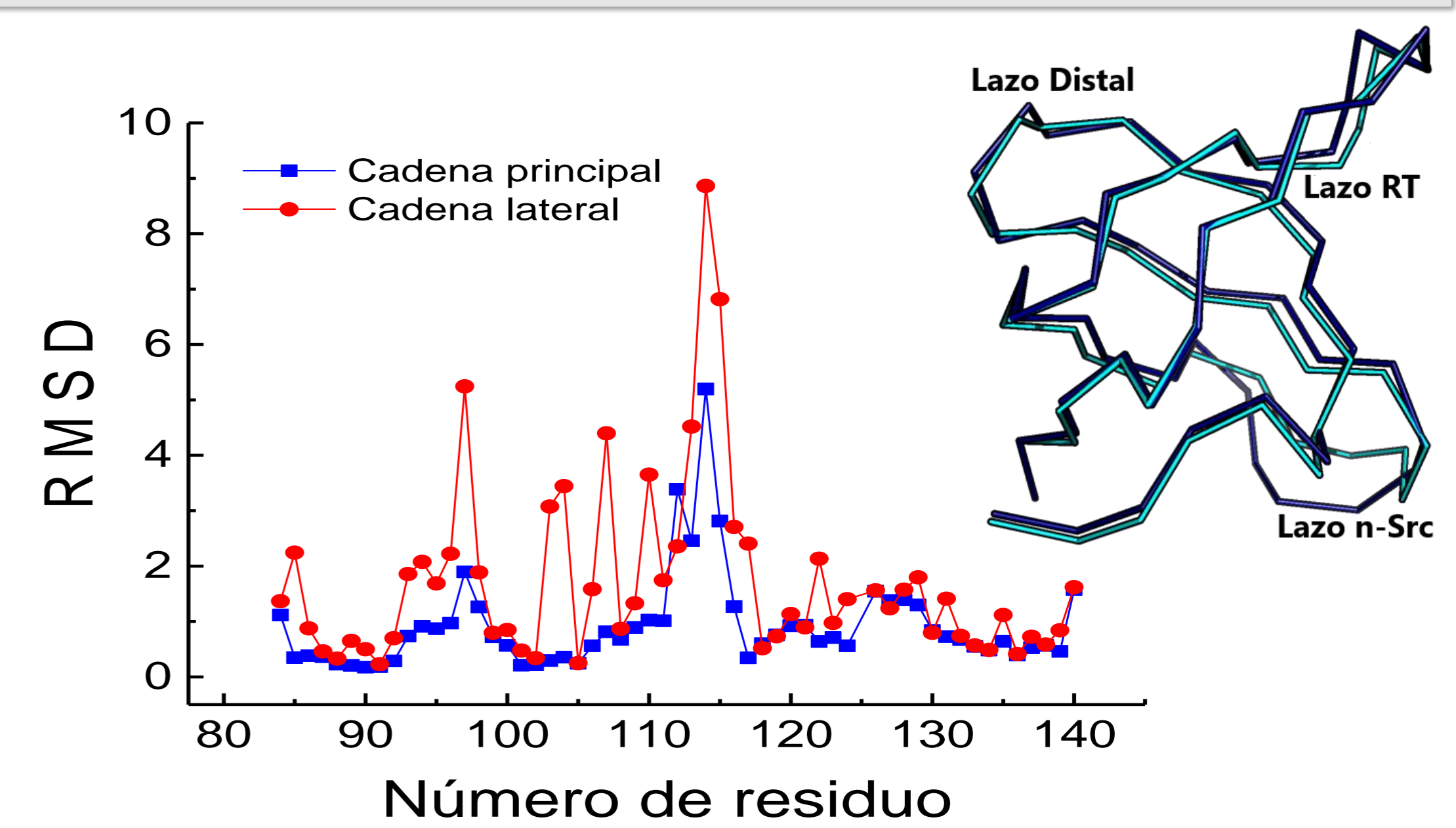
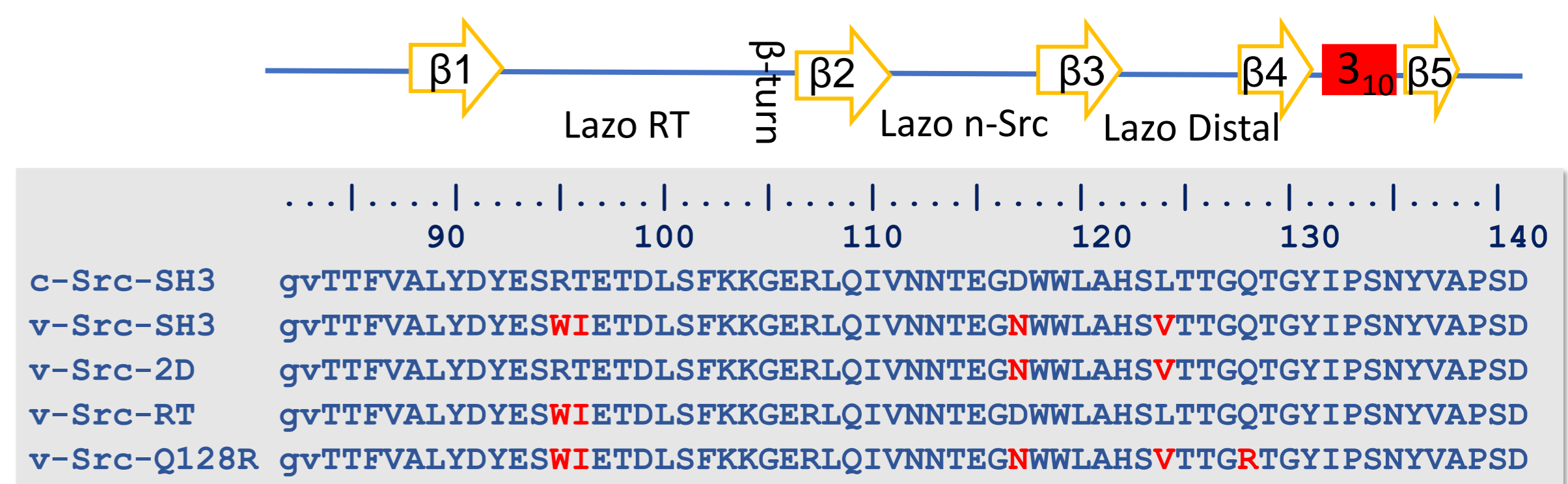
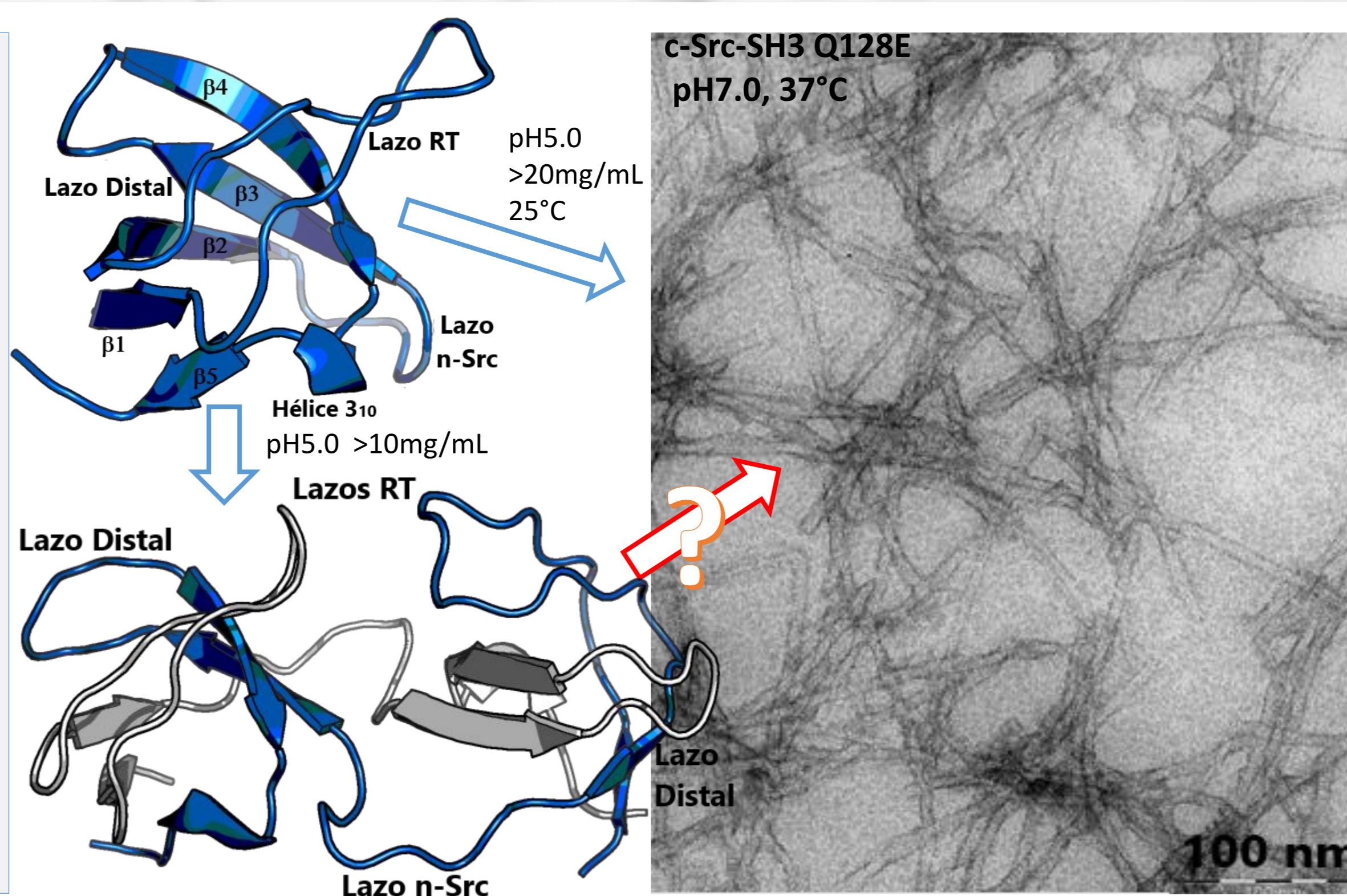


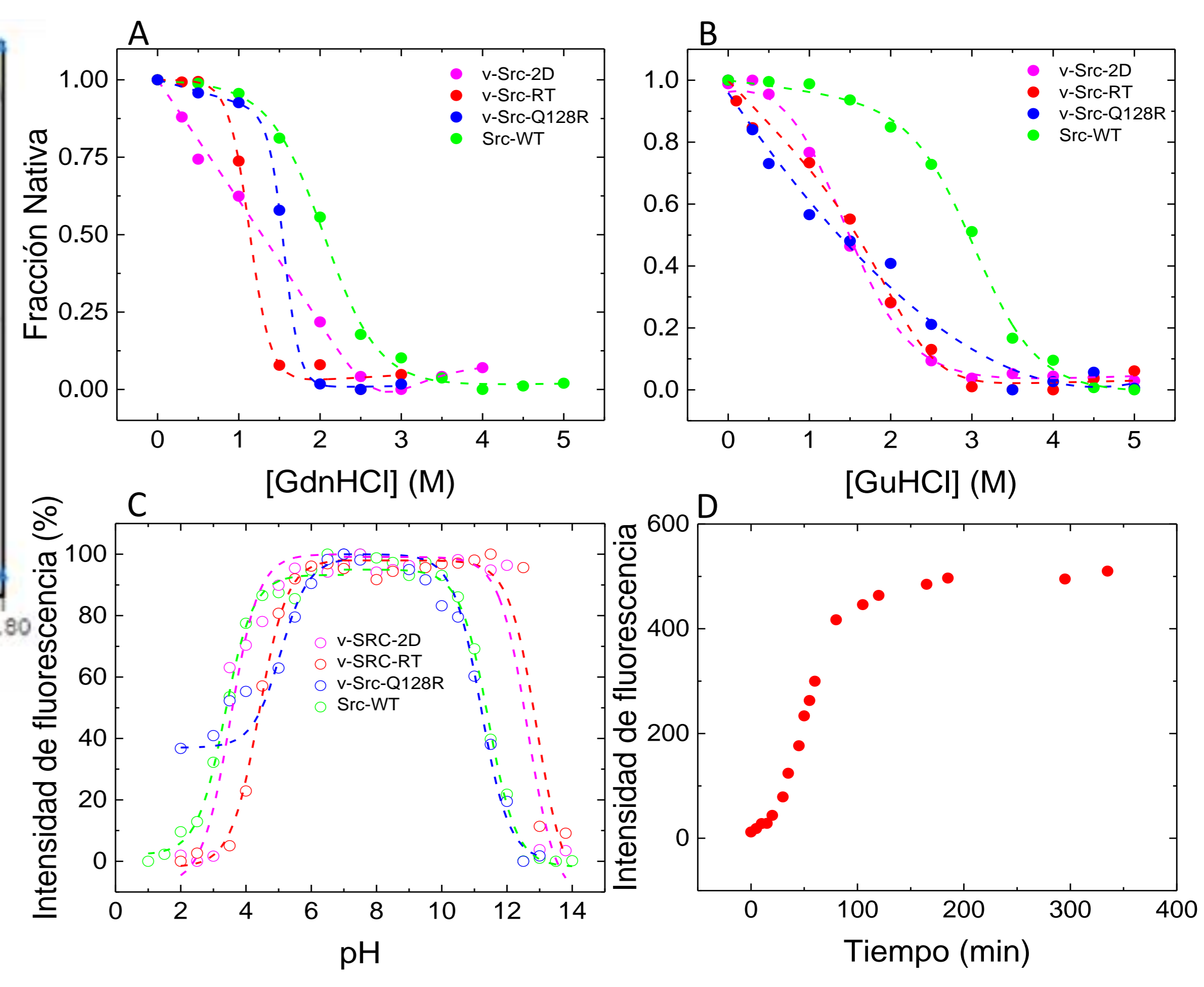
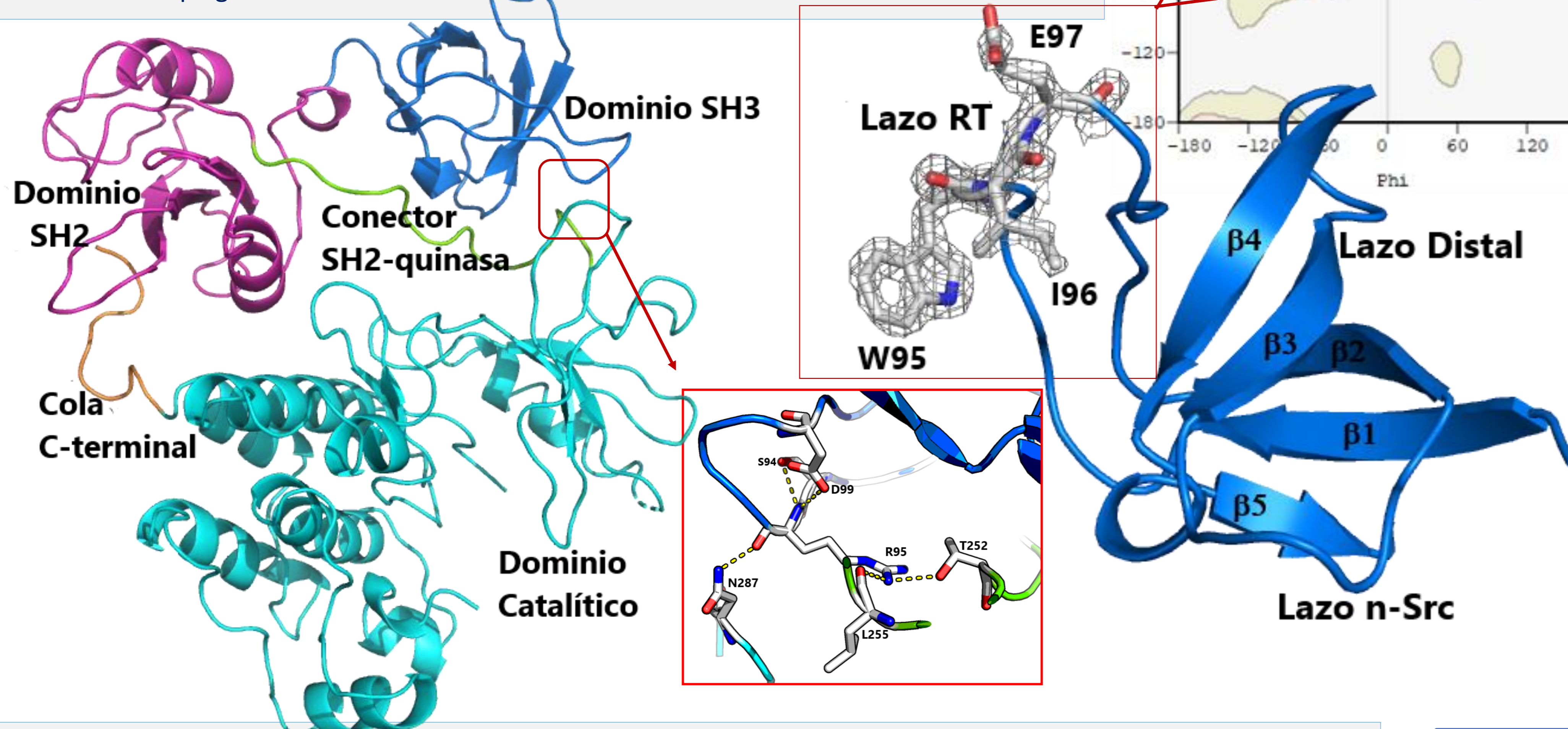
La fosforilación de los residuos de tirosina es clave en la regulación de gran variedad de procesos biológicos como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular. En los seres humanos, algunos miembros de la familia Src tirosina quinasa han sido identificados como oncogenes celulares [1]. En el caso de la c-Src tirosina quinasa oncogénica, v-Src, se ha descrito que su actividad no regulada en comparación con su homóloga no virulenta es causada por la falta de la cola reguladora en el extremo C-terminal y a varias mutaciones puntuales. Algunas de estas mutaciones tienen lugar en el dominio SH3, en puntos críticos para su función. Estudios anteriores, nuestro grupo ha demostrado que el dominio c-Src SH3 sufre un plegado incorrecto por el intercambio de dominios. Además, este dominio también puede formar fibras amiloides. En este estudio, caracterizamos el efecto de las mutaciones presentes en el dominio v-Src SH3 y cómo afectan a la estructura de la proteína y al proceso de plegamiento.

El dominio SH3 es un dominio modular, de aproximadamente 60 residuos, presente en muchas proteínas. Es una proteína completamente β ; donde las cadenas β forman una estructura abierta tipo barril. La comparación de diferentes dominios SH3 revela que el núcleo hidrófobo de estos dominios se conserva principalmente, pero las secuencias y conformaciones de sus lazos muestran una gran variabilidad. Sus características y la formación de dímeros entrecruzados y amiloides en algunos de estos dominios SH3, hacen de este pequeño dominio modular un modelo perfecto para llevar a cabo estudios de plegamiento incorrecto de proteínas [2]. Hasta la fecha, de todos los dominios SH3, el dominio c-Src SH3 es el primer candidato a realizar estos estudios ya que sufre ambos procesos [3].



La comparación de las estructuras de los mutantes del dominio v-Src-SH3 con el dominio c-Src-SH3 muestra que las principales diferencias estructurales tienen lugar en los lazos RT, n-Src y distal.

Los cristales de v-Src-Q128R fueron obtenidos en presencia de sulfato amónico 2,1 M, cloruro de litio 40 mM, 10% glicerol, 5% PEG300, tampón acetato 0,1 M (pH 5,5). La estructura muestra los residuos W95 y E97 ubicados en las regiones menos favorecidas y prohibidas del gráfico de Ramachandran, respectivamente, que apuntan a una conformación energéticamente no favorecida del giro β . Esto podría afectar a la estabilidad general de la proteína. El reemplazamiento de los residuos en el lazo RT y n-Src del dominio c-Src SH3 por los presentes en el dominio c-Abl SH3 da como resultado la apertura de los dos lazos simultáneamente [3], lo que indica que la composición de ambos lazos juega un papel crítico en el correcto plegamiento del dominio.



Estudios de estabilidad de los mutantes del dominio v-Src SH3. En comparación con la variante WT, todos los mutantes muestran una estabilidad muy baja en presencia de agentes caotrópicos a pH 5,0 (A) y pH 7,0 (B) y frente a pH (C). (D) El dominio v-Src RT SH3 forma fibras amiloides en menos de 100 min a 25 °C. La cinética de la formación de amiloides fue seguida por el aumento en la emisión de fluorescencia de tioflavina.

Conformación cerrada de la c-Src tirosina quinasa (código PDB: 2PTK). La familia de las Src tirosina quinasa está organizada en tres dominios: SH1 o dominio catalítico; dominios SH2 y SH3. En la forma activa, los dominios SH2 y SH3 interactúan con los sustratos dando lugar a una conformación abierta de la quinasa y permitiendo que el dominio catalítico lleve a cabo su función. En su estado inactivo, el dominio SH3 interactúa con el dominio catalítico y el conector entre el dominio quinasa y el dominio SH2, facilitando la conformación cerrada de la quinasa, dando como resultado su estado inactivo [5]. El residuo R95 está altamente conservado en los dominios SH3, e interactúa con T252, L255 y N287 favoreciendo la conformación cerrada / inactiva de la quinasa. Esta arginina junto con una treonina da el nombre a este lazo, el lazo RT. Precisamente, estos residuos están mutados en la versión oncogénica de la quinasa.

CONCLUSIONES
El reemplazo de los residuos de arginina y treonina en el lazo RT por los de su versión oncogénica, triptófano e isoleucina, produce la desestabilización de la proteína. Como podemos ver en el gráfico de Ramachandran, esto puede atribuirse a la ubicación de estos residuos del lazo RT en las regiones menos favorecidas de este gráfico, que representan la energía del enlace peptídico. De esta manera, la interacción entre el lazo RT del dominio SH3 con el dominio catalítico se interrumpe, impidiendo que la quinasa adopte su forma cerrada, y favoreciendo el comportamiento no regulado de esta tirosina quinasa oncogénica.