

Julien MIGNON^{a, *}, Eric A. PERPETE^{a, b, c}
et Catherine MICHAUX^{a, b, d}

^a Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules, UCPTS,
Université de Namur, 5000 Namur, Belgique

^b Namur Institute of Structured Matter,
Université de Namur, 5000 Namur, Belgique

^c Institute of Life, Earth, and Environment,
Université de Namur, 5000 Namur, Belgique

^d Namur Research Institute for Life Sciences, Université de
Namur, 5000 Namur, Belgique
julien.mignon@unamur.be



Propriétés associées au désordre et mécanisme d'agrégation d'une nouvelle IDP amyloïdogène : la protéine à doigts de zinc DPF3a

Résumé

Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) doivent leurs diverses fonctions biologiques à leur désordre intrinsèque. Elles sont particulièrement impliquées dans des pathologies humaines sévères telles que les maladies neurodégénératives par fibrillation amyloïde dont le ciblage thérapeutique réclame l'élaboration de nouvelles stratégies médicamenteuses, ce qui requiert l'étude de leur comportement *in vitro*. DPF3 est une protéine à doigts de zinc, existant sous deux isoformes, DPF3b et DPF3a et dont il n'existe aucune donnée structurale. Par combinaison de techniques de caractérisation biophysiques, nous avons mis en lumière le caractère désordonné de DPF3a ainsi que sa propension à l'agrégation en fibrilles amyloïdes.

Disorder properties and aggregation mechanism of a new amyloidogenic IDP: the zinc finger protein DPF3a

Abstract

Intrinsically disordered proteins (IDPs) owe their various biological functions to their intrinsic disorder. They are particularly involved in severe

*human pathologies such as neurodegenerative diseases occurring by amyloid fibrillation, whose therapeutic targeting requires new drug design strategies involving the study of their *in vitro* behaviour. DPF3 is a zinc finger protein, existing in two isoforms, DPF3b and DPF3a, for which no structural data are available. By using a combination of biophysical characterisation techniques, we were able to highlight the DPF3a disordered character as well as its propensity to aggregate into amyloid fibrils.*

1. Les protéines intrinsèquement désordonnées comme nouvelles cibles thérapeutiques

La compréhension et le ciblage thérapeutique du cancer et des protéinopathies (modification de l'état de repliement des protéines) représentent des enjeux majeurs de santé publique. A titre d'exemple, le nombre de nouveaux cas de cancer en 2020 est estimé à 19.3 millions à l'échelle mondiale et le nombre de morts associé à 10.0 millions [1]. Dans le paysage protéique de ces pathologies, un groupe est particulièrement surreprésenté : les protéines

intrinsèquement désordonnées (IDPs pour *intrinsically disordered proteins*).

Introduit depuis la fin des années 1990, le « désordre » est un concept relativement jeune dans le domaine de la biochimie, qui bouscule le paradigme selon lequel une séquence en acides aminés correspond à une structure tertiaire définie menant à une seule fonction [2, 3]. Les IDPs sont des protéines remarquables en ce sens qu'elles demeurent tout à fait fonctionnelles en l'absence d'une structure tertiaire bien déterminée (Figure 1). Par ailleurs, leur plasticité conformationnelle les pourvoit d'une certaine multifonctionnalité dans de nombreux processus cellulaires cruciaux au sein desquels elles sont capables d'interagir avec une grande variété de partenaires moléculaires comme des protéines, des peptides, des acides nucléiques ou encore des lipides [4, 5].

Les IDPs sont présentes dans tous les protéomes répertoriés, avec une prévalence chez les eucaryotes (environ 30 %). Quant à leur distribution dans les pathologies humaines, 52 à 67 % des protéines impliquées dans le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives seraient des IDPs [6]. Il est par ailleurs estimé que plus de 70 % des protéines identifiées dans différents cancers présentent des régions désordonnées dans leur séquence [7]. Certaines IDPs sont

également sensibles à l'agrégation [8]. Parmi elles se retrouvent les protéines dites amyloïdogènes telles que l' α -synucléine ou la protéine tau, respectivement impliquées dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Elles participent activement aux processus de neurodégénérescence via la formation d'oligomères cytotoxiques et de fibrilles amyloïdes [9]. Ces dernières résultent de l'association de filaments au sein desquels les protéines sont repliées en brins β et empilées perpendiculairement à l'axe de la fibrille, résultant en une structure en feuillets β croisés (Figure 2) [10].

Bien que les IDPs apparaissent comme des candidats thérapeutiques de première importance, leur ciblage spécifique requiert de nouvelles stratégies de conception de médicament. En effet, les méthodes traditionnelles basées sur des structures rigides se trouvent vite limitées face aux systèmes dynamiques. Actuellement, quatre voies d'action sur les IDPs et leurs fonctions biologiques sont répertoriées (Figure 3). La première consiste en la conception de principes actifs capables d'inhiber les interactions protéine-protéine (PPIs pour *protein-protein interactions*) entre l'IDP et son partenaire ordonné, notamment en induisant une transition structurale de ce dernier, empêchant ainsi l'assemblage en un complexe fonctionnel. La seconde, à défaut de prévenir la formation du complexe, cherche à en bloquer la

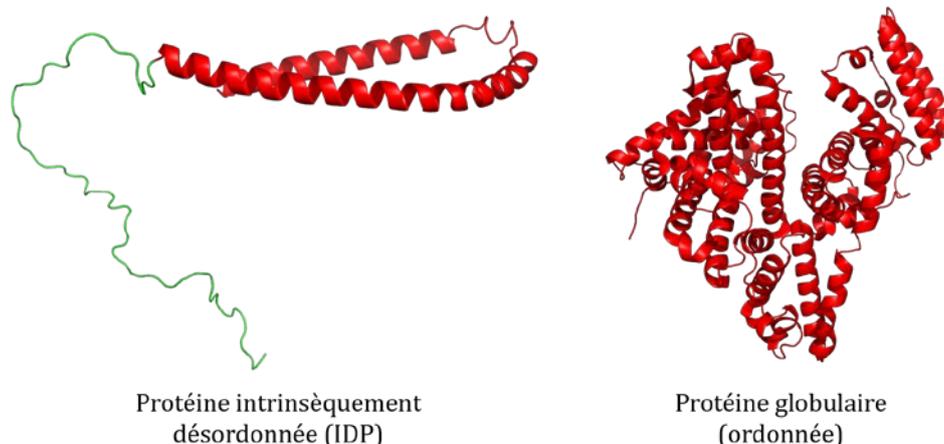


Figure 1. Comparaison de la structure tertiaire typique d'une protéine intrinsèquement désordonnée (à gauche l' α -synucléine ; entrée PDB : 2KKW) et d'une protéine globulaire (à droite l'albumine de sérum bovin ou BSA ; entrée PDB : 4F5S). Les segments ordonnés (hélices α) sont colorés en rouge et la région désordonnée en vert.

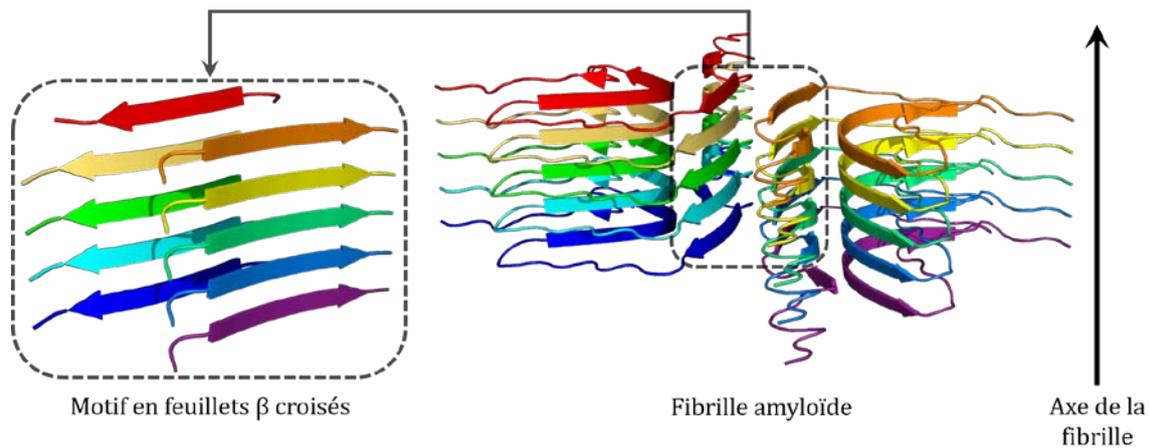


Figure 2. Arrangement structural d'une fibrille amyloïde d' α -synucléine (à droite ; entrée PDB : 6OSJ) caractérisé par un motif en feuillets β croisés au centre de la fibrille (à gauche). Les brins β sont orientés perpendiculairement à l'axe de la fibrille. Chaque couleur représente une molécule distincte d' α -synucléine.

fonction en améliorant sa stabilité ou en inhibant les interactions du complexe avec les acides nucléiques, par exemple. La troisième stratégie est sans doute la plus ambitieuse puisqu'elle vise à déplacer l'ensemble conformationnel de l'IDP vers une distribution plus ordonnée ; autrement

dit il s'agit de « figer » l'IDP dans un état de repliement particulier. La dernière alternative s'attache à développer des agents antiagrégants afin d'entraver l'organisation de certaines IDPs en oligomères de haut ordre ou en fibrilles amyloïdes [11, 12].

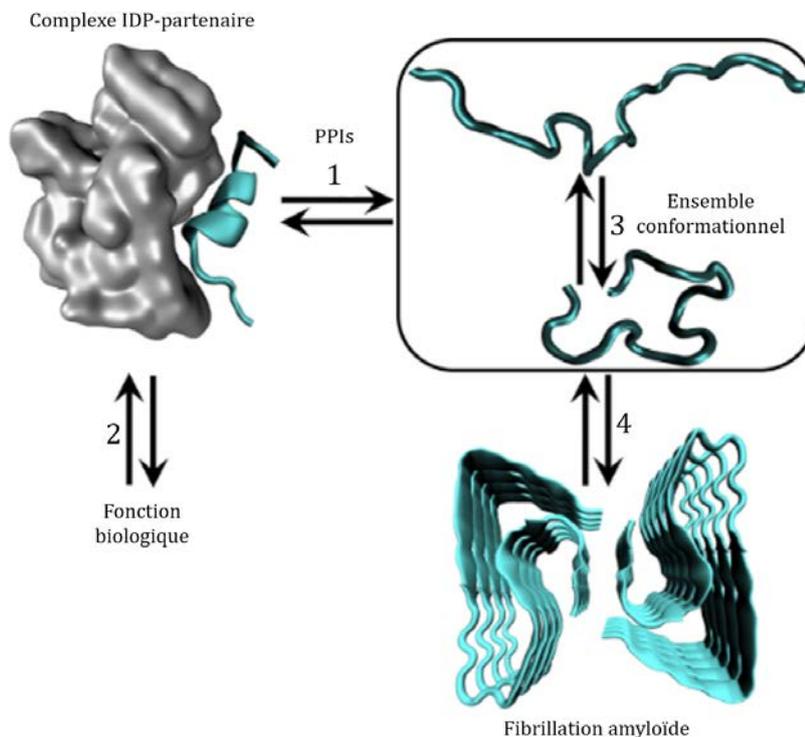


Figure 3. Stratégies de ciblage des IDPs par (1) inhibition des PPIs entre l'IDP et son partenaire d'interaction, (2) blocage de la fonction biologique du complexe IDP-partenaire, (3) déplacement de l'ensemble conformationnel de l'IDP et (4) prévention de l'agrégation en fibrilles amyloïdes. Adaptation de réf. 11 (Fuentes G., *et al.*, 2019).

2. DPF3, une nouvelle IDP amyloïdogène

Le laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules développe de nombreuses recherches visant entre autres i) l'élucidation des processus de repliement et renaturation des protéines, ii) l'étude de protéines membranaires en vue d'applications nanotechnologiques et biomédicales ainsi que (iii) la caractérisation biophysique des PPIs, des propriétés de désordre et d'agrégation d'IDPs à des fins thérapeutiques. C'est dans ce dernier axe que s'inscrit la présente publication.

DPF3 (pour *Double PHD Fingers 3*) est un régulateur épigénétique au sein d'un complexe multiprotéique impliqué dans le remodelage de la chromatine, à savoir qu'il autorise (ou non) la transcription de certains gènes. Cette protéine existe sous deux isoformes désignées par DPF3b et DPF3a. Tandis que la forme canonique (DPF3b) contient dans sa séquence le tandem de doigts de zinc de type PHD (pour *plant homeodomain*), caractéristique de la famille des DPF et servant de lecteur d'histones, la seconde isoforme (DPF3a) voit ce domaine tronqué et sa fonction demeure inconnue [13]. D'un point de vue pathologique, la DPF3 apparaît comme un candidat sérieux dans le développement de nouvelles stratégies de ciblage des IDPs puisque d'une part, sa structure a été prédite comme fortement désordonnée et que d'autre part, elle a d'ores et déjà été identifiée dans les cancers du sein et du rein [14-16].

Actuellement, il n'y a que très peu de données structurales sur ces isoformes, en particulier DPF3a pour laquelle il n'en existe aucune. Néanmoins, dans un de nos récents travaux, nous sommes parvenus à mettre en lumière les premiers indices expérimentaux relatifs à un caractère intrinsèquement désordonné ainsi qu'à une propension à la fibrillation *in vitro* de l'isoforme DPF3a [17].

Une caractérisation spectroscopique en absorption et en émission UV-visible a confirmé les prédictions de désordre de DPF3a, plus désordonnée que DPF3b, dévoilant des

signatures propres aux IDPs. Par fluorescence intrinsèque du tryptophane (ITF pour *intrinsic tryptophan fluorescence*), nous avons observé que les deux résidus tryptophane (Trp) de DPF3a ne sont pas localisés au sein d'un noyau hydrophobe mais sont au contraire fortement exposés au solvant (milieu polaire). Cet état d'exposition résulte en un déplacement bathochrome typique de leur bande d'émission de 330 vers 355 nm, indiquant que les résidus Trp sont localisés dans une chaîne flexible. Les spectres obtenus par dichroïsme circulaire (CD pour *circular dichroism*) révèlent une seule bande négative aux alentours de 202 nm, rendant compte d'une structure de type *random coil*, c'est-à-dire désordonnée (Figure 4A).

Nous avons en outre montré qu'à l'instar de protéines amyloïdogènes bien connues, telles que l' α -synucléine et la protéine tau, DPF3a est aussi capable de se fibriller spontanément au cours du temps dans un environnement proche des conditions physiologiques. La présence d'agrégats est de prime abord confirmée par diffusion dynamique de la lumière, qui permet d'observer des espèces avec des diamètres hydrodynamiques de l'ordre de 250 nm alors que la gamme attendue pour une IDP monomérique varie de 5 à 22 nm.

Afin de déterminer la nature des agrégats de DPF3a, nous avons employé deux types de spectroscopie d'émission. Dans un premier temps, la fluorescence extrinsèque de la thioflavine T (ThT), un fluorophore se liant spécifiquement aux fibrilles, résulte en une forte augmentation de l'intensité d'émission à 485 nm, témoignant de la formation d'agrégats de type amyloïde. Dans un second temps, l'autofluorescence dans le bleu-vert (dbAF pour *deep-blue autofluorescence*) indique la présence de fibrilles par l'apparition d'une bande d'émission intense à 456 nm après excitation à 350 nm (Figure 4B). Il s'agit d'un phénomène d'émission intrinsèque récemment étudié dans la littérature qui est observé durant le processus de fibrillation et dont l'origine demeure débattue [18].

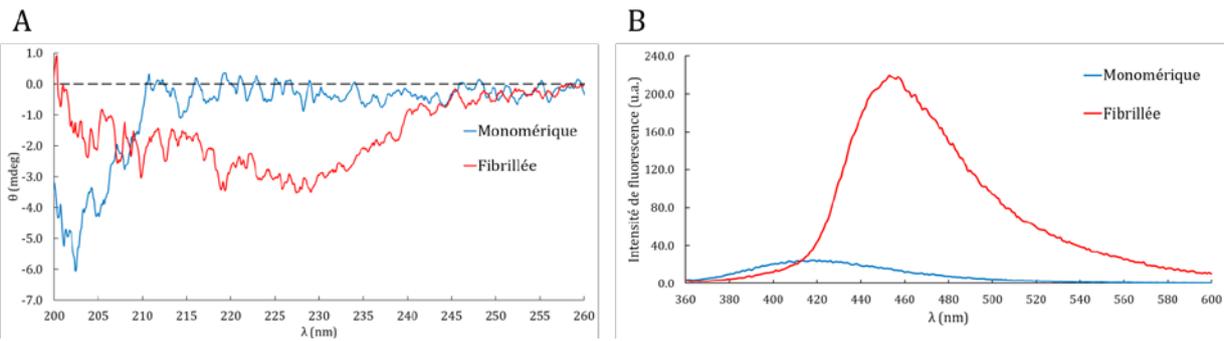


Figure 4. Spectres (A) CD et (B) dbAF de DPF3a sous forme monomérique (en bleu) et agrégée en fibrilles amyloïdes (en rouge). La fibrillation s'accompagne d'un enrichissement en feuillets β et de l'émergence d'une signature d'auto fluorescence dans le bleu-vert.

Le phénomène d'agrégation de DPF3a s'accompagne d'importantes modifications conformationnelles mises en évidence par ITF et CD. Les résidus Trp, initialement fortement exposés à un milieu polaire, gagnent en degré d'enfouissement, ce qui se manifeste par un déplacement hypsochrome de leur bande d'émission vers 335 nm. Parallèlement aux spectres de la ThT et en dbAF, la nature amyloïde est soutenue par un déplacement de l'empreinte CD de 202 à 227 nm, ce qui rend compte d'une réorganisation du *random coil* en feuillets β antiparallèles et/ou « twistés » formant le noyau structural des fibrilles amyloïdes (Fig. 4A).

Enfin, une certaine diversité morphologique a pu être observée par microscopie électronique à transmission au sein des agrégats de DPF3a, renseignant sur son mécanisme de fibrillation. Dans un premier temps, DPF3a s'agrège en

premier lieu en oligomères sphériques de haut ordre (Figure 5A), qui se regroupent et s'allongent ensuite en protofibrilles granulaires, ayant l'apparence de colliers de perles (Figure 5B). Nous supposons que c'est durant l'étape d'oligomérisation que s'opère l'enrichissement en feuillets β . Les protofibrilles poursuivent la voie d'agrégation soit en se ramifiant soit en s'assemblant finalement en fibrilles amyloïdes matures en forme d'aiguille (Figure 5C).

3. Conclusions et perspectives

Les IDPs représentent un large ensemble de protéines extrêmement diversifiées mais dont la fonctionnalité biologique est majoritairement définie par leur caractère désordonné. Alors que leur existence fut longtemps occultée par le paradigme « une séquence - une structure -

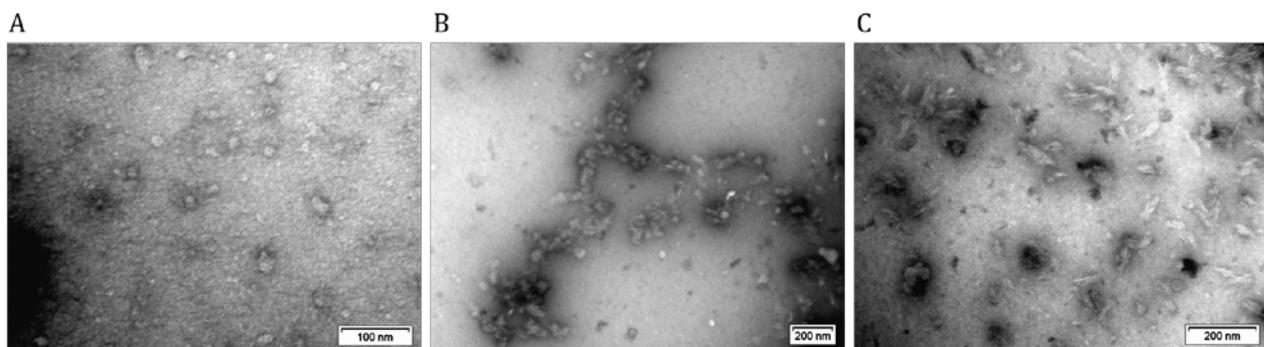


Figure 5. Micrographies des états agrégés de DPF3a assemblée en (A) oligomères sphériques de haut ordre, (B) protofibrilles granulaires et (C) fibrilles en forme d'aiguille.

une fonction », leur prépondérance dans des mécanismes cellulaires clés ainsi que leur implication dans des pathologies sévères gagnent de plus en plus en intérêt de recherche. Certaines IDPs, dites amyloïdogènes, sont en outre connues pour s'assembler en agrégats de type amyloïde responsables de maladies neurodégénératives. De par leur caractère dynamique, les protéines désordonnées requièrent le développement de stratégies de ciblage spécifiques, nécessitant l'élucidation en amont de leur propriétés physico-chimiques et structurales.

Nous avons entamé la caractérisation d'une protéine à doigts de zinc, DPF3a, retrouvée notamment dans différentes formes de cancer. Par une combinaison de méthodes spectroscopiques, microscopiques et de diffusion, nous avons démontré que DPF3a présente à la fois des caractéristiques propres au désordre, ainsi qu'une sensibilité à la fibrillation, suggérant qu'il s'agit d'une IDP amyloïdogène. Une meilleure compréhension des relations existant entre ces propriétés ainsi que la mise en évidence de partenaires d'interaction permettraient par ailleurs la découverte de nouvelles fonctions biologiques et une confirmation supplémentaire de l'implication de DPF3a dans des mécanismes de neurodégénérescence. Ainsi, DPF3a se présente comme une cible prometteuse dans la conception de stratégies d'inhibition des IDPs et des protéines prompts à l'agrégation.

4. Remerciements

J. Mignon remercie le Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS) pour son poste de doctorant FRIA. C. Michaux et E. A. Perpète remercient également le FNRS pour leur poste respectif de Chercheur qualifié et de Maître de recherches.

Références

- [1] Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
- [2] Dunker, A. K. *et al.* Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 26–59 (2001).
- [3] Uversky, V. N. & Kulkarni, P. Intrinsically disordered proteins: Chronology of a discovery. *Biophys. Chem.* **279**, (2021).
- [4] Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208 (2005).
- [5] Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins and their 'Mysterious' (meta)physics. *Front. Phys.* **7**, 8–23 (2019).
- [6] Metallo, S. J. Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 481–488 (2010).
- [7] Santofimia-Castaño, P. *et al.* Targeting intrinsically disordered proteins involved in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 1695–1707 (2020).
- [8] Morris, O. M., Torpey, J. H. & Isaacson, R. L. Intrinsically disordered proteins: Modes of binding with emphasis on disordered domains. *Open Biol.* **11**, (2021).
- [9] Vasili, E., Dominguez-Mejide, A. & Outeiro, T. F. Spreading of α -synuclein and tau: A systematic comparison of the mechanisms involved. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).
- [10] Almeida, Z. L. & Brito, R. M. M. Structure and aggregation mechanisms in amyloids. *Molecules* **25**, (2020).
- [11] Fuertes, G., Nevola, L. & Esteban-Martín, S. Perspectives on drug discovery strategies based on IDPs. in *Intrinsically Disordered Proteins 275–327* (Elsevier Inc., 2019).
- [12] Michaux, C., Mignon, J. & Perpète, E. A. Promising Drug Design Strategies: Intrinsically Disordered Proteins. *Ann. Adv. Biomed. Sci.* **3**, (2020).
- [13] Lange, M. *et al.* Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev.* **22**, 2370–2384 (2008).
- [14] Hadidy, N. El & Uversky, V. N. Intrinsic disorder of the baf complex: Roles in chromatin remodeling and disease development. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
- [15] Lin, W. hao *et al.* Downregulation of DPF3 promotes the proliferation and motility of breast cancer cells through activating JAK2/STAT3 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **514**, 639–644 (2019).
- [16] Colli, L. M. *et al.* Altered regulation of DPF3, a member of the SWI/SNF complexes, underlies the 14q24 renal cancer susceptibility locus. *Am. J. Hum. Genet.* **108**, 1590–1610 (2021).
- [17] Mignon, J. *et al.* Revealing Intrinsic Disorder and Aggregation Properties of the DPF3a Zinc Finger Protein. *ACS Omega* **6**, 18793–18801 (2021).
- [18] Sirangelo, I., Borriello, M., Irace, G. & Ianuzzi, C. Intrinsic blue-green fluorescence in amyloid fibrils. *AIMS Biophys.* **5**, 155–165 (2018).