Formación de fibras amiloides en el dominio SH3 de la Src tirosina quinasa inducidas por el 2,2,2-trifluoroetanol

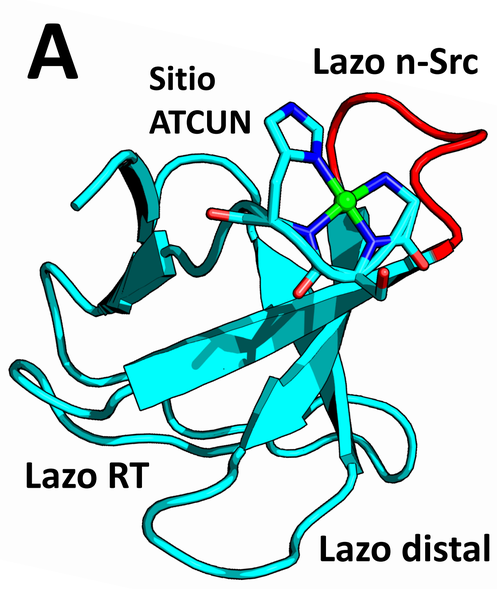
M. Plaza-Garrido M. Salinas-García y A. Cámara-Artigas
Departamento de Química y Física. Universidad de Almería, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Carretera de Sacramento s/n, Almería, 04120, España; mpg159@inlumine.ual.es

El dominio SH3 ha sido utilizado como proteína modelo para estudiar mecanismos de plegamiento en proteínas β gracias a su pequeño tamaño y la ausencia de grupos disulfuro. Nuestro grupo de investigación ha contribuido a ampliar la información estructural de estos dominios con más de 100 estructuras depositadas en el Protein Data Bank, entre ellas la estructura cristalina del dominio SH3 de la c-Src, capaz de sufrir plegamientos alternativos como la formación de dímeros entrecruzados por entrecruzamiento tridimensional de dominios (3D-DS) y la formación de fibras amiloides[1,2]. Ambos procesos tienen lugar a altas concentraciones de proteína (~20 mg/mL) y a pH 5,0. Los estudios se realizaron inicialmente con una proteína que presentaba un artefacto de clonación como consecuencia de introducir un sitio de corte con la proteasa trombina para eliminar la etiqueta de histidinas utilizada en la purificación. Este artefacto consta de los residuos amino terminales Gly-Ser-His y generan lo que se conoce como un sitio ATCUN por su unión preferente de Cu y Ni. La presencia de este sitio tiene como consecuencia un aumento notable de la solubilidad y de la estabilidad de la proteína cuando se encuentra unidad al metal[3]. Cuando la proteína carece del motivo ATCUN, se reduce la solubilidad de la misma, por lo que es difícil obtener dímeros entrecruzados en disolución y fibras amiloides.

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         60         70         80         90        100
c-Src-TK         FGTVATEPKL FGGFNTSDTV TSPQRAGALA GGVTTFVALY DYESRTETDL
c-Src-SH3        ---------- --mgsshhhh hhssgpqqgl rGVTTFVALY DYESRTETDL
ATCUN-SH3        ---------- ---mgsshhh hhhssglvpk GSHMTFVALY DYESRTETDL

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        110        120        130        140        150
c-Src-TK         SFKKGERLQI VNNTEGDWWL AHSLTTGQTG YIPSNYVAPS DSIQAEEWYF
c-Src-SH3        SFKKGERLQI VNNTEGDWWL AHSLTTGQTG YIPSNYVAPS D---------
ATCUN-SH3        SFKKGERLQI VNNTEGDWWL AHSLTTGQTG YIPSNYVAPS D---------
```

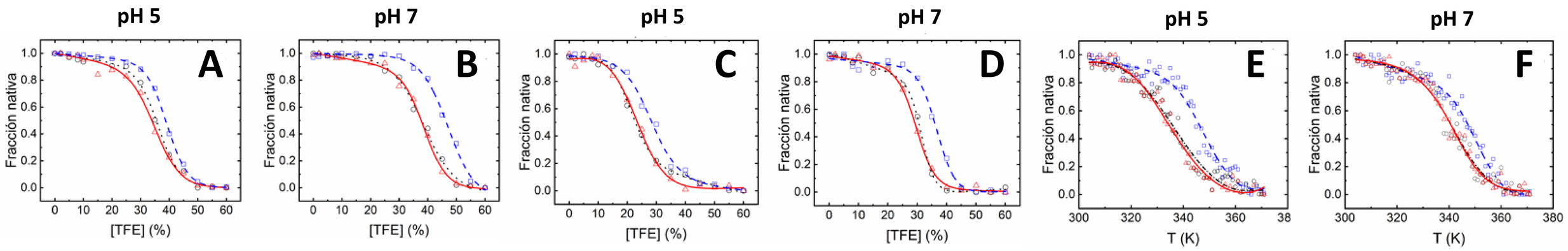
Secuencias del dominio SH3 de la c-Src con el motivo ATCUN (ATCUN-SH3) y sin dicho motivo (c-Src-SH3). Se muestra también parcialmente la secuencia de la tirosina quinasa donde se ha resaltado sobre fondo negro la región anotada como dominio SH3 (c-Src-TK)



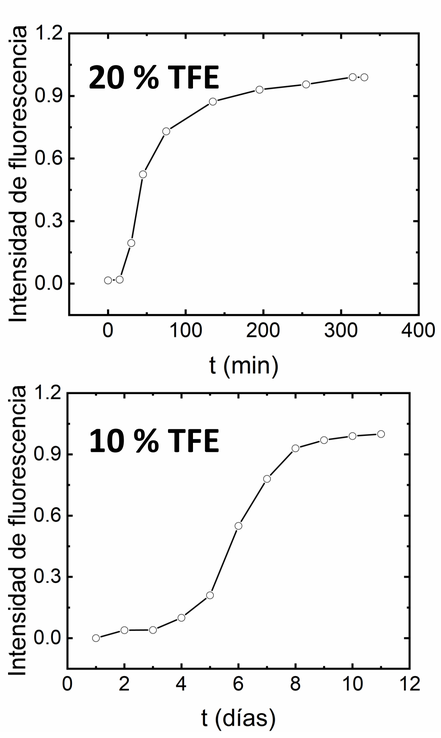
(A) Estructura del monómero del dominio SH3 de la c-Src con el sitio ATCUN. Se puede observar el níquel (verde) unido a los residuos Gly-Ser-His en el extremo N-terminal. (B) Superposición de los monómeros de la c-Src con (cian) y sin (verde) el motivo ATCUN. Las diferencias más significativas se observan en los lazos n-Src y RT

El 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) promueve la formación local de enlaces de hidrógeno al disminuir la polaridad del medio, lo que favorece la formación de estructuras en α-hélice. Ello tiene también un efecto en la agregación de las proteínas globulares y la formación de fibras amiloides. Hemos caracterizado como afecta la adición del TFE a las propiedades del dominio c-Src SH3 con y sin el sitio ATCUN, además de caracterizar su equilibrio conformacional mediante dicroísmo circular y fluorescencia.

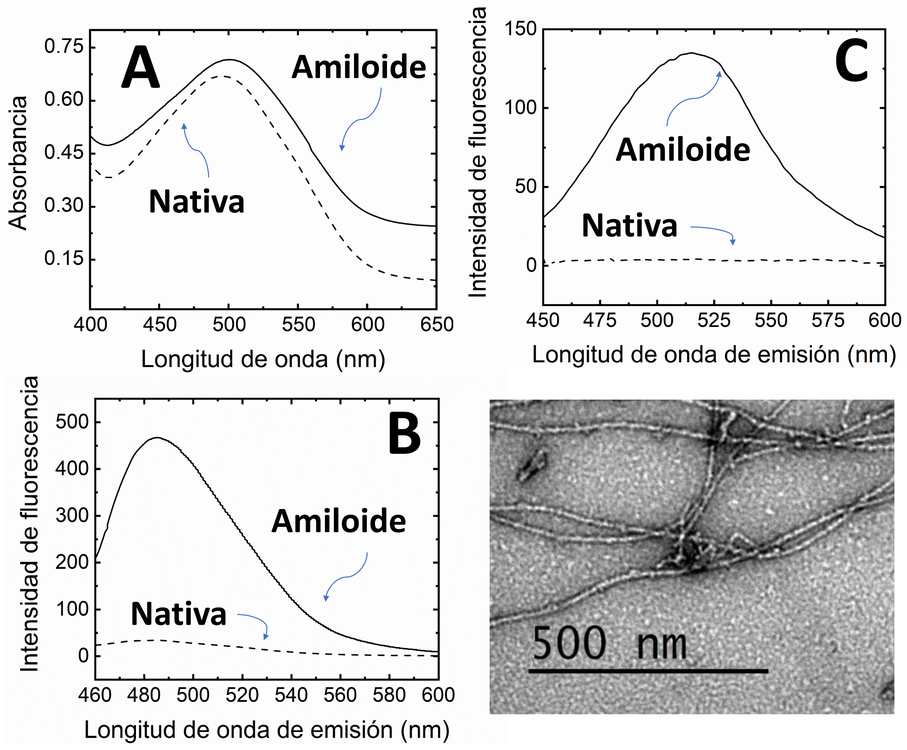
Hemos observado que concentraciones tan bajas como el 5 % de TFE promueven la formación fibras amiloides a pH 5,0 y con concentraciones un orden de magnitud más bajas que las necesarias para la formación de amiloides en la proteína con el sitio de unión de metales. Las pruebas de detección de amiloides se realizaron con tioflavina T (ThT), rojo Congo (RC) y ANS



Espectros de CD-UV lejano a pH 5,0 (A) y 7,0 (B) y titulación con TFE monitorizada por la fluorescencia intrínseca de las proteínas a pH 5,0 (C) y 7,0 (D) a una longitud de onda de excitación de 280 nm y concentraciones crecientes de TFE de 0 a 60 % (v/v). Fracción de proteína nativa vs temperatura a pH 5,0 (E) y pH 7,0 (F) seguida a 222 nm en presencia de TFE al 15 %. En todos los casos, los experimentos se han llevado a cabo para: c-Src-SH3 (negro) y ATCUN-SH3 en ausencia (rojo) y en presencia $NiCl_2$ 1 mM (azul)



Cinética de la formación de amiloides de la c-Src-SH3 en presencia de TFE a 25 ºC. La concentración final de la disolución del amiloide fue de 100 µM y la concentración de ThT fue de 12,5 µM. Las muestras se excitaron a 440 nm y el espectro de emisión de recogió entre 450 y 600 nm manteniendo las rendijas de emisión y excitación a 5 nm



Caracterización de los amiloides de la c-Src-SH3. (A) Espectro de absorbancia de la proteína nativa y de amiloide con 20 µM de RC. Espectro de emisión de fluorescencia con ThT 12,5 µM (B) y ANS 25 µM (C). (D) Imágenes TEM de las fibras obtenidas con TFE 10 % en pH 5,0 incubadas durante 11 días

La c-Src sin el motivo ATCUN es menos soluble que la proteína con dicho motivo, sin embargo, también puede formar dímeros entrecruzados y amiloides. Este trabajo ha demostrado que la formación de fibras se ve promovida por la acción del TFE, capaz de formar enlaces de hidrógeno que favorecen la formación de agregados como los amiloides

(1) Cámara-Artigas A, et al. Intertwined dimeric structure for the SH3 domain of the c-Src tyrosine kinase induced by polyethylene glycol binding. FEBS Letters. 2009, 583, 749-753.
(2) Bacarizo J, et al. 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, 9, e113224.
(3) Plaza-Garrido M, et al. 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, 25, 621-634.

IX SIMPOSIO de Investigación EN CIENCIAS EXPERIMENTALES

Acknowledgements. This research was funded by the Spanish Ministerio de Economia y Competitividad and FEDER (EU) [BIO2016-78020-R] and PAIDI group BIO328 Estructura de proteínas. Data collection was supported by ALBA (Barcelona, Spain) [BAG 2017082320 and 2016091824] and ESRF (Grenoble, France) [BAG MX2064]. We thank the staff of the beamline XALOC (ALBA) and ID30B (ESRF) for assistance and support using beamline.

ceiA3 bital UNIVERSIDAD DE ALMERÍA CENTRO de INVESTIGACIÓN en BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD
UNIÓN EUROPEA Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa"