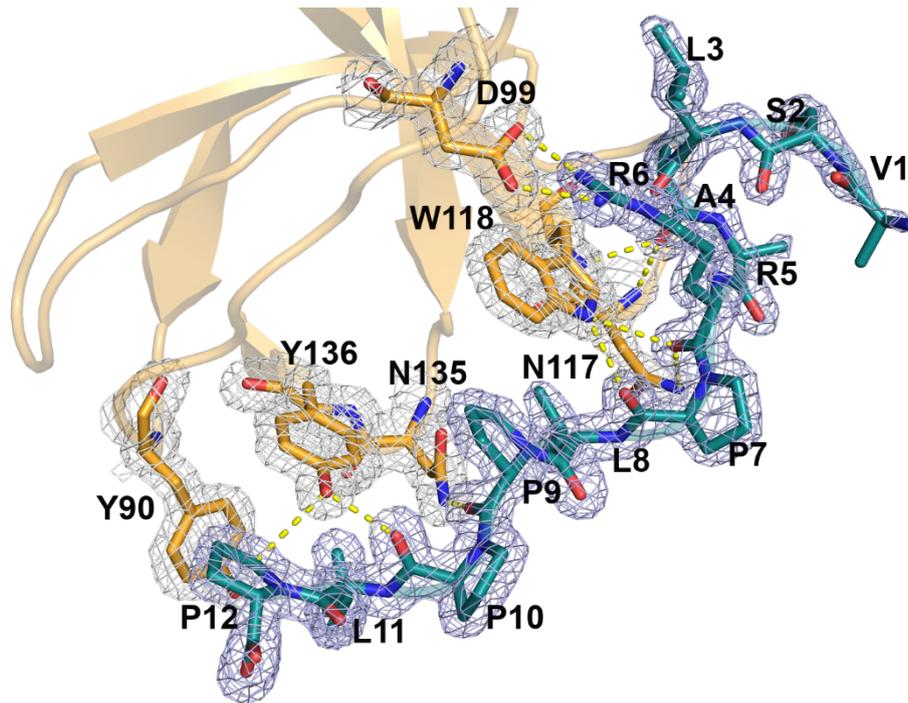


Figura 3.12. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a $1,5 \sigma$ de la unión del péptido VSL12 (VSLARRPLPLP) (cian oscuro) a la cadena C del dominio v-Src-Q128R-SH3 (naranja claro). Las interacciones que se producen entre los residuos se muestran en amarillo. Se ha seleccionado la cadena C, ya que es la que muestra el péptido completo y todos los residuos del lazo n-Src han sido modelados.

El dominio v-Src-Q128R presenta las mutaciones Arg95Trp, Thr96Ile, Asp117Asn, Leu124Val y Gln128Arg, de todas ellas la única implicada en las interacciones con el péptido VSL12 es el residuo Asn117 (Figura 3.13). Este residuo forma un puente de hidrógeno (H) y (ND2) con la Ala4 (O) y Arg6 (O), respectivamente, si comparamos estas interacciones con las que se producen en el complejo c-Src-WT-VSL12 (PDB: 4RTZ) podemos observar que la Arg6 no interacciona con el Asp117, sino con el Trp118 (NE1), y no es posible determinar las interacciones con la Ala4, ya que este residuo no ha sido modelado en esta estructura. Sin embargo, si observamos esta posición en el dominio c-Src-SH3-T98E-VSL12 (PDB:4HVW) podemos comprobar que en este caso la Ala4 (O) forma un enlace de hidrógeno con el Asp117 (N) y con el Trp118 (H). Esta interacción también puede ser observada en la cadena C del complejo v-Src-Q128R-VSL12 (Figura 3.13).

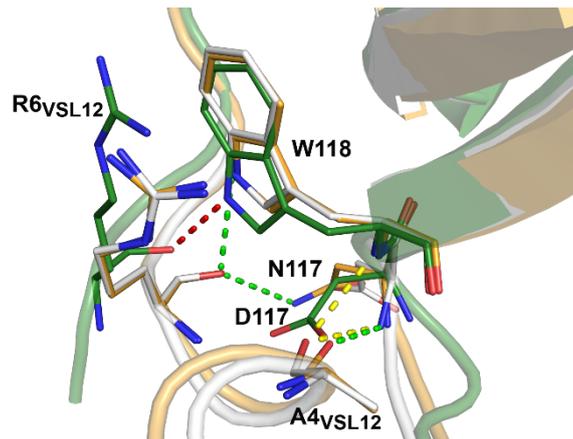


Figura 3.13. Comparación de las interacciones del residuo 117 con el péptido VSL12. La cadena A de la estructura del complejo c-Src-SH3-VSL12 se representa en verde oscuro (PDB:4RTZ), la de la estructura del complejo c-Src-SH3-T98E-VSL12 en blanco (PDB:4HVW) y la cadena C de la estructura del complejo v-Src-Q128R-VSL12 en naranja claro (PDB:7PVT). Las interacciones del complejo v-Src-Q128R-VSL12 se representan en verde, en c-Src-SH3-T98E-VSL12 en amarillo y en c-Src-SH3-VSL12 en rojo.

Este complejo demuestra que las mutaciones que se producen en la homóloga vírica del dominio c-Src-SH3 no afectan en su capacidad para interactuar con ligandos. La constante de unión del péptido VSL12 al dominio v-Src-Q128R es $1,10 \pm 0,03 \mu\text{M}^{-1}$ a pH en tampón fosfato sódico monobásico/ fosfato sódico dibásico 50 mM a pH 7,0 (Figura 3.14). Esta constante es menor que la descrita para el dominio nativo, cuyo valor es $2,22 \mu\text{M}^{-1}$ (Feng *et al.*, 1995).

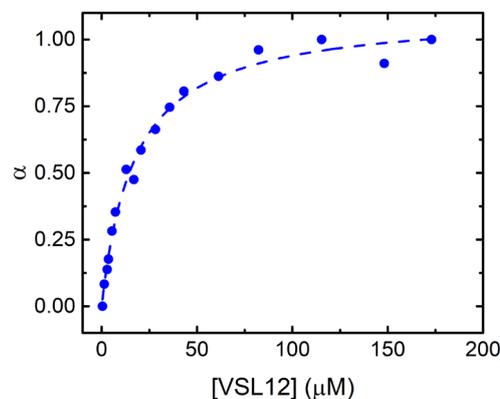


Figura 3.14. Determinación de la constante de unión del péptido VSL12 a al dominio v-Src-Q128R seguida por la amortiguación de la fluorescencia intrínseca de la proteína. Las curvas han sido ajustadas a la ecuación 2.5 tras representar la fracción de saturación (α) frente a la concentración de péptido (μM).

3.3 Discusión

3.3.1 Estructuras de los mutantes del dominio v-Src-SH3

Las tirosinas quinasas de la familia Src desempeñan un papel fundamental como intermediarias en las respuestas de las células a los estímulos extracelulares mediante la fosforilación de una amplia gama de sustratos. Estas enzimas están estrictamente reguladas por varios mecanismos (Roskoski, 2004). En la quinasa v-Src, la variante oncogénica de la c-Src, algunas mutaciones alteran estos mecanismos reguladores. Varias de estas mutaciones se encuentran en el dominio SH3, que desempeña un papel fundamental en la función enzimática al facilitar la interacción con proteínas asociadas y participar directamente en el mecanismo regulador de la actividad quinasa; este dominio interacciona con el conector de los dominios SH1 y SH2 de la quinasa, dando lugar a su forma cerrada o inactiva (Xu *et al.*, 1997). Previamente, se ha descrito que la introducción individual de las mutaciones oncogénicas Arg95Trp, Thr96Ile, Asp117Asn y Leu124Val no modifica la función celular de la c-Src. Sin embargo, cuando se combinan estas mutaciones, la quinasa es activa y altamente oncogénica (Miyazaki *et al.*, 1999). Para estudiar los cambios estructurales producidos por la presencia de estas mutaciones oncogénicas en el dominio SH3 de la tirosina quinasa c-Src, hemos cristalizado y resuelto la estructura de varios mutantes del dominio v-Src-SH3. La proteína portadora de todas las mutaciones oncogénicas muestra una estabilidad muy baja, lo que impide su purificación y, por tanto, su cristalización. Para aumentar la estabilidad de la proteína, hemos utilizado un mutante de la v-Src-SH3 donde la glutamina en la posición 128 fue reemplazada por arginina. Estudios previos demostraron que esta sustitución aumenta la estabilidad del dominio c-Src-SH3 sin afectar a la formación de dímeros entrecruzados (Bacarizo *et al.*, 2014; Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

Hemos obtenido la estructura entrecruzada del mutante v-Src-SH3-W95R-I96T, que muestra el mismo plegamiento general que los dímeros entrecruzados ya descritos del dominio c-Src SH3. El análisis de la estructura muestra que los residuos mutados no producen cambios significativos en ésta (Bacarizo *et al.*, 2014; Camara-Artigas *et al.*, 2009; Plaza-Garrido *et al.*, 2020). Sin embargo, no pudimos obtener la estructura dimérica entrecruzada del dominio v-Src-SH3 que contiene las mutaciones oncogénicas en el lazo RT, incluso con cristales obtenidos usando las mismas condiciones de cristalización. En cambio, solo hemos obtenido la forma monomérica, y ambos mutantes muestran solo una

molécula en la unidad asimétrica. La razón de la falta de dímeros entrecruzados de estos mutantes se puede encontrar en el papel que juegan los residuos Arg95 y Thr96 en la estabilización de la estructura dimérica. Ni el triptófano ni la isoleucina pueden formar interacciones que estabilicen la forma entrecruzada (Figura 3.15).

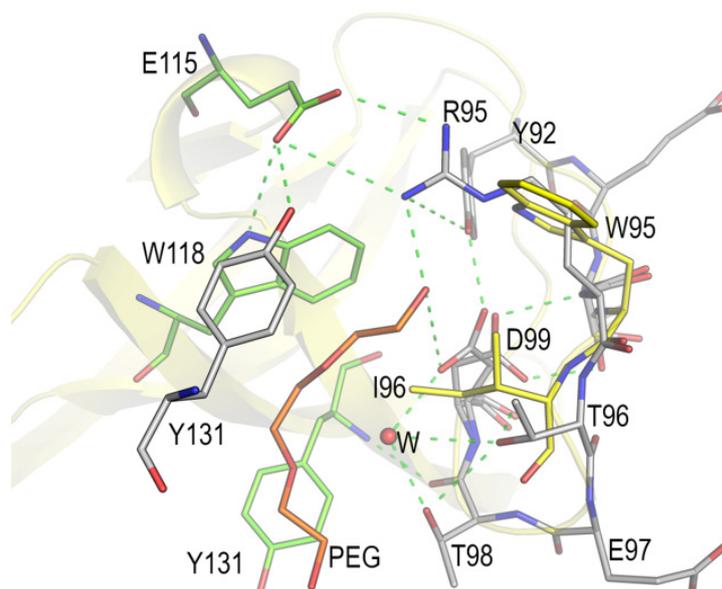


Figura 3.15. Interacciones en la interfaz del dímero entrecruzado del mutante v-Src-SH3-W95R-I96T (PDB: 7NET). Los residuos en las diferentes cadenas del dímero están coloreados en (A) gris y (B) verde. La estructura del mutante v-Src-SH3-Q128R (amarillo) (PDB 7NER) está superpuesta sobre una de las cadenas del dímero. Los residuos mutados, Trp95 e Ile96, se muestran como bastones. Los aminoácidos Thr96_A y Thr98_A forman un enlace de hidrógeno mediado por una molécula de agua (W) con los residuos Thr96_B y Thr98_B relacionados con la simetría. Para mayor claridad, estos residuos relacionados con la simetría no están representados. El aminoácido Asp99 muestra una conformación doble, lo que facilita los enlaces de hidrógeno intracadena con diferentes residuos en el lazo RT.

Es interesante mencionar que la forma monomérica del dominio c-Src SH3 presenta dos o cuatro moléculas en la unidad asimétrica según el cristal a partir del cual se ha obtenido la estructura, y que en ambos casos estas moléculas representan dos conformaciones distintas del dominio (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). En las estructuras de la c-Src SH3, el lazo n-Src muestra una alta flexibilidad que perjudica el modelado de toda la cadena principal y de las cadenas laterales de los residuos del lazo, pero esta flexibilidad se pierde en el mutante v-Src-SH3-Q128R. En el lazo RT, las mutaciones oncogénicas modifican la red de interacciones alrededor del residuo Asp99 y dan como resultado una conformación del lazo diferente en comparación con las estructuras del dominio SH3 de la c-Src. Los residuos Arg95 y Thr96 se conservan en las FSTQ, excepto en la quinasa Hck, en la que los aminoácidos isoleucina e histidina en lugar de arginina y treonina dan como resultado un aumento notable de la flexibilidad del lazo RT (Arold *et al.*, 1998). En la estructura v-Src-SH3-Q128R, la pérdida de las interacciones dentro de

la cadena en el lazo RT podría aumentar la energía del lazo. Además, la estabilidad de este mutante podría verse afectada por la presencia de los residuos Trp95 y Glu97 en las regiones desfavorables del diagrama de Ramachandran. El triptófano no es un residuo típico en los giros β , donde los residuos de prolina y glicina se ven favorecidos estadísticamente, presumiblemente porque sus cadenas laterales únicas contribuyen favorablemente a la estabilidad conformacional del giro β . Además, si el lazo está expuesto al disolvente, los residuos polares suelen estar presentes para estabilizar este giro (Trevino *et al.*, 2007). Un ejemplo de triptófano en un giro β expuesto al disolvente es el Trp60 en la proteína β 2-microglobulina altamente amiloidogénica. La mutación Trp60Gly estabiliza la proteína y reduce la propensión amiloidogénica (Esposito *et al.*, 2008). En nuestro caso, la mutación oncogénica Arg95Trp podría tener el efecto contrario, reduciendo la estabilidad de la proteína y aumentando su propensión a formar fibras amiloides.

Los experimentos de plegamiento realizados por Grantcharova y colaboradores con mutantes del dominio c-Src SH3 con el lazo RT entrecruzado y los extremos N y C terminales mostraron una desaceleración dramática en la velocidad de desplegamiento, lo que sugiere que el paso limitante de la velocidad del plegamiento implica la disociación de los extremos N y C terminales y la apertura del lazo RT (Grantcharova *et al.*, 2000). Estudios experimentales y de dinámicas moleculares desarrollados por Baker y colaboradores demostraron que las primeras regiones del dominio SH3 que se ordenan son los tres lazos en horquilla: distal, RT y n-Src (Riddley *et al.*, 1999). La lámina de tres hebras formada por la horquilla β de los lazos distal y n-Src contiene los residuos considerados como núcleo de plegamiento hidrófobo del dominio SH3 (Ile110, Ala121 e Ile132). Esta lámina tiene una densidad mucho mayor de interacciones estabilizadoras que otras partes de la proteína de longitud similar, y el orden de los residuos produce un aumento significativo en interacciones atractivas. Mientras tanto, la ordenación de residuos adicionales en el lazo RT aumenta el coste entrópico de la formación de la estructura sin aumentos significativos en las interacciones atractivas nativas (Riddle *et al.*, 1999; Northey *et al.*, 2002). La interacción del lazo RT con la lámina central de las tres hebras se ve facilitada por los contactos hidrófobos entre los residuos del núcleo, Phe102 y Leu108, y un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral Glu106 y el átomo de nitrógeno de la cadena principal de la Lys103. Las interacciones débiles entre el núcleo

de plegamiento y el plegado tardío del lazo RT podrían explicar el fácil intercambio de este lazo en la formación de dímeros entrecruzados.

En las estructuras monoméricas de la proteína v-Src-SH3, la conformación del lazo RT es diferente de la que se encuentra en el dominio c-Src-SH3. La pérdida de algunas interacciones en el lazo RT también podría afectar a la estabilidad de la proteína. Además, las interacciones electrostáticas del lazo RT se pueden ver alteradas por la presencia de dos residuos hidrófobos, triptófano e isoleucina, en lugar de los residuos polares arginina y treonina. El valor de pK_a del Asp99 podría verse afectado por estos cambios, y podría explicar el intervalo más corto de estabilidad frente al pH de los mutantes v-Src-SH3 que presentan las mutaciones oncogénicas en el lazo RT.

3.3.2 Interacciones del dominio SH3 en la tirosina quinasa y en complejo con los MRPs

Anteriormente, se ha demostrado que las mutaciones oncogénicas en el dominio SH3 suprimían la unión del dominio c-Src al dominio quinasa para adoptar la conformación cerrada e inactiva, mientras se mantiene la capacidad de unir un subconjunto de proteínas celulares a un nivel similar al de c-Src SH3 (Miyazaki *et al.*, 1999). Los residuos en el lazo RT son responsables de la especificidad de la unión, y el puente salino entre el aminoácido Asp99 y una arginina que flanquea el motivo canónico PxxP determina la orientación del péptido en clase I o II (Figura 3.17) (Bacarizo & Camara-Artigas, 2013). Sin embargo, el Asp99 no interactúa con la *región de unión* (linker region) de la c-Src quinasa presente entre el dominio SH2 y el dominio quinasa (PDB: 2PTK) (Williams *et al.*, 1997). De hecho, la *región de unión* en esta quinasa sólo tiene un residuo de prolina, Pro250, que junto con la cadena alifática de la Lys249 se localizan en el primer bolsillo (entre Tyr90-Tyr136) en la superficie hidrófoba del dominio SH3. El grupo metilo del residuo Thr252 ocupa el segundo bolsillo de unión (Tyr136-Pro133-Trp118), mientras que los aminoácidos Ala256 y Lys257 se acoplan en el tercer bolsillo (Trp118-Tyr131) (Figura 3.16). De esta manera, se espera que la interacción de la *región de unión* entre el dominio SH2 y el dominio quinasa con el dominio SH3 sea más débil que la unión de los MRP de las proteínas asociadas con la secuencia consenso PxxP. El estado cerrado inactivo de la quinasa muestra dos puentes salinos que pueden compensar la falta del segundo residuo de prolina para impulsar la unión intramolecular (Asp91-Lys249 y Asp117-Arg318). La mutación oncogénica Asp117Asn altera el puente salino con la

Arg318, pero también el cambio de arginina por triptófano, Arg95Trp, da como resultado la pérdida de varias interacciones entre la *región de unión* y el lazo RT (Figura 3.16).

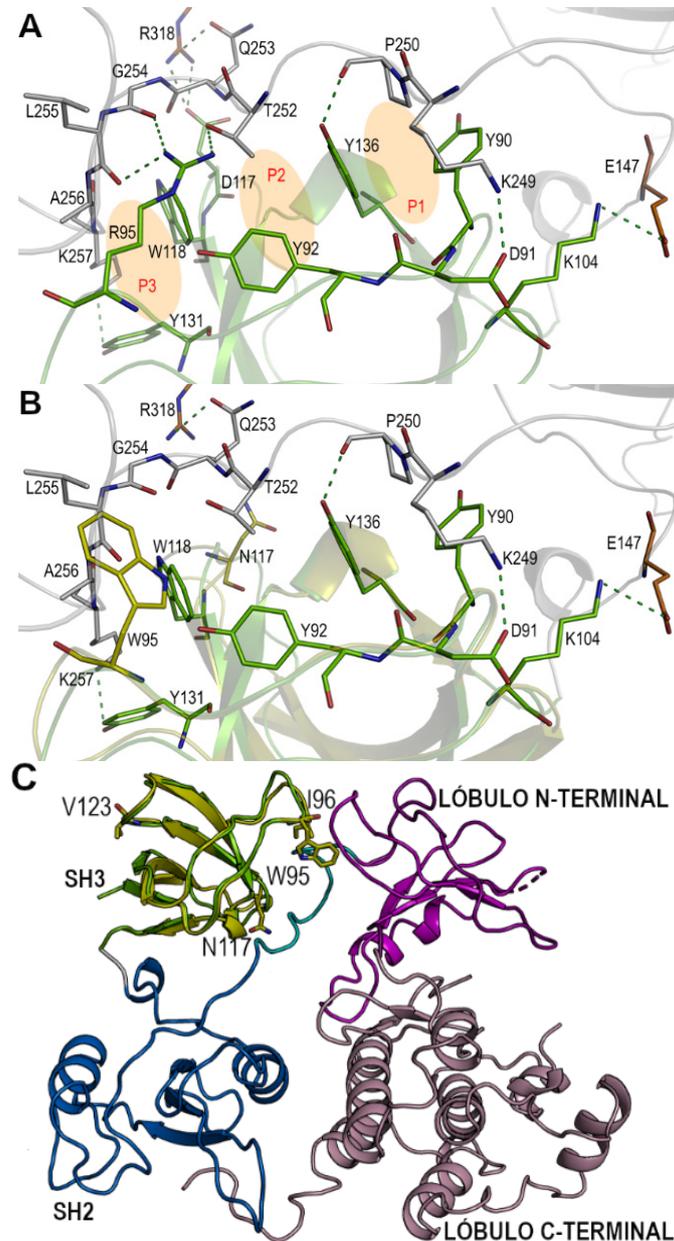


Figura 3.16. (A) Interacciones entre el conector SH2-quinasa (gris) y el dominio SH3 (verde). Los residuos de los dominios SH2 y SH1 que también interactúan con el dominio SH3 en la estructura de la quinasa c-Src (PDB 2PTK) se muestran como bastones naranjas. Las interacciones de los residuos del dominio SH3 con el conector de los dominios SH1 y SH2 (mostradas como barras) están marcadas por líneas de trazos verdes. Los tres bolsillos de interacción están marcados en naranja y etiquetados como P1, P2 y P3. (B) Superposición del dominio v-Src-SH3 con el dominio SH3 de la c-Src quinasa y v-Src-SH3-Q128R (PDB 7NER, amarillo). Las mutaciones oncogénicas Trp95 y Asn117 se muestran como bastones amarillos y se han eliminado las interacciones establecidas por los residuos Arg95 y Asp117. (C) Conformación inactiva cerrada de la tirosina quinasa c-Src de pollo (PDB: 2PTK). Los lóbulos N- y C-terminal del dominio SH1 se han coloreado en magenta y rosa, respectivamente. El dominio SH2 está coloreado en azul y el conector SH2-SH1 en cian. El dominio SH3 se muestra en verde y la superposición de v-Src-SH3 se muestra en amarillo. Los residuos mutados en el dominio SH3 se muestran como bastones.

Por lo tanto, estas interacciones podrían ser esenciales para respaldar el contacto débil entre el dominio SH3 y la *región de unión* y explicarían los resultados anteriores que apuntan a la falta de unión del dominio v-Src-SH3 con la región de unión en la quinasa v-Src (Figura 3.16 C) (Miyazaki *et al.*, 1999). Sin embargo, los residuos Arg95 y Thr96 no interactúan con residuos en los MRP de las estructuras del complejo de los péptidos de clase I y II del dominio c-Src SH3 (Bacarizo & Camara-Artigas, 2013) (Figura 3.17). De esta manera, la interacción del dominio v-Src-SH3 con proteínas asociadas podría no verse afectada como se observó anteriormente (Miyazaki *et al.*, 1999) tal y como demuestra el complejo obtenido v-Src-Q128R-VSL12 (Figura 3.12).

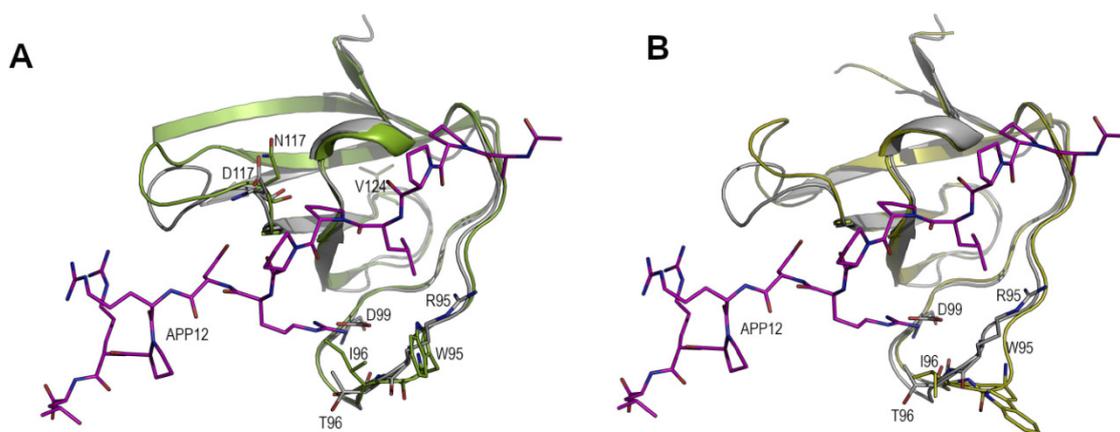


Figura 3.17. Superposición del mutante (A) v-Src-SH3-Q128R (verde) y (B) v-Src-SH3-N117D-V124L (amarillo) y la estructura del complejo de la c-Src-SH3-Q128R/ APP12 (PDB: 5OB1). El dominio SH3 se ha representado como dibujo (blanco) y el péptido como bastones (magenta). Las mutaciones presentes en cada variante oncogénica se representan como bastones. También se muestra el puente salino Asp99-APP12-Arg7 que dirige la orientación del péptido tras la unión.

Aunque el intercambio tridimensional de dominios se ha descrito en el dominio SH3 de la tirosina quinasa c-Src aislado, hasta la fecha, no hay evidencia de la formación de estructuras entrelazadas en la quinasa c-Src completa. Otros dominios SH3 pertenecientes a proteínas con diferentes estructuras y funciones, también forman dímeros entrecruzados (Cámara-Artigas, 2016; Richter *et al.*, 2020). Además, este proceso de oligomerización también se ha descrito en el dominio SH2 (Huculeci *et al.*, 2015). Dada la aparición repetida de esta asociación oligomérica en los dominios de estas quinasas, surge la pregunta de si podría haber una función biológica asociada y cómo afectaría esta oligomerización a su función. Los estudios comparativos realizados con las proteínas c-Src y v-Src demostraron que la forma viral contiene un mayor número de regiones no estructuradas, menor compactibilidad, mayor exposición de residuos hidrófobos, una mayor sensibilidad contra la desnaturalización y una tendencia más pronunciada hacia la

agregación (Falsone *et al.*, 2004). En el dominio SH3 de la c-Src, la formación de los oligómeros entrecruzados se produce mediante el intercambio del lazo RT, donde el lazo n-Src actúa como lazo bisagra, lo que permite la exposición parcial del núcleo hidrófobo de la proteína. El protómero abierto puede evolucionar para formar el protómero cerrado de nuevo o, si la concentración es lo suficientemente alta, los residuos hidrófobos podrían evitar la exposición al disolvente intercambiando el lazo RT entre cadenas vecinas. Nuestros resultados han demostrado que aquellos mutantes del dominio v-Src-SH3 donde el dímero no está estabilizado son especialmente propensos a agregar.

Capítulo 4

Propiedades biofísicas y estructurales de las
quimeras Src-Abl y Abl-Src

Son numerosos los estudios sobre formación de oligómeros entrecruzados que han fijado su interés en la composición y características de los lazos bisagra (Ogihara *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2012; Nagao *et al.*, 2020). Para que este pueda desempeñar su función se ha propuesto que debe tener cierta flexibilidad (Liu & Eisenberg, 2002). En los dominios SH3 que forman oligómeros entrecruzados el papel de lazo bisagra es desempeñado por diferentes lazos dependiendo de la naturaleza del dominio. En el dímero entrecruzado del dominio c-Src SH3 y Eps-8 es el lazo n-Src el que actúa como lazo bisagra, mientras que en el dominio p47phox-SH3 el lazo que sufre la apertura es el lazo distal, y el RT es el que actúa como lazo bisagra en el dímero del CRKL-SH3 (Kishan *et al.*, 1997; Kishan *et al.*, 2001; Yuzawa *et al.*, 2004; Harkiolaki *et al.*, 2006; Cámara-Artigas *et al.*, 2009). En estudios previos de nuestro grupo de investigación con el mutante Gln128Arg de la quimera SA-2X se obtuvo como resultado un dímero entrecruzado en el que, además del lazo n-Src también el lazo RT actuaba como lazo bisagra (Cámara-Artigas *et al.*, 2014).

En este capítulo se recogen los experimentos realizados para caracterizar los dominios SH3 de la Abl y c-Src tirosina quinasas en los que se han intercambiado los lazos RT y n-Src (Figura 2.1), llevándose a cabo tanto la caracterización biofísica como estructural de las quimeras resultantes.

4.1 Resultados

4.1.1 Expresión y purificación de las quimeras Src-Abl y Abl-Src

Todas las proteínas quimera fueron clonadas en un vector de expresión pHTP1 que contiene resistencia a kanamicina y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal seguido de un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV. Se optimizó la temperatura de inducción para la obtención de un mayor rendimiento y en todos los casos se utilizó 20 °C. En la tabla 4.1 se indica la del valor promedio del rendimiento de la purificación de cada quimera.

Tabla 4.1. Rendimiento obtenido en la purificación de los dominios Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	Rendimiento (mg por L de cultivo)
SA-RT	30
SA-Src	30
SA-2X	10
AS-RT	20
AS-Src	30
AS-2X	10

La presencia de proteína y su pureza fue comprobada en cada etapa de la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE con gels al 16%. La figura 4.1 muestra un gel de electroforesis tipo de la purificación de las quimeras.

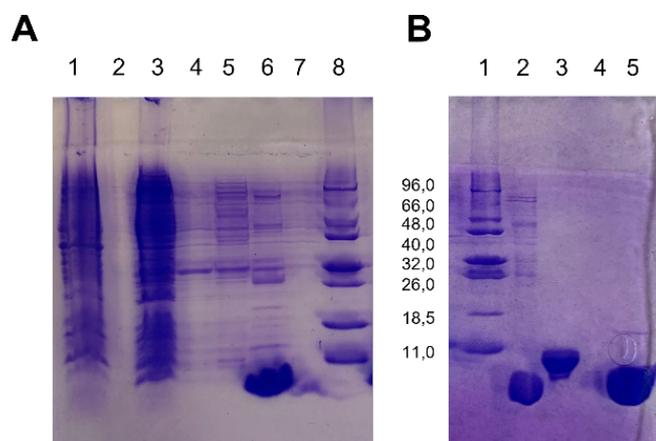


Figura 4.1. Gel de electroforesis PAGE-SDS de (A) Quimeras Abl-Src; Calles, 1: Pellet, 3: Fracción del sobrenadante saliente de la columna de afinidad. 4: Lavado con TEC, 5: Lavado con TEC con imidazol 20 mM, 6: Lavado con TEC con imidazol 250 mM (AS-Src), 8: Patrón. (B) Quimeras Src-Abl; Calles, 1: Patrón, 2: SA-RT, 3: SA-2X y 5: SA-Src.

Para eliminar posibles agregados y alcanzar un mayor grado de pureza, tras el paso de la columna de níquel para eliminar la proteasa TEV, los dominios fueron sometidos a una cromatografía final en una columna de exclusión molecular Hi-Load 26/60 Superdex-75 conectada a un sistema AKTA-FPLC. Las fracciones correspondientes a la proteína pura se alicuotaron en volúmenes de 1-2 mL a una concentración de 1-3 mg/mL en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM pH 8,0, cloruro sódico 300 mM, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.1.2 Caracterización biofísica de las quimeras Src-Abl-SH3 y Abl-Src-SH3

4.1.2.1 Solubilidad de las quimeras

Se ha determinado la solubilidad de las quimeras a 25 °C a pH 5,0 (ácido acético/acetato sódico 50 mM) y 7,0 (fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM). Los resultados se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Solubilidad de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	Solubilidad (mg/mL)	
	pH 5,0	pH 7,0
SA-RT	11,1	13,7
SA-Src	4,5	4,8
SA-2X	10,4	12,5
AS-RT	3,9	8,1
AS-Src	5,2	11,0
AS-2X	0,8	3,8

Todas las quimeras muestran una mayor solubilidad a pH 7,0, mientras que a pH 5,0 las quimeras Src-Abl apenas muestran variación en la solubilidad, las quimeras Abl-Src sufren una reducción drástica de ésta. Es especialmente notable la baja solubilidad de la quimera AS-2X.

4.1.2.2 Estabilidad de las quimeras en función del pH

La estabilidad de las quimeras de los dominios SH3 en función del pH se ha estudiado mediante la medida de la fluorescencia intrínseca de la proteína en un rango de pH de 1-14 (Figura 4.2). En todos los casos se obtuvo una dependencia en forma de campana con una única transición tanto a pH ácido como básico. En la tabla 4.3 se recopilan los valores del pK_a aparente calculados con la ecuación 2.1.

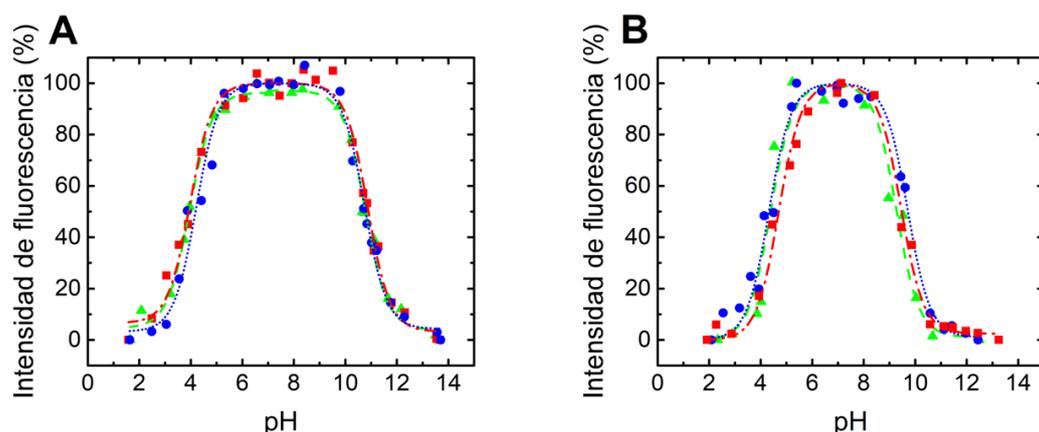


Figura 4.2. Porcentaje de la intensidad de fluorescencia de las quimeras frente al pH a 25 °C: (A) Quimeras Src-Abl: SA-RT (rojo, - · -■- · -), SA-Src (azul, -●-), SA-2X (verde, ---▲---). (B) Quimeras Abl-Src: AS-RT (rojo, - · -■- · -), AS-Src (azul, -●-), AS-2X (verde, ---▲---).

Tabla 4.3. Valores del pK_a aparente de la desnaturalización ácida y básica de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	pK _a (Ácido)	pK _a (Básico)	Número de residuos ionizables						
			Asp	Glu	His	Tyr	Lys	Arg	Cys
c-Src-SH3-WT ¹	4,0±0,1	10,8±0,1	4	4	1	4	2	2	0
SA-RT	4,0±0,1	10,9±0,1	4	3	1	4	2	1	0
SA-Src	4,2±0,1	10,7±0,1	4	3	2	5	2	2	0
SA-2X	4,0±0,1	10,8±0,1	4	2	2	5	2	1	0
AS-RT	4,7±0,1	9,4±0,1	1	5	1	3	3	2	1
AS-Src	4,3±0,1	9,7±0,1	2	4	0	2	3	1	1
AS-2X	4,4±0,1	9,3±0,1	1	6	0	2	3	2	1

¹Datos de Plaza-Garrido *et al.* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

En la región ácida, todas las quimeras Src-Abl presentan un pK_a aparente en torno a 4,0, que es el mismo valor obtenido para la proteína WT. Esta transición puede ser atribuida fundamentalmente a los residuos de aspartato (pK_a del aminoácido libre 3,86), sin descartar alguna contribución de los residuos de glutamato (pK_a del aminoácido libre 4,25). El mismo comportamiento se observa en la región básica, todas las quimeras presentan un pK_a aparente alrededor de 10,8 que es el valor obtenido para el dominio c-Src-SH3 WT. Esta transición podría ser atribuida principalmente a los residuos de tirosina (pK_a del aminoácido libre 10,07) y lisina (pK_a del aminoácido libre 10,53). En consecuencia, todas las quimeras presentan un intervalo de estabilidad similar en el rango de pH 5,0-10,0.

En el caso de las quimeras Abl-Src hay una mayor variación en los valores de pK_a aparente y en todos los casos una estabilidad ligeramente inferior al de las quimeras Src-Abl. En este caso, la transición a pH ácido es atribuible mayormente a los residuos de glutámico que predominan en esta quimera en comparación con las quimeras Src-Abl. En

la región básica, todas las quimeras presentan un pK_a aparente alrededor de 9,5. En este caso, el menor valor del pK_a aparente puede ser atribuido a la presencia de un residuo de cisteína (pK_a del aminoácido libre 8,33) y a las tirosinas (pK_a del aminoácido libre 10,07). En este caso, el intervalo de estabilidad comprende el rango de pH 5,5-8,5, que es menor que el de las quimeras Src-Abl.

4.1.2.3 Estabilidad de las quimeras en presencia de cloruro de guanidinio

La desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio (GdnHCl) de las quimeras fue medida mediante el descenso de la fluorescencia intrínseca de la proteína. Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C y a dos pHs: a pH 5,0 en tampón ácido acético/acetato sódico 50 mM; y a pH 7,0 en tampón fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM. La variación de la fluorescencia frente a la concentración de agente desnaturalizante fue analizada mediante un modelo de dos estados según la ecuación 2.2 (Figura 4.3 y 4.4). En la tabla 4.4 se recopilan los parámetros termodinámicos obtenidos para cada quimera.

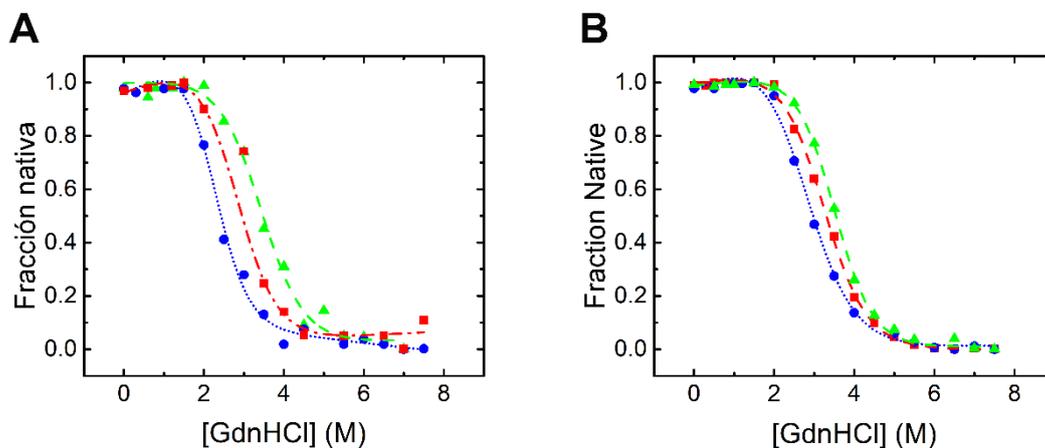


Figura 4.3. Fracción nativa de las quimeras Src-Abl frente a la concentración de GdnHCl a (A) pH 5,0 y (B) pH 7,0 a 25 °C: SA-RT (rojo, - · -■- · -), SA-Src (azul, -●-), SA-2X (verde, ---▲---).

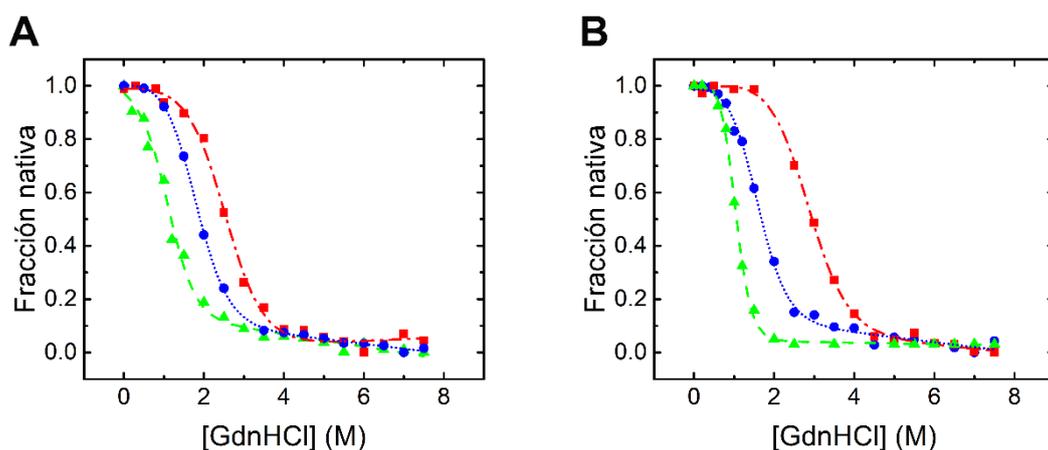


Figura 4.4. Fracción nativa de las quimeras Abl-Src frente a la concentración de GdnHCl a (A) pH 5,0 y (B) pH 7,0 a 25 °C: AS-RT (rojo, - - ■ - -), AS-Src (azul, -●-), AS-2X (verde, ---▲---).

Tabla 4.4. Parámetros termodinámicos de las quimeras Src-Abl y Abl-Src obtenidos de la desnaturalización química con GdnHCl.

Proteína	pH 5,0		pH 7,0	
	$D_{1/2}$ (M)	ΔG_w (kJ/mol)	$D_{1/2}$ (M)	ΔG_w (kJ/mol)
c-Src-SH3-WT ¹	2,43±0,02	11,20±1,50	2,76±0,03	17,11±2,00
SA-RT	2,81±0,03	13,99±3,93	3,21±0,03	15,00±1,28
SA-Src	2,21±0,02	11,00±2,29	2,95±0,04	14,94±1,11
SA-2X	3,21±0,03	15,68±3,44	3,49±0,04	18,00±0,85
Abl-SH3-WT ²	-	-	2,80±0,10	16,20±0,80
AS-RT	2,52±0,03	12,92±1,88	2,79±0,03	13,92±1,74
AS-Src	1,74±0,02	10,50±0,81	1,52±0,02	9,98±1,84
AS-2X	1,14±0,01	8,49±2,96	0,97±0,01	10,07±1,55

¹Datos de Plaza-Garrido *et al.* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). ²Datos de Filimonov *et al.* (Filimonov *et al.*, 1999). Datos del dominio nativo Abl-SH3 no disponibles a pH 5,0.

Todas las quimeras Src-Abl son más estables a pH 7,0 que a pH 5,0. De todas las quimeras la que presenta mayor estabilidad es la SA-2X, por lo que introducir los lazos RT y n-Src del dominio Abl-SH3 en el dominio c-Src genera un dominio más estable frente a la desnaturalización inducida por GdnHCl.

En el caso de las quimeras Abl-Src la estabilidad en presencia de GdnHCl es similar a ambos pHs. La comparación de los valores de $D_{1/2}$ y ΔG_w obtenidos con los descritos en la bibliografía para el dominio nativo a pH 7,0 muestra que el intercambio de los lazos RT y n-Src produce dominios menos estables. Es notable la disminución de estabilidad de las quimeras AS-Src y AS-2X, por lo que podríamos concluir que la introducción del lazo n-Src del dominio c-Src-SH3 en el dominio Abl-SH3 produce una desestabilización del dominio.

4.1.2.4 Estabilidad térmica de las quimeras

La estabilidad térmica de las quimeras Src-Abl y Abl-Src se determinó mediante el cambio de elipticidad a 223 y 230 nm, respectivamente, utilizando una rampa de temperatura entre 10 y 98 °C. Las medidas se realizaron a dos pHs, 5,0 y 7,0, en los tampones ácido acético/acetato sódico 50 mM y fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico 50 mM. Las figuras 4.5 y 4.6 muestran las curvas de desnaturalización térmica de las quimeras Src-Abl y Abl-Src, respectivamente, a pH 5,0 y pH 7,0. Todas las curvas fueron analizadas mediante un modelo de dos estados según la ecuación 2.8. En la tabla 4.5 se recopilan los parámetros termodinámicos obtenidos, T_m y ΔH , para cada uno de los dominios SH3 Src-Abl y Abl-Src. La reversibilidad del proceso fue comprobada mediante la comparación de los espectros de CD de la proteína nativa, con los obtenidos de la proteína desnaturalizada tras recuperar una temperatura de 25 °C.

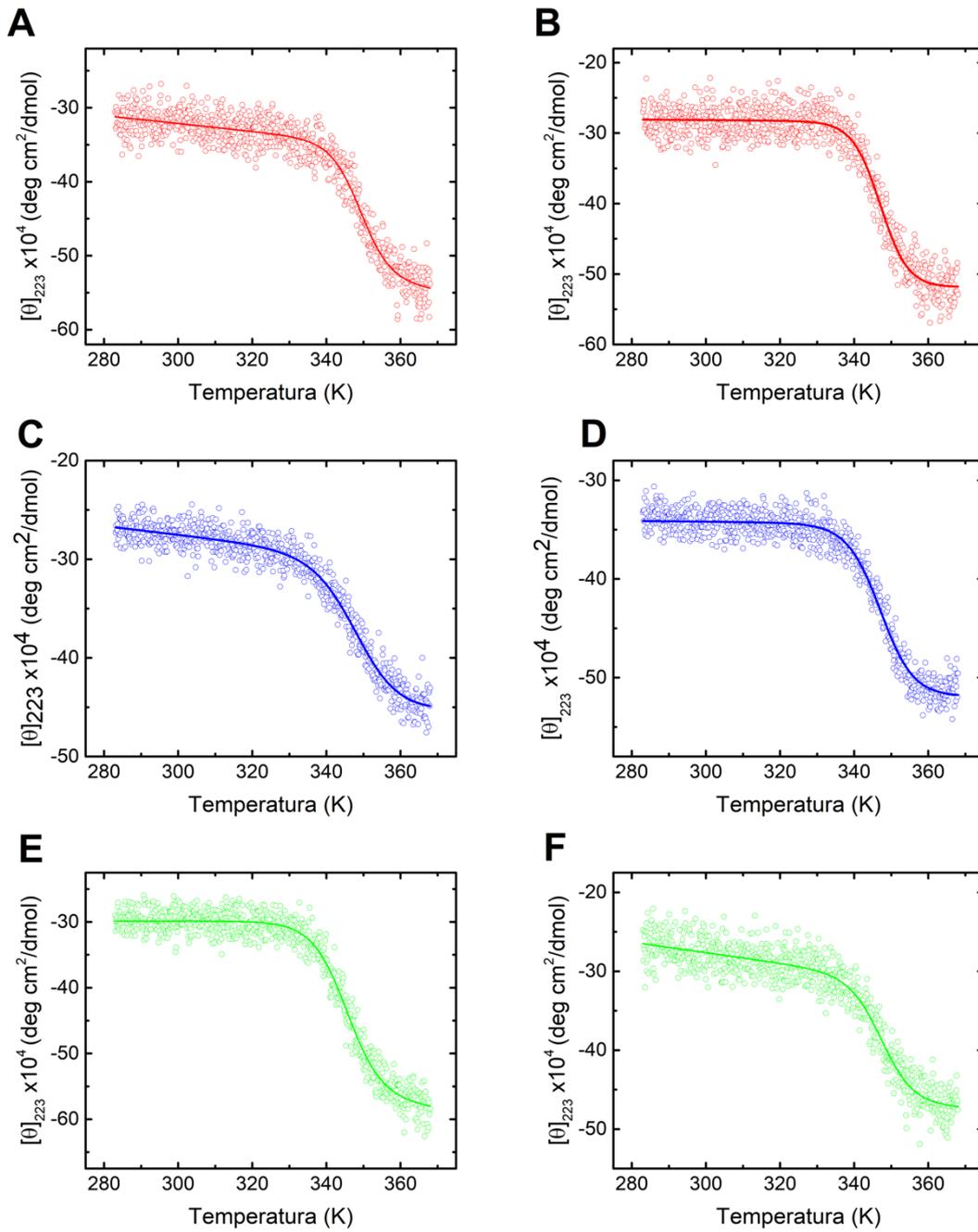


Figura 4.5. Elipticidad molar a 223 nm de las quimeras Src-Abl frente a la temperatura: SA-RT (A) pH 5,0 y (B) pH 7,0; SA-Src (C) pH 5,0 y (D) pH 7,0; SA-2X (E) pH 5,0 y (F) pH 7,0.

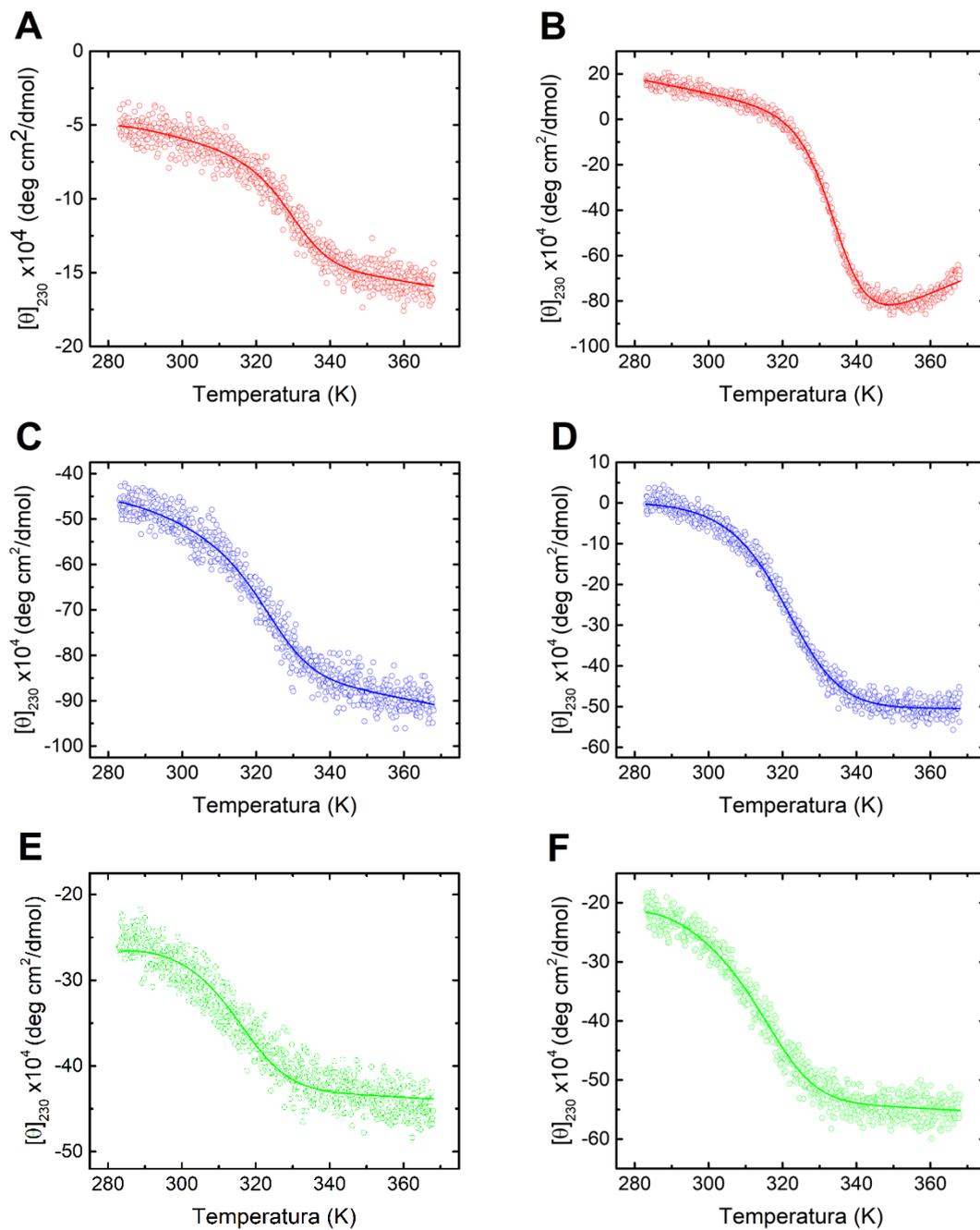


Figura 4.6. Elipticidad molar a 230 nm de las quimeras Abl-Src frente a la temperatura: AS-RT (A) pH 5,0 y (B) pH 7,0; AS-Src (C) pH 5,0 y (D) pH 7,0; AS-2X (E) pH 5,0 y (F) pH 7,0.

Tabla 4.5. Parámetros termodinámicos obtenidos de la desnaturalización térmica de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	pH 5,0		pH 7,0	
	T _m (K)	ΔH _m (kJ/mol)	T _m (K)	ΔH _m (kJ/mol)
c-Src-SH3-WT ¹	345,4±0,4	308±14	348,6±0,5	321±32
SA-RT	349,1±0,8	253±16	347,0±0,2	268±11
SA-Src	347,9±0,3	174±8	347,0±0,2	224±6
SA-2X	345,0±0,5	212±7	347,4±0,9	232±17
Abl-SH3-WT ²	-	-	341,5±0,2	194±10
AS-RT	328,6±0,7	151±14	334,3±0,1	197±3
AS-SRC	321,5±1,0	119±13	319,0±0,4	116±6
AS-2X	311,0±2,6	80±19	313,0±1,3	87±11

¹Datos de Plaza-Garrido *et al.* (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). ²Datos de Filimonov *et al.* (Filimonov *et al.*, 1999). Datos del dominio nativo no disponibles a pH 5,0.

En las quimeras Src-Abl, los resultados muestran que los dominios SA-RT y SA-Src poseen una T_m ligeramente superior a pH 5,0. A este pH, el intercambio de los lazos produce una ligera estabilización en la quimera SA-Src que es más notable en la quimera SA-RT, mientras que el valor de T_m obtenido para SA-2X es más próximo al de la proteína nativa. En cambio, a pH 7,0 todas las quimeras muestran una T_m similar, produciéndose una ligera desestabilización respecto del dominio nativo.

En todos los casos se determinó la reversibilidad del proceso midiendo el espectro de CD de la proteína a 25 °C tras someterla a la rampa de temperatura. El dominio SA-RT mostró una desnaturalización reversible a ambos pHs, mientras que la quimera SA-2X mostró reversibilidad tan solo a pH 7,0. En el caso de SA-Src la desnaturalización fue irreversible a los dos pHs estudiados.

En el caso de los dominios Abl-Src, de nuevo la variación depende de los lazos intercambiados. Los resultados muestran que la quimera AS-RT es más estable a pH 7,0 que 5,0, mientras que las quimeras que portan el lazo Src, AS-Src y AS-2X no presentan diferencias significativas en los pHs estudiados, siendo la AS-Src un poco más estable a pH ligeramente ácido. A ambos pHs el comportamiento de estas quimeras es el mismo, la inserción de los lazos produce una desestabilización del dominio nativo (comparable solo a pH 7,0) que es más notable en la quimera AS-Src y AS-2X. De modo que, el intercambio del lazo n-Src produce una mayor desestabilización en comparación al

intercambio del lazo RT, originando una disminución de la T_m y ΔH_m en AS-Src. Así mismo, cuando ambos lazos se intercambian, quimera AS-2X, originan una disminución de estos valores mucho mayor que la observada en AS-Src. A pH neutro se produce este mismo efecto, en el que el intercambio de los lazos produce una desestabilización importante de la T_m en todas las quimeras Abl-Src respecto del dominio nativo, que es más notable en la sustitución del lazo n-Src que en la del RT.

Los espectros registrados a 25 °C tras someter la proteína a la rampa de temperatura mostró una desnaturalización reversible a ambos pHs para el dominio AS-Src, mientras que la quimera AS-2X mostró reversibilidad tan solo a pH 5,0. La desnaturalización térmica de la quimera AS-RT presenta una renaturalización parcial siendo mayor a pH 7,0 que a pH 5,0. Cabe destacar que la curva de desnaturalización térmica de la proteína AS-RT a pH 7,0 muestra una línea base inclinada, debida probablemente a la aparición de una conformación alternativa, que podría corresponder a la formación de agregados (Lee *et al.*, 2003).

4.1.2.5 Caracterización del estado de oligomerización de las quimeras Src-Abl y Abl-Src

El estado de oligomerización de las quimeras se estudió teniendo en cuenta la solubilidad de las quimeras. De esta forma en el caso de las quimeras Src-Abl ha sido posible determinar el estado de oligomerización mediante medidas de DLS a 5 y 10 mg/mL a pH 5,0 y 7,0. Dada la menor solubilidad de las quimeras Abl-Src solo ha sido posible determinar el estado de oligomerización a 5 y 10 mg/mL a pH 7,0 y a 5 mg/mL a pH 5,0. Teniendo en cuenta que el dominio c-Src SH3 forma dímeros entrecruzados en presencia de PEG de bajo peso molecular, hemos estudiado también el efecto de éste aditivo en la oligomerización de las quimeras (Cámara-Artigas *et al.*, 2009). Los resultados se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6. Valores de R_h (nm) de las quimeras Src-Abl y Abl-Src a pH 5,0 y 7,0.

pH	R_h (nm)					
	5,0		7,0		5,0	7,0
Proteína (mg/mL)	+ 5% PEG300					
	5	10	5	10	5	5
SA-RT	1,80±0,03	1,75±0,06	1,85±0,05	1,68±0,02	2,54±0,12	2,45±0,08
SA-2X	2,09±0,05	2,43±0,07	1,78±0,06	1,97±0,06	2,17±0,04	1,80±0,01
SA-Src (*)	1,86±0,02	-	2,12±0,04	-	2,05±0,10	2,19±0,06
AS-RT	-	-	1,90±0,04	-	2,14±0,10	2,31±0,06
AS-2X	-	-	-	-	-	2,19±0,07
AS-Src	1,90±0,02	-	1,86±0,02	1,95±0,02	2,15±0,06	2,33±0,22

(*) Medida a la concentración más alta posible.

Al comparar los valores de radio hidrodinámico obtenidos para el monómero (1,8 nm) y el dímero (2,4 nm) de la proteína nativa (Plaza-Garrido *et al.*, 2020) con los resultados obtenidos, podemos concluir que la quimera SA-RT forma dímeros en presencia de 5% de PEG 300. A pH 5,0 la quimera SA-2X forma dímeros a 5 mg/mL en presencia de PEG 300, aunque se observa una tendencia a dimerizar a este pH incluso en ausencia de PEG. Este comportamiento es el mismo observado en el mutante Gln128Arg de la quimera SA-2X estudiado previamente (Cámara-Artigas *et al.*, 2014). Los resultados de la quimera SA-Src son poco concluyentes ya que las medidas se realizaron en el límite de solubilidad y la proteína presentaba agregados de mayor tamaño que los dímeros ($R_h > 10$ nm).

En el caso de las quimeras Abl-Src los resultados demuestran que en ausencia de PEG 300 las proteínas son monoméricas en disolución a los dos pHs ensayados. Sin embargo, la adición de 5% de PEG podría propiciar un equilibrio entre monómero y dímero similar al que ocurre en la quimera SA-Src, más desplazado a la forma dimérica a pH 7,0. Debido a la baja solubilidad de la quimera AS-2X, la medida del R_h solo ha sido posible en presencia de 5% de PEG 300 a pH 7,0, donde al igual que el resto de quimeras Abl-Src, se aprecia la presencia de un equilibrio monómero-dímero.

4.1.3 Cristalización y determinación estructural de las quimeras Src-Abl y Abl-Src

Para determinar las condiciones de cristalización de las quimeras se llevaron a cabo cribados con disoluciones comerciales, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En la tabla 4.7 se muestran las condiciones de cristalización obtenidas para cada una de las quimeras estudiadas. En todos los casos el agente precipitante fue sulfato amónico. En aquellos casos en los que la proteína mostró problemas de nucleación, se utilizaron técnicas de *micro* y *macroseeding*. También para reducir la nucleación y lograr cristales

más grandes se usaron aditivos como glicerol y PEGs de bajo peso molecular. También se exploró el efecto de la adición de concentraciones bajas de otras sales, como por ejemplo LiCl. Dado el efecto que tiene la adición de PEG de baja masa molecular en la oligomerización de los dominios, también se cribaron las condiciones de cristalización en presencia de PEG 300 (Cámara-Artigas *et al.*, 2009).

Para su transporte a las instalaciones de luz sincrotrón, los cristales optimizados fueron sometidos a enfriamiento en nitrógeno líquido una vez recogidos de la gota donde crecían, mediante un criolazo. Durante este proceso no se utilizaron crio-protectores y en todos los casos se eliminó el líquido del lazo tal y como se describe en Pellegrini *et al.*, 2011. Tal como se indica en Materiales y Métodos, se procesaron los datos obtenidos para cada quimera a partir de los cristales de mayor calidad para resolver las estructuras de interés a la mayor resolución posible.

Tabla 4.7. Condiciones de cristalización de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	SA-RT	SA-RT	SA-2X	SA-2X
Grupo espacial	<i>P22</i> ₂ ₁	<i>P6</i> ₄	<i>P2</i> ₁	<i>P6</i> ₃
Método	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor
Tipo de bandeja	Gota sentada	Gota sentada	Gota sentada	Gota sentada
Temperatura (°C)	25	25	25	25
Concentración de proteína (mg/mL)	10	10	10	10
Composición del tampón de la proteína	Tris 10 mM pH 8,0	Ácido acético/acetato sódico 10 mM pH 5,0	Tris 10 mM pH 8,0	Tris 10 mM pH 8,0
Composición de la disolución del reservorio	Sulfato amónico 1,5 M, PEG 4000 5%, Tris 0,1 M pH 8,0	Sulfato amónico 1,5 M, PEG 300 5%, ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 5,0	Sulfato amónico 2,0 M, LiCl 40 mM, glicerol 10%, PEG 300 5%, Mes 0,1 M pH 6,0	Sulfato amónico 0,9 M, PEG 300 5%, ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 4,0
Volumen y ratio de la gota (µL)	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	6, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	6, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio
Volumen del reservorio (µL)	200	1000	200	1000
Observaciones		Proteína incubada en 5% PEG 300 a 25 °C durante toda la noche	Proteína en complejo con VSL12 en proporción 1:2	
Imagen				

Tabla 4.7 (continuación). Condiciones de cristalización de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

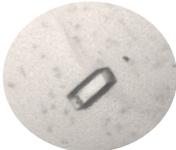
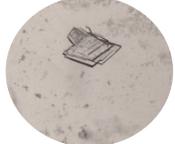
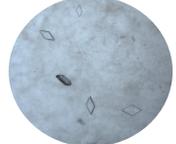
Proteína	SA-Src	AS-RT	AS-Src
Grupo espacial	$P2_1$	$P4_1$	$I2_12_12_1$
Método	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor
Tipo de bandeja	Gota sentada	Gota sentada	Gota sentada
Temperatura (°C)	4	25	10
Concentración de proteína (mg/mL)	4	8	8
Composición del tampón de la proteína	Tris 10 mM pH 8,0	Tris 10 mM pH 8,0	Tris 10 mM pH 8,0
Composición de la disolución del reservorio	Sulfato amónico 1,8 M, LiCl 40 mM, glicerol 10%, PEG 300 5%, ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 5,0	Sulfato amónico 2,0 M, Hepes 0,1 M pH 7,0	Sulfato amónico 1,6 M, LiCl 40 mM, glicerol 10%, PEG 200 5%, ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 5,5
Volumen y ratio de la gota (μL)	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	6, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio
Volumen del reservorio (μL)	200	200	200
Observaciones	1 μL de semillas fue añadido a la gota de cristalización. Los cristales obtenidos fueron usados en <i>macroseeding</i>		1 μL de semillas fue añadido a la gota de cristalización
Imagen			

Tabla 4.7 (continuación). Condiciones de cristalización de las quimeras Src-Abl y Abl-Src.

Proteína	AS-2X	AS-2X	AS-2X
Grupo espacial	$P4_1$	$P2_122_1$	$P2_122_1$
Método	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor	Difusión en el vapor
Tipo de bandeja	Gota sentada	Gota sentada	Gota sentada
Temperatura (°C)	15	15	10
Concentración de proteína (mg/mL)	10	10	10
Composición del tampón de la proteína	Tris 10 mM pH 8.0	Tris 10 mM pH 8.0	Tris 10 mM pH 8.0
Composición de la disolución del reservorio	Sulfato amónico 1,8 M, Mes 0,1 M pH 6,0	Sulfato amónico 1,8 M, Mes 0,1 M pH 6,0	Sulfato amónico 2,6 M, LiCl 40 mM, glicerol 10%, PEG 200 5%, Mes 0,1 M pH 6,5
Volumen y ratio de la gota (µL)	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio	4, ratio 1:1 proteína a disolución de reservorio
Volumen del reservorio (µL)	200	200	200
Observaciones			
Imagen			

4.1.3.1 Estructura de la quimera SA-RT

En la quimera SA-RT el lazo RT del dominio c-Src-SH3 ha sido reemplazado por el del dominio Abl-SH3 (E93V-S94A-R95S-T96G). Las estructuras obtenidas de este dominio son:

- *Estructura del monómero.* Se cristalizó en presencia de sulfato amónico 1,5 M y Tris 0,1 M pH 8,0, en el grupo espacial $P22_12_1$ con parámetros de celdilla unidad $a=26,0 \text{ \AA}$, $b=41,5 \text{ \AA}$, $c=52,2 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, y una sola molécula en la unidad asimétrica (PDB:7PVY).
- *Estructura del dímero entrecruzado.* Los cristales fueron obtenidos en presencia de sulfato amónico 1,5 M y 5 % de PEG 300 en tampón ácido acético/acetato sódico pH 5,0. El grupo espacial fue $P6_4$ y la celdilla unidad $a=b=48,8 \text{ \AA}$, $c=90,9 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ y $\gamma=120^\circ$ (PDB:7PVZ).

La tabla 2 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de estas estructuras. A diferencia del dominio nativo, esta quimera presenta una sola molécula en la unidad asimétrica en la estructura del monómero.

El monómero del dominio c-Src SH3 cristaliza en dos conformaciones distintas en su unidad asimétrica (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). En la figura 4.7 se comparan la cadena A de la quimera SA-RT con ambas cadenas, A y B, de la c-Src-SH3. Tal y como muestran los valores de RMSD, el dominio SA-RT posee una mayor similitud a la cadena B del dominio nativo.

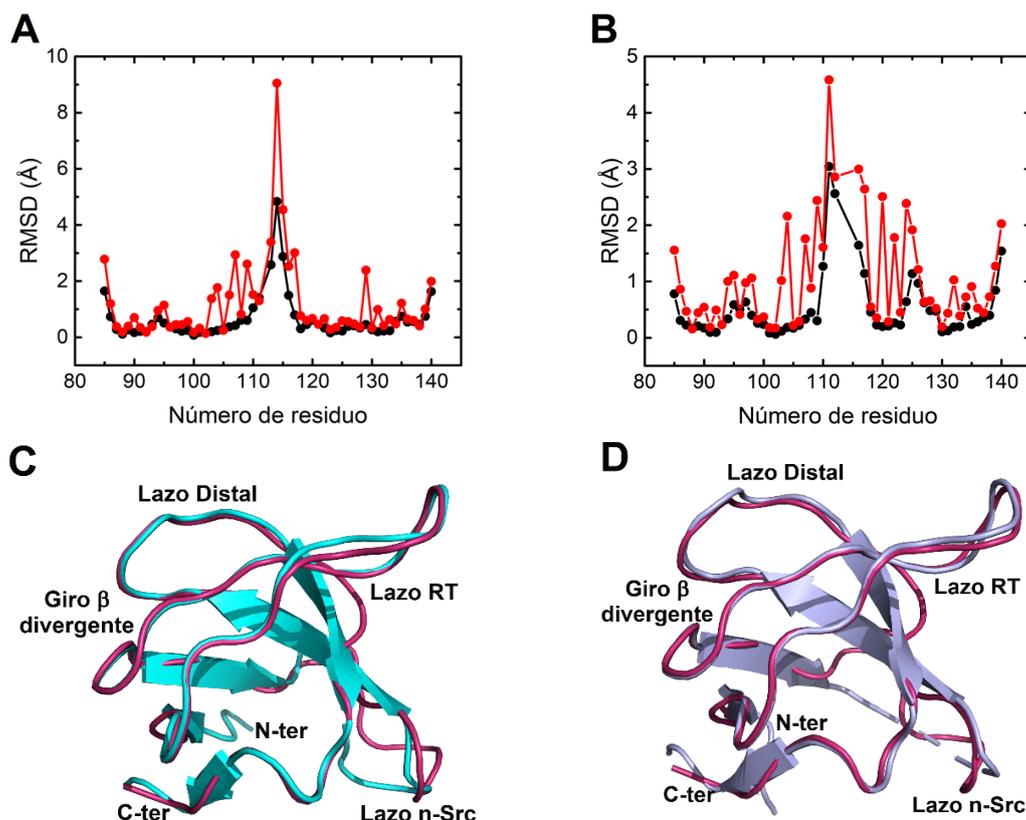


Figura 4.7. RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena A de la SA-RT (PDB:7PVY) a las cadenas (A) A y (B) B del dominio nativo (PDB:6XVN). El valor medio de RMSD para la cadena A es 0,64 Å y para la B 0,52 Å. Superposición de la cadena A de la SA-RT (magenta) con las cadenas (C) A (cian) y (D) B (lila) del dominio c-Src-SH3 (PDB:6XVN).

A pesar de que las mutaciones se encuentran en el lazo RT, las mayores diferencias entre ambas cadenas pueden ser encontradas en el lazo n-Src, que suele mostrar una gran flexibilidad (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). La figura 4.8 muestra los valores de los factores B de la SA-RT en su estado monomérico.

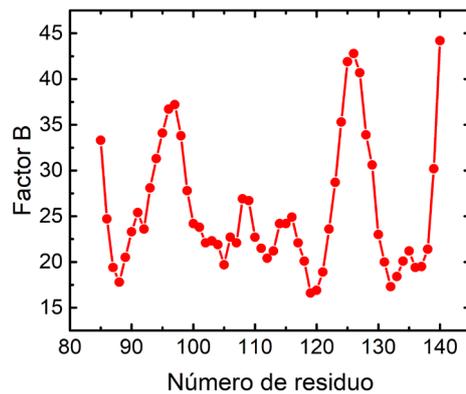


Figura 4.8. Factores B de los residuos de la cadena principal de la quimera SA-RT en su estado monomérico (PDB:7PVY).

Se observa una reducción en el número de enlaces de hidrógeno que se establecen entre los residuos del lazo RT cuando se compara con la proteína nativa. Los aminoácidos ionizables Glu93 y Arg95 han sido sustituidos por un aminoácido alifático, Val93, y polar, Ser95, que además presentan una cadena lateral más corta. En el cristal de la proteína nativa la Arg95 de la cadena A interacciona con el Glu97 de la cadena B y esta interacción no es posible en esta quimera. Además, la quimera SA-RT presenta la mutación Thr96Gly, por lo que se pierde la interacción con la Thr98 tanto directamente, como a través de una molécula de agua. Así mismo, la sustitución de serina por alanina en la posición 94, introduce un aminoácido apolar en la posición de uno polar, lo que elimina la interacción con moléculas de agua a través de su cadena lateral (Figura 4.9).

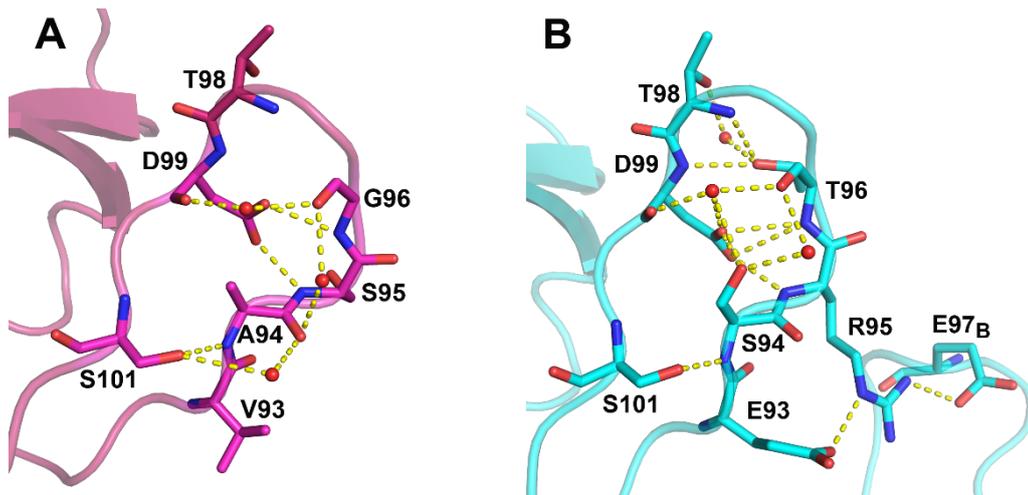


Figura 4.9. Comparación de la red de enlaces de hidrógeno en el lazo RT en la quimera SA-RT (magenta) (PDB: 7PVY) y la cadena A de la c-Src-SH3 (cian) (PDB: 6XVN). Las interacciones se muestran en amarillo y las moléculas de agua en rojo.

También se ha obtenido la estructura del dímero entrecruzado de la quimera SA-RT. Aunque el lazo bisagra es el mismo que en el caso del dominio nativo, el lazo n-Src, este dímero tiene una orientación diferente de las cadenas de protómero en la unidad asimétrica comparadas con las estructuras previas del dímero entrecruzado de la c-Src-SH3 nativa y mutantes. La comparación del dímero con su correspondiente monómero, excluyendo el lazo bisagra muestra que los valores de RMSD obtenidos para las cadenas principales son 0,31 y 0,38 Å, para los residuos Thr85-Val111 y Trp118-Ser140, respectivamente, lo que indica que no hay cambios aparentes entre la estructura monomérica y dimérica más allá de la apertura del lazo bisagra (Figura 4.10).

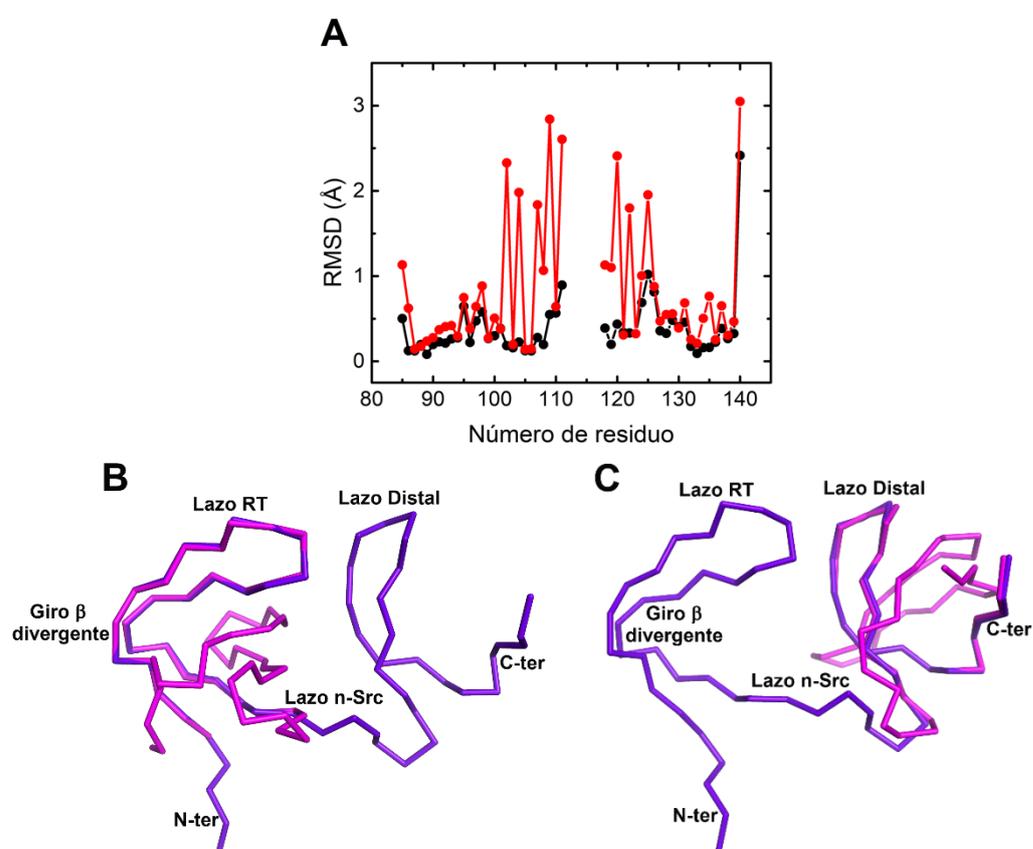


Figura 4.10. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena A del monómero de la SA-RT (PDB:7PVY) al protómero abierto del dímero entrecruzado de la SA-RT (PDB:7PVZ). Superposición de la cadena A del monómero SA-RT (magenta) al protómero abierto (violeta) del dímero entrecruzado entre los aminoácidos (B) Thr84-Val111 y (C) Trp118-Ser140.

En este caso, al igual que ocurre en la forma monomérica, los lazos RT y distal son los que presentan mayor flexibilidad, tal y como indican sus valores de factor B (Figura 4.11).

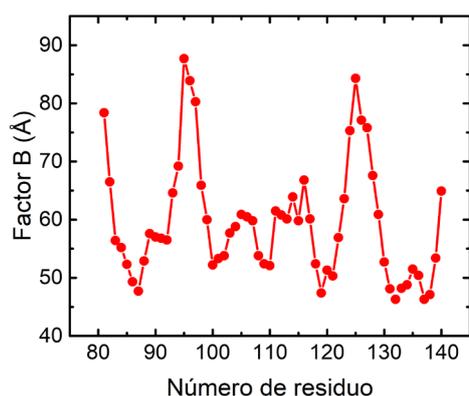


Figura 4.11. Factores B de los residuos de la cadena principal de la quimera SA-RT en su estado de dímero entrecruzado (PDB:7PVZ).

La comparación de los protómeros abiertos del dímero entrecruzado de la quimera SA-RT y el del dominio nativo muestra unos valores de RMSD para las cadenas principales de 0,43 y 0,49 Å, para los aminoácidos Thr84-Val111 y Trp118-Ser140, respectivamente (Figura 4.12). Por lo tanto, si se excluyen los residuos del lazo bisagra, las estructuras son muy similares.

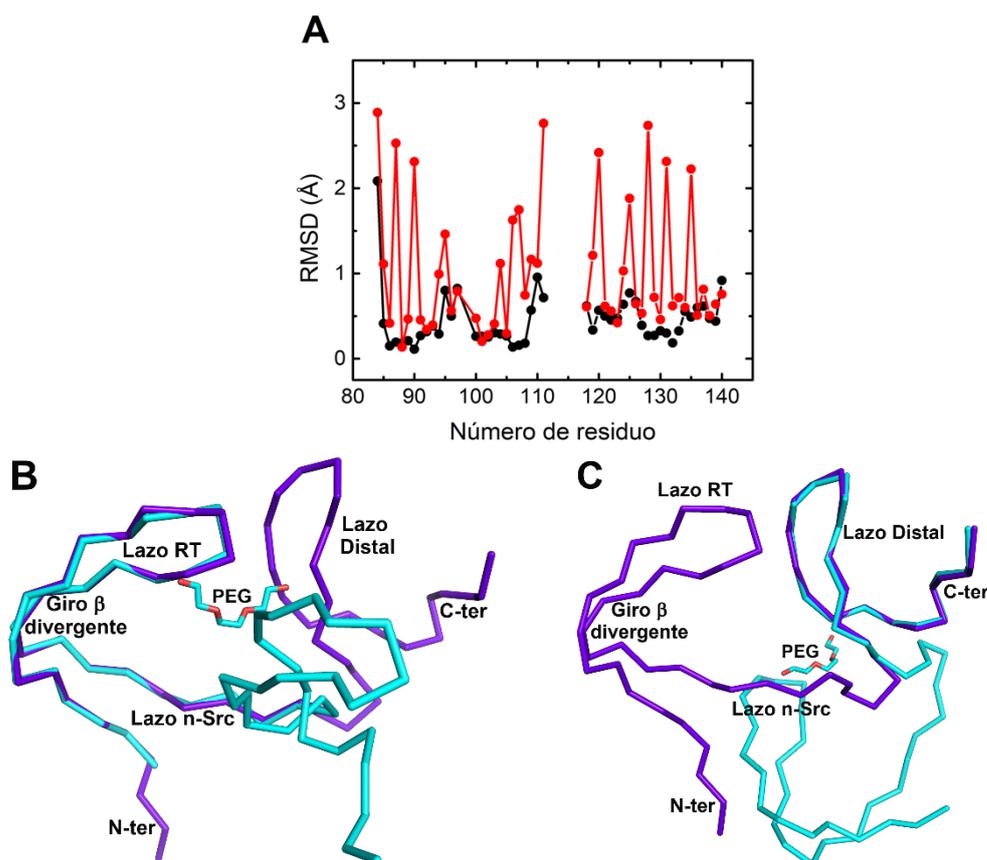


Figura 4.12. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena del protómero abierto del dímero entrecruzado de la SA-RT (PDB:7PVZ) con el dominio nativo (PDB:6XVO). Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado de la SA-RT (violeta) con la del dominio c-Src-SH3 (cian), entre los aminoácidos (B) Thr84-Val111 y (C) Trp118-Ser140. La molécula de PEG que aparece en la interfaz del dímero del dominio nativo también ha sido representada.

Si comparamos las interacciones que se producen en el dímero entrecruzado del dominio c-Src-SH3 (Cámara-Artigas *et al.*, 2009, Bacarizo *et al.*, 2014) con las que se dan en el dímero SA-RT, podemos observar que la interacción entre las cadenas laterales de los residuos Glu106_A (OE2) y Ser123_B (OG) se conserva. Este enlace de hidrógeno juega un papel clave en el plegamiento del dominio y, tal como se ve en la estructura del dímero entrecruzado, el cambio de orientación de las cadenas del dímero no afecta a dicho enlace (Figura 4.13).

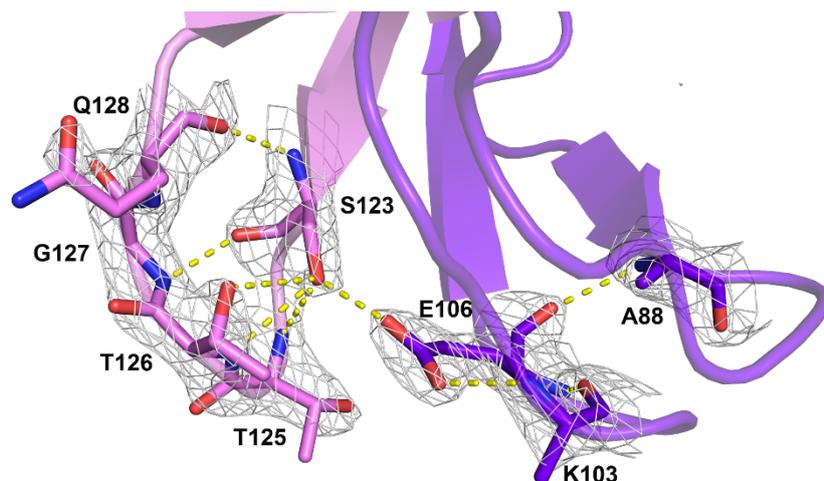


Figura 4.13. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a $1,5 \sigma$ de la distribución de enlaces de hidrógeno en el sitio de nucleación en las cadenas A (violeta) y B (rosa), generada por simetría, de la SA-RT. Los puentes de hidrógeno se representan en amarillo.

Sin embargo, algunas otras interacciones que estabilizan el dímero del dominio nativo, no están presente en este, como por ejemplo el puente salino entre los residuos Glu115_A-Arg95_B y Glu115_B-Arg95_A. En la quimera SA-RT la mutación Arg95Ser impide la formación de este puente salino. También se pierde la red de enlaces de hidrógeno en la que está implicado el residuo Thr96, mutado a glicina, con varias moléculas de agua. Estos cambios pueden ser los responsables de la distinta orientación de las cadenas del dímero entrecruzado de la quimera SA-RT. En la figura 4.14 se representa el lazo RT de ambos dominios, así como las interacciones en las que están implicados los residuos mutados.

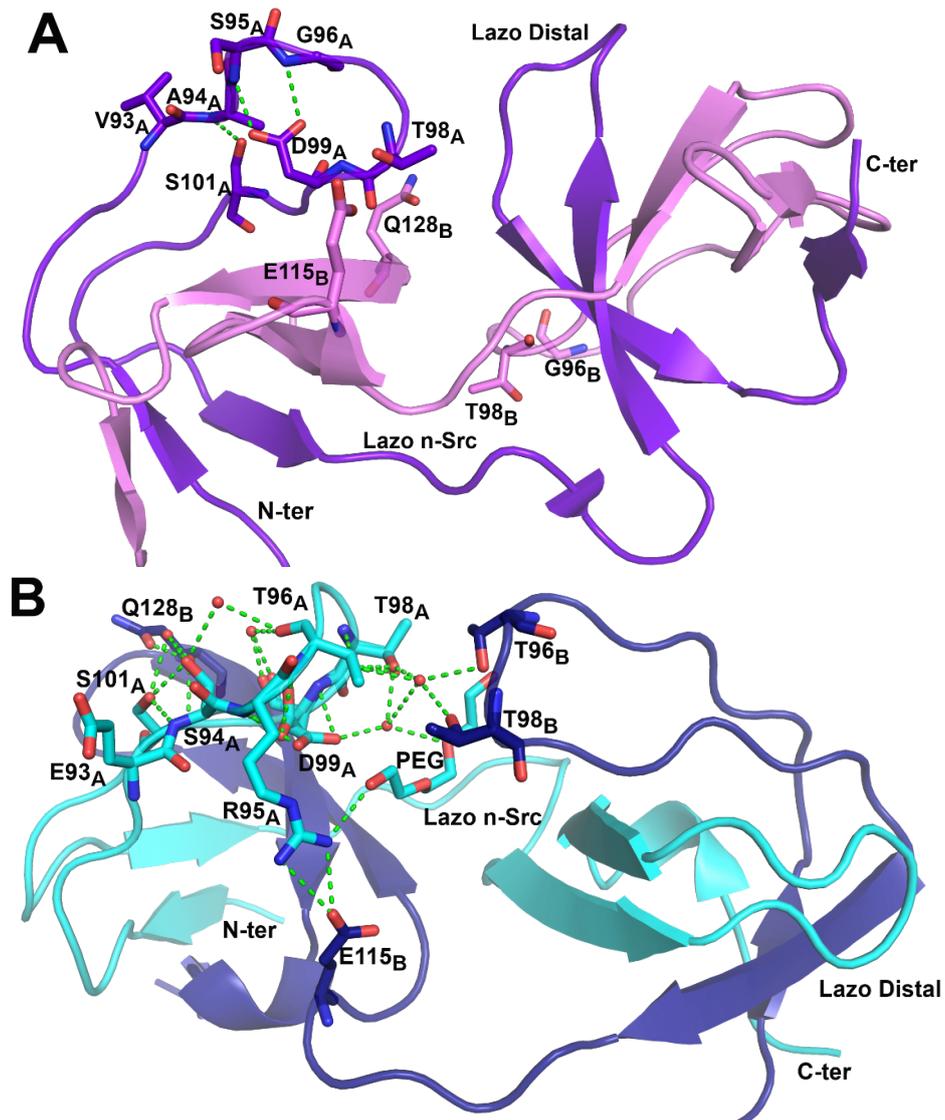


Figura 4.14. Representación gráfica de las interacciones que se producen en el lazo RT en (A) SA-RT (violeta, y la cadena generada por simetría, rosa) y (B) c-Src-SH3 (cian, y la cadena generada por simetría, azul oscuro). Los puentes de hidrógeno se han representado en verde y las moléculas de agua en rojo.

Algunas interacciones descritas para el dominio nativo se mantienen en el dímero de SA-RT, como la que se produce entre las cadenas principales de los residuos Trp118 y Glu115, y las cadenas laterales de Asp99 (OD2) y Tyr92 (OH). Al igual que otros dímeros de la c-Src, este dímero cristaliza a pH ácido. Tal como hemos obtenido en las medidas de DLS, el dímero del dominio nativo está favorecido a estos pHs, en los que es de esperar que el residuo Asp117 se encuentre protonado y de esta forma se evite el efecto repulsivo entre las cargas de los residuos Asp117_A y Asp117_B (Cámara-Artigas *et al.*, 2009, Bacarizo *et al.*, 2014, Cámara-Artigas *et al.*, 2014). Sin embargo, estos dos residuos no interaccionan entre sí en el dímero entrecruzado de la SA-RT (Figura 4.15).

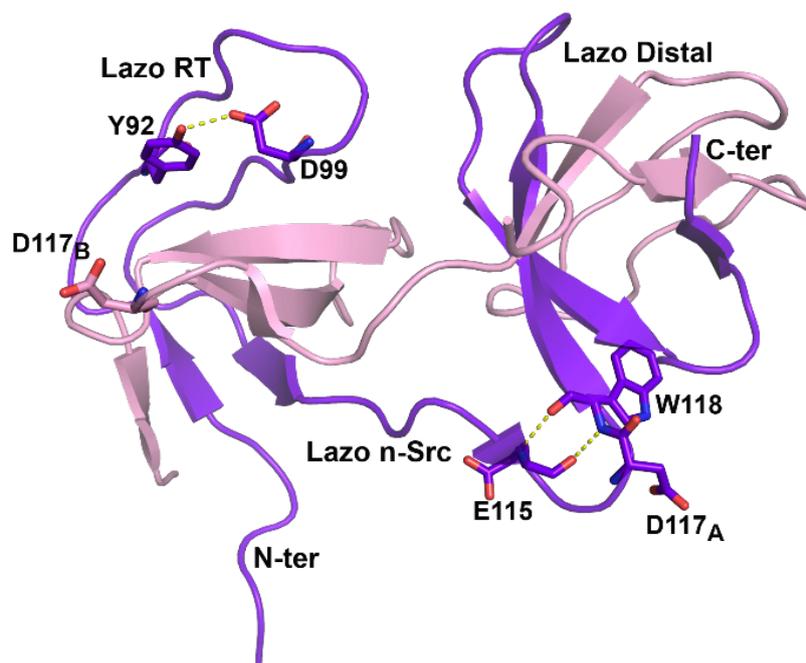


Figura 4.15. Representación gráfica de algunas de las interacciones que se producen en el dímero entrecruzado de la SA-RT. Los aminoácidos implicados están representados en bastones y los puentes de hidrógeno en amarillo.

Además, se han comparado las variaciones en los ángulos diedros de los dominios nativos Abl-SH3, c-Src-SH3 y SA-RT en sus formas monomérica y dimérica (Tabla 4.8). Los ángulos diedros muestran que en SA-RT aparece un giro β tipo II en el lazo n-Src formado por los residuos Glu115-Glu116-Asp117-Trp118.

Tabla 4.8. Ángulos diedros de los residuos de los lazos RT^A y n-Src^A.

c-Src	ϕ 6XVN ¹	ψ 6XVN	Φ 6XVO ²	Ψ 6XVO	Abl ³	ϕ	ψ	SA-RT	ϕ 7PVY ⁴	ψ 7PVY	ϕ 7PVZ ⁵	ψ 7PVZ
Y92	-135,8	125,1	-136,2	127,1	F72	-140,5	125,9	Y92	-136,7	129,8	-137,6	133,3
E93	-99,0	128,6	-103,1	129,1	V73	-93,7	126,1	V93	-105,9	121,5	-112,4	124,8
S94	-58,0	133,9	-62,8	142,0	A74	-53,0	136,3	A94	-62,7	139,1	-75,3	145,2
R95	-128,3	0,6	-87,7	-17,1	S75	-127,0	-72,6	S95	-109,9	-5,7	-105,0	-30,3
T96	-130,0	179,1	90,1	-3,2	G76	-99,7	174,7	G96	-136,3	-160,1	-103,7	-154,8
E97	-73,5	-17,8	-59,9	140,9	D77	-47,1	130,9	E97	-95,1	-12,4	-119,4	1,0
T98	-125,5	-3,1	-108,0	176,4	N78	71,7	18,3	T98	-119,9	-8,5	-106,7	-9,8
V111	-104,0	25,3	-107,2	106,2	L91	-94,3	-28,1	V111	-98,1	-37,7	-113,0	157,9
N112	SM	SM	-47,1	132,8	G92	166,7	-169,1	N112	-146,6	113,1	-91,2	153,7
N113	-108,4	-169,5	-161,9	171,5	Y93	-136,3	162,1	N113	-116,9	27,7	-54,1	-39,3
T114	-91,8	22,7	-75,9	-21,9	N94	-82,8	-172,2	T114	-53,7	-41,0	-129,6	145,4
E115	-59,6	142,7	-72,2	-25,8	H95	-63,2	-37,4	E115	-95,9	151,2	-132,6	95,2
G116	75,9	-166,4	79,0	178,5	N96	-99,5	-0,9	G116	-89,1	-17,9	63,2	-109,7
D117	-110,5	-14,1	-56,7	154,6	G97	82,1	1,8	D117	-95,4	-42,3	-106,3	14,9

¹ 6XVN: monómero de c-Src-SH3. ² 6XVO: dímero entrecruzado de c-Src-SH3. ³ 4JJC: monómero de Abl-SH3. ⁴ 7PVY: monómero de SA-RT. ⁵ 7PVZ: dímero entrecruzado de SA-RT. En negrita se muestran los residuos fuera de las regiones favorecidas del Ramachandran o que no han podido ser modelados (SM).

4.1.3.2 Estructura de la quimera SA-Src

En la quimera SA-Src el lazo n-Src del dominio c-Src-SH3 ha sido reemplazado por el del dominio Abl-SH3 (N112G-N113Y-T114N-E115H). La estructura obtenida de este dominio es:

Estructura del monómero. Los cristales fueron obtenidos en presencia de sulfato amónico 1,8 M, 5 % de PEG 300, 10% de glicerol y cloruro de litio 40 mM a pH 5,0, en tampón ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 5,5. Los cristales de esta proteína pertenecen al grupo espacial monoclinico $P2_1$, con una celdilla unidad $a=37,3 \text{ \AA}$, $b=93,1 \text{ \AA}$, $c=80,4 \text{ \AA}$, $\alpha=\gamma=90^\circ$ y $\beta=97^\circ$. Se modelaron hasta ocho moléculas en la unidad asimétrica (PDB:7PW0). Para obtener cristales de calidad a partir de los cuales obtener el patrón de difracción se aplicaron métodos de *micro* y *macro-siembra* a 4 °C. La tabla 3 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de esta estructura.

La superposición de cada una de las ocho moléculas presentes en la unidad asimétrica, tomando de referencia la cadena A, demuestra que se pueden diferenciar dos conformaciones preferentes: I, correspondiente a las cadenas A-D y II a las cadenas E-H (Figura 4.16). Los valores de RMSD obtenidos para cada cadena son: B, 0,11 Å; C, 0,09 Å; D, 0,14 Å; E, 0,61 Å; F, 0,63 Å; G, 0,60 Å; H, 0,53 Å.

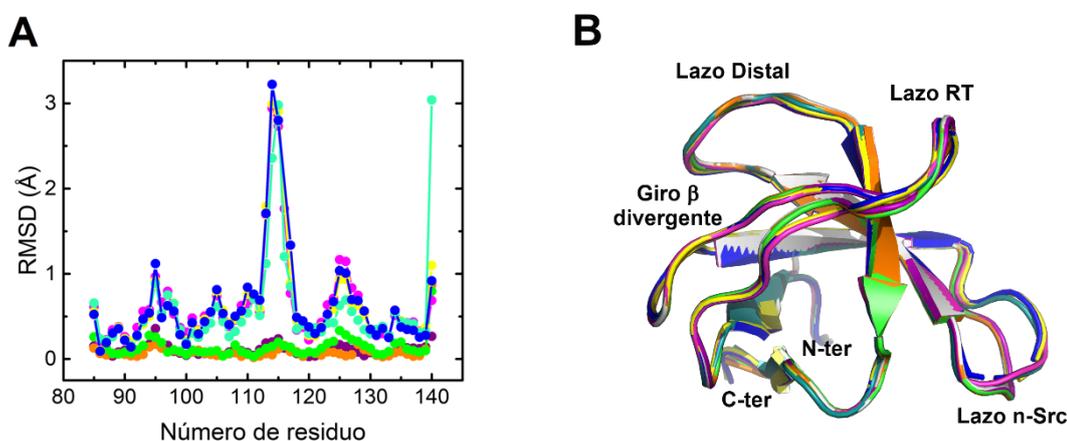


Figura 4.16. (A) RMSD obtenido al superponer las cadenas principales A-H presentes en la unidad asimétrica de la quimera SA-Src (PDB:7PW0). (B) Superposición de las cadenas A-H presentes en la unidad asimétrica de la SA-Src: A (blanco), B (violeta), C (naranja), D (verde), E (azul), F (magenta), G (amarillo) y H (cian oscuro).

Las mayores diferencias que se observan entre las dos conformaciones se localizan en el lazo n-Src y en menor medida, en los lazos RT y distal. En este último podemos encontrar diferencias significativas en la red de puentes de hidrógeno entre los residuos implicados en el estado de transición del plegamiento del dominio. Este resultado es

equivalente al encontrado en otras estructuras del dominio c-Src donde aparecen a menudo dos conformaciones, con diferencias notables en la red de enlaces de hidrógeno en el llamado sitio de nucleación (Bacarizo *et al.*, 2014). Como se puede observar en la Figura 4.17, en la conformación I se pierde el enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos Glu106 (OE1) y Ser123 (OG). En su lugar aparece una molécula de agua mediando este enlace.

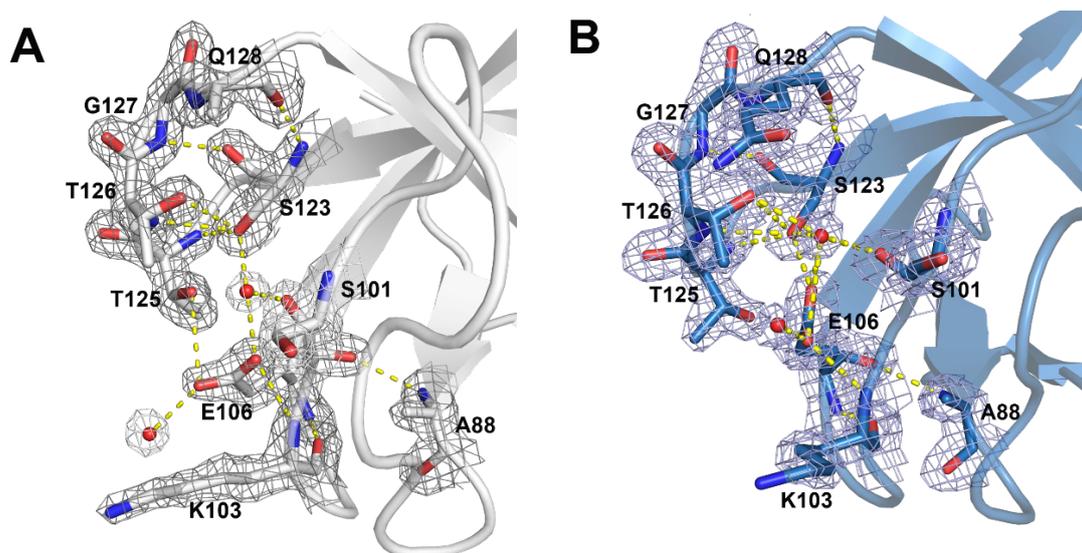


Figura 4.17. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a $1,5 \sigma$ del sitio de nucleación en las cadenas (A) A (blanco) y (B) E (azul) de la SA-Src. Los puentes de hidrógeno se representan en amarillo y las moléculas de agua en rojo.

La comparación del lazo n-Src entre las cadenas que muestran la conformación I y II muestra también diferencias en la distribución de enlaces de hidrógeno tal y como puede observarse en la figura 4.19. Esto es debido, tal como se ha indicado previamente, a la alta flexibilidad del lazo n-Src (Figura 4.18), por lo que es frecuente encontrarlo en distintas conformaciones en las que se establecen distintas interacciones entre los residuos implicados en este lazo y en otros elementos de estructura secundaria de la proteína.

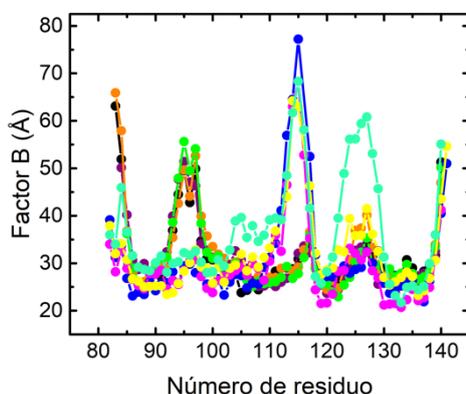


Figura 4.18. Factores B de los residuos de las cadenas principales de las cadenas A (negro), B (violeta), C (naranja), D (verde), E (azul), F (magenta), G (amarillo) y H (cian oscuro) de la SA-Src (PDB: 7PW0).

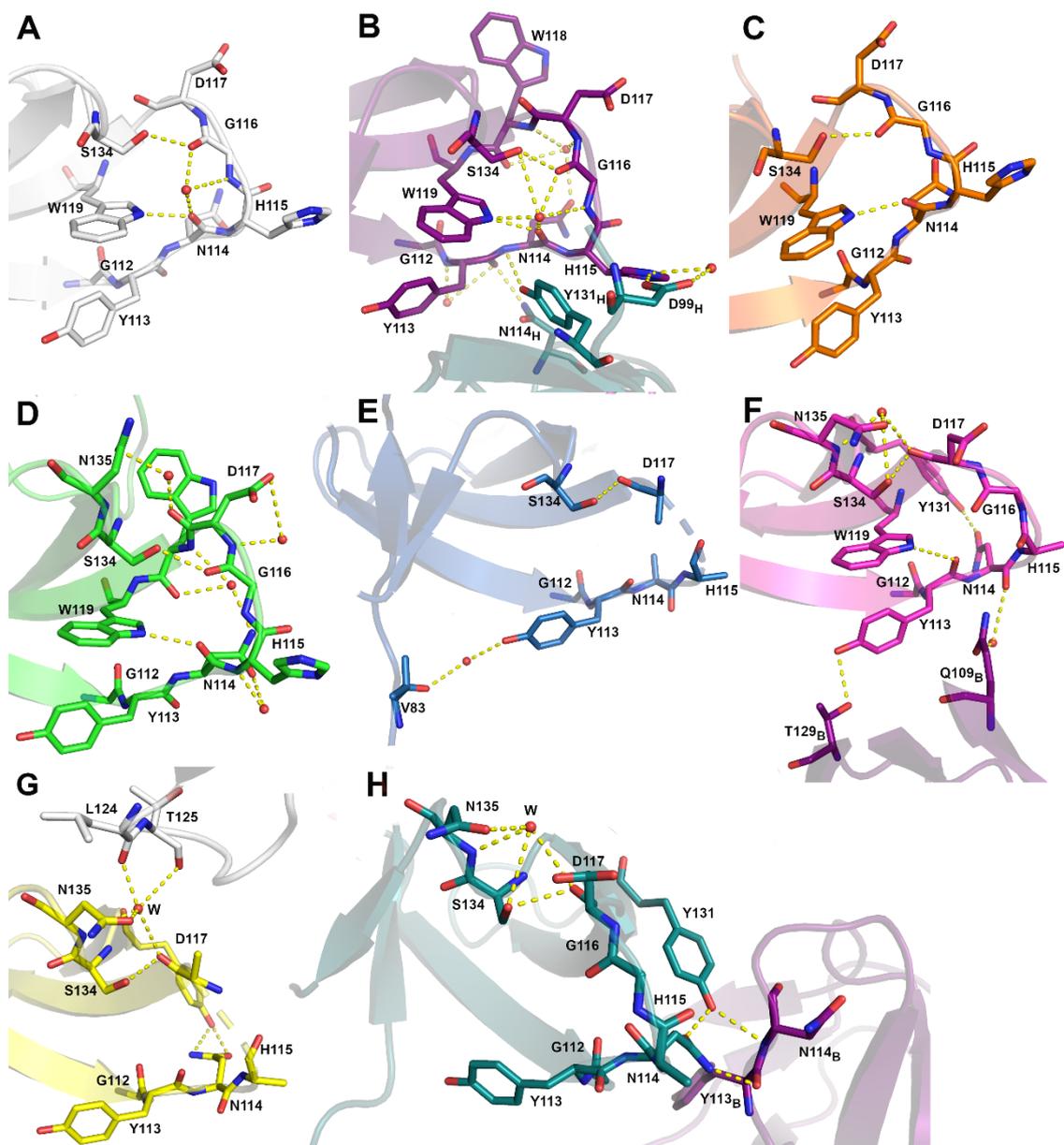


Figura 4.19. Representación gráfica de la distribución de enlaces de hidrógeno en el lazo n-Src de las cadenas A (blanco), B (violeta), C (naranja), D (verde), E (azul), F (magenta), G (amarillo) y H (cian oscuro) de la SA-Src. Los puentes de hidrógeno se representan en amarillo y las moléculas de agua en rojo.

Por último, hemos comparado las cadenas pertenecientes a las conformaciones I y II de la SA-Src con las presentes en el dominio nativo. Como en casos anteriores, la principal diferencia entre las cadenas principales aparece al comparar los residuos del lazo n-Src. Sin embargo, en el caso de la conformación I se observan valores mayores de RMSD en la cadena principal del lazo distal y del residuo Glu106 (Figura 4.20) que en el caso de la conformación II. Como se ha explicado anteriormente, en las cadenas A-D se produce un cambio de disposición en las interacciones que se dan en el núcleo de plegamiento.

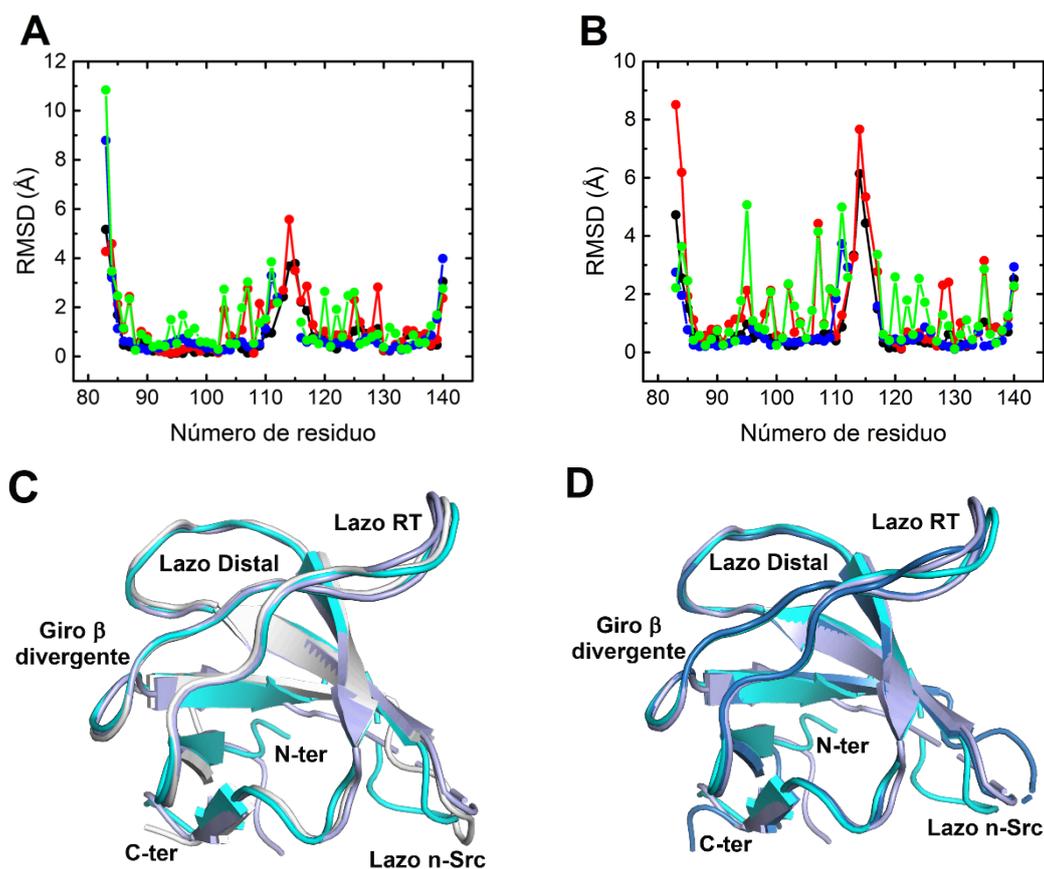


Figura 4.20. RMSD obtenido al superponer las cadenas principales (A, negro y B, azul) y laterales (A, rojo y B, verde) del dominio nativo c-Src-SH3 (PDB: 6XVN) a las cadenas (A) A (0,89 Å para A y B) y (B) E (0,88 Å para A y, 0,68 Å para B) presentes en la unidad asimétrica de la quimera SA-Src (PDB:7PW0). Superposición de las cadenas (C) A (blanco) y (D) E (azul) presentes en la unidad asimétrica de la SA-Src a las cadenas A (cian) y B (lila) del dominio nativo c-Src-SH3.

4.1.3.3 Estructura de la quimera SA-2X

En la quimera SA-2X los lazos RT y n-Src del dominio c-Src-SH3 han sido reemplazados por los del dominio Abl-SH3 (E93V-S94A-R95S-T96G-N112G-N113Y-T114N-E115H). Las estructuras obtenidas de este dominio son:

- *Estructura del monómero.* Los cristales fueron obtenidos en presencia de sulfato amónico 2,0 M, 5 % de PEG 300, 10% de glicerol y cloruro de litio 40 mM en tampón Mes 0,1 M pH 6,0. Los cristales pertenecían al grupo espacial monoclinico $P2_1$ con una celdilla unidad $a=29,0$ Å, $b=59,7$ Å, $c=37,3$ Å, $\alpha=\gamma=90^\circ$ y $\beta=99^\circ$ (PDB:7PVX) que contenían dos moléculas del dominio en la unidad asimétrica. La obtención de la estructura del monómero de esta quimera solo fue posible en presencia del péptido sintético de alta afinidad VSL12.
- *Estructura del dímero entrecruzado.* Los cristales se obtuvieron en presencia de sulfato amónico 0,9 M, 5% PEG 300, ácido acético/acetato sódico 0,1 M a pH

4,0, y pertenecían al grupo espacial $P6_3$ con parámetros de celdilla unidad $a=b=68,0 \text{ \AA}$, $c=46,2 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ y $\gamma=120^\circ$ (PDB:7PVW).

La tabla 4 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de estas estructuras. La estructura del complejo SA-2X-VSL12 (VSLARRPLPLP) presenta dos moléculas del complejo en la unidad asimétrica, A y C. La comparación de las cadenas principal y lateral de A y C, correspondientes al dominio SH3, en la unidad asimétrica de la SA-2X (Figura 4.21), resulta en un RMSD para la cadena principal de $0,37 \text{ \AA}$. Las principales diferencias se encuentran en los lazos RT y n-Src, los cuales son muy flexible, tal y como indican los valores de factor B (Figura 4.21.C).

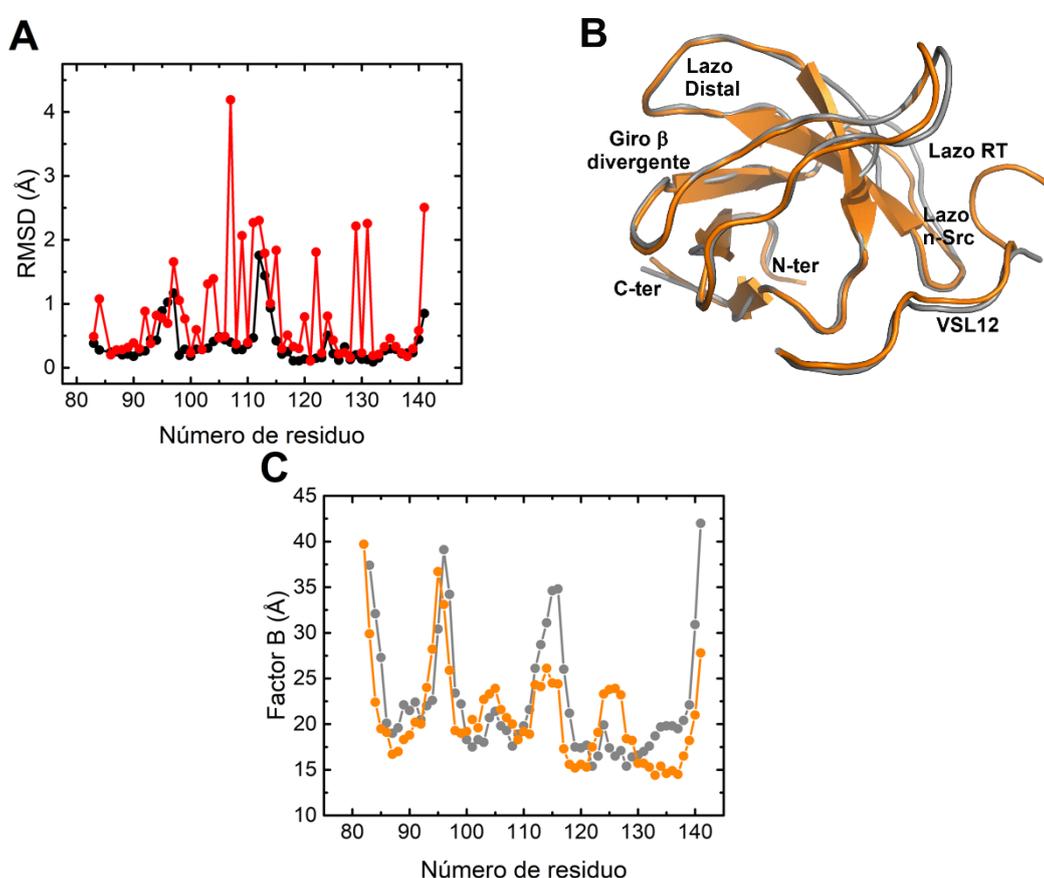


Figura 4.21. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena A y C presentes en la unidad asimétrica del monómero de la SA-2X-VSL12 (PDB:7PVX). (B) Superposición de las cadenas A (naranja) y C (gris) presentes en la SA-2X-VSL12. (C) Factores B de los residuos de la cadena principal de las cadenas A (naranja) y C (gris) del complejo SA-2X-VSL12.

La comparación el complejo SA-2X-VSL12 con la estructura del complejo del dominio nativo, que cuenta con una sola molécula en la unidad asimétrica (Figura 4.22), resulta en un valor RMSD para las cadenas principales de $0,62 \text{ \AA}$ para A y $0,59 \text{ \AA}$ para C. Las mayores diferencias con respecto del dominio nativo se encuentran en el lazo n-

Src, el cual sufre cambios conformacionales notables cuando se encuentra unido al péptido.

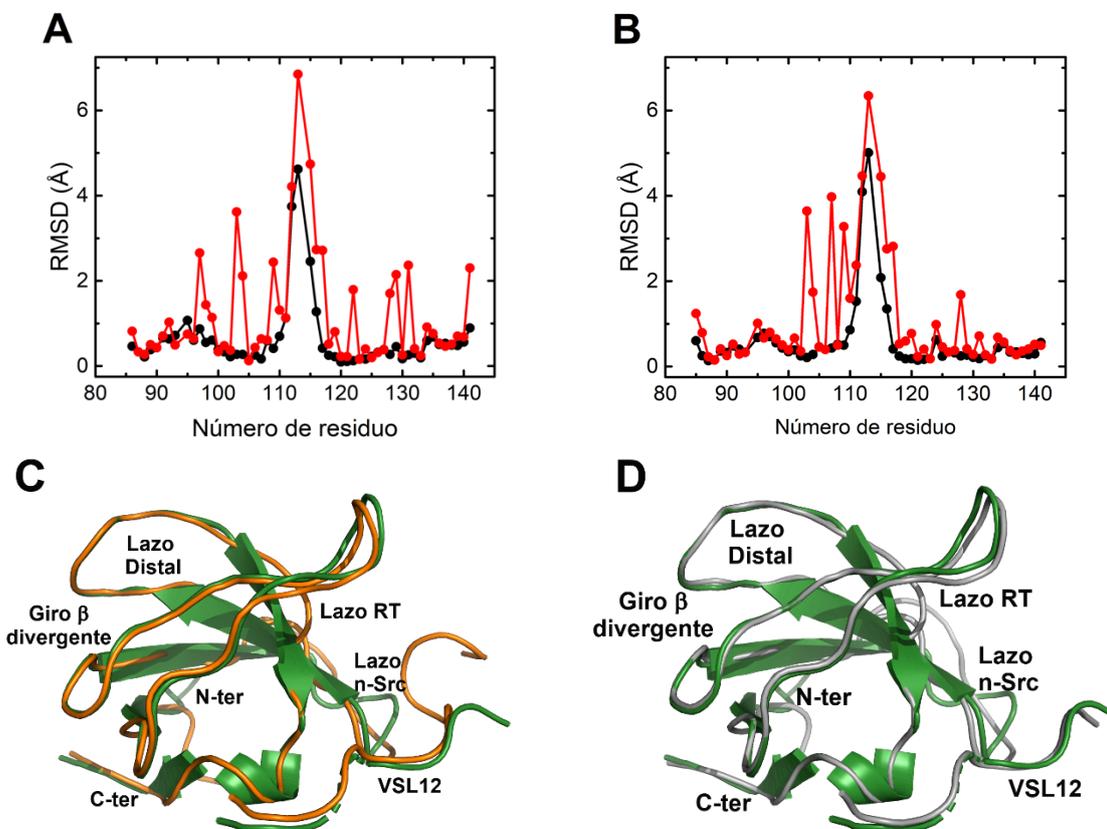


Figura 4.22. RMSD de la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la comparación de las cadenas (A) A y (B) C presentes en la unidad asimétrica del monómero de la SA-2X en complejo con el péptido VSL12 (PDB:7PVX) con la cadena A de la c-Src-WT en complejo con VSL12 (PDB:4RTZ). Superposición de las cadenas (C) A (naranja) y (D) C (gris) presentes en la unidad asimétrica de la SA-2X-VSL12 con la cadena A de la c-Src-VSL12 (verde oscuro) (PDB:4RTZ).

En la figura 4.23 y 4.24 se han comparado los lazos RT y n-Src de los complejos SA-2X-VSL12 y c-Src-SH3-VSL12. En el dominio nativo la Ser94, que se encuentra en doble conformación, interactúa con las cadenas principales de los residuos Thr96 y Asp99 a través de una molécula de agua. En la quimera, la mutación Ser94Ala elimina estas interacciones y las establece con la molécula de agua W₂₀₃ que favorece la interacción con otros residuos del lazo, papel similar al que realiza la W₃₂₂ en el dominio nativo (Figura 4.23).

En el caso del lazo n-Src, la conformación de este es significativamente diferente entre ambas estructuras, ya que la interacción entre la Asn112 (N) y la Leu120 (O) de la proteína nativa no se produce en el dominio SA-2X. En este caso la molécula de agua W₂₂₂, que aparece en ambos dominios, presenta una red de interacciones que se conservan en ambas estructuras (Figura 4.24).

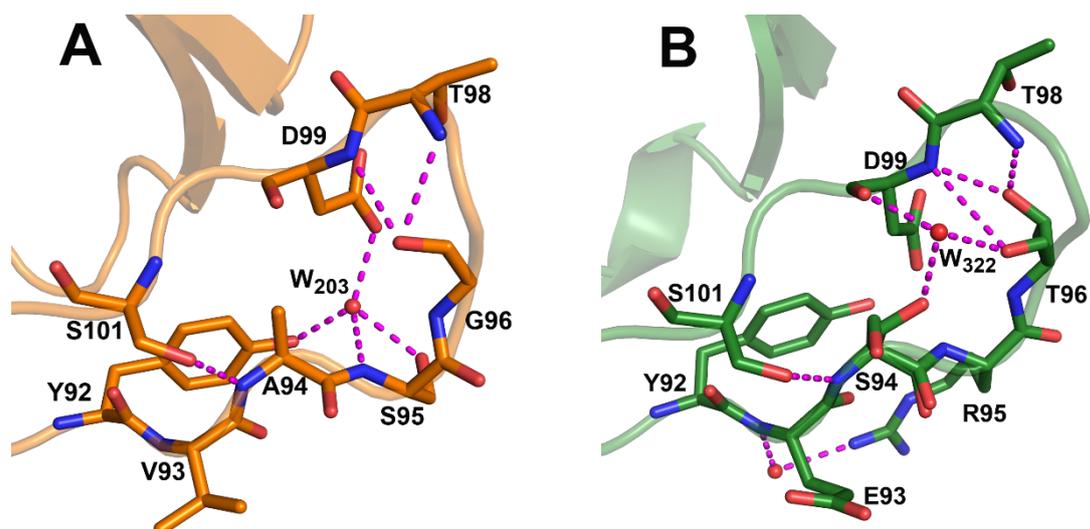


Figura 4.23. Comparación de las interacciones entre los residuos mutados en el lazo RT de (A) SA-2X-VSL12 (cadena A) y (B) c-Src-SH3-VSL12. Los puentes de hidrógeno y las aguas están representados en magenta y rojo, respectivamente.

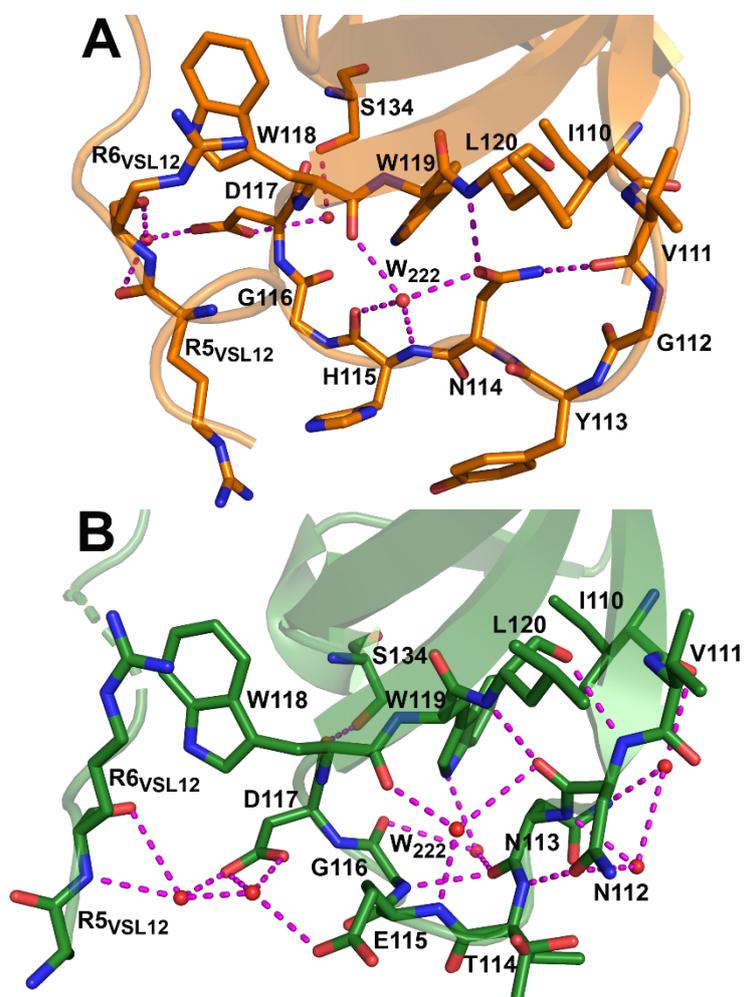


Figura 4.24. Comparación de las interacciones entre los residuos mutados en el lazo n-Src de (A) SA-2X-VSL12 (cadena A) y (B) c-Src-SH3-VSL12. Los puentes de hidrógeno y las aguas están representados de magenta y rojo, respectivamente.

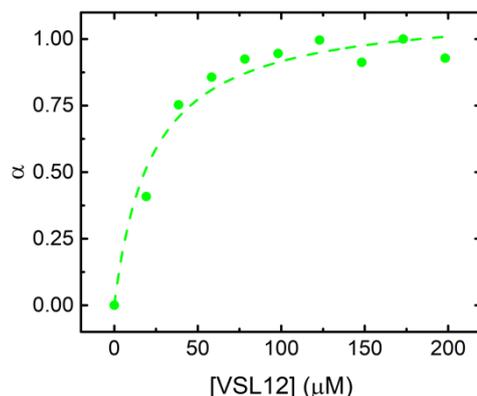


Figura 4.26. Determinación de la constante de unión del péptido VSL12 a la quimera SA-2X seguida por la amortiguación de la fluorescencia intrínseca de la proteína. Las curvas han sido ajustadas a la ecuación 2.5 tras representar la fracción de saturación (α) frente a la concentración de péptido (μM).

La comparación el dímero entrecruzado de la SA-2X con el dímero del dominio nativo muestra varias diferencias. Además de la diferencia en el lazo bisagra, que en el caso de la quimera SA-2X implica también el lazo RT, en esta estructura no se ha modelado ninguna molécula de PEG en la interfaz del dímero. La principal característica de este dímero es la presencia de dos lazos bisagra, donde los aminoácidos Thr96-Asp99, pertenecientes al lazo RT, y Gly112-Gly116, pertenecientes al lazo n-Src, aparecen en una conformación extendida. En este último lazo aparece una hélice 3_{10} que no aparece en el dominio nativo. La figura 4.27 A y 4.27 B muestra el dímero entrecruzado de la SA-2X y la c-Src-WT, respectivamente.

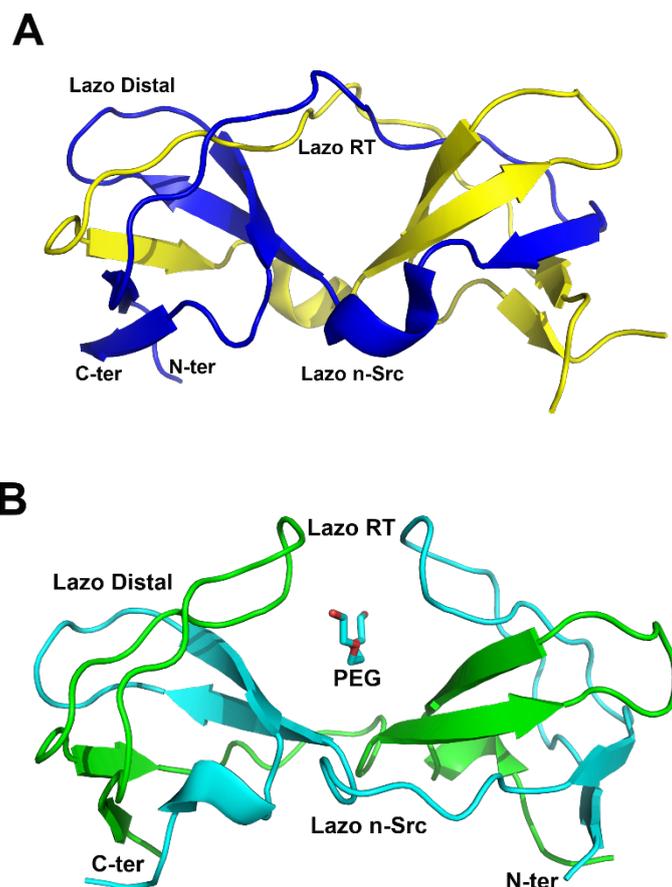


Figura 4.27. (A) Representación de la estructura de la SA-2X a pH 4,0 (azul oscuro). El dímero entrecruzado ha sido generado mediante simetría (amarillo). (B) Representación de la estructura de la c-Src-SH3 (cian). El dímero entrecruzado ha sido generado mediante simetría (verde). Este ha sido representado para facilitar la visualización de la diferente geometría que presenta la quimera respecto del dominio nativo.

Al comparar los protómeros abiertos del dímero entrecruzado de la quimera SA-2X y el del dominio nativo, los valores de RMSD obtenidos para las cadenas principales son 0,64 Å para los residuos Asp99-Val111 y 0,34 Å para los residuos Trp118-Ser140 (Figura 4.28).

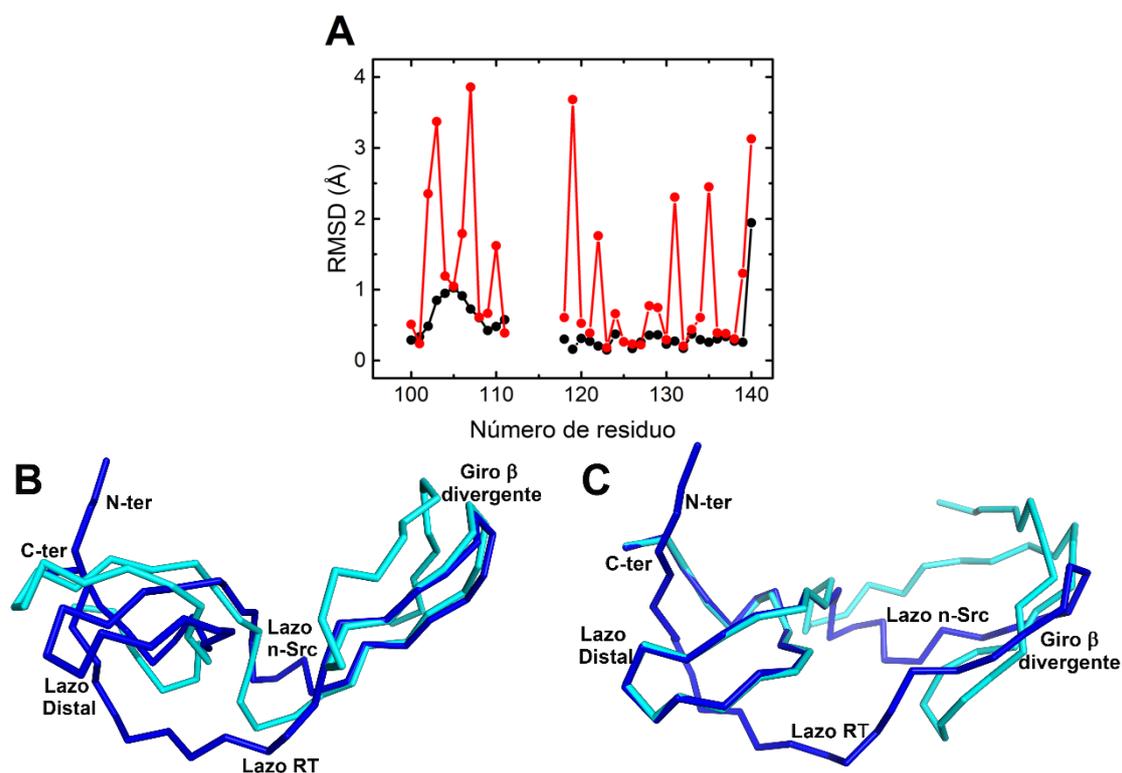


Figura 4.28. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) del protómero abierto del dímero entrecruzado de la SA-2X (PDB:7PVW) con el dominio nativo (PDB: 6XVO). Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado de la SA-2X (azul oscuro) con la del dominio c-Src-SH3 (cian), entre los aminoácidos (B) Asp99-Val111 y (C) Trp118-Ser140.

Al igual que ocurre en el dominio nativo, el residuo Asp117 se encuentra a una distancia de 2,5 Å y, por tanto, es de esperar que la formación de este dímero se establezca a pH ácido donde este residuo este protonado, para evitar la repulsión de cargas entre los residuos Asp117_A y Asp117_B (Figura 4.29).

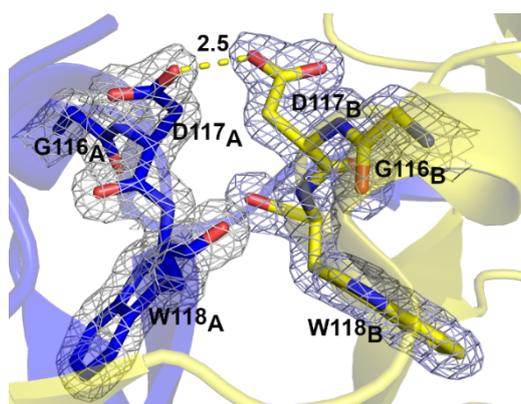


Figura 4.29. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a 1,5 σ de la interfaz del dímero entrecruzado de la SA-2X (PDB:7PVW), donde se muestra el enlace de hidrógeno establecido entre los aminoácidos Asp117_A-Asp117_B (distancia 2.5 Å). El grupo carboxílico de este aminoácido debe estar protonado para evitar la repulsión de cargas entre estos dos residuos. La cadena A se representa en azul oscuro y la cadena B, generada por simetría, en amarillo.

Debido a que no ha sido posible la obtención de la forma monomérica libre para SA-2X, hemos comparado el protómero abierto de esta con la cadena A del monómero del dominio nativo. Los valores de RMSD son 0,56 Å para los residuos Asp99-Val111 y 0,42 Å para los residuos Trp118-Ser140 (Figura 4.30).

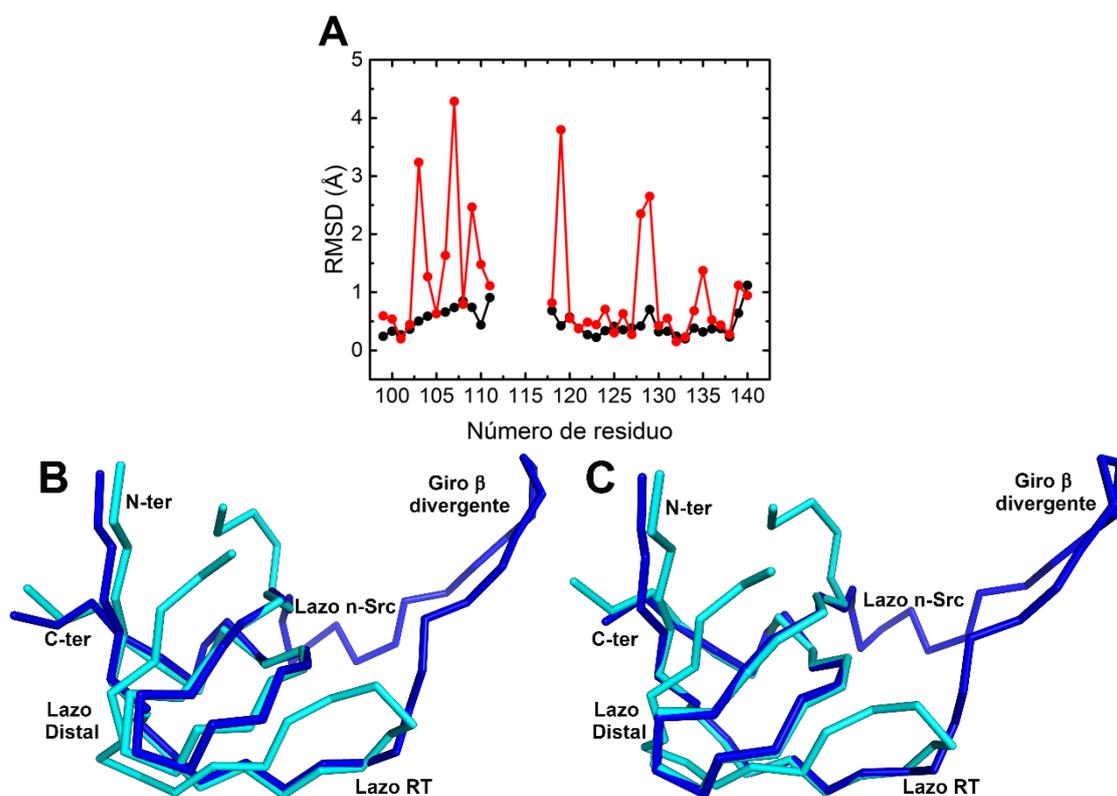


Figura 4.30. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena del protómero abierto del dímero entrecruzado de la SA-2X (PDB:7PVW) con la cadena A del monómero del dominio nativo (PDB: 6XVN). Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado de la SA-2X (azul oscuro) con la cadena A de c-Src-SH3 (cian), entre los aminoácidos (B) Asp99-Val111 y (C) Trp118-Ser140.

Estudios previos han demostrado que el residuo Arg128 estabiliza notablemente el dominio c-Src-SH3 (Bacarizo *et al.*, 2014). Hemos comparado el dímero entrecruzado de la quimera con esta mutación (Cámara-Artigas *et al.*, 2014) con la obtenida en esta Tesis. La comparación de ambas estructuras evidencia que no existen diferencias significativas entre ambas, tal como demuestra el valor de RMSD obtenido para los residuos de la cadena principal, que es de solo 0,36 Å (Figura 4.31). La red de enlaces de hidrógeno asociados a esta posición se muestra en la figura 4.32.

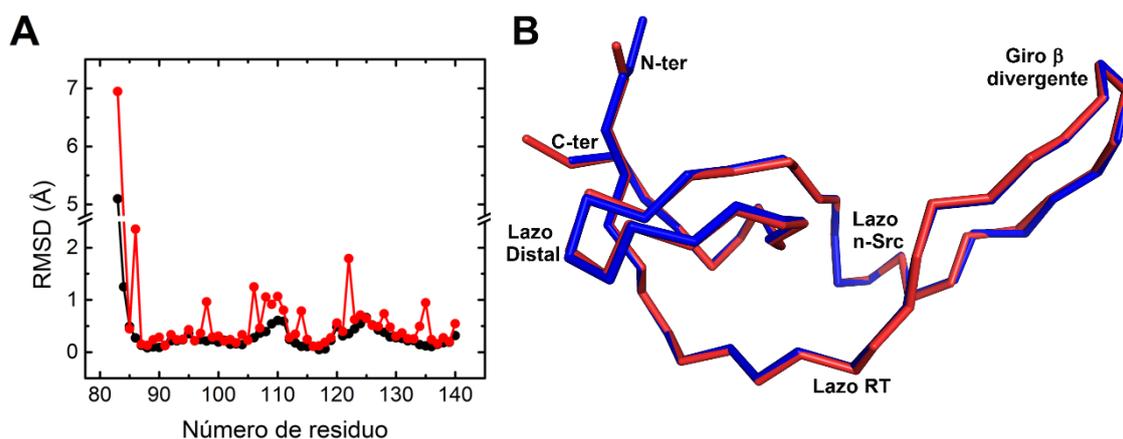


Figura 4.31. Comparación entre las quimeras SA-2X y SA-2X-Q128R. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) del protómero abierto del dímero entrecruzado de la SA-2X (PDB:7PVW) con el de la SA-2X-Q128R (PDB: 4LE9). (B) Superposición de la cadena abierta del dímero entrecruzado de la SA-2X (azul oscuro) con la del dominio SA-2X-Q128R (rojo).

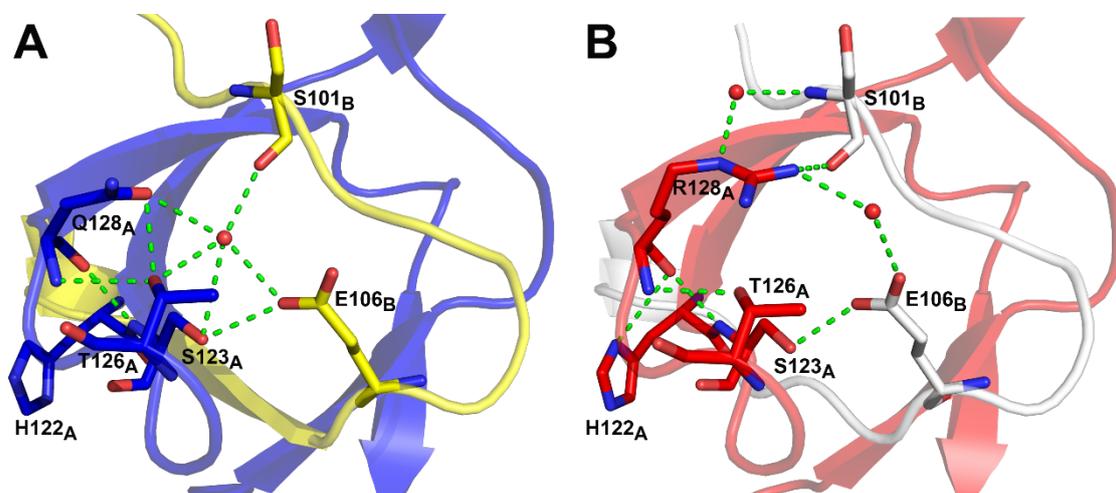


Figura 4.32. Comparación de las interacciones de la cadena lateral del residuo 128 en (A) SA-2X (cadena A, azul oscuro, y B, generada por simetría, amarillo) y SA-2X-Q128R (cadena A, rojo, y B, generada por simetría, blanco). Los puentes de hidrógeno y moléculas de agua se muestran en verde y rojo, respectivamente. Nótese que se conserva el puente de hidrógeno entre los residuos Ser123_A y Glu106_B, descrito en el dímero entrecruzado del dominio nativo (PDB: 6XVO).

La tabla 4.9 muestra la comparación de la variación en los ángulos diedros de los dominios nativos c-Src-SH3, en su forma monomérica y dimérica, Abl-SH3, en su forma monomérica, y la forma dimérica de SA-2X y SA-2X-Q128R. Los ángulos diedros muestran que, al igual que ocurre en SA-2X-Q128R, aparece una hélice 3_{10} en el lazo n-Src formada por los residuos Tyr113-Asn114-His115 (Cámara-Artigas *et al.*, 2014).

Tabla 4.9. Ángulos diedros de los residuos de los lazos RT^A y n-Src^A.

c-Src	ϕ 6XVN ¹	ψ 6XVN	ϕ 6XVO ²	ψ 6XVO	Abl ³	ϕ	ψ	SA-2X	ϕ 7PVW ⁴	ψ 7PVW	ϕ 4LE9 ⁵	ψ 4LE9
Y92	-135,8	125,1	-136,2	127,1	F72	-140,5	125,9	Y92	-136,2	127,1	-139,9	126,8
E93	-99,0	128,6	-103,1	129,1	V73	-93,7	126,1	V93	-103,1	129,1	-104,7	127,8
S94	-58,0	133,9	-62,8	142,0	A74	-53,0	136,3	A94	-62,8	142,0	-66,1	144,8
R95	-128,3	0,6	-87,7	-17,1	S75	-127,0	-72,6	S95	-87,7	-17,1	-87,1	-24,5
T96	-130,0	179,1	90,1	-3,2	G76	-99,7	174,7	G96	90,1	-3,2	-94,0	3,0
E97	-73,5	-17,8	-59,9	140,9	D77	-47,1	130,9	E97	-59,9	140,9	-61,7	142,8
T98	-125,5	-3,1	-108,0	176,4	N78	71,7	18,3	T98	-108,0	176,4	-107,0	178,2
V111	-104,0	25,3	-107,2	106,2	L91	-94,3	-28,1	V111	-107,0	138,5	-100,2	125,2
N112	SM	SM	-47,1	132,8	G92	166,7	-169,1	G112	65,3	34,4	66,8	40,8
N113	-108,4	-169,5	-161,9	171,5	Y93	-136,3	162,1	Y113	-52,0	-34,5	-49,8	-37,5
T114	-91,8	22,7	-75,9	-21,9	N94	-82,8	-172,2	N114	-61,8	-20,9	-62,1	-16,6
E115	-59,6	142,7	-72,2	-25,8	H95	-63,2	-37,4	H115	-82,7	-10,0	-83,0	-8,4
G116	75,9	-166,4	79,0	178,5	N96	-99,5	-0,9	G116	90,9	-173,4	86,8	-176,5
D117	-110,5	-14,1	-56,7	154,6	G97	82,1	1,8	D117	-86,7	170,3	-84,9	173,6

¹ 6XVN: monómero de c-Src-SH3. ² 6XVO: dímero entrecruzado de c-Src-SH3. ³ 4JJC: monómero de Abl-SH3. ⁴ 7PVW: dímero entrecruzado de SA-2X. ⁵ 4LE9: dímero entrecruzado de SA-2X-Q128R. En negrita se muestran los residuos fuera de las regiones favorecidas del Ramachandran o que no han podido ser modelados (SM).

4.1.3.4 Estructura de la quimera AS-RT

En la quimera AS-RT el lazo RT del dominio Abl-SH3 ha sido reemplazado por el del dominio c-Src-SH3 (V73E-A74S-S75R-G76T-D77E). La estructura obtenida de este dominio es:

Estructura del monómero. Los cristales se obtuvieron en presencia de sulfato amónico 2,0 M y Hepes 0,1 M pH 7,0, en el grupo espacial $P4_1$ con parámetros de celdilla unidad $a=b=42,6 \text{ \AA}$, $c=30,4 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, y una sola molécula en la unidad asimétrica (PDB:PW2). La tabla 5 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de esta estructura.

La comparación de la quimera AS-RT con la Abl-SH3 nativa (Figura 4.33) resulta en un RMSD para la cadena principal de 0,51 Å. En este caso, la diferencia más notable se encuentra en el lazo RT, donde se localizan las mutaciones, y en el lazo n-Src. Ambos lazos muestran una alta flexibilidad, tal y como indican sus valores de factor B (Figura 4.33 C).

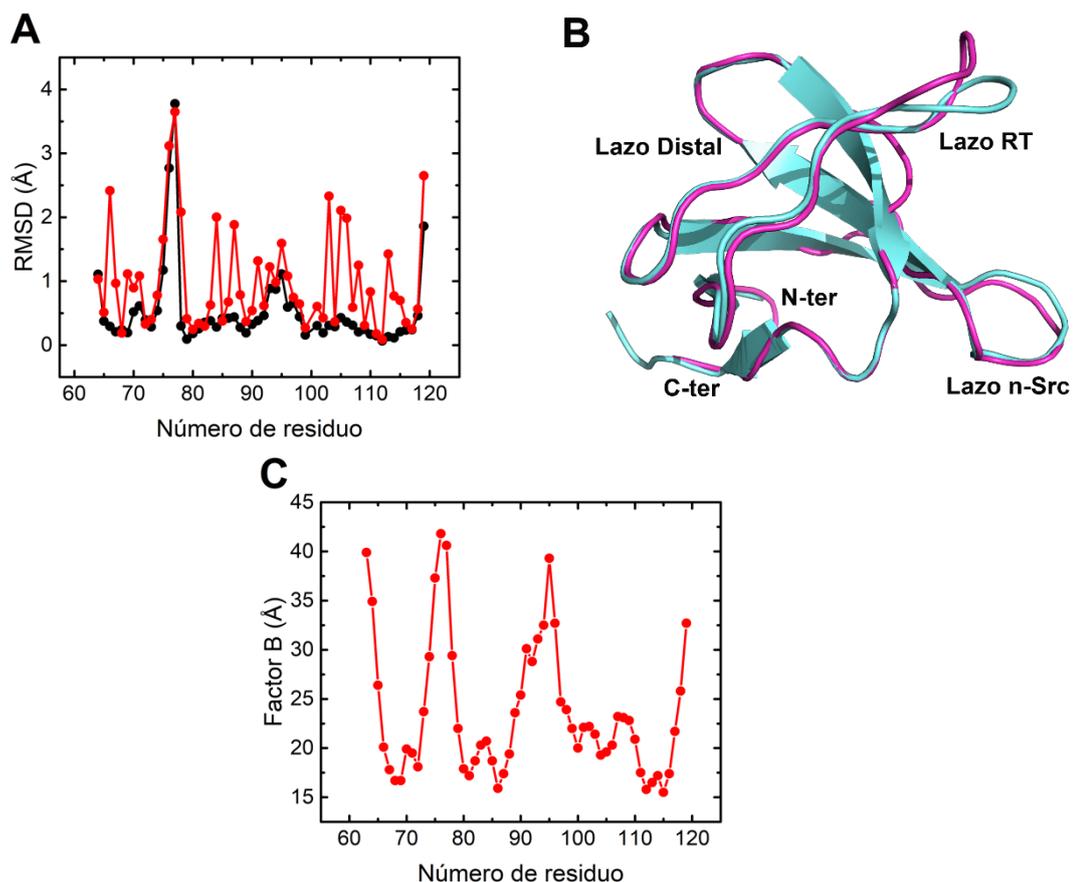


Figura 4.33. (A) RMSD obtenido al superponer las cadenas principales (negro) y laterales (rojo) de la cadena A presente en la unidad asimétrica de la quimera AS-RT (PDB:7PW2) a la cadena A del dominio nativo Abl-SH3 (PDB: 4JJC). (B) Superposición de la cadena A (magenta) presente en la unidad asimétrica de la AS-RT a la cadena A del dominio nativo Abl-SH3 (PDB: 4JJC) (cian claro). (C) Factores B de los residuos de la cadena principal de la cadena A de la AS-RT (PDB: 7PW2).

La figura 4.34 muestra las interacciones en el lazo RT en el dominio Abl-SH3 nativo y en la quimera AS-RT. En este lazo se han reemplazado aminoácidos sin carga por aminoácidos ionizables (Val93Glu y Ser95Arg) y aminoácidos hidrofóbicos por polares (Ala74Ser y Gly76Thr). La red de enlaces de hidrogeno presenta ciertas diferencias con la proteína nativa, que implica también a varias moléculas de agua.

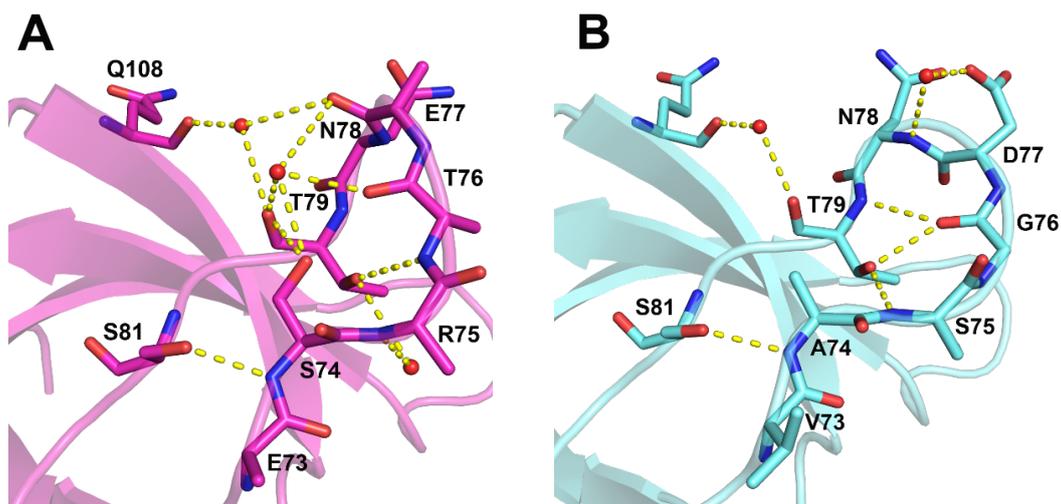


Figura 4.34. Representación gráfica de la distribución de enlaces de hidrógeno en el lazo RT de los dominios (A) AS-RT (magenta) y (B) Abl-SH3 (cian claro). Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

En el sitio de nucleación no se observan diferencias significativas y el enlace entre los residuos Glu86 (OE2) y Thr104 (OG1) se produce a través de una molécula de agua, que también interacciona con los residuos Ser81 (O) y Asn106 (ND2 o OD1) (Figura 4.35).

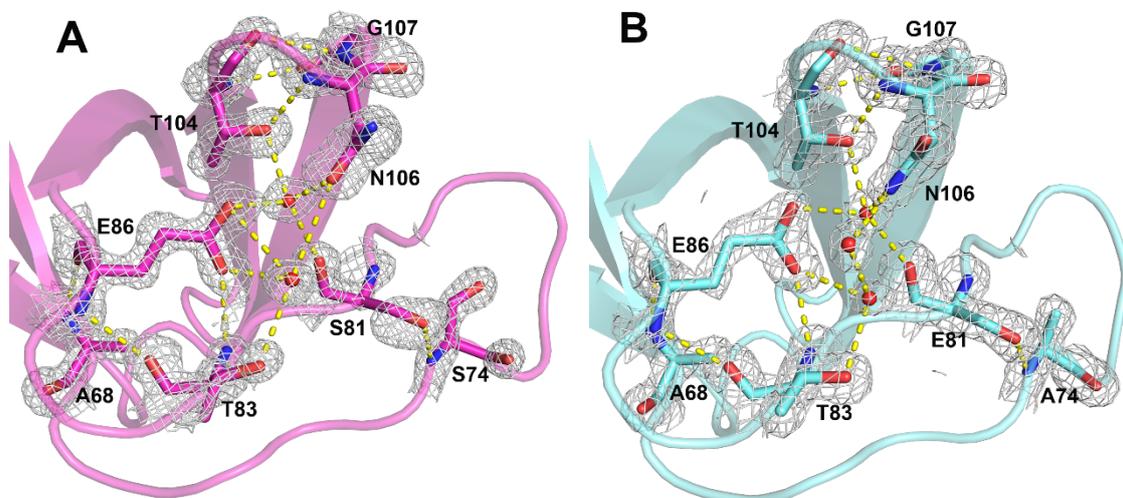


Figura 4.35. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a $1,5 \sigma$ del sitio de nucleación de los dominios (A) AS-RT (magenta) y (B) Abl-SH3 (cian claro). Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

4.1.3.5 Estructura de la quimera AS-Src

En la quimera AS-Src el lazo n-Src del dominio Abl-SH3 ha sido reemplazado por el del dominio c-Src-SH3 (G92N-Y93N-N94T-H95E) con el fin de estudiar el efecto de dicho lazo en la formación de dímeros entrecruzados. La estructura obtenida de este dominio es:

Estructura del monómero. Los cristales se obtuvieron en presencia de sulfato amónico 1,6 M, y PEG 300 y tampón ácido acético/acetato sódico 0,1 M pH 5,5. Inicialmente se obtenía un precipitado microcristalino. Para disminuir la nucleación y mejorar la calidad de los cristales se añadió a la disolución precipitante 10% de glicerol y cloruro de litio 40 mM. Los cristales pertenecían al grupo espacial ortorrómbico $I2_12_12_1$ con parámetros de celdilla unidad $a=41,9 \text{ \AA}$, $b=47,4 \text{ \AA}$, $c=75,6 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$, y presentaban solo una molécula en la unidad asimétrica (PDB:7PVV). La tabla 6 del Apéndice 7 muestra las estadísticas de esta estructura.

La comparación de la quimera AS-Src y la Abl-SH3 (Figura 4.36) resulta en un RMSD para la cadena principal de $1,2 \text{ \AA}$. La principal diferencia se encuentra en el lazo n-Src, que es donde se han introducido las mutaciones. En esta estructura tanto el lazo RT como el n-Src presentan una alta flexibilidad, tal y como indican sus valores de factor B, lo cual es de esperar por el papel que desempeñan ambos lazos en la unión de secuencias ricas en prolina (Figura 4.36 C).

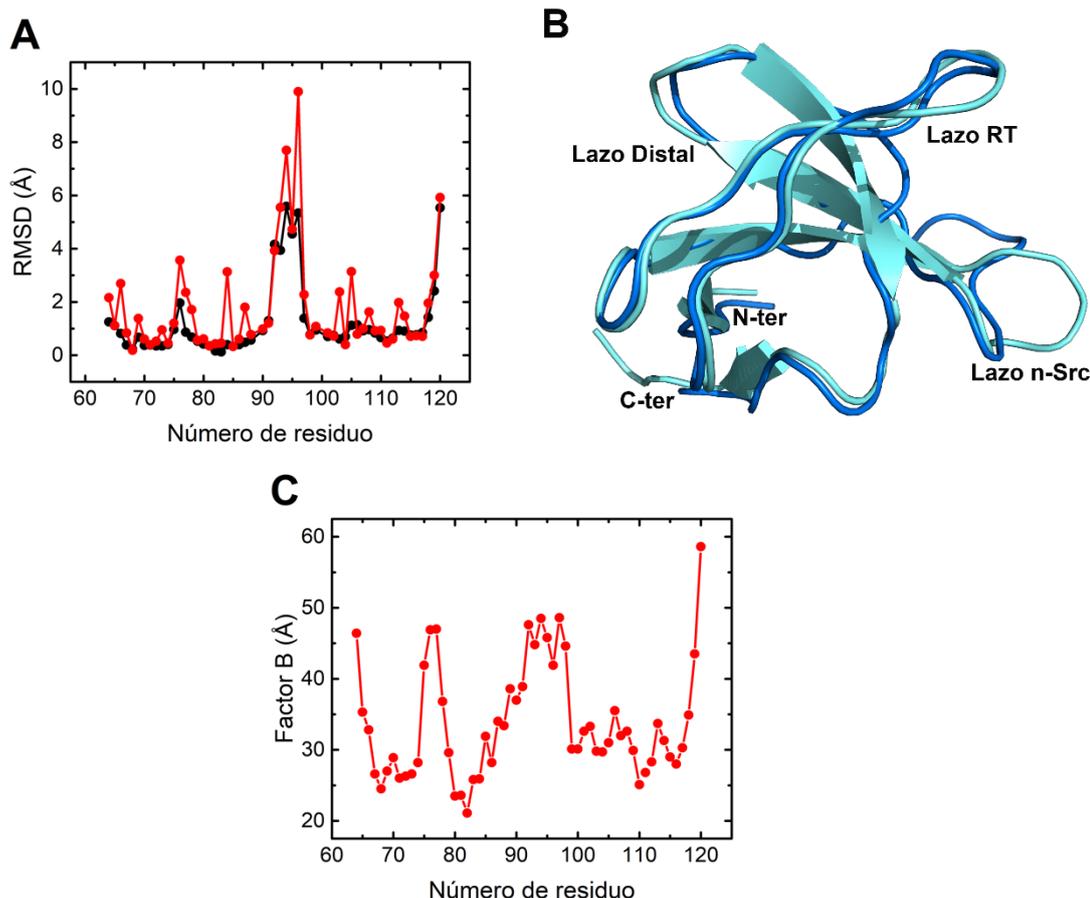


Figura 4.36. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena A presente en la unidad asimétrica de la quimera AS-Src (PDB:7PVV) a la cadena A del dominio nativo Abl-SH3 (PDB: 4JJC). (B) Superposición de la cadena A (azul) presente en la unidad asimétrica de la AS-Src a la cadena A del dominio nativo Abl-SH3 (PDB: 4JJC) (cian claro). (C) Factores B de los residuos de la cadena principal A de la AS-Src (PDB: 7PVV).

La figura 4.37 muestra las interacciones en el lazo n-Src en el dominio Abl-SH3 nativo y en la quimera AS-Src. El lazo n-Src muestra una conformación más extendida en la quimera y como consecuencia se observa una redistribución de los puentes de hidrógeno que establecen los residuos del lazo. Por ejemplo, la Asn96 (OD1) forma un puente de hidrógeno con el Glu101 (N), que en el caso del dominio nativo se establece con el Gly92(O). De todas las mutaciones introducidas, la mutación Asn94Thr es la que parece tener un mayor impacto en la distribución de enlaces de este lazo. Este residuo establece un gran número de puentes de hidrógeno con otros aminoácidos en el dominio nativo, mientras que en AS-Src no observamos dicha red de interacciones.

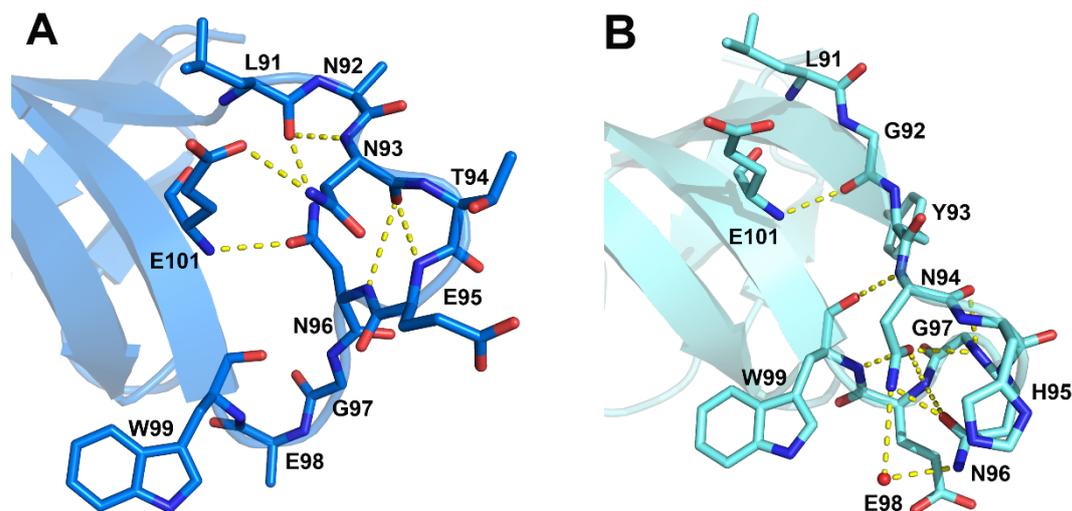


Figura 4.37. Representación gráfica de la distribución de enlaces de hidrógeno en el lazo n-Src de los dominios AS-Src (azul) (PDB: 7PVV) y Abl-SH3 (cian claro) (PDB: 4JJC). Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

Hemos comparado el lazo distal de la quimera con la de la estructura nativa, donde se encuentran los residuos que están implicados en el estado de transición del proceso de nucleación de la proteína. Se mantiene el puente de hidrógeno entre los aminoácidos Glu86 (OE2) y Thr104 (OG1) a través de una molécula de agua, la cual también interacciona con los residuos Ser81 (O) y Asn106 (ND2) (Figura 4.38).

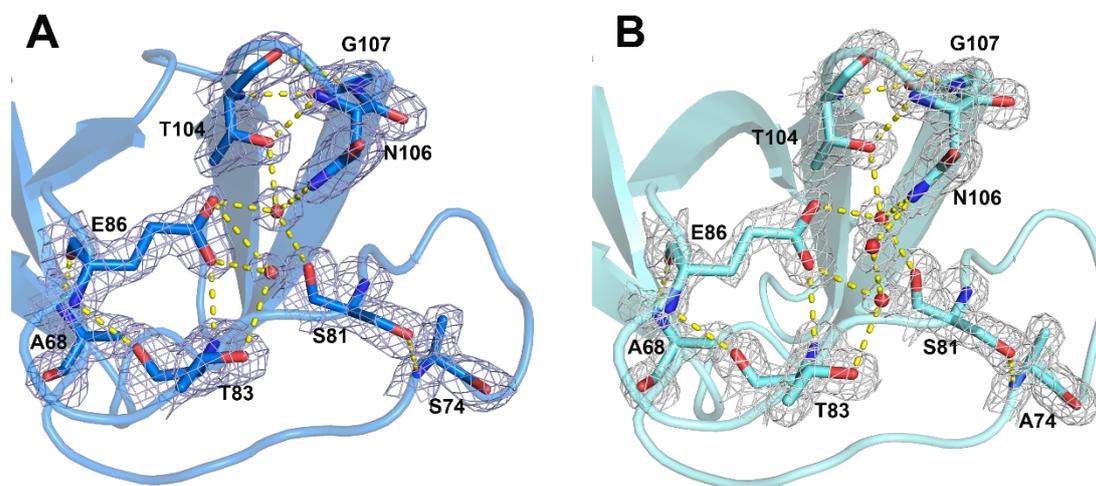


Figura 4.38. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a $1,5 \sigma$ del sitio de nucleación de los dominios (A) AS-Src (azul) y (B) Abl-SH3 (cian claro). Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

4.1.3.6 Estructura de la quimera AS-2X

En la quimera AS-2X los lazos RT y n-Src del dominio Abl-SH3 han sido reemplazados por los del dominio c-Src-SH3 (V73E-A74S-S975R-G76T-D77E-G92N-Y93N-N94T-H95E). Se han obtenido las siguientes estructuras de este dominio:

- *Estructura del monómero a pH 6,0.* Fue cristalizado en dos grupos espaciales distintos, aunque ambos cristales se obtuvieron en presencia de sulfato amónico 1,8 M, en tampón Mes 0,1 M.
 - Polimorfo I. Pertenece al grupo espacial tetragonal $P4_1$ con parámetros de celdilla unidad, $a=b=42,4 \text{ \AA}$, $c=30,4 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, y una sola molécula en la unidad asimétrica (PDB:7PVR).
 - Polimorfo II. Pertenece al grupo espacial ortorrómbico $P2_122_1$ con parámetros de celdilla unidad $a=27,3 \text{ \AA}$, $b=43,4 \text{ \AA}$, $c=94,9 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, y dos moléculas en la unidad asimétrica (PDB:7PVQ).
- *Estructura del monómero a pH 6,5 en presencia de PEG.* Fue cristalizado en presencia de sulfato amónico 1,8 M y 5 % de PEG 200, en tampón Mes 0,1 M. Los cristales se optimizaron añadiendo 10% de glicerol y cloruro de litio 40 mM al agente precipitante. Esta estructura presentaba dos moléculas en la unidad asimétrica. Los cristales pertenecían también al grupo espacial ortorrómbico $P2_122_1$ con parámetros de celdilla unidad $a=27,1 \text{ \AA}$, $b=43,5 \text{ \AA}$, $c=94,6 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (PDB:7PVS). La tabla 7 del Apéndice 3 muestra las estadísticas de estas estructuras.

La comparación de las cadenas A y B en aquellas estructuras que presentan dos cadenas en la unidad asimétrica, 7PVQ y 7PVS, demuestra que ambas cadenas son muy similares ya que los RMSD obtenidos para las cadenas principales son menores de $0,3 \text{ \AA}$ ($0,16 \text{ \AA}$ para 7PVQ y $0,26 \text{ \AA}$ para 7PVS) (Figura 4.39).

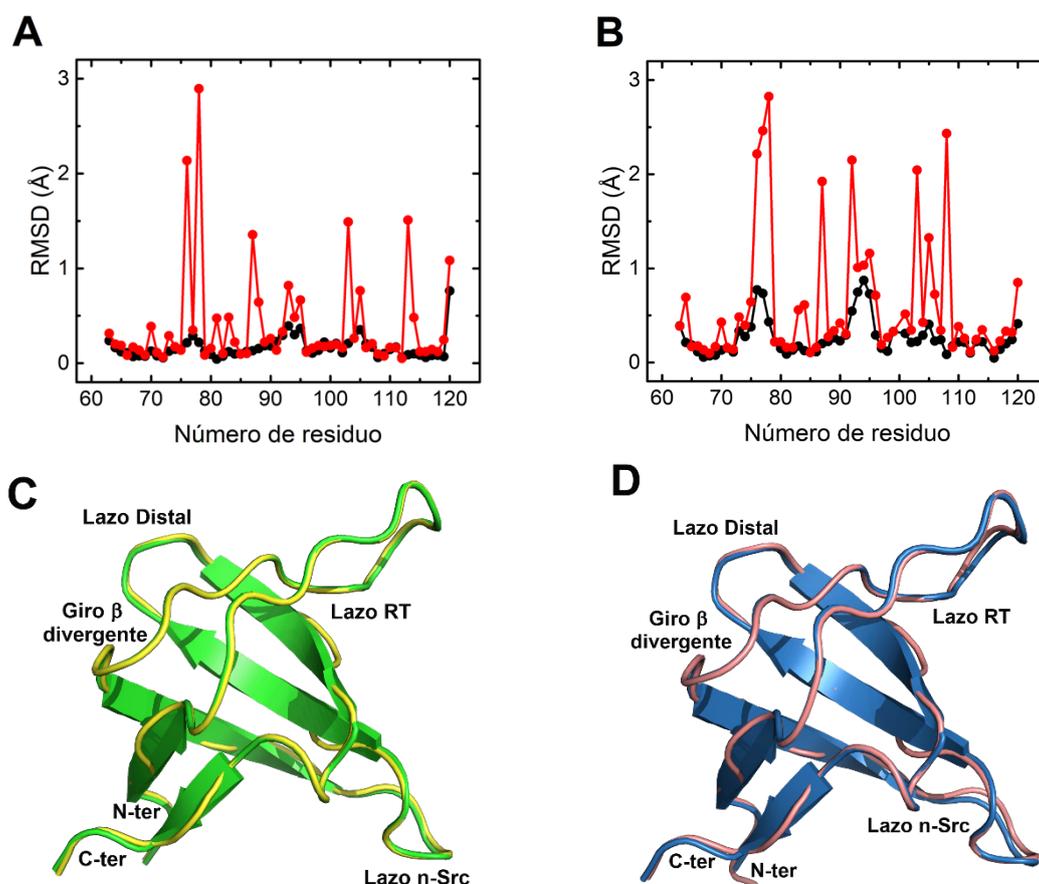


Figura 4.39. RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro) y laterales (rojo) de la cadena A y B presentes en la unidad asimétrica de la quimera AS-2X a (A) pH6,0 (PDB:7PVQ) y (B) pH6,5 (PDB: 7PVS). Superposición de las cadenas A y B presentes en la unidad asimétrica de la quimera AS-2X en (C) pH6,0 (PDB:7PVQ): cadena A, verde y B, amarilla, y (D) pH6,5 (PDB: 7PVS): cadena A, azul, y B, salmón.

También se ha llevado a cabo la comparación de cada una de las estructuras de la quimera AS-2X con el dominio Abl-SH3. Los valores de RMSD obtenidos para las cadenas principales son muy similares entre las estructuras tal como puede verse en la figura 4.40, y las mayores diferencias aparecen en los lazos RT y n-Src, que son los lazos mutados. Además, estos lazos presentan una gran flexibilidad tal y como demuestran sus valores de factor B (Figura 4.40 H).

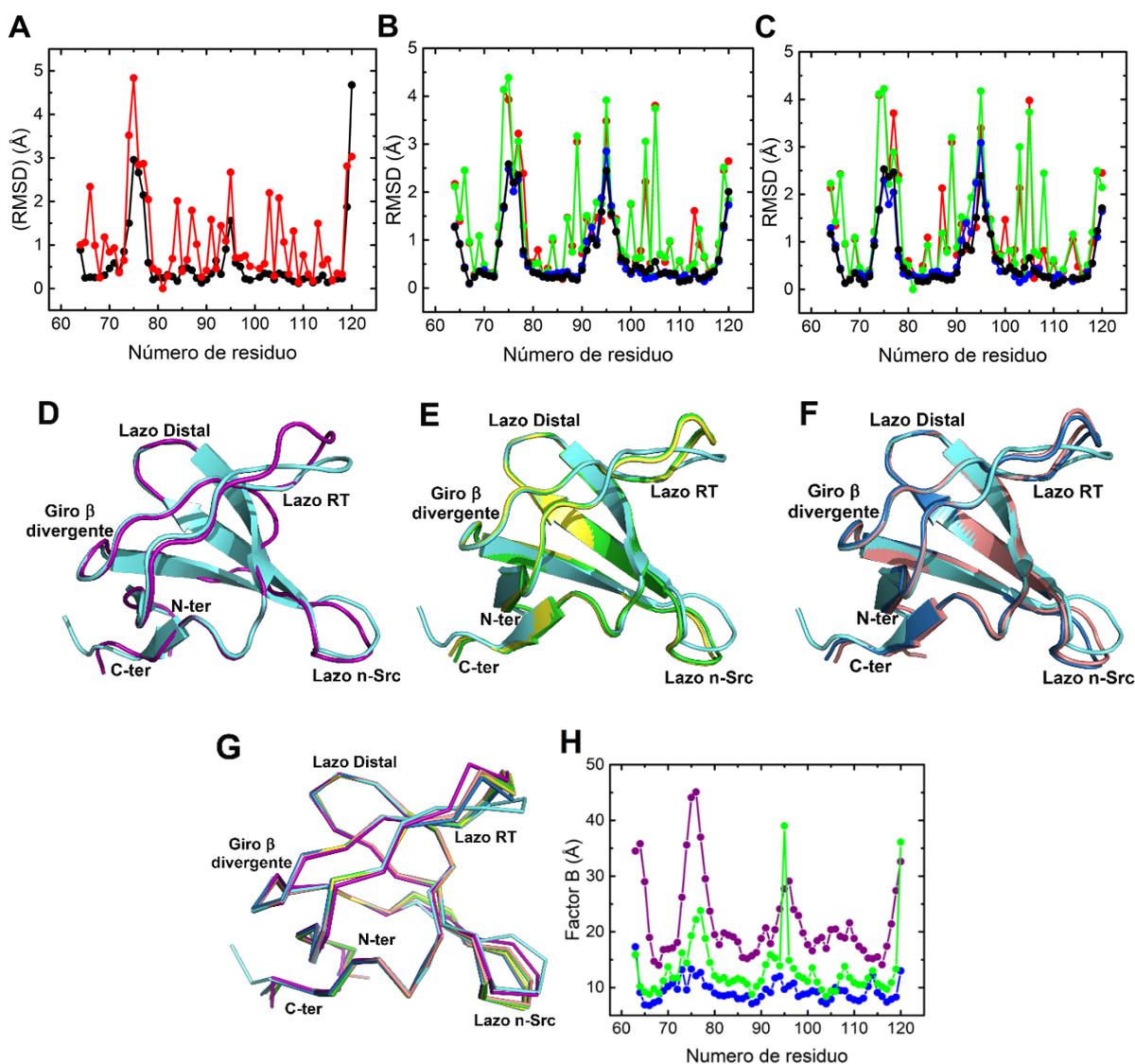


Figura 4.40. (A) RMSD obtenido al superponer la cadena principal (negro y/o azul) y laterales (rojo y/o verde) de la cadena A del dominio nativo (PDB: 4JJC) con las cadenas A y/o B presentes en la unidad asimétrica de la quimera AS-2X (A) PDB: 7PVR (0,60 Å), (B) PDB: 7PVQ (0,67 Å para A y B) y (C) PDB: 7PVS (0,70 Å, para A y 0,66 Å para B). Superposición de las cadenas presentes en la unidad asimétrica de cada una de las estructuras de AS-2X con la del dominio Abl-SH3 (cian claro) (D) 7PVR (violeta), (E) 7PVQ: cadena A, verde y B, amarillo y (F) 7PVS: cadena A, azul, y B, salmón. (G) Superposición de todas las cadenas de la quimera AS-2X al dominio nativo (con el mismo mapa de colores). (H) Factores B de los residuos de la cadena principal de las cadenas A de las estructuras de la AS-2X, 7PVR (violeta), 7PVQ (verde) y 7PVS (azul).

La figura 4.41 muestra las diferencias en la distribución de enlaces de hidrógeno en el lazo RT para las tres estructuras de la AS-2X y la Abl-SH3. Hay que destacar que en las estructuras 7PVR y 7PVS la Ser81 presenta una doble conformación. En 7PVS los residuos Ser74, Arg75 y Thr76 forman parte de la interfaz entre las cadenas A y B de la estructura en la que también interviene una molécula de PEG. Además, los residuos Thr76_A, Asn96_B y Glu98_B interactúan con la molécula de PEG a través de una molécula de agua (Figura 4.41 E).

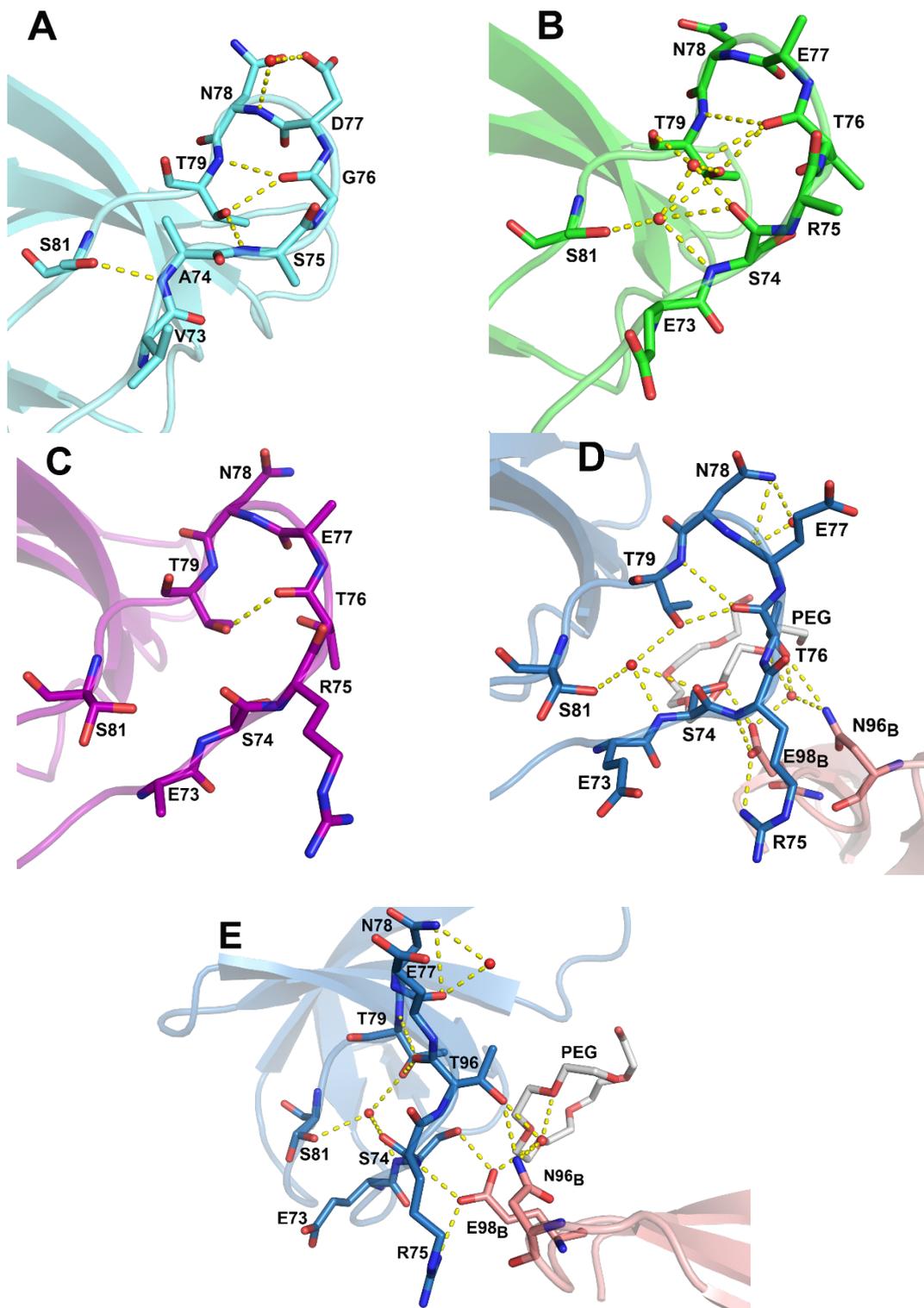


Figura 4.41. Representación gráfica de la distribución de enlaces de hidrógeno en los residuos mutados del lazo RT de los dominios (A) Abl-SH3 (cian claro) (PDB: 4JJC) y AS-2X (B) PDB:7PVQ (verde), (C) PDB:7PVR (morado), (D) 7PVS (azul). (E) Interfaz entre las cadenas A (azul) y B (salmón) de 7PVS a través del lazo RT. Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

La figura 4.42 muestran las interacciones en el lazo n-Src, donde se aprecia los cambios de interacciones entre los residuos de este lazo en las estructuras de la quimera.

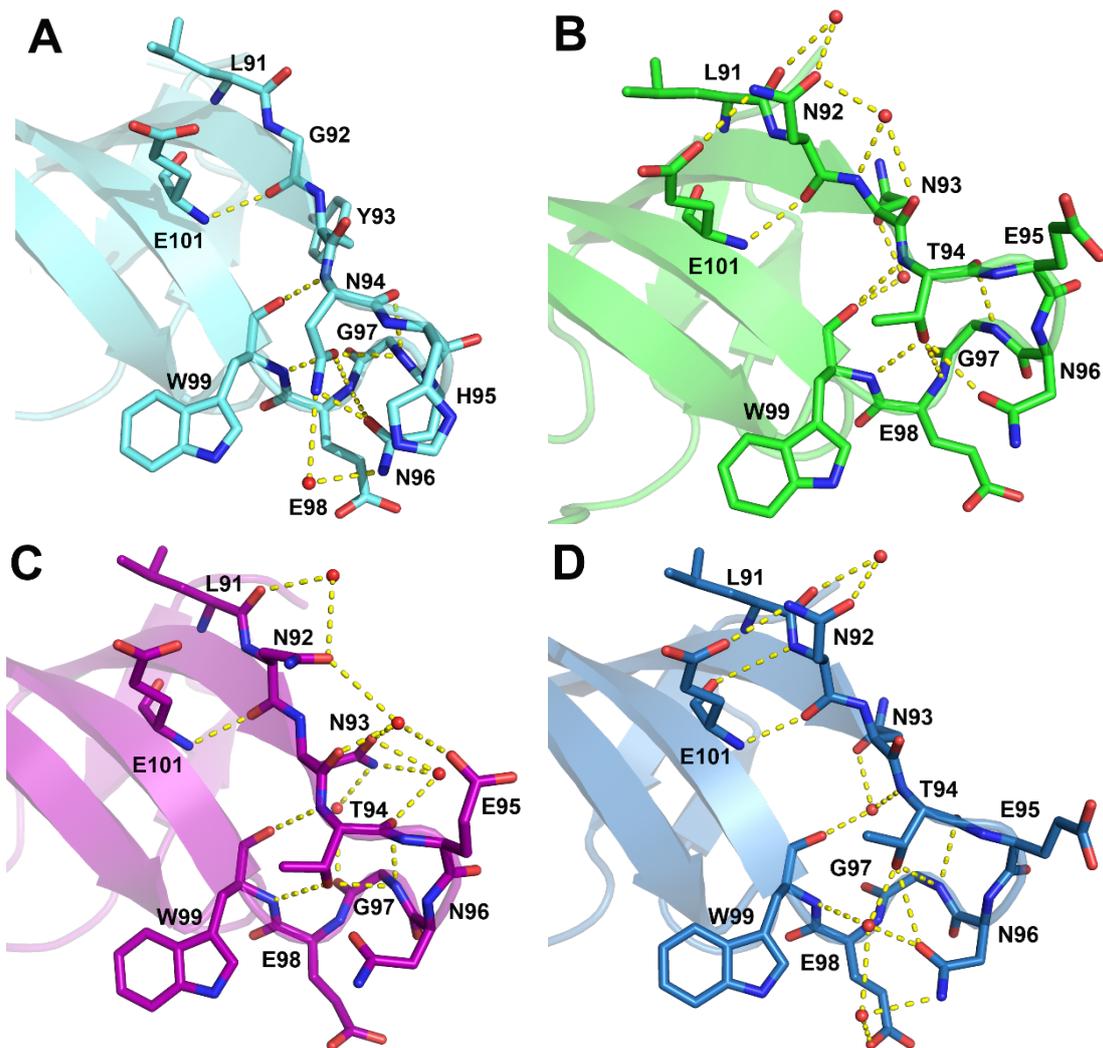


Figura 4.42. Representación gráfica de la distribución de enlaces de hidrógeno en los residuos mutados del lazo n-Src de los dominios (A) Abl-SH3 (cian claro) (PDB: 4JJC) y AS-2X (B) PDB:7PVQ (verde), (C) PDB:7PVR (morado) y (D) PDB: 7PVS (azul). Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

El sitio de nucleación en las estructuras del dominio AS-2X no presenta grandes cambios respecto del dominio nativo. Hay que destacar que, en las estructuras con dos moléculas en la unidad asimétrica, 7PVQ y 7PVS, la Lys105 (NZ) establece un puente salino con Glu86 (OE2) que no se observa en el dominio nativo (Figura 4.43).

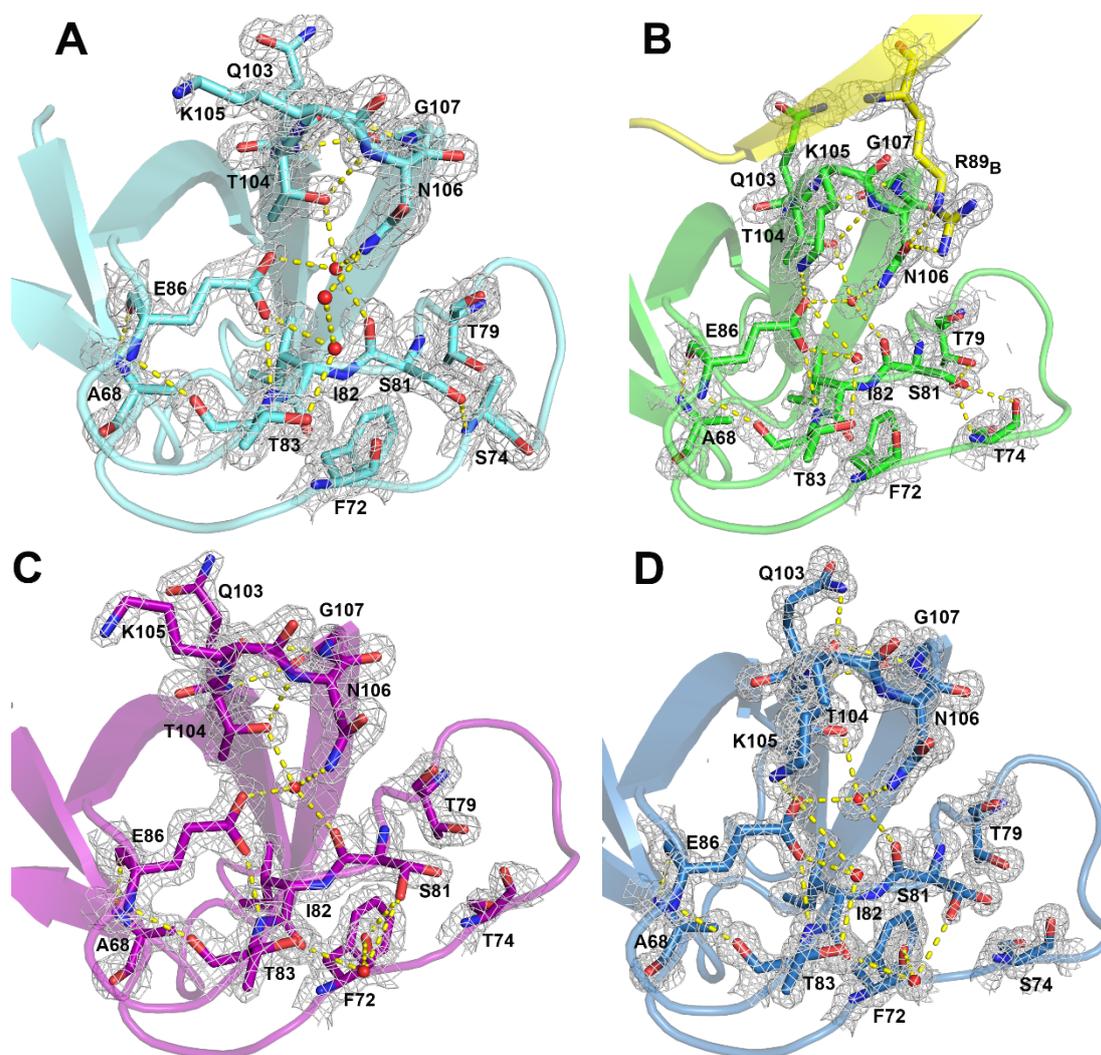


Figura 4.43. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a 1,5 σ del sitio de nucleación de los dominios (A) Abl-SH3 (cian claro) y AS-2X (B) PDB:7PVQ (verde), (C) PDB:7PVR (morado) y (D) PDB:7PVS (azul). Las interacciones y las moléculas de agua se representan en amarillo y rojo, respectivamente.

4.1.4 Estudios para caracterizar la formación de fibras amiloides en las quimeras Src-Abl y Abl-Src

Con frecuencia la formación de oligómeros entrecruzados está vinculada a la formación también de fibras amiloides. Para determinar la formación de fibras amiloides en las quimeras objeto de estudio en esta tesis, se llevó a cabo un cribado de las posibles condiciones. Se partieron de las condiciones determinadas en estudios previos (Bacarizo *et al.*, 2014), y por ello se ensayaron:

- Temperatura: 25 y 37 °C.
- Fuerza iónica: NaCl, 0,1 M y 0,5 M.
- pH: 5,0 ácido acético/acetato sódico 50 mM; 7,0 fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM; 9,5 carbonato sódico/ ácido carbónico 50 mM (para las quimeras

Abl-Src); 12,0 fosfato trisódico/hidróxido sódico 50 mM (para las quimeras Src-Abl).

Las muestras se incubaron en un agitador orbital termostatzado con una velocidad de 400 rpm. Los resultados obtenidos se muestran de forma resumida en las tablas 4.10 y 4.11. La figura 4.44 muestran la caracterización mediante colorantes de la formación de fibras amiloides en la SA-RT.

Tabla 4.10. Representación esquemática del cribado y condiciones de formación de las fibras amiloides en los dominios quimera a 25 °C.

[NaCl] (M)	0,1						0,5					
pH	5,0		7,0		9,5/12,5		5,0		7,0		9,5/12,5	
[Proteína] (mg/mL)	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
SA-RT	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Blue	Orange		Orange		Orange	Orange
SA-2X	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Blue	Orange		Orange		Orange	Orange
SA-Src	Blue		Blue		Blue		Red		Red		Red	
AS-RT	Orange		Orange		Orange		Orange		Orange		Orange	
AS-2X*	Orange		Orange		Orange		Orange		Orange		Orange	
AS-Src	Orange		Blue	Blue	Blue	Blue	Orange		Orange	Orange	Orange	Orange

Azul: resultado negativo en la formación de fibras amiloides
Verde: resultado positivo en la formación de fibras amiloides
Naranja: resultado positivo con precipitado en suspensión
Rojo: muestras precipitadas

Tabla 4.11. Representación esquemática del cribado y condiciones de formación de las fibras amiloides en los dominios quimera a 37 °C.

[NaCl] (M)	0,1						0,5					
pH	5,0		7,0		9,5/12,5		5,0		7,0		9,5/12,5	
[Proteína] (mg/mL)	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
SA-RT	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Blue	Red		Orange		Orange	Orange
SA-2X	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Blue	Red		Orange		Orange	Orange
SA-Src	Blue		Blue		Blue		Red		Red		Red	
AS-RT	Orange		Orange		Orange		Red		Red		Red	
AS-2X*												
AS-Src	Orange		Blue	Blue	Blue	Blue	Red		Red	Red	Red	Red

* El estudio de formación de amiloides en AS-2X a 37 °C no se ha llevado a cabo debido a la T_m de esta quimera, cercana a 37 °C (Tabla 4.2).

Azul: resultado negativo en la formación de fibras amiloides
Verde: resultado positivo en la formación de fibras amiloides
Naranja: resultado positivo con precipitado en suspensión
Rojo: muestras precipitadas

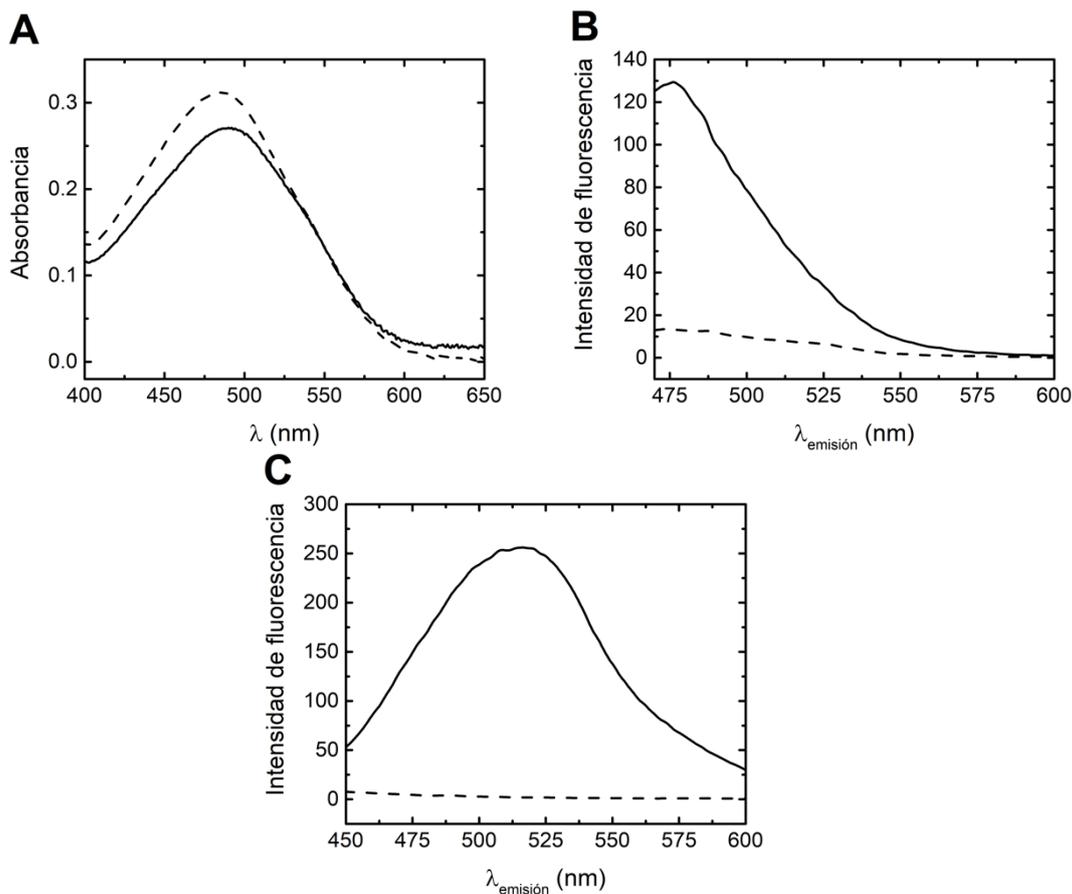


Figura 4.44. Caracterización de los amiloides de la quimera SA-RT a 10 mg/mL incubados en tampón ácido acético/acetato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M pH 5,0 a 25 °C. (A) Espectro de absorbancia de la proteína nativa (línea discontinua) y de la muestra de amiloide (línea continua) en presencia de RC 20 μ M. (B) Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína nativa (línea discontinua) y de la muestra de amiloide (línea continua) en presencia de ThT 10 μ M. (C) Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína nativa (línea discontinua) y de la muestra de amiloide (línea continua) en presencia de ANS 200 μ M.

También se ha estudiado la cinética de formación de fibras amiloides para las quimeras SA-RT y SA-2X en presencia de NaCl 0,1 M en los tampones ácido acético/acetato sódico 50 mM, pH 5,0 y fosfato monosódico/fosfato disódico 50 mM, pH 7,0 a 25 °C y 37 °C. Para ello se midió el cambio en la intensidad de fluorescencia en presencia de ThT hasta que se alcanzó un valor estable de la intensidad de fluorescencia (Figura 4.45).

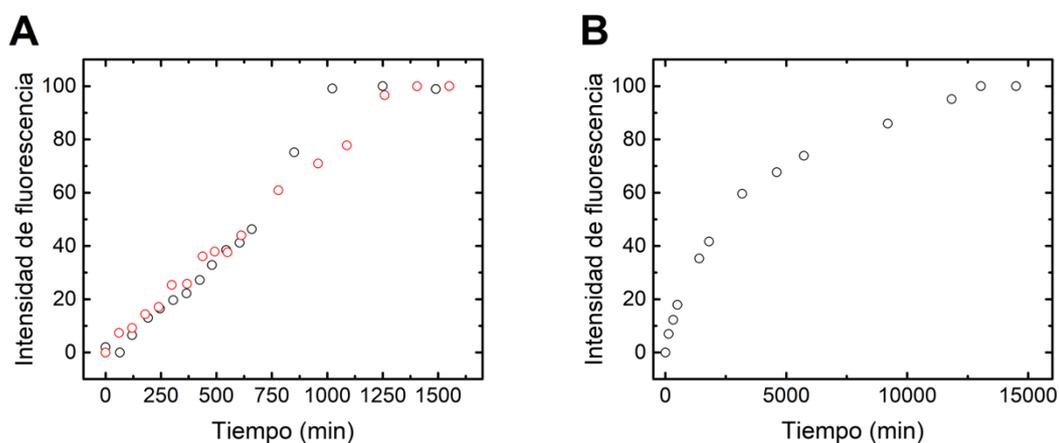


Figura 4.45. Cinética de formación de las fibras amiloides seguida mediante el aumento en la intensidad de fluorescencia de la ThT en las proteínas (A) SA-RT a 37 °C a pH 5,0 (negro) y pH 7,0 (rojo) y (B) SA-2X a pH 5,0 y 25°C.

4.2 Discusión

En el año 2021 hemos sido testigo de una gran revolución en la biología estructural con el desarrollo de Alpha Fold 2 (Jumper *et al.*, 2021). Desde los trabajos pioneros de Anfinsen en los años sesenta, uno de los objetivos principales de los científicos durante más de medio siglo ha sido poder predecir la estructura tridimensional de las proteínas a partir de la secuencia (Dill *et al.*, 2008; Anfinsen, 1973). Sin embargo, una cuestión por determinar es cómo encaja en este proceso de predicción de las estructuras tridimensionales aquellas que además del plegamiento reconocido funcionalmente presenta otros plegamientos alternativos. Un ejemplo de estos es la formación de fibras amiloides. Su relación con múltiples enfermedades, entre ellas numerosas enfermedades neurodegenerativas, las ha convertido en el objeto de numerosos estudios. Otro ejemplo de plegamiento alternativo es el entrecruzamiento de dominios (3D-DS), el cual se ha relacionado en numerosas ocasiones con la formación de amiloides. Ambos procesos requieren de una desestabilización inicial de la proteína, por lo que se piensa que los pasos iniciales que dan lugar a la amiloidogénesis podrían ser comunes a la formación del 3D-DS (Liu & Eisenberg, 2002; Ding *et al.*, 2006; Bennet *et al.*, 2006; Van der Wel, 2012).

En el desarrollo de este trabajo, nuestro principal objetivo ha sido el estudio de procesos de los plegamientos alternativos mencionados y la relación entre ellos. Para llevar a cabo dichos análisis hemos usado el dominio SH3 de las c-Ser tirosina quinasa. Hasta la fecha, este es el único dominio SH3 donde han sido descritos tanto la formación de fibras amiloides como el entrecruzamiento de dominios. Tal como ya hemos descrito

a lo largo de esta Tesis, este dominio presenta la peculiaridad de formar dímeros entrecruzados y fibras amiloides (Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Bacarizo *et al.*, 2014). Durante años el foco de las investigaciones de los oligómeros entrecruzados se ha puesto en la composición del lazo bisagra. Por ello, para esclarecer el efecto que tienen los lazos en la formación de oligómeros entrecruzados, hemos construido una serie de proteínas quimeras en las que los lazos RT y n-Src han sido intercambiados entre los dominios SH3 de las proteínas c-Src y Abl, obteniendo quimeras Src-Abl y Abl-Src. Hemos seleccionado el dominio SH3 de la Abl tirosina quinasa porque estos dominios comparten una similitud de secuencia relativamente baja, del 47%, y las diferencias más notables se localizan en los lazos del dominio. Las diferencias en los lazos RT y n-Src controlan la especificidad frente a la unión de MRPs entre estos dos dominios. Adicionalmente, por el momento, ninguno de estos procesos de plegamiento alternativo ha sido descrito para el dominio Abl SH3, ni en nuestra experiencia trabajando con él durante más de 15 años (Pisabarro *et al.*, 1998; Filimonov *et al.*, 1999; Palencia *et al.*, 2004; Nagar *et al.*, 2006; Corbi-Verges *et al.*, 2013).

Nuestro interés en este tipo de quimeras es aún mayor teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación con un mutante de la quimera SA-2X, en la cual el residuo Gln128 estaba sustituido por arginina. Este residuo estaba presente en la secuencia del vector proporcionado por el Departamento de Química Física de la Universidad de Granada y durante varios trabajos de investigación se ha trabajado con mutaciones realizadas sobre este mutante. Por ello, en estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación nos centramos en cual era el efecto de esta mutación sobre la estabilidad del dominio c-Src SH3. Estos estudios demostraron que esta mutación estabiliza notablemente el dominio Src-SH3, el cual en determinadas circunstancias es muy propenso a formar fibras amiloides (Bacarizo *et al.*, 2014). Adicionalmente, resultados previos demostraron que la quimera SA-2X-Q128R formaba un dímero entrecruzado en donde ambos lazos, RT y n-Src, actuaban como lazo bisagra (Cámara-Artigas *et al.*, 2014). Debido a la baja homología secuencial de estos lazos en el dominio Abl-SH3, este resultado ponía en cuestión cual era realmente el papel de los lazos bisagra y si la secuencia de estos eran los únicos responsables de la apertura del dominio para formar los oligómeros entrecruzados.

Por ello, en esta tesis nos hemos propuesto ampliar estos estudios para dilucidar si el 3D-DS que se produce en el dominio c-Src-SH3 es atribuible al lazo bisagra o existen otros aspectos determinantes a tener en cuenta. Para ello, hemos realizado un estudio de las propiedades biofísicas y estructurales de las quimeras del dominio Src y Abl-SH3 en los que se han intercambiado estos lazos. Estos estudios son complementarios de los realizados en la Tesis de la Doctora Marina Plaza-Garrido en el que se estudiaron las quimeras producidas por el intercambio de los lazos RT y n-Src entre los dominios c-Src y Fyn SH3, y los resultados se han analizado y discutido teniendo en cuenta especialmente estos resultados previos (Plaza-Garrido, 2021). Todos estos estudios están enmarcados en el desarrollo del proyecto de investigación BIO2016-78020-R *Estudios cristalográficos de plegamientos anómalos de proteínas*.

4.2.1 Efecto en la estabilidad de las quimeras de la sustitución de los lazos RT y Src

Hemos realizado una caracterización de las propiedades biofísicas de las quimeras objeto de estudio para ver el efecto del intercambio de los lazos RT y n-Src en la estabilidad y oligomerización de las mismas. En estos estudios hemos determinado la estabilidad térmica y química en función del pH y de la presencia de agentes caotrópicos como el GdnHCl.

Antes de afrontar estos estudios hemos medido como las mutaciones presentes en los lazos afectan a la solubilidad de las proteínas quimeras de estos dominios SH3, ya que los procesos de oligomerización pueden ser dependientes de la concentración de la proteína, tal como fue demostrado previamente para el dominio c-Src SH3 nativo (Bacarizo *et al.*, 2014). Los experimentos se llevaron a cabo a dos pHs: ácido acético/acetato sódico 50 mM a pH 5,0 y fosfato sódico monobásico/ fosfato sódico dibásico 50 mM a pH 7,0. En el caso de las quimeras Abl-Src se produce una notable disminución de la solubilidad a pH 5,0, que es menor del 50% de la solubilidad a pH 7,0. Esta menor solubilidad puede estar asociada a su menor estabilidad frente al pH cuyo intervalo de estabilidad comprende el rango de pH 5,5-8,5, que es menor que el de las quimeras Src-Abl que presentan un mayor rango de estabilidad frente al pH, de 5,0-10,0. En las quimeras Abl-Src es muy notable la disminución de la solubilidad de la quimera AS-2X. En el caso de las quimeras Src-Abl presentan una solubilidad parecida tanto a pH 5,0 como 7,0, aunque es de destacar la baja solubilidad de la quimera SA-Src tanto a pH ácido como neutro. En esta, debemos considerar la mutación Glu115His, que afecta al

punto isoeléctrico de la proteína. De esta forma el punto isoeléctrico calculado para la proteína nativa Src-SH3 es 4,50 que cambia a 4,96 en el caso de la quimera SA-Src, con lo que es de esperar un mínimo de solubilidad cuando el pH de la disolución coincida con el punto isoeléctrico. Sin embargo, a pH 7,0 la solubilidad de esta quimera es también inusualmente baja, por lo que no se puede descartar que la introducción de un residuo aromático en el lazo, Asn113Tyr, pueda afectar también a la solubilidad de la proteína. En este caso la tirosina introducida en el lazo n-Src forma un clúster hidrofóbico con los residuos Phe86, Ile110 y Trp119 que podría afectar a la solubilidad de la proteína (siendo el valor de ASA promedio de la Tyr113 de 30,5 Å²). Este clúster no está presente en las estructuras disponibles de la quimera SA-2X, donde está presente también, este residuo está expuesto al solvente (siendo el valor de ASA de la Tyr113 42,5 Å² para el complejo y 47,0 Å² para el dímero entrecruzado).

A pesar de los cambios notables en solubilidad, el intercambio de los lazos no parece afectar a la estabilidad en función del pH, ya que todas las quimeras presentan un intervalo de estabilidad similar. En el caso de las quimeras Src-Abl esta es además similar al medido del dominio c-Src-SH3, incluidos los pK_as aparentes determinados para las transiciones en la zona ácida y básica (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). El cálculo de los pK_as aparentes individuales a partir de las estructuras determinadas con el servidor de Rosetta, Rosie (<https://rosie.graylab.jhu.edu/>), están recogidos en la Tabla 4.12. Es de destacar el valor inusualmente bajo en el pK_a calculado para el residuo Asp99 en algunas de las estructuras de las quimeras Src-Abl. Es especialmente notorio la variación del pK_a de este residuo en la estructura de la quimera SA-Src, la cual ha cristalizado con ocho moléculas en la unidad asimétrica y el pK_a de este residuo varía desde 1,0 hasta 3,6. Existe una correlación entre la superficie expuesta al solvente del residuo y el pK_a calculado. Este residuo juega un papel clave en la interacción con los MRPs, ya que forma un puente salino con el residuo de carga positiva que flanquea la secuencia canónica PxxP (Bacarizo & Cámara-Artigas, 2013). La unión de los MRPs produce un cambio conformacional en estos dominios para maximizar el empaquetamiento de la secuencia canónica de unión PxxP en los bolsillos hidrofóbicos sobre la superficie del dominio SH3 y se observa un acercamiento entre los lazos RT y n-Src (Bacarizo & Cámara-Artigas, 2013). En las estructuras del dominio libre en las que el pK_a del residuo Asp99 es inusualmente bajo, su cadena lateral se encuentra totalmente enterrada en el interior del lazo RT formando varios puentes de hidrógeno con los residuos del lazo y su forma desprotonada puede

justificarse ya que favorecería una conformación más compacta (Kilambi & Gray, 2012; Salinas-García *et al.*, 2021).

Tabla 4.12. Valores de pK_a aparente de los grupos ionizables calculado con Rosetta. En negrita se muestran los residuos con pK_a inusualmente bajo y los no modelados se representan como SM.

Proteína	SA-Src 7PW0							
	A	B	C	D	E	F	G	H
TYR90	9,8	9,8	10,0	9,8	9,4	9,8	9,3	9,8
ASP91	1,7	3,3	2,4	2,8	3,1	3,0	1,0	1,0
TYR92	11,1	10,4	10,3	10,2	10,2	10,3	10,4	10,4
GLU93	4,3	3,9	4,3	4,3	3,6	4,2	3,8	3,4
GLU97	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,7
ASP99	1,0	1,0	3,1	2,6	3,5	1,0	3,6	3,1
LYS103	10,4	10,7	10,4	10,4	10,6	10,8	10,4	10,6
LYS104	10,7	10,7	10,5	10,6	10,6	10,7	10,6	10,7
GLU106	3,7	3,7	3,9	3,9	3,2	1,0	3,2	3,2
TYR113	9,8	9,9	9,8	9,6	9,9	8,4	9,7	9,7
HIS115	6,4	6,7	6,4	6,4	6,5	6,2	6,5	6,5
ASP117	3,7	4,3	3,7	3,7	4,6	3,8	4,0	3,8
HIS122	6,4	6,5	6,3	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
TYR131	9,8	9,9	9,8	9,8	9,6	9,7	9,8	9,4
TYR136	9,9	9,9	9,8	10,5	8,8	9,8	8,9	9,7
ASP141	SM	SM	SM	SM	3,8	SM	3,7	SM

También aplicamos el cálculo del pK_a aparente con el servidor Rosetta para el dominio Abl-SH3 y las quimeras Abl-Src. En la tabla 4.13 se muestran los valores del pK_a aparente calculados y el código PDB de las estructuras usadas para este cálculo. Nuestros resultados muestran que en la región ácida las quimeras AS-Src y AS-2X muestran un pK_a de ~4,4, mientras que la AS-RT muestra un pK_a ligeramente superior. La presencia de la His95 en la quimera AS-RT, que presenta un pK_a aparente de 6,7, podría contribuir al mayor valor del pK_a aparente obtenido para esta quimera. En la región básica las quimeras AS-RT y AS-2X muestran un pK_a aparente entorno a ~9,4, mientras el pK_a de la AS-Src es ligeramente superior, de 9,7.

Tabla 4.13. Valores de pK_a aparente de los grupos ionizables calculado con Rosetta.

Abl-WT		AS-RT		AS-Src		AS-2X			
Residuo	4JJC	Residuo	7PW2	Residuo	7PVV	Residuo	7PVR	7PVQ A/B	7PVS A/B
TYR70	9,9	TYR70	9,8	TYR70	9,8	TYR70	9,8	9,8/9,8	9,8/9,8
ASP71	3,2	ASP71	3,3	ASP71	3,2	ASP71	3,3	3,3/3,2	3,2/3,2
VAL73	-	GLU73	3,5	VAL73	-	GLU73	4,1	4,6/4,6	4,8/5,0
ASP77	3,7	GLU77	4,5	ASP77	3,8	GLU77	4,6	4,6/4,6	4,4/4,5
LYS84	10,5	LYS84	10,6	LYS84	10,5	LYS84	10,5	10,5/10,5	10,6/10,6
GLU86	4,1	GLU86	3,9	GLU86	4,1	GLU86	3,9	3,5/3,1	3,8/4,1
LYS87	12,0	LYS87	10,3	LYS87	10,2	LYS87	10,3	10,2/10,2	10,3/10,3
TYR93	9,8	TYR93	9,7	ASN93	-	ASN93	-	-	-
HIS95	6,7	HIS95	6,7	GLU95	4,5	GLU95	4,5	4,4/4,4	4,5/4,4
GLU98	4,3	GLU98	4,4	GLU98	4,3	GLU98	4,4	4,4/4,4	3,1/2,9
GLU101	4,4	GLU101	4,2	GLU101	3,7	GLU101	3,8	4,1/3,5	4,2/4,6
LYS105	10,4	LYS105	10,4	LYS105	10,5	LYS105	10,4	9,3/10,9	10,4/10,5
TYR115	9,8	TYR115	9,8	TYR115	9,8	TYR115	9,8	9,8/9,8	8,8/11,0

En cuanto a la desnaturalización con agentes químicos el comportamiento de las quimeras Src-Abl frente a la modificación de los lazos es aparentemente la contraria a la que presentan las quimeras Abl-Src. A pH 5,0 la introducción del lazo RT en las primeras parece producir una estabilización respecto el dominio nativo, que es más notable en la quimera SA-2X. Mientras que, cuando solo se intercambia el lazo n-Src, este parece provocar cierta desestabilización. A pH neutro el intercambio de los lazos RT y n-Src del dominio c-Src-SH3 por aquellos presentes en el dominio Abl-SH3 prácticamente no producen un cambio muy significativo de la estabilidad de las tres quimeras, que a su vez parecen ser más estables que la proteína nativa (Plaza-Garrido *et al.*, 2020). Sin embargo, en las quimeras Abl-Src el efecto al introducir los lazos RT y n-Src del dominio c-Src SH3 si produce una desestabilización muy notable.

Los resultados de la desnaturalización térmica de las quimeras Src-Abl muestran que, a los pHs ensayados, no hay diferencias significativas con la proteína nativa. De nuevo en el caso de las quimeras Abl-Src el efecto del intercambio de los lazos es más notable. En este caso se produce una disminución de la estabilidad, siendo la quimera del lazo RT más estable que aquella en la que se introduce el lazo n-Src. Este resultado se obtiene tanto en las desnaturalizaciones por agentes químicos cómo por la temperatura y a ambos pHs ensayados. Ello puede indicar que es el lazo n-Src de la c-Src-SH3, que actúa como bisagra en los dímeros entrecruzados, el que produce mayores cambios conformacionales y que estos afectan considerablemente a la estabilidad del dominio Abl-SH3. Este efecto se acentúa cuando el lazo RT de la c-Src-SH3 está también presente.

4.2.2 ¿Está la apertura de los protómeros condicionada por la secuencia del lazo?

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una técnica que permite una determinación rápida y no destructiva del estado de oligomerización de las proteínas. Ello nos ha permitido comprobar que las químeras Src-Abl, al igual que la proteína nativa, forma dímeros a pH 5,0, y la oligomerización se ve favorecida por la presencia de PEG 300 (Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2014). Mientras, a pH neutro, el R_h obtenido corresponde a monómero, incluso en presencia de PEG. La confirmación de la formación de dímeros entrecruzados nos la proporciona las estructuras cristalográficas de las quimeras SA-RT y SA-2X. No ha sido posible obtener la estructura del dímero SA-Src, si bien es cierto que esta proteína ha sido más difícil de cristalizar debido a su menor solubilidad tanto a pH ácido como neutro. Aunque se observa un aumento del radio hidrodinámico, no se alcanza los valores de los dímeros obtenidos de la proteína nativa y las otras quimeras que sí se han obtenido en la forma dimérica entrecruzada.

En general, las estructuras de los dímeros entrecruzados del dominio c-Src-SH3 se han obtenido a partir de la proteína cristalizada a pHs ácidos, mientras que el dímero del mutante v-Src-W95T-I96T (7NET) se obtuvo a pH 6,5. En este último el Asp117 está sustituido por Asn117 lo que evita la repulsión entre las cargas del aspartato ionizado. Ello explica por qué se ve favorecido la formación del dímero a pH ácido y no a pHs donde se espera que el aspartato esté ionizado (Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2014; Plaza-Garrido *et al.*, 2020). En el dímero de la quimera SA-RT, la orientación relativa de las moléculas de protómero abierto es distinta a la que se ha obtenido para las estructuras previas del dímero entrecruzado. Aunque los cristales de esta se han obtenido también a pH 5,0, los únicos aminoácidos ionizables que están a una distancia en la que puedan interactuar son la His122 y Glu97. La estabilidad de estas quimeras frente al pH muestra que a valores menores de 5,0 la proteína pierde estabilidad y empieza a desplegarse. Luego el potencial puente salino formado por el par His122-Glu97 podría tener un papel en la estabilidad de la proteína frente al pH y en la formación del dímero. Desafortunadamente, la cadena lateral del residuo Glu97 no se ha podido modelar adecuadamente por falta de densidad electrónica en los mapas de diferencia electrónica.

Otra peculiaridad del dímero entrecruzado de la quimera SA-RT es la ausencia de una molécula de PEG en la interfaz de dímero. En las estructuras de los dímeros

entrecruzados de la proteína nativa y mutantes de la c-Src la presencia de PEG favorece la estabilización del dímero entrecruzado (Cámara-Artigas *et al.*, 2009). Esta molécula está ausente en la interfaz del dímero de la quimera SA-RT, a pesar de que los cristales se obtuvieron en presencia de 5% de PEG 300. La ausencia de la molécula de PEG en la interfaz fue también una novedad en la estructura del dímero de la SA-2X-Q128R, confirmada en la estructura de la SA-2X obtenida en esta Tesis. Esta quimera presenta también la peculiaridad de sufrir la apertura a través de ambos lazos intercambiados, por lo que la topología del dímero entrecruzado es de nuevo distinta.

Las medidas de DLS de las quimeras Abl-Src, demuestran que las quimeras AS-RT y AS-Src son monómeros a pH 7,0. Debido a la menor solubilidad de estas quimeras, no ha sido posible realizar todas las medidas a los dos pHs y concentraciones seleccionadas. La quimera AS-Src es la única cuyo valor de solubilidad ha permitido determinar su R_h a pH 5,0, y el valor de 1,9 nm obtenido para el radio hidrodinámico sugiere que es un monómero a este pH, si bien la concentración alcanzada en la disolución puede no ser la adecuada, tal como ocurre para formar los dímeros del dominio c-Src. En presencia de 5 % de PEG 300 las quimeras Abl-Src son más solubles, lo que ha permitido determinar el R_h a pH 7,0 de las tres variantes a 5 mg/mL de concentración. En todos los casos se obtuvo un radio que sugiere que la proteína tiende a dimerizar en presencia del PEG. El mismo resultado se ha obtenido a pH 5,0 para las quimeras AS-RT y AS-Src en presencia de 5% de PEG 300 ($R_h \sim 2,2$ nm). La menor solubilidad de la quimera AS-2X no ha permitido su medida.

Aunque los valores obtenidos de radio hidrodinámico sugieren que las quimeras Abl-Src también podrían dimerizar formando entrecruzamiento de dominios, este resultado no ha sido corroborado mediante las estructuras obtenidas. Incluso en el caso de la quimera AS-2X, obtenida en presencia de PEG a pH 6,5 (PDB: 7PVS) con dos moléculas en la unidad asimétrica, lo que se ha modelado son dos moléculas del dominio SH3 en su forma monomérica. El análisis de esta estructura con el servidor PISA (Krissinel, 2011) detecta la formación de un dímero estable en la unidad asimétrica con un $\Delta G_{int}^1 = -49.4$ kcal/M y una superficie enterrada en su formación de 2130 Å. Luego es posible que la proteína forme dímeros estables en disolución sin que sea necesariamente un caso de 3D-DS.

¹ ΔG_{int} , indica la ganancia de energía libre de solvatación en la formación del oligomero

En todos los casos, aunque las medidas en disolución apunten a la formación de dímeros, son precisamente las estructuras tridimensionales las que confirman la presencia, o no, del fenómeno del 3D-DS. Se considera un *verdadero entrecruzamiento entre dominios* cuando existe evidencia estructural tanto de la forma monomérica como del oligómero entrecruzado (Bennet *et al.*, 1995; Liu & Eisenberg, 2002).

4.2.3 ¿Qué demuestran las estructuras acerca del papel del lazo bisagra?

Uno de los determinantes clave para que se produzca el entrecruzamiento de dominios es el cambio conformacional del lazo bisagra y por ello su papel en el 3D-DS ha sido ampliamente estudiado. En general, es el único elemento que cambia significativamente de conformación cuando se produce este tipo de oligomerización. En su apertura, estos lazos bisagra suelen adoptar una estructura de hebra β , que se suele estabilizar mediante la formación de enlaces de hidrógeno y/o puentes salinos con otros elementos de estructura secundaria o el propio lazo bisagra de la cadena complementaria. Tal como se puede observar en las tablas 4.8 y 4.9 esto no se cumple para las quimeras estudiadas en este trabajo. Además, en el caso de la quimera SA-2X se forma una corta hélice entre los residuos del lazo bisagra (Gly112-Gly116) (Figura 4.27). Esta quimera a su vez presenta otra peculiaridad, que es la apertura simultánea de los dos lazos insertados de la Abl. Un requisito para la apertura de estos lazos es que presenten una alta flexibilidad. Esta es una propiedad que se suele reflejar en las estructuras cristalinas en valores de factores B altos o bien la imposibilidad de modelar los residuos. En los dominios SH3 es común encontrar una alta flexibilidad en los lazos RT y n-Src dado su papel en la unión de MRP (Plaza-Garrido *et al.*, 2020).

Es habitual encontrar en la bibliografía estudios sobre 3D-DS donde se estudian factores como la longitud y flexibilidad de los lazos bisagra, así como las inserciones, deleciones o mutaciones de determinados residuos que pueden favorecer la apertura del lazo (Bennet, *et al.*, 2006; Rousseau *et al.*, 2012; Cámara-Artigas, 2016). En la mayoría de los casos, para realizar estos estudios se partía de proteínas de las cuales la formación de dímeros entrecruzados había sido descrita previamente. Un ejemplo es la proteína Suc1, la cual al sustituir los residuos de prolina del lazo bisagra por alanina era capaz de formar trímeros y oligómeros de mayor orden, efecto que se acentuaba cuando estas prolinas eran sustituidas por glicinas (Rousseau *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2012). Otros estudios llevados a cabo por Nagao y colaboradores con la mioglobina se centraron en

mutaciones puntuales en los lazos bisagra y demostraron que las mutaciones Gly80Ala y Gly81Ala originaban una estabilización del dímero entrecruzado. Adicionalmente, observaron que un aumento en la propensión helicoidal del residuo 80 originaba un aumento en la tendencia a formar 3D-DS (Nagao *et al.*, 2020). En nuestro caso, la introducción del lazo n-Src de la Abl en la quimera SA-2X produce la formación de una corta hélice en los residuos insertados y estabiliza notablemente la formación del dímero entrecruzado. Un factor indicador de ello puede ser que a pesar de todos los intentos realizados para obtener la estructura de la forma monomérica solo ha sido posible obtenerla en complejo con un péptido de alta afinidad, el VSL12 (PDB:7PVX). En estudios previos, nuestro grupo demostró que la presencia de estos péptidos podía desplazar el equilibrio de formación del oligómero a la formación del complejo (Bacarizo & Cámara-Artigas, 2013)

No es la primera vez que en la bibliografía se describe una proteína que forme oligómeros entrecruzados por medio de dos lazos bisagra. Este es el caso de la ribonucleasa A, la cual se ha descrito que forma dímeros y trímeros entrecruzados mediante el intercambio de la hélice α en el amino-terminal o el intercambio de la hebra β del carboxilo terminal, si bien no se han descrito oligómeros entrecruzados en los que ambos lazos estén abiertos (Crestfield *et al.*, 1962; Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Gotte & Libonati, 2004). Es precisamente en esta proteína en la que se ensayó la inserción de una secuencia amiloidogénica de diez glutaminas justo detrás del residuo 111 (el lazo bisagra del intercambio de la hebra carboxilo terminal comprende los residuos 112-115). El mutante con la inserción de poliglutaminas, al que se le llamó RNAsa Q10, tuvo como resultado la formación de fibras amiloides (Sambashivan *et al.*, 2005). Sin duda muchos de los estudios sobre la composición de los lazos bisagra también buscan aclarar la relación entre 3D-DS y la formación de amiloides, dada la circunstancia de la ocurrencia de ambos fenómenos en muchas proteínas. Aunque cuestionado, algunos autores han propuesto un intercambio abierto fuera de control (*runaway domain swapping*) como mecanismo de formación de fibras amiloides (Bennet *et al.*, 2006). Este tipo de modelo de agregación es el sugerido por experimentos como los realizados por Ogihara y colaboradores (Ogihara *et al.*, 2001) los cuales pretendían promover la formación de estos dímeros entrecruzados en proteínas de diseño. En concreto, estos autores partieron de un haz de hélices (*coiled-coil*) diseñado a partir de la hepta-repetición con residuos de leucina en las posiciones a y c, al que llamaron *coil-Ser*. Las tres hélices

estaban conectadas por dos lazos y la eliminación de uno de los lazos daba lugar a un dímero entrecruzado en una de las construcciones, mientras que en la otra construcción la eliminación del lazo originaba fibras amiloides mediante la formación de un oligómero entrecruzado abierto que permitía la adición de protómeros abiertos del haz de hélices de forma ilimitada. Los experimentos citados son una buena ilustración de cómo alterar la composición de los lazos no solo pueden favorecer la formación del dímero entrecruzado, sino además la formación de amiloides.

Dentro del marco del proyecto de investigación BIO2016-78020-R *Estudios cristalográficos de plegamientos anómalos de proteínas* se han resuelto más de 50 estructuras de quimeras de los dominios c-Src, Fyn y Abl en los que se intercambiaron los lazos RT y n-Src. De las estructuras resueltas de estas quimeras, todo parece indicar que la secuencia del lazo no es crítica para la formación de las estructuras entrecruzadas. Así, los lazos intercambiados del dominio Abl-SH3 sufren la apertura al igual que el lazo n-Src de la c-Src. Y adicionalmente, los lazos de la c-Src insertados en el dominio Abl, no producen la apertura del protómero de este dominio. En el caso de las estructuras de las quimeras de los dominios c-Src y Fyn el resultado es análogo: solo se han obtenido dímeros entrecruzados del dominio c-Src, mientras que la inserción de los lazos de este dominio en el dominio Fyn no han favorecido la formación de las estructuras entrecruzadas. Esto es aún más relevante cuando entre estos dominios la homología de sus secuencias es del orden del 80%, y en muchos casos los cambios son conservativos. Estos resultados sugieren que, si bien el lazo bisagra puede desempeñar un papel crítico, no es el único determinante de la formación de dímeros entrecruzados. Por ello, procede realizar un análisis más pormenorizado de las estructuras para detectar qué otros elementos favorecen la formación de las estructuras entrecruzadas en el dominio c-Src SH3, es decir, qué factores más allá de la composición del lazo, pueden contribuir a la estabilización de los dímeros entrecruzados.

En el capítulo anterior de la versión vírica de la c-Src, v-Src-SH3, hemos visto como las mutaciones en los lazos son importantes para la estabilización de la estructura entrecruzada y cómo la pérdida de un puente salino entre Arg95 y Glu115 parece desestabilizar la formación del dímero hasta el punto de que esta proteína es altamente amiloidogénica. Debido a las grandes dificultades para obtener el dominio SH3 con todas las mutaciones para realizar estudios estructurales, hemos recurrido a un mutante (Gln128Arg) para poder estabilizar la proteína lo suficiente y así, poder caracterizarla.

En esta Tesis hemos obtenidos resultados relevantes en cuanto a la formación de las estructuras entrecruzadas que pueden ayudar a aclarar el papel de otros residuos más allá del lazo bisagra en la estabilización de estas estructuras. En concreto, cabe destacar la obtención de la quimera SA-RT, la cual es diferente a las descritas previamente para la proteína nativa y mutantes puntuales del dominio c-Src-SH3. En esta estructura entrecruzada, aunque el lazo n-Src sigue actuando de lazo bisagra, no está presente la molécula de PEG de baja masa molecular en la interfaz del dímero y la orientación de las cadenas del protómero es distinta a la presente en otras estructuras entrecruzadas, tal como se puede ver en la Figura 4.14. De nuevo, el dímero presenta simetría binaria, tal como se refleja en que los datos cristalográficos se indexaron inicialmente en un grupo espacial $P6_422$ en el cual se modelaba una única molécula del protómero abierta y el dímero se generaba por el eje binario de simetría. Sin embargo, esta estructura resultaba en factores R más altos de los esperados para la resolución y calidad de los datos y se procesó la estructura con los datos indexados en el grupo espacial $P6_4$ con dos moléculas en la unidad asimétrica. En este caso, al obtener tanto la forma entrecruzada como la monomérica de la quimera nos ha sido posible comparar los cambios estructurales observados en el 3D-DS. Los factores B son útiles para identificar las zonas más flexibles de las estructuras al comparar los valores de este parámetro en las estructuras del dímero y monómero. Cabe destacar que las zonas más flexibles identificadas a través de este parámetro son el lazo RT y el distal, y sorprendentemente el lazo n-Src muestra valores de factor B más bajos en ambas estructuras de la proteína. En concreto es de las pocas estructuras del dominio c-Src SH3 donde se ha modelado en su totalidad el lazo n-Src con sus cadenas laterales. En general, en la mayoría de las estructuras de los dímeros entrecruzados del dominio c-Src obtenidas hasta la fecha son los lazos RT y n-Src los que muestran una mayor flexibilidad (Cámara-Artigas *et al.*, 2009; Bacarizo *et al.*, 2014; Cámara-Artigas *et al.*, 2014; Plaza-Garrido *et al.*, 2020; Plaza-Garrido, 2021; Salinas-García *et al.*, 2021). Esto es coherente con lo descrito hasta ahora en bibliografía también para otros dominios SH3 que sufren 3D-DS. Por ejemplo, el análisis de los factores B en el dímero entrecruzado del dominio Eps8-SH3 también muestra mayores valores de este parámetro en el lazo n-Src que es el que actúa como lazo bisagra (Kishan *et al.*, 2001).

4.2.4 ¿Hay un papel en el 3D-DS de otros residuos más allá de los del lazo bisagra?

En el análisis de los dímeros entrecruzados es común encontrar la formación de algún enlace exclusivo del dímero que justifica su mayor estabilización frente al monómero, en

el caso del dímero del dominio Eps8-SH3 son los puentes salinos entre el residuo Glu22 con la Arg18 y la Lys42 (Kishan *et al.*, 2001). En el caso de los dímeros entrecruzados del dominio c-Src es el puente salino entre la Arg95 y Glu115 el que parece jugar un papel clave. Para el dímero SA-RT este papel podrían desempeñarlo los residuos Glu97 e His122 y en el caso de la quimera SA-2X los residuos Lys103 y Asp91.

En estudios previos a esta Tesis se analizó el efecto de la mutación puntual en el residuo 128 del dominio c-Src-SH3 (Bacarizo *et al.*, 2014). Estos estudios demostraron que la naturaleza del residuo en esta posición producía un efecto estabilizador cuando la glutamina era sustituida por residuos cargados positivamente como arginina y lisina, a la vez que la mutación a glutámico daba lugar a una desestabilización. Este residuo se encuentra en el lazo distal en un entorno en el que el enlace de hidrógeno entre la Ser123 y el Glu106 juegan un papel crítico en el estado de transición del proceso de plegamiento de la proteína, actuando como sitio de nucleación (Gnanakaran & Garcia, 2003). Adicionalmente, nuestro grupo de investigación ha resuelto varias estructuras de mutantes puntuales del dominio c-Src SH3 y de su homólogo Fyn SH3, algunas de ellas como parte del proyecto de investigación bajo cuya financiación se ha desarrollado esta Tesis (Plaza-Garrido, 2021). Una curiosidad de estas estructuras cristalográficas, especialmente las de las formas nativas de los dominios c-Src y Fyn, es que en muchos casos se presentan con al menos dos moléculas en la unidad asimétrica que corresponden a dos conformaciones alternativas del lazo distal. Estas conformaciones están propiciadas por un reordenamiento distinto de los enlaces de hidrógeno entre residuos del lazo distal y divergente. Sin embargo, estas diferencias en las conformaciones del lazo distal no están presentes en las estructuras de los dímeros entrecruzados en los que las dos cadenas de protómeros abiertos son superponibles con un bajo valor de RMSD. Esto es aún más evidente cuando en las estructuras del dímero entrecruzado, la segunda cadena de protómero puede ser generada por un eje binario de simetría.

La estructura del monómero de la quimera SA-RT es peculiar ya que presenta una única molécula en la unidad asimétrica con una sola conformación en el lazo distal. Al compararla con la estructura del dímero entrecruzado de la misma quimera presenta notables diferencias en la conformación del lazo distal como puede verse en la Figura 4.10. Hay que señalar que la estructura del dímero fue resuelta a partir de cristales obtenidos a pH 5,0 y la del monómero a pH 8,0 y estas diferencias podrían ser atribuidas a los diferentes pHs. Este efecto del pH en la conformación del lazo distal puede

justificarse teniendo en cuenta la implicación de ciertos residuos ionizables en torno a este lazo, como por ejemplo el Glu106.

El caso de la estructura monomérica de la quimera SA-Src es totalmente distinto al de la SA-RT, y se repite el patrón observado en otras estructuras con dos conformaciones del dominio en la unidad asimétrica. En este caso se han modelado hasta ocho cadenas del dominio SH3 en la unidad asimétrica. Entre los cambios más remarcables encontrados en las diferentes moléculas del dominio SH3 es de destacar que la cadena lateral del Glu106 puede modelarse en dos conformaciones distintas, lo que modifica la red de enlaces de hidrógenos entre los residuos del lazo distal, en concreto con la Ser123. En las dos conformaciones posibles, el puente de hidrógeno entre el Glu106 del lazo divergente y la Ser123 del lazo distal se forma directamente o a través de una molécula de agua (Figura 4.17). Esto ya fue observado por primera vez en estructuras homólogas del dominio Fyn SH3 obtenidas a resolución atómica y en un amplio rango de pH (3,0-6,0). En estas estructuras, se modelaba el residuo Glu107 (equivalente al Glu106 de la c-Src) en dos conformaciones: una correspondía a la posición habitual, es decir, formando un enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos Glu107 y Ser124; en la segunda la cadena lateral del glutámico no formaba este enlace de hidrógeno. Cuando sólo se modelaba esta segunda conformación era posible modelar una molécula de agua entre las cadenas laterales de la serina y el glutámico (Figura 4.46). Otros cambios conformacionales observados en la estructura de la FS-Src-LAH obtenida en un rango de pHs afectaban a los residuos Asp100 y Tyr93 de la Fyn-SH3 (equivalentes a Asp99 y Tyr92 en la c-Src).

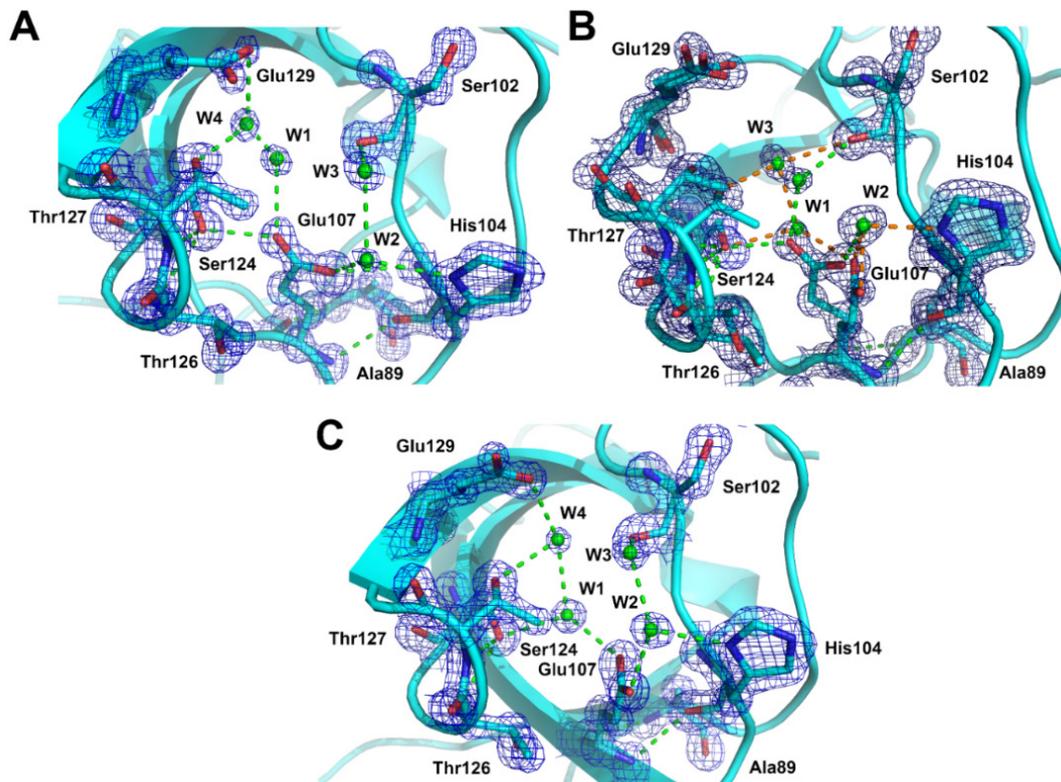


Figura 4.46. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc contorneado a 1.5σ de la distribución de los puentes de hidrógeno del Glu107 en sus distintas conformaciones. (A) Estructura obtenida a pH 3,0 (PDB: 7A2W). (B) Estructura obtenida a pH 5,0 (PDB: 7A2X). En verde se muestran los puentes de hidrógeno asociados al Glu107_A y en naranja los formados por el Glu107_B. (C) Estructura obtenida a pH 6,0 (PDB: 7A2Z) (Plaza-Garrido, 2021).

Las estructuras de las formas monoméricas de las quimeras AS-RT y AS-Src apuntan a que la sustitución de los residuos en los lazos tiene repercusiones en otros residuos que son críticos en el equilibrio conformacional del dominio SH3 en solución. Esto puede estar relacionado con el papel de los lazos intercambiados en la unión de MRP ya que las estructuras a alta resolución de los complejos del dominio c-Src SH3 con péptidos de alta afinidad como el APP12 o VSL12 muestran cambios en los lazos RT y n-Src en la unión que están correlacionados con las interacciones establecidas por residuos en estos lazos con residuos flanqueando el motivo canónico PxxP. Este es el caso del Asp99 que forma un puente salino con la arginina que flanquean el motivo canónico y que propicia la orientación de los MRP.

A pesar de las muchas condiciones ensayadas no ha sido posible obtener la forma monomérica de la quimera de la c-Src en la que se han intercambiado los dos lazos de la Abl-SH3, SA-2X. Sí ha sido posible obtener el complejo con el péptido de alta afinidad VSL12 en la cual se han obtenido dos moléculas del monómero del dominio SH3 unidas cada una a una molécula del péptido. Estos cristales se obtuvieron en presencia de PEG,

que en ausencia del péptido promueve la formación del dímero tal como hemos determinado mediante las medidas de DLS. Previamente se ha descrito que péptidos de alta afinidad son capaces de desplazar el equilibrio monómero-dímero entrecruzado hacia la forma monomérica. En este caso, los enlaces en la interfaz del complejo SA-2X-VSL12 no muestran diferencias significativas respecto al dominio c-Src-SH3-T98E-VSL12 (Bacarizo & Cámara-Artigas, 2013) y comparando el dominio SH3 del complejo con otros monómeros libres del dominio SH3 se observan los cambios habituales que existen entre el dominio libre y unido.

Las quimeras de la Abl en las que se han intercambiado los lazos de la c-Src, AS-RT, AS-Src y AS-2X, solo se han cristalizado en su forma monomérica. Mientras que las estructuras de las dos primeras presentan una sola molécula en la unidad asimétrica, la quimera AS-2X presenta dos moléculas, cuya principal diferencia se puede encontrar en los lazos n-Src y RT. Al igual que ocurre con los dominios c-Src, en el dominio Abl SH3 estos lazos son los que presentan una mayor flexibilidad debido a su papel en la unión de MRP.

A pesar de la desestabilización producida en el dominio Abl-SH3 como consecuencia de la introducción de los lazos n-Src y RT de la c-Src-SH3, no se ha propiciado la apertura del dominio para formar el dímero entrecruzado. Tampoco se ha promovido la formación de fibras amiloides, al menos en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en las quimeras Abl-Src demuestran que la formación de 3D-DS en estos dominios no solo depende de la naturaleza de los lazos presentes en el mismo. Como evidencia, la introducción del lazo n-Src de la c-Src-SH3, que actúa como lazo bisagra en todos los dímeros entrecruzados descritos de este dominio y sus mutantes, no induce a la formación de 3D-DS en la quimera AS-Src. Si consideramos los resultados de la quimera SA-2X en la que la sustitución del lazo RT y n-Src del dominio Abl producía también la apertura por ambos lazos, todo apunta a un papel marginal de estos lazos en la apertura y estabilización del oligómero entrecruzado del dominio c-Src-SH3. Otros estudios realizados con proteínas que forman 3D-DS apoyan también esta conclusión. Los llevados a cabo por O'Neill y colaboradores demostraron que una mutación puntual en el núcleo hidrofóbico del dominio B1 de la proteína L daba lugar a la formación de un dímero entrecruzado, evidenciando que el lazo bisagra no era el único factor responsable de este proceso (O'Neill *et al.*, 2001). Mediante simulaciones y análisis computacional Sirota y colaboradores sugirieron que las mutaciones que provocan una desestabilización

del núcleo hidrofóbico del monómero pueden ser las responsables del 3D-DS, al disminuir la estabilidad termodinámica del estado monomérico, y con ello la barrera energética de su desplegamiento (Sirota *et al.*, 2008). En el caso de la proteína *suc1* las mutaciones en una de sus láminas β , que se encontraba alejada del lazo bisagra, provocaban una alteración del equilibrio monómero-dímero entrecruzado, si bien los autores describen que el efecto no era tan notorio como las mutaciones en la región bisagra (Rousseau *et al.*, 2012).

4.2.5 ¿Está relacionado el 3D-DS con la formación de amiloides?

Algunos autores sugieren cierta correlación entre la formación de 3D-DS y la propensión a oligomerizar dando lugar a fibras amiloides (Schlunegger *et al.*, 1997; Bennet *et al.*, 2006; Van der Wel, 2012; Cámara-Artigas *et al.*, 2016; Mondal & Redy, 2020). En muchos casos el 3D-DS da lugar a la formación de estructuras entrecruzadas cerradas, oligómeros entrecruzados, cuyos extremos no pueden continuar oligomerizando. El ejemplo típico es la primera proteína en la que se describió este proceso, la RNasa (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Gotte & Libonati, 2004). Pero tal como hemos comentado antes, alteraciones en uno de los lazos bisagra de esta proteína pueden producir la formación de fibras amiloides, para las cuales se han propuesto varios modelos (Sambashivan *et al.*, 2005). En otras proteínas sí se ha descrito la ocurrencia simultánea de ambos procesos de plegamiento alternativo como es el caso de la cistatina C, cuyas fibras amiloides están relacionadas con el desarrollo de enfermedades (Knaus *et al.*, 2001; Janowski *et al.*, 2001; Staniforth *et al.*, 2001; Liu & Eisenberg, 2002).

En los últimos años la criomicroscopía electrónica ha adquirido gran importancia en el estudio estructural de macromoléculas gracias a que los avances tecnológicos han permitido aumentar los límites de resolución de las estructuras resueltas (PDB: 6Z9F, 6Z9E, 6Z6U, 7A6A, 7A6B, Yip *et al.*, 2020). Esta técnica presenta la gran ventaja de no tener que cristalizar las proteínas para su determinación estructural, lo que la hace imprescindible para la determinación de las estructuras de grandes complejos supramoleculares o para determinar las de aquellas proteínas reacias a cristalizar como es el caso de las fibras amiloides (Fitzpatrick *et al.*, 2017; Kollmer *et al.*, 2019; Cendrowska *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021). Aún con la ayuda de la microscopía, el mecanismo molecular que da lugar a estos agregados aún no está del todo claro, y es en este aspecto donde la caracterización del proceso de formación de oligómeros

entrecruzados puede ser clave (Cámara-Artigas, 2016; Mondal & Redy, 2019; Mondal & Redy, 2020).

El dominio c-Src-SH3 es un buen candidato para realizar estudios de la correlación entre el 3D-DS y la formación de amiloides. Antes de resolver la primera estructura cristalográfica de este dominio algunos estudios computacionales proponían la existencia de dímeros entrecruzados por intercambio entre dos protómeros abiertos del lazo RT (Ding *et al.*, 2002). Esto fue confirmado experimentalmente por nuestro grupo de investigación (Cámara-Artigas *et al.*, 2009). En el mismo trabajo de Ding y colaboradores se proponía la formación de un protómero abierto en el que el lazo RT también se abría y daba lugar a un oligómero abierto capaz de polimerizar en forma de fibras amiloides. Este modelo se correspondería a lo observado en la quimera SA-2X, en la cual se forma un dímero entrecruzado con los dos lazos intercambiados actuando de lazo bisagra, aunque en este caso la apertura del lazo RT promueve la formación de un dímero entrecruzado estable. Las pruebas de formación de amiloides en esta quimera han dado resultados positivos si la concentración de proteína en la disolución es lo suficientemente alta, es decir unos 10 mg/mL, la cual coincide con aquellas concentraciones que promueve la formación del dímero entrecruzado. En su estudio computacional Ding y colaboradores concluían que aquellas proteínas que contenían lazos inestables podían ser susceptibles a agregación, y que precisamente estos elementos de estructura secundaria inestables podían constituir los bloques elementales para la construcción de las fibras amiloides. Durante este proceso de agregación, los residuos de los aminoácidos en los bloques de construcción pueden reorientarse para establecer conexiones estables, principalmente mediante interacciones de enlaces de hidrógeno. Observando las estructuras cristalográficas obtenidas en esta Tesis, y otras pertenecientes a nuestro grupo de investigación, el papel del Asp99 puede ser clave en este proceso. Es precisamente este residuo, que, por su papel en el proceso de unión de MRP, el que sufre un cambio conformacional más drástico y como consecuencia un intercambio de los enlaces de hidrógeno en los que participa su cadena lateral. Este residuo no está presente en el dominio Abl SH3 y aunque está sustituido por una treonina (Thr79), esta no tiene el potencial de formación de enlaces de hidrógeno e interacciones salinas que tiene el aspartato, y de hecho no participa en la unión de MRP en los complejos de este dominio (Figura 4.47).

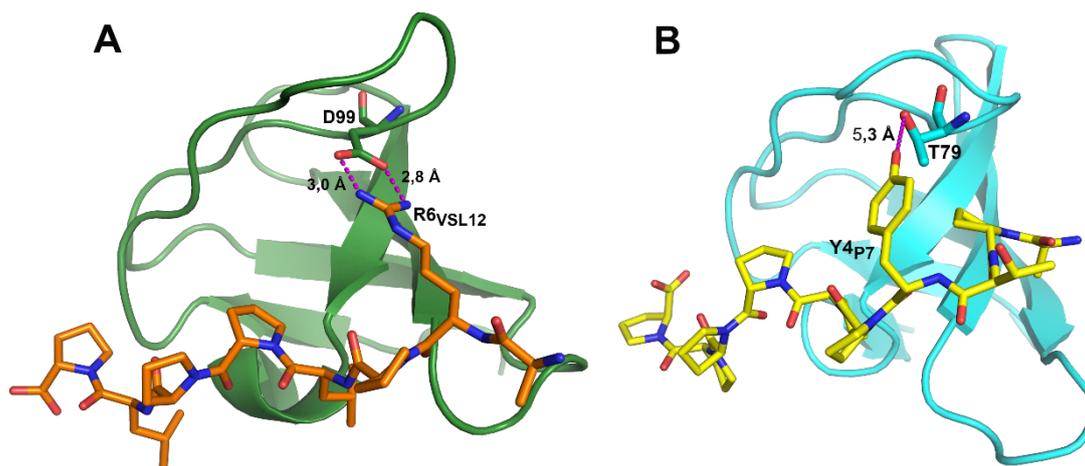


Figura 4.47. Interacción de (A) VSL12 (VSLARRPLPLP, naranja) con el residuo Asp99 de la c-Src-SH3 (verde oscuro) y (B) P7 (APTYPPIPPPP, amarillo) con el residuo Thr79 de la Abl-SH3 (cian). Nótese que este último este residuo no interacciona con ninguno de los residuos de la MRP.

Nuestros estudios demuestran que las quimeras de la Src-Abl, SA-RT y SA-2X forman amiloides tanto a pH ligeramente ácido como neutro. Estas son precisamente las quimeras que se han cristalizado como dímeros entrecruzados. No se ha detectado la formación de fibras amiloides en la quimera SA-Src, que precisamente es la que no hemos conseguido cristalizar como dímeryo entrecruzado. Esto en parte puede ser debido a la menor solubilidad de la quimera, que no se puede solubilizar a concentraciones mayores de 5 mg/mL, mientras que los amiloides de las otras quimeras Src-Abl se obtuvieron para muestras a 10 mg/mL. Por otro lado, esta es la quimera que presenta menor estabilidad en presencia de GdnHCl, por lo que sería de esperar un comportamiento análogo al de las otras quimeras.

La correlación que hemos encontrado entre la formación de dímeros entrecruzados y fibras amiloides en las quimeras Src-Abl, parece corroborar el papel del 3D-DS como precursores de la formación de fibras amiloides (Guo & Eisenberg, 2006). Sin embargo, es discutible que sean los protómeros los que en un intercambio abierto fuera de control (*runaway domain swapping*) constituyan las unidades que formen las fibras amiloides. Con los datos disponibles lo único que podemos afirmar es la correlación entre la formación de 3D-DS y la tendencia a formar amiloides del dominio c-Src SH3. Ello puede ser indicativo de que ambos procesos pueden compartir al menos los pasos iniciales. Si se dan las circunstancias adecuadas para estabilizar los protómeros abiertos estos abortan la formación de fibras amiloides. De no favorecerse la formación de estos oligómeros estables, la proteína puede avanzar hasta el proceso de formación de fibras amiloides, tal como concluíamos de los experimentos realizados con el dominio v-Src-SH3.

Conclusiones

Conclusions

De los estudios realizados en este trabajo, podemos concluir:

1. La caracterización biofísica de las quimeras objeto de estudio en esta Tesis muestra que el intercambio de los lazos en las quimeras Src-Abl presentan solo cambios ligeros en la estabilidad del dominio siendo más estable la que introduce el lazo RT de la Abl-SH3. Mientras, en las quimeras Abl-Src se observa una notable disminución de la estabilidad en comparación con el dominio nativo, siendo más notable cuando ambos lazos son intercambiados.
2. Solo se han conseguido dímeros entrecruzados de las quimeras Src-Abl. La introducción simultánea de los lazos RT y n-Src del dominio Abl-SH3 en c-Src-SH3 da lugar a un dímero entrecruzado donde se produce la apertura de ambos lazos. En el caso de la quimera en la que se introduce el lazo RT del dominio Abl-SH3 se obtiene un dímero entrecruzado con una orientación diferente al dominio nativo. Por último, no hemos obtenido el dímero entrecruzado de la quimera en la que se ha introducido el lazo n-Src de la Abl, a pesar de que este mismo lazo actúa como lazo bisagra en la quimera SA-2X, que contiene los dos lazos intercambiados.
3. En las condiciones ensayadas en este estudio, las quimeras Abl-Src no forman el dímero entrecruzado. A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis podemos concluir que el proceso de 3D-DS en el dominio c-Src-SH3 depende de otros factores adicionales, más allá de la naturaleza de los lazos del dominio.
4. Algunas quimeras solo ha sido posible obtenerlas en la forma de dímeros entrecruzados, cómo es el caso de la quimera SA-2X. Solo ha sido posible obtener el dominio en su forma monomérica unido a péptidos de alta afinidad, los cuales se ha descrito previamente que desplazan el equilibrio monómero-dímero entrecruzado al estado monomérico.
5. Se ha estudiado y caracterizado la formación de fibras amiloides y las únicas quimeras que han dado positivo en las pruebas de detección de amiloides han sido las SA-2X y SA-RT, tanto a pH 5,0 como 7,0. En el caso de las quimeras Abl-Src, todas las pruebas realizadas resultaron negativas, si bien la baja solubilidad de esta proteína puede ser un impedimento para estudiar este proceso de agregación. Estos resultados podrían indicar una correlación entre la formación de dímeros entrecruzados y la formación de amiloides, de forma que el mecanismo inicial que permite la apertura del protómero puede ser común a ambos procesos.

6. La variante oncogénica de la c-Src tirosina quinasa, v-Src, contiene mutaciones en los lazos RT, n-Src y distal. El mutante v-Src-SH3 que contiene solo las mutaciones en los lazos n-Src y distal (variante W95R-I96T), muestra una estabilidad reducida en comparación con el dominio c-Src, pero mayor que la proteína que contienen las mutaciones en el lazo RT. Mientras que la variante W95R-I96T sigue formando los dímeros entrecruzados con la misma orientación que la proteína nativa c-Src, las variantes que presentan las mutaciones en el lazo RT no forman estos dímeros, pero son muy propensas a formar agregados de alto peso molecular.
7. La comparación de las estructuras del dominio SH3, v-Src-SH3-Q128R, que contienen todas las mutaciones oncogénicas con la conformación inactiva de la tirosina quinasa c-Src de pollo revela la pérdida de algunas interacciones que podrían ser críticas para estabilizar el estado inactivo o cerrado de la quinasa. A su vez, la obtención del complejo v-Src-SH3-Q128R-VSL12 muestra que los residuos mutados no afectan a la formación del complejo, por lo que las estructuras cristalográficas de este trabajo podrían explicar el comportamiento de la quinasa v-Src, la cual no puede auto inhibirse uniéndose al conector SH2-SH1, mientras conserva su capacidad para reconocer proteínas asociadas para su fosforilación.

From the studies present in this work, we can conclude:

1. The biophysical characterization of the chimeras under study shows that in the Src-Abl chimeras, the loops' interchange only produces slight changes in the domain's stability. From the three Src-Abl chimeras, the protein with the RT loop of the Abl-SH3 is the most stable. Meanwhile, in the Abl-Src chimeras, a notable decrease in the stability is observed compared to the native protein, which is more notable when both loops, RT and n-Src, are exchanged.
2. We have obtained only intertwined dimers of Src-Abl chimeras. Moreover, the simultaneous introduction of the RT and n-Src loops of the Abl-SH3 domain into c-Src-SH3 gives an intertwined dimer where both loops are open. Besides, the chimera with the RT loop of the Abl-SH3 domain, gives an intertwined dimer with a different arrangement to the native domain. Finally, we have not obtained the intertwined dimer of the chimera in which the n-Src loop of Abl-SH3 has been introduced. This same loop acts as a hinge loop in the SA-2X chimera, which contains the two loops swapped.
3. Under the conditions tested in this study, the Abl-Src chimeras do not form the intertwined dimer. From the results obtained, we can conclude that the 3D-DS process in the c-Src-SH3 domain depends on additional factors beyond the nature of the loops.
4. Some chimeras have only crystallized as intertwined dimers. This is the case with the SA-2X chimera. It has only been possible to obtain the domain in its monomeric form in complex with high-affinity peptides. It has been previously described that the binding of these peptides favors the monomer-intertwined dimer equilibrium to the monomeric state.
5. The formation of amyloid fibers has been studied and characterized. The only chimeras that were positive for amyloid test were SA-2X and SA-RT, both at pH 5.0 and 7.0. In the case of Abl-Src chimeras, all the tests performed were negative. However, the low solubility of this protein may be an impediment to studying this aggregation process. These results might indicate a correlation between the formation of intertwined dimers and amyloids. Both protein misfolding processes might share the mechanism's initial steps that allow the opening of the protomer and the consecutive aggregation process.

6. The oncogenic variant of c-Src tyrosine kinase, v-Src, contains mutations in the RT, n-Src and distal loops. The v-Src-SH3 mutant containing only mutations in the n-Src and distal loop (variant W95R-I96T) shows reduced stability than the c-Src domain. Still, it is more stable than those variants containing mutations in the RT loop. The W95R-I96T variant forms intertwined dimers in the same orientation as the native c-Src, but variants with mutations in the RT loop do not form these dimers but are prone to form high molecular weight aggregates.
7. The comparison of the v-Src-SH3-Q128R with the inactive conformation of chicken c-Src tyrosine kinase reveals the loss of some interactions that might be critical to stabilizing the inactive state of the kinase. At the same time, obtaining the v-Src-SH3-Q128R-VSL12 complex shows that the mutated residues do not affect the formation of the complex. Indeed, the crystallographic structures in this work could explain the particular behavior of the v-Src kinase. This kinase cannot bind to the SH2-SH1 linker to self-inhibition while retaining its ability to recognize partners proteins for phosphorylation.

Bibliografía

1. Adamcik J, Mezzenga R. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018 Jul 9;57(28):8370-8382.
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. 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.
4. Agius MP, Ko KS, Johnson TK, Kwarcinski FE, Phadke S, Lachacz EJ, Soellner MB. Selective Proteolysis to Study the Global Conformation and Regulatory Mechanisms of c-Src Kinase. *ACS Chem Biol.* 2019 Jul 19;14(7):1556-1563.
5. Alcalá S, Mayoral-Varo V, Ruiz-Cañas L, López-Gil JC, Heesch C, Martín-Pérez J, Sainz B Jr. Targeting SRC Kinase Signaling in Pancreatic Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 9;21(20):7437.
6. Almeida ZL, Brito RMM. Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules.* 2020 Mar 6;25(5):1195.
7. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 1973 Jul 20;181(4096):223-30.
8. Anfinsen 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.
9. Arakawa T, Timasheff SN. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J.* 1985 Mar;47(3):411-4.
10. Arbesú M, Pons M. Integrating disorder in globular multidomain proteins: Fuzzy sensors and the role of SH3 domains. *Arch Biochem Biophys.* 2019 Nov 30; 677:108161.
11. Arzensek. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*, 2010.
12. Atwood CS, Bowen RL, Smith MA, Perry G. Cerebrovascular requirement for sealant, anti-coagulant and remodeling molecules that allow for the maintenance of vascular integrity and blood supply. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003 Sep;43(1):164-78.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. Baldwin AJ, Bader R, Christodoulou J, MacPhee CE, Dobson CM, Barker PD. Cytochrome display on amyloid fibrils. *J Am Chem Soc*. 2006 Feb 22;128(7):2162-3.
19. Ben-Neriah Y, Bernards A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D. Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell*. 1986 Feb 28;44(4):577-86.
20. 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.
21. Bennett MJ, Sawaya MR, Eisenberg D. Deposition diseases and 3D domain swapping. *Structure*. 2006 May;14(5):811-24.
22. Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci*. 1995 Dec;4(12):2455-68.
23. Bergfors T. Seeds to crystals. *J Struct Biol*. 2003 Apr;142(1):66-76.
24. Bergfors T. Succeeding with seeding: some practical advice. In *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*. Springer, Dordrecht; 2007, 1-10
25. Berndt S, Gurevich VV, Iverson TM. Crystal structure of the SH3 domain of human Lyn nonreceptor tyrosine kinase. *PLoS One*. 2019 Apr 10;14(4): e0215140.
26. Bianchi G, Longhi S, Grandori R, Brocca S. Relevance of Electrostatic Charges in Compactness, Aggregation, and Phase Separation of Intrinsically Disordered Proteins. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 27;21(17):6208.
27. Blakes AJM, Gaul E, Lam W, Shannon N, Knapp KM, Bicknell LS, Jackson MR, Wade EM, Robertson S, White SM, Heller R, Chase A, Baralle D, Douglas AGL. Pathogenic variants causing ABL1 malformation syndrome cluster in a myristoyl-binding pocket and increase tyrosine kinase activity. *Eur J Hum Genet*. 2021 Apr;29(4):593-603.
28. 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.
29. Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7918-27.
30. Brasher BB, Roumiantsev S, Van Etten RA. Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain. *Oncogene*. 2001 Nov 22;20(53):7744-52.
31. Brasher BB, Van Etten RA. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem*. 2000 Nov 10;275(45):35631-7.
32. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7957-68.
33. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 7;1287(2-3):121-49.
34. Brugge JS, Erikson RL. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*. 1977 Sep 22;269(5626):346-8.
35. Bucciantini M, Rigacci S, Stefani M. Amyloid Aggregation: Role of Biological Membranes and the Aggregate-Membrane System. *J Phys Chem Lett*. 2014 Feb 6;5(3):517-27.

36. Cahyono RN, Yamanaka M, Nagao S, Shibata N, Higuchi Y, Hirota S. 3D domain swapping of azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Metallomics*. 2020 Mar 25;12(3):337-345.
37. Callaway E. 'It will change everything': DeepMind's AI makes gigantic leap in solving protein structures. *Nature*. 2020 Dec;588(7837):203-204.
38. 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
39. 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.
40. 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.
41. Canchi DR, García AE. Cosolvent effects on protein stability. *Annu Rev Phys Chem*. 2013; 64:273-93.
42. Cancino GI, Toledo EM, Leal NR, Hernandez DE, Yévenes LF, Inestrosa NC, Alvarez AR. STI571 prevents apoptosis, tau phosphorylation and behavioural impairments induced by Alzheimer's beta-amyloid deposits. *Brain*. 2008 Sep;131(Pt 9):2425-42.
43. 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.
44. Cendrowska U, Silva PJ, Ait-Bouziad N, Müller M, Guven ZP, Vieweg S, Chiki A, Radamaker L, Kumar ST, Fändrich M, Tavanti F, Menziani MC, Alexander-Katz A, Stellacci F, Lashuel HA. Unraveling the complexity of amyloid polymorphism using gold nanoparticles and cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Mar 24;117(12):6866-6874.
45. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*. 2002 Feb 1;295(5556):851-5.
46. 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.
47. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Jan;66 (Pt 1):12-21.
48. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75:333-66
49. 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 USA*. 1999 Mar 30;96(7):3590-4.
50. Cohen AS. General introduction and a brief history of amyloidosis. In *Amyloidosis*. Springer, Dordrecht; 1986, 3-19.
51. Cohen SI, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TP. Nucleated polymerisation in the presence of pre-formed seed filaments. *Int J Mol Sci*. 2011;12(9):5844-52.
52. Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal*. 2010 Sep 14;3(139):re6.

53. Contreras PS, Tapia PJ, González-Hódar L, Peluso I, Soldati C, Napolitano G, Matarese M, Heras ML, Valls C, Martinez A, Balboa E, Castro J, Leal N, Platt FM, Sobota A, Winter D, Klein AD, Medina DL, Ballabio A, Alvarez AR, Zanlungo S. c-Abl Inhibition Activates TFEB and Promotes Cellular Clearance in a Lysosomal Disorder. *iScience*. 2020 Oct 15;23(11):101691.
54. Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science*. 1986 Mar 21;231(4744):1431-4.
55. Corbi-Verge C, Marinelli F, Zafra-Ruano A, Ruiz-Sanz J, Luque I, Faraldo-Gómez JD. Two-state dynamics of the SH3-SH2 tandem of Abl kinase and the allosteric role of the N-cap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Sep 3;110(36):E3372-80.
56. Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Manley PW, Jahnke W, Fabbro D, Liebetanz J, Meyer T. The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure*. 2005 Jun;13(6):861-71.
57. Crestfield AM, Stein WH, Moore S. On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease. *Arch Biochem Biophys*. 1962 Sep; Suppl 1:217-22.
58. D'Arcy A, Bergfors T, Cowan-Jacob SW, Marsh M. Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: what have we learned? *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Sep;70(Pt 9):1117-26.
59. 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.
60. Deville SS, Delgadillo Silva LF, Vehlow A, Cordes N. c-Abl Tyrosine Kinase Is Regulated Downstream of the Cytoskeletal Protein Synemin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Radioresistance and DNA Repair. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 1;21(19):7277.
61. Di Donato A, Cafaro V, Romeo I, D'Alessio G. Hints on the evolutionary design of a dimeric RNase with special bioactions. *Protein Sci*. 1995 Aug;4(8):1470-7.
62. Diaz-Avalos R, Long C, Fontano E, Balbirnie M, Grothe R, Eisenberg D, Caspar DL. Cross-beta order and diversity in nanocrystals of an amyloid-forming peptide. *J Mol Biol*. 2003 Jul 25;330(5):1165-75.
63. Dill KA, Ozkan SB, Shell MS, Weikl TR. The protein folding problem. *Annu Rev Biophys*. 2008; 37:289-316.
64. Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*. 1990 Aug 7;29(31):7133-55.
65. 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.
66. Ding F, Prutzman KC, Campbell SL, Dokholyan NV. Topological determinants of protein domain swapping. *Structure*. 2006 Jan;14(1):5-14.
67. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):884-90
68. Eakin CM, Attenello FJ, Morgan CJ, Miranker AD. Oligomeric assembly of native-like precursors precedes amyloid formation by beta-2 microglobulin. *Biochemistry*. 2004 Jun 22;43(24):7808-15.
69. 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.
70. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Apr;66(Pt 4):486-501.

71. Estrada LD, Chamorro D, Yañez MJ, Gonzalez M, Leal N, von Bernhardi R, Dulcey AE, Marugan J, Ferrer M, Soto C, Zanlungo S, Inestrosa NC, Alvarez AR. Reduction of Blood Amyloid- β Oligomers in Alzheimer's Disease Transgenic Mice by c-Abl Kinase Inhibition. *J Alzheimers Dis.* 2016 Oct 4;54(3):1193-1205.
72. Evans PR. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 Apr;67(Pt 4):282-92.
73. Falsone SF, Leptihn S, Osterauer A, Haslbeck M, Buchner J. Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase. *J Mol Biol.* 2004 Nov 12;344(1):281-91.
74. Fändrich M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Aug;64(16):2066-78.
75. 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.
76. Filimonov VV, Azuaga AI, Viguera AR, Serrano L, Mateo PL. A thermodynamic analysis of a family of small globular proteins: SH3 domains. *Biophys Chem.* 1999 Mar 29;77(2-3):195-208.
77. Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Crowther RA, Ghetti B, Goedert M, Scheres SHW. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature.* 2017 Jul 13;547(7662):185-190.
78. 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.
79. Frame MC, Fincham VJ, Carragher NO, Wyke JA. v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Apr;3(4):233-45.
80. Frederikse PH. Amyloid-like protein structure in mammalian ocular lenses. *Curr Eye Res.* 2000 Jun;20(6):462-8.
81. Gavira JA. Current trends in protein crystallization. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Jul 15; 602:3-11.
82. Gnanakaran S, Garcia AE. Folding of a highly conserved diverging turn motif from the SH3 domain. *Biophys J.* 2003 Mar;84(3):1548-62.
83. Gomes CM, Faísca PF. Protein Folding: An Introduction. In *Protein Folding.* Springer, Cham; 2019, 1-63.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID, Dobson CM. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Apr 14;95(8):4224-8.
89. Guo Z, Eisenberg D. Runaway domain swapping in amyloid-like fibrils of T7 endonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 May 23;103(21):8042-7.

90. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Jan;5(1):33-44.
91. Härd T, Lendel C. Inhibition of amyloid formation. *J Mol Biol.* 2012 Aug 24;421(4-5):441-65
92. 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.
93. Harper JD, Lieber CM, Lansbury PT Jr. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem Biol.* 1997 Dec;4(12):951-9.
94. Hebron ML, Lonskaya I, Moussa CE. Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of α -synuclein in Parkinson's disease models. *Hum Mol Genet.* 2013 Aug 15;22(16):3315-28.
95. Hill AF, Barnham KJ, Bottomley SP, Cappai R. *Protein Folding, Misfolding, and Disease.* Humana Press; 2011.
96. Hirota S. Oligomerization of cytochrome c, myoglobin, and related heme proteins by 3D domain swapping. *J Inorg Biochem.* 2019 May; 194:170-179.
97. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, Fletcher JA, Zhu M, Marino-Enriquez A, Friedlander P, Gonzalez R, Weber JS, Gajewski TF, O'Day SJ, Kim KB, Lawrence D, Flaherty KT, Luke JJ, Collichio FA, Ernstoff MS, Heinrich MC, Beadling C, Zukotynski KA, Yap JT, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Fisher DE. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol.* 2013 Sep 10;31(26):3182-90.
98. Hoehler T, von Wichert G, Schimanski C, Kanzler S, Moehler MH, Hinke A, Seufferlein T, Siebler J, Hochhaus A, Arnold D, Hallek M, Hofheinz R, Hacker UT. Phase I/II trial of capecitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab and imatinib in patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK 0205. *Br J Cancer.* 2013 Sep 17;109(6):1408-13.
99. Honda T, Morii M, Nakayama Y, Suzuki K, Yamaguchi N, Yamaguchi N. v-Src-driven transformation is due to chromosome abnormalities but not Src-mediated growth signaling. *Sci Rep.* 2018 Jan 18;8(1):1063.
100. 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.
101. 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.
102. Iconomidou VA, Vriend G, Hamodrakas SJ. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS Lett.* 2000 Aug 18;479(3):141-5.
103. Ihara H, Okada T, Taniguchi N, Ikeda Y. Involvement of the α -helical and Src homology 3 domains in the molecular assembly and enzymatic activity of human α 1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020 Jul;1864(7):129596.
104. Ishizawa R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell.* 2004 Sep;6(3):209-14.
105. 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.

106. 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.
107. 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.
108. Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry.* 1992 Dec 15;31(49):12345-52.
109. Jiang M, Axe T, Holgate R, Rubbi CP, Okorokov AL, Mee T, Milner J. p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene.* 2001 Sep 6;20(39):5449-58.
110. Joosten RP, Long F, Murshudov GN, Perrakis A. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ.* 2014 May 30;1(Pt 4):213-20.
111. Jove R, Hanafusa H. Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu Rev Cell Biol.* 1987; 3:31-56.
112. Jove R, Hanafusa T, Hamaguchi M, Hanafusa H. In vivo phosphorylation states and kinase activities of transforming p60c-src mutants. *Oncogene Res.* 1989;5(1):49-60.
113. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021 Aug;596(7873):583-589.
114. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Feb;66(Pt 2):125-32.
115. Kato JY, Takeya T, Grandori C, Iba H, Levy JB, Hanafusa H. Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src protein to a transforming protein. *Mol Cell Biol.* 1986 Dec;6(12):4155-60.
116. Kay BK. SH3 domains come of age. *FEBS Lett.* 2012 Aug 14;586(17):2606-8.
117. Keten S, Buehler MJ. Geometric confinement governs the rupture strength of H-bond assemblies at a critical length scale. *Nano Lett.* 2008 Feb;8(2):743-8.
118. Kharbanda S, Pandey P, Morris PL, Whang Y, Xu Y, Sawant S, Zhu LJ, Kumar N, Yuan ZM, Weichselbaum R, Sawyers CL, Pandita TK, Kufe D. Functional role for the c-Abl tyrosine kinase in meiosis I. *Oncogene.* 1998 Apr 9;16(14):1773-7.
119. Kilambi KP, Gray JJ. Rapid calculation of protein pK_a values using Rosetta. *Biophys J.* 2012 Aug 8;103(3):587-595.
120. 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.
121. 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.
122. Klimov DK, Thirumalai D. Stiffness of the distal loop restricts the structural heterogeneity of the transition state ensemble in SH3 domains. *J Mol Biol.* 2002 Apr 12;317(5):721-37.

123. Knauer MF, Soreghan B, Burdick D, Kosmoski J, Glabe CG. Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7437-41.
124. Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK, Yee VC. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*. 2001 Sep;8(9):770-4.
125. Knowles TP, Fitzpatrick AW, Meehan S, Mott HR, Vendruscolo M, Dobson CM, Welland ME. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1900-3.
126. Kollmer M, Close W, Funk L, Rasmussen J, Bsoul A, Schierhorn A, Schmidt M, Sigurdson CJ, Jucker M, Fändrich M. Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nat Commun*. 2019 Oct 29;10(1):4760.
127. Kolodziejczyk R, Michalska K, Hernandez-Santoyo A, Wahlbom M, Grubb A, Jaskolski M. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J*. 2010 Apr;277(7):1726-37.
128. Krissinel E, Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2256-68.
129. Krissinel E. Macromolecular complexes in crystals and solutions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011 Apr;67(Pt 4):376-85.
130. Kundu S, Jernigan RL. Molecular mechanism of domain swapping in proteins: an analysis of slower motions. *Biophys J*. 2004 Jun ;86(6):3846-54.
131. Kurochkina N, Guha U. SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophys Rev*. 2013 Mar;5(1):29-39.
132. Lafita A, Tian P, Best RB, Bateman A. Tandem domain swapping: determinants of multidomain protein misfolding. *Curr Opin Struct Biol*. 2019 Oct; 58:97-104.
133. Lansbury PT Jr. Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3342-4.
134. Lapidus D, Duka V, Stonkus V, Czaplewski C, Liwo A, Ventura S, Liepina I. Multiple β -sheet molecular dynamics of amyloid formation from two ABI-SH3 domain peptides. *Biopolymers*. 2012;98(6):557-66.
135. Larson SM, Davidson AR. The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci*. 2000 Nov;9(11):2170-80.
136. Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, Jun B, Murti G, Ribeiro RC, Zambetti G, Schultz CP, Kriwacki RW. Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *J Mol Biol*. 2003 Mar 28;327(3):699-709.
137. Levaot N, Simoncic PD, Dimitriou ID, Scotter A, La Rose J, Ng AH, Willett TL, Wang CJ, Janmohamed S, Grynpas M, Reichenberger E, Rottapel R. 3BP2-deficient mice are osteoporotic with impaired osteoblast and osteoclast functions. *J Clin Invest*. 2011 Aug;121(8):3244-57.
138. Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE, Bishop JM. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell*. 1978 Oct;15(2):561-72.
139. Li Q, Babinchak WM, Surewicz WK. Cryo-EM structure of amyloid fibrils formed by the entire low complexity domain of TDP-43. *Nat Commun*. 2021 Mar 12;12(1):1620.

140. Li SS. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*. 2005 Sep 15;390(Pt 3):641-53.
141. Lim WA, Richards FM, Fox RO. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*. 1994 Nov 24;372(6504):375-9.
142. Lipsick J. A History of Cancer Research: Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019 Feb 1;11(2): a035592.
143. Liu Y, Eisenberg D. 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci*. 2002 Jun;11(6):1285-99.
144. 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.
145. 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.
146. Maass N, Schem C, Bauerschlag DO, Tiemann K, Schaefer FW, Hanson S, Muth M, Baier M, Weigel MT, Wenners AS, Alkatout I, Bauer M, Jonat W, Mundhenke C. Final safety and efficacy analysis of a phase I/II trial with imatinib and vinorelbine for patients with metastatic breast cancer. *Oncology*. 2014;87(5):300-10.
147. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KP, Simon R, Schubert D, Eisenberg D, Rivier J, Sawchenko P, Vale W, Riek R. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 2009 Jul 17;325(5938):328-32.
148. Makin OS, Atkins E, Sikorski P, Johansson J, Serpell LC. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):315-20.
149. Mamour Sakho EA, Oluwafemi, OS. Dynamic light scattering (DLS). *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. 2017, 3-37.
150. 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.
151. Mascarenhas NM, Gosavi S. Protein Domain-Swapping Can Be a Consequence of Functional Residues. *J Phys Chem B*. 2016 Jul 21;120(28):6929-38.
152. Mascarenhas NM, Gosavi S. Understanding protein domain-swapping using structure-based models of protein folding. *Prog Biophys Mol Biol*. 2017 Sep; 128:113-120.
153. 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.
154. Mayer BJ, Gupta R. Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 228:1-22.
155. McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Jan;70(Pt 1):2-20.
156. McPherson A. Protein Crystallization. *Methods Mol Biol*. 2017; 1607:17-50.
157. Meersman F, Dobson CM. Probing the pressure-temperature stability of amyloid fibrils provides new insights into their molecular properties. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Mar;1764(3):452-60.

158. Miyazaki K, Senga T, Matsuda S, Tanaka M, Machida K, Takenouchi Y, Nimura Y, Hamaguchi M. Critical amino acid substitutions in the Src SH3 domain that convert c-Src to be oncogenic. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Oct 5;263(3):759-64.
159. Moissoglu K, Sachdev S, Gelman IH. Enhanced v-Src-induced oncogenic transformation in the absence of focal adhesion kinase is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May 13;330(3):673-84.
160. Mondal B, Reddy G. A Transient Intermediate Populated in Prion Folding Leads to Domain Swapping. *Biochemistry.* 2020 Jan 14;59(1):114-124.
161. 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.
162. Moore CJ, Winder SJ. Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun Signal.* 2010 Feb 17; 8:3.
163. 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.
164. Morel B, Ruzafa D, Conejero-Lara F. SH3 domains as suitable models to study amyloid aggregation. In *SH Domains.* Springer, Cham; 2015, 1-15.
165. 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.
166. Musacchio A, Wilmanns M, Saraste M. Structure and function of the SH3 domain. *Prog Biophys Mol Biol.* 1994;61(3):283-97.
167. Musacchio A. How SH3 domains recognize proline. *Adv Protein Chem.* 2002; 61:211-68.
168. Nagao S, Suda A, Kobayashi H, Shibata N, Higuchi Y, Hirota S. Thermodynamic Control of Domain Swapping by Modulating the Helical Propensity in the Hinge Region of Myoglobin. *Chem Asian J.* 2020 Jun 2;15(11):1743-1749.
169. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4236-43.
170. Nagar B, Hantschel O, Seeliger M, Davies JM, Weis WI, Superti-Furga G, Kuriyan J. Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol Cell.* 2006 Mar 17;21(6):787-98.
171. Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, Clarkson B, Superti-Furga G, Kuriyan J. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell.* 2003 Mar 21;112(6):859-71.
172. Navarra G, Leone M, Militello V. Thermal aggregation of beta-lactoglobulin in presence of metal ions. *Biophys Chem.* 2007 Dec;131(1-3):52-61.
173. Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riekkel C, Grothe R, Eisenberg D. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature.* 2005 Jun 9; 435(7043):773-8.
174. 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.
175. Newcomer ME. Protein folding and three-dimensional domain swapping: a strained relationship? *Curr Opin Struct Biol.* 2002 Feb;12(1):48-53.

176. Nielsen L, Frokjaer S, Carpenter JF, Brange J. Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy. *J Pharm Sci.* 2001 Jan;90(1):29-37.
177. 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.
178. Noble ME, Musacchio A, Saraste M, Courtneidge SA, Wierenga RK. Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2617-24.
179. Northey JG, Di Nardo AA, Davidson AR. Hydrophobic core packing in the SH3 domain folding transition state. *Nat Struct Biol.* 2002 Feb;9(2):126-30.
180. Ogihara NL, Ghirlanda G, Bryson JW, Gingery M, DeGrado WF, Eisenberg D. Design of three-dimensional domain-swapped dimers and fibrous oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1404-9.
181. O'Neill JW, Kim DE, Johnsen K, Baker D, Zhang KY. Single-site mutations induce 3D domain swapping in the B1 domain of protein L from *Peptostreptococcus magnus*. *Structure.* 2001 Nov;9(11):1017-27.
182. Ow SY, Dunstan DE. A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease. *Protein Sci.* 2014 Oct;23(10):1315-31.
183. Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K. Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* 1996 Jan;10(1):75-83.
184. Palencia A, Cobos ES, Mateo PL, Martínez JC, Luque I. Thermodynamic dissection of the binding energetics of proline-rich peptides to the Abl-SH3 domain: implications for rational ligand design. *J Mol Biol.* 2004 Feb 13;336(2):527-37.
185. Pallitto MM, Murphy RM. A mathematical model of the kinetics of beta-amyloid fibril growth from the denatured state. *Biophys J.* 2001 Sep;81(3):1805-22.
186. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 2004 Oct 18;23(48):7906-9.
187. Pellegrini E, Piano D, Bowler MW. Direct cryocooling of naked crystals: are cryoprotection agents always necessary? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 Oct;67(Pt 10):902-6.
188. 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.
189. 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):262-5.
190. Pisabarro MT, Serrano L, Wilmanns M. Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions. *J Mol Biol.* 1998 Aug 21;281(3):513-21.
191. 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.
192. 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.

193. Plaza-Garrido M. 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. 2021.
194. Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):247-59.
195. Proulx-Bonneau S, Guezguez A, Annabi B. A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2011;6(6): e21511.
196. Rambaran RN, Serpell LC. Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion*. 2008 Jul-Sep;2(3):112-7.
197. Reches M, Gazit E. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science*. 2003; Apr 25;300(5619):625-7.
198. Reynolds AB, Vila J, Lansing TJ, Potts WM, Weber MJ, Parsons JT. Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. *EMBO J*. 1987 Aug;6(8):2359-64.
199. 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 ϵ /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.
200. 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.
201. Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 26;324(4):1155-64.
202. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004 Jul;10 Suppl: S10-7.
203. 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.
204. 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.
205. Royer CA. Fluorescence spectroscopy. *Methods Mol Biol*. 1995; 40:65-89.
206. Rupniewska E, Roy R, Mauri FA, Liu X, Kaliszczak M, Bellezza G, Cagini L, Barbareschi M, Ferrero S, Tommasi AM, Aboagye E, Seckl MJ, Pardo OE. Targeting autophagy sensitises lung cancer cells to Src family kinase inhibitors. *Oncotarget*. 2018 Jun 8;9(44):27346-27362.
207. Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Applications to Structural Biology*. 1st. Ed. Garland Science; 2010.
208. Russo Krauss I, Merlino A, Vergara A, Sica F. An overview of biological macromolecule crystallization. *Int J Mol Sci*. 2013 May 31;14(6):11643-91.
209. S. Barrau, F. Zhang, A. Herland, W. Mammo, M. R. Andersson, and O. Inganäs. Integration of amyloid nanowires in organic solar cells. *Appl. Phys. Lett*. 2008. 93, 023307
210. Saint-Jean AP, Phillips KR, Creighton DJ, Stone MJ. Active monomeric and dimeric forms of *Pseudomonas putida* glyoxalase I: evidence for 3D domain swapping. *Biochemistry*. 1998 Jul 21;37(29):10345-53.
211. Saksela K, Permi P. SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett*. 2012 Aug 14;586(17):2609-14.

212. Salinas-Garcia MC, Plaza-Garrido M, Cámara-Artigas A. The impact of oncogenic mutations of the viral Src kinase on the structure and stability of the SH3 domain. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2021 Jun 1;77(Pt 6):854-866.
213. Sambashivan S, Liu Y, Sawaya MR, Gingery M, Eisenberg D. Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature.* 2005 Sep 8;437(7056):266-9.
214. Sarkar P, Saleh T, Tzeng SR, Birge RB, Kalodimos CG. Structural basis for regulation of the Crk signaling protein by a proline switch. *Nat Chem Biol.* 2011 Jan;7(1):51-7.
215. Scheibel T, Parthasarathy R, Sawicki G, Lin XM, Jaeger H, Lindquist SL. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 15;100(8):4527-32.
216. Schlunegger MP, Bennett MJ, Eisenberg D. Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. *Adv Protein Chem.* 1997; 50:61-122.
217. Schymkowitz JW, Rousseau F, Wilkinson HR, Friedler A, Itzhaki LS. Observation of signal transduction in three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol.* 2001 Oct;8(10):888-92.
218. Sicheri F, Kuriyan J. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):777-85.
219. Simatou A, Simatos G, Goulielmaki M, Spandidos DA, Baliou S, Zoumpourlis V. Historical retrospective of the SRC oncogene and new perspectives (Review). *Mol Clin Oncol.* 2020 Oct;13(4):21.
220. Simpsom RJ, Adams PD, Golemis EA. *Basic Methods in Protein: Purification and Analysis: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory; 2009.
221. Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* 2000 Jun;130(2-3):88-98.
222. Sirangelo I, Malmo C, Iannuzzi C, Mezzogiorno A, Bianco MR, Papa M, Irace G. Fibrillogenesis and cytotoxic activity of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):13183-9.
223. Sirota FL, Héry-Huynh S, Maurer-Stroh S, Wodak SJ. Role of the amino acid sequence in domain swapping of the B1 domain of protein G. *Proteins.* 2008 Jul;72(1):88-104.
224. Sirvent A, Benistant C, Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell.* 2008 Nov;100(11):617-31.
225. Sirvent A, Mevizou R, Naim D, Lafitte M, Roche S. Src Family Tyrosine Kinases in Intestinal Homeostasis, Regeneration and Tumorigenesis. *Cancers (Basel).* 2020 Jul 23;12(8):2014.
226. Smith JF, Knowles TP, Dobson CM, Macphee CE, Welland ME. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 24;103(43):15806-11.
227. Sreerama N, Woody RW. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* 2004; 383:318-51.
228. Staniforth RA, Giannini S, Higgins LD, Conroy MJ, Hounslow AM, Jerala R, Craven CJ, Waltho JP. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *EMBO J.* 2001 Sep 3;20(17):4774-81.

229. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)*. 2003 Nov;81(11):678-99.
230. Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 24;1739(1):5-25.
231. Stefani M. Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in Alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits. *Prog Neurobiol*. 2012 Dec;99(3):226-45.
232. Sulatsky MI, Sulatskaya AI, Povarova OI, Antifeeva IA, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils. *Prion*. 2020 Dec;14(1):67-75.
233. Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20; 86:27-68.
234. Sun Z, Liu Q, Qu G, Feng Y, Reetz MT. Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. *Chem Rev*. 2019 Feb 13;119(3):1626-1665.
235. Sunde M, Kwan AH, Templeton MD, Beever RE, Mackay JP. Structural analysis of hydrophobins. *Micron*. 2008 Oct;39(7):773-84.
236. Superti-Furga G, Fumagalli S, Koegl M, Courtneidge SA, Draetta G. Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *EMBO J*. 1993 Jul;12(7):2625-34
237. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997; 13:513-609.
238. Toyama BH, Weissman JS. Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem*. 2011; 80:557-85.
239. Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. Measuring and increasing protein solubility. *J Pharm Sci*. 2008 Oct;97(10):4155-66.
240. Uptain SM, Lindquist S. Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56:703-41.
241. Uversky VN, Garriques LN, Millett IS, Frokjaer S, Brange J, Doniach S, Fink AL. Prediction of the association state of insulin using spectral parameters. *J Pharm Sci*. 2003 Apr; 92(4):847-58.
242. Van der Wel PC. Domain swapping and amyloid fibril conformation. *Prion*. 2012 Jul 1;6(3):211-6.
243. Van Etten RA, Debnath J, Zhou H, Casanovas JM. Introduction of a loss-of-function point mutation from the SH3 region of the *Caenorhabditis elegans* sem-5 gene activates the transforming ability of c-abl in vivo and abolishes binding of proline-rich ligands in vitro. *Oncogene*. 1995 May 18;10(10):1977-88.
244. Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*. 1989 Aug 25;58(4):669-78.
245. Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol*. 1999 May;9(5):179-86.
246. 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.
247. Ventura S, Lacroix E, Serrano L. Insights into the origin of the tendency of the PI3-SH3 domain to form amyloid fibrils. *J Mol Biol*. 2002 Oct 4;322(5):1147-58.

248. Vihinen M, Smith CI. Interactions between SH2 and SH3 domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jan 14;242(2):351-6.
249. 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.
250. Vogt PK. Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nat Rev Cancer.* 2012 Sep;12(9):639-48.
251. Vonrhein C, Flensburg C, Keller P, Sharff A, Smart O, Paciorek W, Womack T, Bricogne G. Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 Apr;67(Pt 4):293-302.
252. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condrón MM, Teplow DB. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.* 1997 Aug 29;272(35):22364-72.
253. Wang Y, Liu S, Jiang G, Zhai W, Yang L, Li M, Chang Z, Zhu B. NOK associates with c-Src and promotes c-Src-induced STAT3 activation and cell proliferation. *Cell Signal.* 2020 Nov; 75:109762.
254. Wei Y, Thyparambil AA, Latour RA. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230nm. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec;1844(12):2331-7.
255. 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.
256. 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.
257. 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.
258. 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.
259. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 Apr;67(Pt 4):235-42.
260. Woody RW. Circular dichroism. *Methods Enzymol.* 1995; 246:34-71.
261. Wu J, Yang JT, Wu CS. Beta-II conformation of all-beta proteins can be distinguished from unordered form by circular dichroism. *Anal Biochem.* 1992 Feb 1;200(2):359-64.
262. Xu W, Harrison SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):595-602.
263. Yang H, Guranovic V, Dutta S, Feng Z, Berman HM, Westbrook JD. Automated and accurate deposition of structures solved by X-ray diffraction to the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004 Oct;60(Pt 10):1833-9.
264. Yildirim E, Yaba A. Determination of c-Abl tyrosine kinase and mTERT catalytic subunit of telomerase expression level during prenatal-postnatal mouse ovary-testis development. *Reprod Biol.* 2020 Dec;20(4):555-567.

265. Yip KM, Fischer N, Paknia E, Chari A, Stark H. Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*. 2020 Nov;587(7832):157-161.
266. Younan ND, Viles JH. A Comparison of Three Fluorophores for the Detection of Amyloid Fibers and Prefibrillar Oligomeric Assemblies. ThT (Thioflavin T); ANS (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic Acid); and bisANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic Acid). *Biochemistry*. 2015 Jul 21;54(28):4297-306.
267. Young MA, Gonfloni S, Superti-Furga G, Roux B, Kuriyan J. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell*. 2001 Apr 6;105(1):115-26.
268. Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*. 1994 Mar 11;76(5):933-45
269. Yu H, Rosen MK, Shin TB, Seidel-Dugan C, Brugge JS, Schreiber SL. Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science*. 1992 Dec 4;258(5088):1665-8.
270. 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.

Apéndices

Apéndice 1: Reactivos e instrumentación

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 α (NzyTech, MB006 y MB004, respectivamente).
- Cloruro de guanidinio (Panreac Applichem, A1499.100).
- Cloruro sódico (NzyTech, MB15901).
- Di-hidrógeno fosfato sódico monohidratado (MERCK, A629346).
- Ditiotreititol (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, y Additive Screen (Molecular Dimensions, MD1-01, MD1-02, MD1-11, respectivamente). Las disoluciones presentes en cada uno de los productos se muestran en el Apéndice 2.
- 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 (Crystalgen).
- 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 (Pharmacia 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-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 Dimension

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
							% w/v		PEG 4000
			0.1 M		Sodium citrate	5.6	20 % v/v		2-Propanol
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		2-Propanol
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		2-Propanol
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		2-Propanol
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		2-Propanol
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			
		Sodium phosphate monobasic monohydrate-Potassium phosphate monobasic							
0.8 M		monobasic	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
							% w/v		PEG 4000
			0.1 M		Sodium HEPES	7.5	20 % v/v		2-Propanol
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		2-Propanol
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	0.1 M		Tris	8.5			
0.4 M		Potassium sodium tartrate 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 Dimension

Conc	Units	Salt	Conc	Units	Buffer	pH	Conc	Units	Precipitant
0.1 M		Sodium chloride	0.1 M		BICINE	9.0	30 % v/v		PEG 500 MME
2.0 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		BICINE	9.0			
							10 % w/v		PEG 20000
			0.1 M		BICINE	9.0	2 % v/v		1.4-Dioxane
0.2 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	3.4 M		1.6-Hexanediol
			0.1 M		Tris	8.5	25 % v/v		tert-Butanol
1.0 M		Lithium sulfate							
0.01 M		Nickel(II) chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5			
1.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Tris	8.5	12 % v/v		Glycerol
0.2 M		Ammonium phosphate monobasic	0.1 M		Tris	8.5	50 % v/v		MPD
			0.1 M		Tris	8.5	20 % v/v		Ethanol
0.01 M		Nickel(II) chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	20 % w/v		PEG 2000 MME
0.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Sodium HEPES	7.5	30 % v/v		MPD
							10 % w/v		PEG 6000
			0.1 M		Sodium HEPES	7.5	5 % v/v		MPD
			0.1 M		Sodium HEPES	7.5	20 % v/v		Jeffamine® M-600
1.6 M		Ammonium sulfate							
0.1 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium HEPES	7.5			
2.0 M		Ammonium formate	0.1 M		Sodium HEPES	7.5			
1.0 M		Sodium acetate trihydrate							
0.05 M		Cadmium sulfate 8/3-hydrate	0.1 M		Sodium HEPES	7.5			
			0.1 M		Sodium HEPES	7.5	70 % v/v		MPD
4.3 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium HEPES	7.5			
							10 % w/v		PEG 8000
			0.1 M		Sodium HEPES	7.5	8 % v/v		Ethylene glycol
1.6 M		Magnesium sulfate heptahydrate	0.1 M		MES	6.5			
2.0 M		Sodium chloride							
0.1 M		Potassium phosphate monobasic							
0.1 M		Sodium phosphate monobasic monohydrate	0.1 M		MES	6.5			
			0.1 M		MES	6.5	12 % w/v		PEG 20000
1.6 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES	6.5	10 % v/v		1.4-Dioxane
0.05 M		Cesium chloride	0.1 M		MES	6.5	30 % v/v		Jeffamine® M-600
1.0 M		Cobalt(II) chloride hexahydrate							
1.8 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES	6.5			
0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES	6.5	30 % w/v		PEG 5000 MME
0.01 M		Zinc sulfate heptahydrate	0.1 M		MES	6.5	25 % v/v		PEG 500 MME
			0.1 M		Sodium HEPES	7.5	20 % w/v		PEG 10000
2.0 M		Ammonium sulfate							
0.2 M		Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1 M		Sodium citrate	5.6			
1.0 M		Lithium sulfate							
0.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Sodium citrate	5.6			
0.5 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium citrate	5.6	4 % v/v		Polyethyleneimine
			0.1 M		Sodium citrate	5.6	35 % v/v		tert-Butanol
0.01 M		Iron(III) chloride hexahydrate	0.1 M		Sodium citrate	5.6	10 % v/v		Jeffamine® M-600
0.01 M		Manganese(II) chloride tetrahydrate	0.1 M		Sodium citrate	5.6	2.5 M		1.6-Hexanediol
2.0 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium acetate	4.6			
0.2 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium acetate	4.6	30 % v/v		MPD
0.01 M		Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M		Sodium acetate	4.6	1.0 M		1.6-Hexanediol
0.1 M		Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0.1 M		Sodium acetate	4.6	30 % v/v		PEG 400
0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		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							
0.01 M		CTAB							
							25 % v/v		Ethylene glycol
							35 % v/v		1.4-Dioxane
2.0 M		Ammonium sulfate					5 % v/v		2-Propanol
			1.0 M		Imidazole	7.0			
							10 % w/v		PEG 1000
							10 % w/v		PEG 8000
1.5 M		Sodium chloride					10 % v/v		Ethanol
			1.6 M		Sodium citrate	6.5			
							15 % w/v		Polyvinylpyrrolidone
2.0 M		Urea							

Additive Screen-11

Conc.	Units	Additive
0.5 M		Glycine
0.1 M		L-Glutamine
0.1 M		Spermine tetrahydrochloride
0.1 M		Spermidine
0.05 M		EDTA
0.05 M		DL-Dithiothreitol
0.1 M		Sodium thiocyanate
0.1 M		Taurine
0.1 M		Betaine monohydrate
100 %		Dimethyl sulfoxide
5 % w/v		Octyl glucoside
0.2 M		Xylitol
1,0 M		Potassium iodide
100 %		Thymol
0.5 M		Sodium malonate dibasic monohydrate
1,0 M		Ethylenediamine
0.1 M		Cadmium chloride hemi(pentahydrate)
0.1 M		Cobalt(II) chloride hexahydrate
0.1 M		Magnesium chloride hexahydrate
0.1 M		Zinc chloride
100 %		1,4-Dioxane
0.2 M		Phenol
60 % v/v		2-Propanol
20 % v/v		Glycerol

Apéndice 3: Estadísticas de refinado de las estructuras obtenidas

Tabla 1. Colección de datos y estadísticas de refinado de los mutantes v-Src-SH3

	v-Src-SH3 Q128R	v-Src-SH3 Q128R-VSL12	v-Src-SH3 N117D-V124L	v-Src-SH3 W95R-I96T
PDB entry	7NER	7PVT	7NES	7NET
Beamline	ESRF- ID30B	ESRF- ID30A-3	ESRF- ID30B	ALBA-XALOC
Data collection temperature	100 K	100K	100 K	100 K
Wavelength (Å)	0.9686	0.9677	0.9762	0.9791
Resolution range (Å)	19.08 -1.55 (1.60-1.55)	16.77 - 1.6 (1.68 - 1.60)	18.59 - 1.35 (1.40 - 1.35)	19.26 - 1.50 (1.55 - 1.50)
Space group	$P2_1$	$P3_2$	$P3_221$	$P6_5$
Unit cell (Å)	22.34 34.98 31.14	51.23 51.23 46.34	37.17 37.17 65.82	46.65 46.65 127.97
(°)	90 96.40 90	90 90 120	90 90 120	90 90 120
Total reflections	18418 (843)	116855 (12087)	91544 (4717)	83941 (2306)
Unique reflections	6888 (337)	17875 (1807)	12108 (600)	24714 (1007)
Multiplicity	2.7 (2.5)	6.5 (6.7)	7.6 (7.9)	3.4 (2.3)
Completeness (%)	97.9 (94.5)	99.57 (99.67)	100 (100)	98.3 (83.3)
Mean I/sigma(I)	6.5 (1.9)	13.64 (0.76)	18.1 (2.5)	20.3 (1.9)
Wilson B-factor (Å ²)	14.77	25.13	15.79	25.26
R-merge	0.049 (0.311)	0.06374 (0.6979)	0.043 (0.707)	0.023 (0.377)
R-meas	0.052 (0.352)	0.06924 (0.757)	0.049 (0.814)	0.032 (0.522)
R-pim	0.037 (0.249)	0.02678 (0.2912)	0.018 (0.400)	0.016 (0.326)
CC1/2	0.998 (0.831)	0.998 (0.813)	1 (0.922)	0.999 (0.817)
CC*	1 (0.96)	0.999 (0.947)	1 (0.987)	1 (0.954)
Reflections used in refinement	6879 (679)	17862 (1806)	12056 (1193)	24655 (2190)
Reflections used for R-free	337 (34)	893 (94)	612 (54)	1223 (104)
R-work	0.147 (0.203)	0.1773 (0.2960)	0.158 (0.233)	0.185 (0.241)
R-free	0.162 (0.179)	0.2029 (0.3181)	0.183 (0.234)	0.194 (0.289)
CC (work)	0.976 (0.935)	0.964 (0.791)	0.973 (0.950)	0.961 (0.91)
CC (free)	0.972 (0.897)	0.933 (0.838)	0.947 (0.934)	0.96 (0.88)
Number of non-hydrogen atoms	544	1094	546	1062
macromolecules	478	1025	479	952
Ligands	36	13	0	97
Solvent	48	56	67	67
Protein residues	60	131	59	114
RMS (bonds) Å	0.011	0.005	0.010	0.018
RMS (angles) °	0.96	1.11	1.00	1.60
Ramachandran favored (%)	96.55	99.17	98.21	99.09
Ramachandran allowed (%)	3.45	0.83	1.79	0.91
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00	0.00	0.00
Rotamer outliers (%)	0.00	0.00	1.96	0.00
Clashscore	0.00	0.49	0.00	0.52
Average B-factor (Å ²)	18.69	33.12	20.71	38.46
macromolecules	16.67	32.49	19.31	37.56
ligands	37.77	62.34	-	50.64
solvent	31.73	37.91	30.68	43.46

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

Tabla 2. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera SA-RT

	SA-RT Monómero	SA-RT Dímero entrecruzado
PDB entry	7PVY	7PVZ
Beamline	ALBA-XALOC	ALBA-XALOC
Data collection temperature	100 K	100 K
Wavelength (Å)	0.9791	0.9791
Resolution range (Å)	18.41 - 1.40 (1.45 - 1.40)	19.16 - 2.0 (2.07 - 2.00)
Space group	$P22_12_1$	$P6_4$
Unit cell (Å)	25.98 41.50 52.21	48.79 48.79 90.93
(°)	90 90 90	90 90 120
Total reflections	22893 (2230)	16618 (1666)
Unique reflections	11464 (1118)	8310 (833)
Multiplicity	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
Completeness (%)	97.89 (96.86)	99.81 (100.00)
Mean I/sigma(I)	17.35 (2.90)	24.52 (3.71)
Wilson B-factor (Å ²)	19.03	52.91
R-merge	0.0112 (0.1418)	0.01289 (0.1921)
R-meas	0.01584 (0.2005)	0.01823 (0.2717)
R-pim	0.0112 (0.1418)	0.01289 (0.1921)
CC1/2	1 (0.983)	0.999 (0.881)
CC*	1 (0.996)	1 (0.968)
Reflections used in refinement	11407 (1112)	8307 (833)
Reflections used for R-free	566 (47)	431 (49)
R-work	0.1973 (0.2806)	0.2294 (0.3665)
R-free	0.2242 (0.3633)	0.2548 (0.3109)
CC (work)	0.962 (0.919)	0.976 (0.577)
CC (free)	0.909 (0.701)	0.957 (0.790)
Number of non-hydrogen atoms	481	896
macromolecules	432	893
Solvent	49	3
Protein residues	56	120
RMS (bonds) Å	0.009	0.013
RMS (angles) °	1.27	1.47
Ramachandran favored (%)	100.00	100.00
Ramachandran allowed (%)	0.00	0.00
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00
Rotamer outliers (%)	0.00	1.15
Clashscore	0.00	1.17
Average B-factor (Å ²)	27.74	61.25
macromolecules	26.26	61.16
solvent	40.87	86.02

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

Tabla 3. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera SA-Src

	SA-Src
PDB entry	7PW0
Beamline	ESRF- ID30A-3
Data collection temperature	100K
Wavelength (Å)	0.9677
Resolution range (Å)	19.95 - 1.70 (1.76 - 1.70)
Space group	$P2_1$
Unit cell (Å)	37.26 93.14 80.44
(°)	90 97.252 90
Total reflections	116586 (11729)
Unique reflections	59187 (5910)
Multiplicity	2.0 (2.0)
Completeness (%)	98.88 (99.28)
Mean I/sigma(I)	9.50 (1.28)
Wilson B-factor (Å ²)	23.08
R-merge	0.03885 (0.6987)
R-meas	0.05494 (0.9881)
R-pim	0.03885 (0.6987)
CC1/2	0.999 (0.599)
CC*	1 (0.866)
Reflections used in refinement	59144 (5910)
Reflections used for R-free	2923 (295)
R-work	0.2096 (0.3987)
R-free	0.2284 (0.4131)
CC (work)	0.965 (0.824)
CC (free)	0.965 (0.746)
Number of non-hydrogen atoms	4010
macromolecules	3624
Solvent	386
Protein residues	465
RMS (bonds) Å	0.007
RMS (angles) °	1.14
Ramachandran favored (%)	96.85
Ramachandran allowed (%)	3.15
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.27
Clashscore	1.30
Average B-factor (Å ²)	33.69
macromolecules	33.08
solvent	39.37

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

Tabla 4. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera SA-2X

	SA-2X-VSL12	SA-2X
	Monómero	Dímero entrecruzado
PDB entry	7PVX	7PVW
Beamline	ESRF- ID30A-3	ALBA-XALOC
Data collection temperature	100K	100 K
Wavelength (Å)	0.9677	0.9791
Resolution range (Å)	24.49 - 1.43 (1.49 - 1.43)	19.11 - 1.50 (1.55-1.50)
Space group	$P2_1$	$P6_3$
Unit cell (Å)	28.99 59.66 37.35	68.04 68.04 46.18
(°)	90 98.61 90	90 90 120
Total reflections	42954 (4410)	39028 (3898)
Unique reflections	22791 (2286)	19606 (1963)
Multiplicity	1.9 (1.9)	2.0 (2.0)
Completeness (%)	98.58 (99.39)	99.77 (99.75)
Mean I/sigma(I)	11.77 (2.39)	18.17 (2.31)
Wilson B-factor (Å ²)	18.55	22.70
R-merge	0.02906 (0.2584)	0.01523 (0.3357)
R-meas	0.04109 (0.3655)	0.02154 (0.4748)
R-pim	0.02906 (0.2584)	0.01523 (0.3357)
CC1/2	0.998 (0.897)	0.999 (0.87)
CC*	1 (0.973)	1 (0.965)
Reflections used in refinement	22785 (2278)	19582 (1959)
Reflections used for R-free	1156 (131)	997 (97)
R-work	0.1739 (0.2318)	0.1610 (0.2246)
R-free	0.2097 (0.2986)	0.1885 (0.2525)
CC (work)	0.954 (0.925)	0.973 (0.951)
CC (free)	0.948 (0.776)	0.959 (0.892)
Number of non-hydrogen atoms	1185	1037
macromolecules	1084	935
Ligands	-	17
Solvent	101	85
Protein residues	139	119
RMS (bonds) Å	0.019	0.014
RMS (angles) °	1.64	1.32
Ramachandran favored (%)	100.00	100.00
Ramachandran allowed (%)	0.00	0.00
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00
Rotamer outliers (%)	0.87	0.00
Clashscore	1.89	0.54
Average B-factor (Å ²)	24.87	30.15
macromolecules	23.85	28.75
Ligands	-	52.53
solvent	35.79	41.09

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

Tabla 5. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera AS-RT

	AS-RT
PDB entry	7PW2
Beamline	ALBA-XALOC
Data collection temperature	100 K
Wavelength (Å)	0.9791
Resolution range (Å)	16.14 - 1.10 (1.14 - 1.10)
Space group	$P4_1$
Unit cell (Å)	42.58 42.58 30.41
(°)	90 90 90
Total reflections	33716 (3402)
Unique reflections	21188 (2155)
Multiplicity	1.6 (1.6)
Completeness (%)	95.04 (96.90)
Mean I/sigma(I)	10.05 (1.81)
Wilson B-factor (Å ²)	17.78
R-merge	0.01875 (0.3488)
R-meas	0.02652 (0.4933)
R-pim	0.01875 (0.3488)
CC1/2	0.998 (0.727)
CC*	1 (0.918)
Reflections used in refinement	21188 (2155)
Reflections used for R-free	1131 (131)
R-work	0.1822 (0.2697)
R-free	0.2009 (0.2947)
CC (work)	0.956 (0.802)
CC (free)	0.954 (0.729)
Number of non-hydrogen atoms	478
macromolecules	427
Solvent	51
Protein residues	57
RMS (bonds) Å	0.017
RMS (angles) °	1.66
Ramachandran favored (%)	96.36
Ramachandran allowed (%)	3.64
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	2.38
Clashscore	0.00
Average B-factor (Å ²)	25.77
macromolecules	24.44
solvent	36.89

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

Tabla 6. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera AS-Src

	AS-Src
PDB entry	7PVV
Beamline	ALBA-XALOC
Data collection temperature	100 K
Wavelength (Å)	0.9791
Resolution range (Å)	19.90 - 1.82 (1.89 - 1.82)
Space group	$I2_12_12_1$
Unit cell (Å)	41.89 47.40 75.57
(°)	90 90 90
Total reflections	13949 (1359)
Unique reflections	7019 (692)
Multiplicity	2.0 (2.0)
Completeness (%)	99.62 (99.71)
Mean I/sigma(I)	15.40 (2.82)
Wilson B-factor (Å ²)	28.10
R-merge	0.01406 (0.1664)
R-meas	0.01988 (0.2353)
R-pim	0.01406 (0.1664)
CC1/2	1 (0.959)
CC*	1 (0.989)
Reflections used in refinement	7015 (691)
Reflections used for R-free	327 (32)
R-work	0.2244 (0.3232)
R-free	0.2383 (0.3990)
CC (work)	0.950 (0.836)
CC (free)	0.944 (0.877)
Number of non-hydrogen atoms	506
macromolecules	449
Ligands	17
Solvent	40
Protein residues	57
RMS (bonds) Å	0.006
RMS (angles) °	1.02
Ramachandran favored (%)	96.36
Ramachandran allowed (%)	3.64
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.00
Clashscore	0.00
Average B-factor (Å ²)	33.89
macromolecules	33.42
Ligands	34.27
solvent	38.96

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

Tabla 7. Colección de datos y estadísticas de refinado de la quimera AS-2X

	AS-2X		
PDB entry	7PVQ	7PVR	7PVS
Beamline	ALBA-XALOC	ESRF- ID30A-3	ALBA-XALOC
Data collection temperature	100 K	100K	100 K
Wavelength (Å)	0.9791	0.9677	0.9791
Resolution range (Å)	19.76 - 1.55 (1.61-1.55)	17.4 - 1.65 (1.71-1.65)	18.59 - 1.05 (1.09 - 1.05)
Space group	<i>P</i> ₂ ₁ ₂ ₂ ₁	<i>P</i> ₄ ₁	<i>P</i> ₂ ₁ ₂ ₂ ₁
Unit cell (Å)	27.31 43.46 94.85	42.42 42.42 30.41	27.13 43.48 94.58
(°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Total reflections	27163 (2459)	10700 (190)	104380 (9436)
Unique reflections	15094 (1488)	5412 (114)	52754 (4975)
Multiplicity	1.8 (1.6)	2.0 (1.7)	2.0 (1.9)
Completeness (%)	87.66 (87.68)	81.63 (17.04)	99.10 (94.60)
Mean I/sigma(I)	13.82 (4.41)	30.59 (2.66)	15.39 (2.28)
Wilson B-factor (Å ²)	13.23	19.35	9.98
R-merge	0.03852 (0.1544)	0.01234 (0.2612)	0.01728 (0.2912)
R-meas	0.05447 (0.2183)	0.01745 (0.3694)	0.02443 (0.4118)
R-pim	0.03852 (0.1544)	0.01234 (0.2612)	0.01728 (0.2912)
CC1/2	0.996 (0.956)	1 (0.804)	1 (0.827)
CC*	0.999 (0.989)	1 (0.944)	1 (0.951)
Reflections used in refinement	14995 (1487)	5412 (114)	52746 (4976)
Reflections used for R-free	723 (65)	290 (8)	2695 (234)
R-work	0.2313 (0.2707)	0.1736 (0.3222)	0.1687 (0.2386)
R-free	0.2733 (0.2968)	0.2083 (0.3801)	0.1840 (0.2487)
CC (work)	0.938 (0.889)	0.966 (0.670)	0.964 (0.911)
CC (free)	0.892 (0.781)	0.955 (0.321)	0.954 (0.887)
Number of non-hydrogen atoms	1061	522	1166
macromolecules	914	454	973
Ligands	-	-	52
Solvent	147	68	141
Protein residues	116	58	117
RMS (bonds) Å	0.010	0.005	0.011
RMS (angles) °	1.23	1.00	1.44
Ramachandran favored (%)	96.43	98.21	99.12
Ramachandran allowed (%)	3.57	1.79	0.88
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00	0.00
Rotamer outliers (%)	1.98	0.00	1.82
Clashscore	0.00	0.00	3.00
Average B-factor (Å ²)	16.74	23.78	13.61
macromolecules	15.35	22.77	11.43
Ligands	-	-	28.01
solvent	25.38	30.53	23.37

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

Apéndice 4: Publicaciones

De la presente Tesis Doctoral deriva la publicación: “The impact of oncogenic mutations of the viral Src kinase on the structure and stability of the SH3 domain”. De esta publicación se han obtenido las estructuras depositadas en el PDB: 7NER, 7NES y 7NET.

Otras publicaciones resultantes del capítulo 4 se encuentran en redacción.

Otras publicaciones

A continuación, se muestran los artículos que se han obtenido del trabajo realizado durante esta etapa formativa, pero que no están relacionados con la Tesis doctoral de forma directa. La mayoría de estos artículos están relacionados con la lisozima, proteína que usamos en nuestro laboratorio como modelo para la mejora de la calidad de los cristales.

Las publicaciones resultantes son:

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

Las estructuras depositadas en el PDB de estos artículos son: 6XVM, 6XVN, 6XVO, 6S7N, 6F9Y, 6F9X, 6F9Z, 6FA0, 6F9Y, 6F9X, 6F9Z, 6FA0, 6SYC, 6SYD y 6SYE.



ISSN 2059-7983

The impact of oncogenic mutations of the viral Src kinase on the structure and stability of the SH3 domain

M. Carmen Salinas-Garcia, Marina Plaza-Garrido and Ana Camara-Artigas*

Department of Chemistry and Physics, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) and CIAMBITAL, University of Almeria, Carretera de Sacramento s/n, 04120 Almeria, Spain. *Correspondence e-mail: acamara@ual.es

Received 15 February 2021

Accepted 22 April 2021

Edited by E. F. Garman, University of Oxford, United Kingdom

Keywords: SH3 domain; Src kinase; tyrosine kinases; intertwined dimer; oncogens; crystal structure.

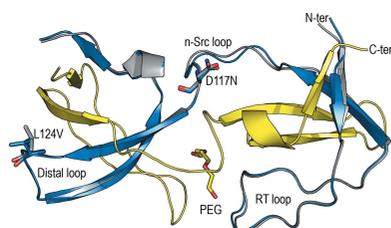
PDB references: v-Src SH3 domain, Q128R mutant, 7ner; N117D-V124L mutant, 7nes; W95R-I96T mutant, 7net

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/d

Src kinase belongs to the family of Src-related nonreceptor tyrosine kinases. Because of its physiological role in cell growth and proliferation, its activity is strictly controlled by several mechanisms. Nevertheless, in viral Src kinase (v-Src) some of these mechanisms fail, and its uncontrolled activity is responsible for the occurrence of cancer. Here, the crystal structures of three SH3-domain mutants of v-Src were determined to unveil the effects of these oncogenic mutations in this regulatory domain. Mutations in the n-Src and distal loops have a low impact on the overall structure of the domain and its capacity to form intertwined dimers. However, mutations in the RT loop compromise the stability of the domain and make the protein very prone to aggregation. Additionally, these mutations prevent the formation of intertwined dimers. The results show a synergistic effect between mutations in the RT loop and those in the n-Src and distal loops. Analysis of the structures of the v-Src SH3-domain mutants and the closed inactive conformation of cellular Src kinase (c-Src) point to a loss of the interactions that are required to establish the compact inactive form of the kinase. Nevertheless, an analysis of structures of the c-Src SH3 domain complexed with class I and II peptides points to minor changes in the interactions between the v-Src SH3 domain and these peptides. In this way, the structures reported here indicate that mutations in the RT loop might impair the kinase regulation mechanism without affecting the recognition of short proline-rich motifs in the target proteins of the kinase, thus explaining the oncogenic behaviour of the protein.

1. Introduction

Cellular Src kinase (c-Src) is one of the most representative members of the Src-family kinases (SFKs), a group of non-receptor tyrosine kinases that mediate responses to extracellular stimuli, phosphorylating a broad range of downstream substrates. These kinases are involved in several cellular processes such as proliferation, migration, differentiation and survival (Brown & Cooper, 1996; Parsons & Parsons, 2004; Bagnato *et al.*, 2020). When overactivated, they also play a role in the onset and progression of cancer. The members of this family share an overall structure organization, including a myristoylated N-terminal segment, three Src-homology (SH) domains and a C-terminal tail. The C-terminal SH1, or catalytic, domain contains an autoregulatory phosphorylation site provided by a tyrosine residue, Tyr527. When it is phosphorylated, this tyrosine binds intramolecularly to the SH2 domain. In addition, a linker region between the SH1 and SH2 domains facilitates the closed inactive conformation of the kinase by interacting with the SH3 domain. In addition, the SH3 domain recognizes short proline-rich motifs (PRMs) and





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

Marina Plaza-Garrido¹ · M^a Carmen Salinas-García¹ · José C. Martínez² · Ana Cámara-Artigas¹

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 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

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

² Department of Physical Chemistry and Institute of Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

Orthorhombic lysozyme crystallization at acidic pH values driven by phosphate binding

Marina Plaza-Garrido, M. Carmen Salinas-Garcia and Ana Camara-Artigas*

Department of Chemistry and Physics, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) and CIAMBITAL, University of Almería, Carretera de Sacramento, 04120 Almería, Spain. *Correspondence e-mail: acamara@ual.es

Received 19 January 2018

Accepted 2 April 2018

Edited by J. Newman, Bio21 Collaborative Crystallisation Centre, Australia

Keywords: lysozyme; low humidity; polymorphism; phosphate binding; X-ray crystallography.

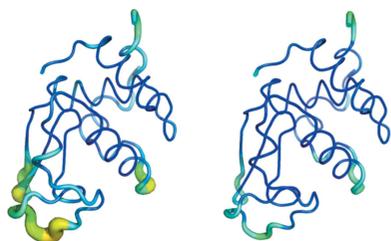
PDB references: lysozyme crystallized in the presence of 100 mM ammonium sulfate at pH 4.5, 6fa0; lysozyme crystallized in the presence of 100 mM lithium sulfate at pH 4.5, 6f9x; lysozyme crystallized in the presence of 10 mM lithium sulfate at pH 4.5, 6f9y; lysozyme crystallized in the presence of 5 mM ammonium sulfate at pH 4.5, 6f9z; lysozyme crystallized in the presence of 100 mM sodium phosphate at pH 4.5, 6f1l; lysozyme crystallized in the presence of 100 mM sodium phosphate at pH 4.5, low-humidity form, 6f1m; orthorhombic lysozyme crystallized at 298 K and pH 4.5, 6f1o; tetragonal lysozyme crystallized at 298 K and pH 4.5 with phosphate bound, 6f1p; tetragonal lysozyme crystallized at 298 K and pH 4.5 with phosphate bound, 6f1r

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/d

The structure of orthorhombic lysozyme has been obtained at 298 K and pH 4.5 using sodium chloride as the precipitant and in the presence of sodium phosphate at a concentration as low as 5 mM. Crystals belonging to space group $P2_12_12_1$ (unit-cell parameters $a = 30$, $b = 56$, $c = 73$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$) diffracted to a resolution higher than 1 Å, and the high quality of these crystals permitted the identification of a phosphate ion bound to Arg14 and His15. The binding of this ion produces long-range conformational changes affecting the loop containing Ser60–Asn74. The negatively charged phosphate ion shields the electrostatic repulsion of the positively charged arginine and histidine residues, resulting in higher stability of the phosphate-bound lysozyme. Additionally, a low-humidity orthorhombic variant was obtained at pH 4.5, and comparison with those previously obtained at pH 6.5 and 9.5 shows a 1.5 Å displacement of the fifth α -helix towards the active-site cavity, which might be relevant to protein function. Since lysozyme is broadly used as a model protein in studies related to protein crystallization and amyloid formation, these results indicate that the interaction of some anions must be considered when analysing experiments performed at acidic pH values.

1. Introduction

Hen egg-white lysozyme (HEWL) is one of the best-studied proteins from the crystallographic point of view and its crystallization has been reported in 15 different space groups belonging to five lattice systems: hexagonal, tetragonal, orthorhombic, monoclinic and triclinic. For this reason, HEWL is a good candidate to study the molecular basis of polymorphic behaviour in proteins. The presence of different salts in the crystallization experiment has been reported to influence the space group in which the protein crystallizes (Gavira, 2016; Retailleau *et al.*, 2002; Ries-Kautt & Ducruix, 1989). The solubility diagrams of HEWL have been thoroughly measured under diverse conditions, particularly those leading to the formation of tetragonal and orthorhombic crystals, and indicate that crystallization of the orthorhombic crystal form of HEWL is favoured by high temperature and low ionic strength (Ataka & Asai, 1988, 1990; Howard *et al.*, 1988; Oki *et al.*, 1999; Guilloteau *et al.*, 1992). This behaviour suggests that its formation has a positive heat of crystallization and therefore factors affecting entropy play an important role in the stabilization of the crystal. Indeed, several crystal structures belonging to the primitive orthorhombic space group have been reported and most of them have been obtained at high temperatures and diffracted to medium/low resolution (Sharma *et al.*, 2016; Rypniewski *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 2000; Sukumar *et al.*, 1999). One exception is a crystal of HEWL obtained under a high magnetic field of 10 T (PDB entry 1wtm, 1.13 Å resolution; Saijo *et al.*, 2005).





Major conformational changes in the structure of lysozyme obtained from a crystal with a very low solvent content

M. Carmen Salinas-Garcia, Marina Plaza-Garrido, Daniel Alba-Elena and Ana Camara-Artigas*

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

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

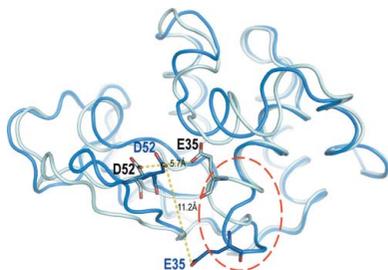
Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/f

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 α -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° 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 β -(1,4)-glycosidic linkage between



© 2019 International Union of Crystallography



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, 6syd; 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, 6syd

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/d

Lysozyme crystals dyed with bromophenol blue: where has the dye gone?

Marina Plaza-Garrido,^a M. Carmen Salinas-Garcia,^a Daniel Alba-Elena,^a Jose C. Martínez^b and Ana Camara-Artigas^{a*}

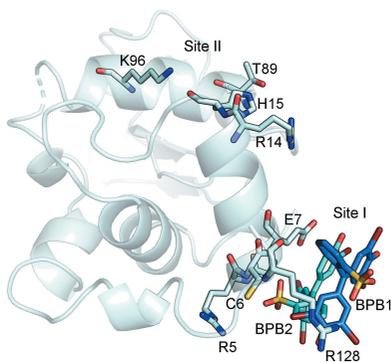
^aDepartment of Chemistry and Physics, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) and CIAMBITAL, University of Almería, Carretera de Sacramento s/n, 04120 Almería, Spain, and ^bDepartment of Physical Chemistry and Institute of Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain. *Correspondence e-mail: acamara@ual.es

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

