



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Determinantes energéticos de la
interacción entre Imatinib y el dominio
tirosina cinasa de la proteína Bcr-Abl**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

MARIO ALBERTO TREJO PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS
QFB. CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDÓN

ASESOR INTERNO:
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



México DF, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica 2 y Biología molecular del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del QFB. Christian Axel Luviano Jardón (Profesor de la FES-Zaragoza, UNAM) y del Dr. Enrique García Hernández (Investigador Titular del Instituto de Química, UNAM). Como asesor interno fungió el M. en C. Luis Sánchez Sánchez (Unidad de Investigación Celular y Cáncer FES-Zaragoza, UNAM). El presente proyecto contó con la financiación del proyecto CONACYT "Bases energético-estructurales del funcionamiento de proteínas con arquitectura modular" clave 235831.



Dedicatorias

A mi familia

*A mis padres **Sofía** y **Roberto** quienes me dieron la vida y me han apoyado a lo largo de mi crecimiento... quienes han sido luz en la oscuridad en este camino de la vida.*

*A mi hermana **Les** que ha sido mi amiga y cómplice en las muchas aventuras que hemos vivido juntos.*

*A mis abuelitos **Guille** y **Mario** quienes me han cuidado y soportado cariñosamente durante toda mi vida.*

*A mis hermanos **Aby** y **Beto** que me han procurado, molestado y ayudado en gran parte de mi vida.*

*...A mi pequeñita **Ailyn***

A mis amigos

*Los gemelos **Robert** y **Vlado** quienes fueron mis primeros amigos en la FES y a quienes siempre les tendré un lugar en mi corazón.*

*A los **mamíferos** por su apoyo durante la carrera y las aventuras que hemos vivido, los amo.*

*A **Dante**, gracias por los momentos divertidos que hemos compartido en tan poco tiempo de conocernos.*

*A **Josh**, **Baruc** y **Lidia**... los extraño amigos, gracias por todo.... Josh eres el ñoño que más quiero; Baruc gracias por ser mi sensei; Lidia hola... te quiero mucho y sin ti no hubiera salido de la prepa.*

*A **Aidee**, **Erick**, **Sandra** y **Raidol**... me cuesta decírselos pero son únicos y los quiero mucho...*

Aidee, gracias por escucharme siempre y apoyarme hasta cuándo ni yo creo en mi.

Erick... aunque me das miedo ha sido maravilloso vivir esas experiencias tan excitantes y de miedo en el límite de lo increíble y sobrenatural.

Sandra... gracias por todos esos momentos de pláticas y risas inolvidables que debido a tus ocurrencias tuvieron lugar.

Raidol... gracias por la confianza y consejos que se han traducido en una hermandad inquebrantable.

*A **Susi**... por ser de esas personas que vale la pena conservar a pesar de los años y la distancia.*

*Finalmente y no menos importante a **Axel**... sin palabras... gracias por todo, sabes la estima y admiración que te tengo y sabes que aparte de mi tutor eres un amigo especial y dramático.*

Agradecimientos

Al Prof. Axel Luviano por creer y confiar en mí enteramente, por las enseñanzas buenas y malas que he aprendido, por los momentos buenos y malos que hemos pasado incluyendo peleas, fiestas, viajes y días completos en el laboratorio... por seguir motivándome para superarme y cumplir mis metas personales y académicas.

Al Dr. Enrique García Hernández por sus enseñanzas, por permitirme formar parte de su laboratorio y por seguir sembrando en mí un titipuchal de curiosidad científica.

Al Dr. Ignacio Regla por la donación del Imatinib empleado en este trabajo.

A la Dra. Patricia Cano, por soportarme junto con Axel en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química de nuestra UNAM, la apreciamos Dra Paty.

A mis compañeros miembros del Clan de Kikes: Memo, Manuel, Georgie-boy, Lalo, Itzel, Abigail, Luis Pablo, Homero.

A los miembros de mi jurado y profesores: M. en C. Luis Sánchez Sánchez, Dr. Hugo López Muñoz, M. en C. JM Vicente Hernández Vázquez y Dr. Benny Weiss Steider por sus valiosas enseñanzas, comentarios y sugerencias durante la carrera y la revisión de la tesis.

Al Prof. Gumesindo, pieza clave en algún momento de mi vida.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de nuestra Universidad Nacional Autónoma de México.

Cuando uno desea algo, todo el universo conspira para que se realice -Cohelo

Yo no vengo a ver si puedo, sino porque puedo vengo –Chavela Vargas

Todo aquello que puedas o sueñes hacer, comiéndalo. La audacia contiene en si misma genio, poder y magia -Goethe

El peor enemigo con el que puedes encontrarte serás siempre tu mismo, a ti mismo te acechas tú en las cavernas y en los bosques -Nietzche

Aquel que no ha encontrado algo por lo que valga la pena morir, no merece vivir -Anónimo

La fuerza más grande, proviene de nuestras mayores debilidades -Anónimo

Nadie llegó a la cumbre acompañado por el miedo -Publio

Sólo los cadáveres permanecen inmutables a las razón -El Teatro de Galileo de Bertolt Brecht

Cuando vayas en medio de la oscuridad solo puedes ver con los ojos del corazón –Ma & Ax

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas y símbolos	1
Resumen	2
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Bcr-Abl y leucemia mieloide crónica.....	3
1.2. Estructura general de Abl y Bcr-Abl.....	5
1.3. Descripción estructural del dominio cinasa de Abl.....	8
1.4. Imatinib.....	14
1.5. Bases estructurales de la unión de Imatinib al dominio cinasa de Abl.....	16
1.6. Resistencia a Imatinib.....	19
1.7. Termodinámica de la interacción proteína-ligando.....	20
1.8. Principios de ITC.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVO GENERAL	27
4.1. Objetivos particulares.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Soluciones amortiguadoras y reactivos.....	28
5.2. Vectores de expresión pET28a-TKD-Abl y pCDFDuet-1-YopH.....	29
5.3. Transformación de bacterias.....	29
5.4. Sobreexpresión del dominio cinasa Abl.....	30
5.5 Purificación del dominio cinasa de Abl.....	31
5.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	32
5.7. Cuantificación y preparación de las muestras.....	32

5.8. Espectrometría de masas.....	33
5.9. Dicroísmo circular (DC).....	33
5.10. Calorimetría de titulación isotérmica.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. Análisis de la construcción pET28a-TKD-Abl.....	35
6.2 Purificación del dominio cinasa de Abl.....	38
6.3. Dicroísmo circular (DC).....	41
6.4. Calorimetría de titulación isotérmica.....	47
7. DISCUSIÓN.....	51
7.1. Obtención del dominio cinasa de Abl recombinante.....	51
7.2. Plegamiento y estabilidad de Abl.....	52
7.3. Energética de la interacción entre Abl e Imatinib.....	54
7.4. Cambios conformacionales de Abl tras la unión de Imatinib.....	60
8. CONCLUSIONES.....	67
9. PERSPECTIVAS.....	68
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

Abreviaturas y símbolos

Abl: Dominio catalítico de Abl (Abelson Leukemia virus homologue protein kinase)

ASA: Área superficial accesible al solvente

ATP: Adenosin trifosfato

Bcr: Breakpoint Cluster Region

DC: Dicroísmo Circular

DNA: Ácido desoxirribonucleico

IPTG: Isopropil-tio-o-galactopiranosido

ITC: Isothermal Titration Calorimetry

K_a : Constante de asociación

K_d : Constante de disociación

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LPXXP: Lazo de poliprolinas

MALDI-TOF: Matriz Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight

Ph: Cromosoma filadelfia

PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

PPII: Hélices de poliprolina tipo II

PKC: Protein Kinase C

SH2: Src Homology 2

SH3: Src Homology 3

Subdominio C: Subdominio C-terminal de Abl

Subdomino N: Subdominio N-terminal de Abl

T : Temperatura

ΔC_p : Cambio en la capacidad calorífica

ΔG : Cambio en la energía libre de Gibbs

ΔH : Cambio en la entalpía

ΔS : Cambio en la entropía

ΔASA : Cambio de área superficial accesible al solvente

Resumen

La activación constitutiva de la actividad tirosina cinasa de la proteína quimérica Bcr-Abl originada por la traslocación cromosómica t(9;22)(q34;q11) es la causa molecular de la leucemia mieloide crónica (LMC). El Imatinib es un fármaco para el tratamiento de LMC y actúa uniéndose al sitio de reconocimiento del complejo cosustrato MgATP en Bcr-Abl inhibiendo su actividad catalítica. Existen muchos estudios estructurales sobre la interacción entre el dominio cinasa de Bcr-Abl (Abl) e Imatinib sin embargo los determinantes energéticos de la interacción aun no han sido descritos.

En este trabajo se realizó la sobreexpresión y purificación Abl recombinante, el cual se obtuvo con una pureza $\geq 98\%$ y un rendimiento del orden de miligramos. La caracterización de la proteína recombinante por dicroísmo circular mostró un espectro característico de una α/β -proteína la cual al ser desplegada térmicamente reveló una transición bifásica de su estado plegado a su estado desplegado. El desplegamiento térmico es parcialmente reversible. Mediante calorimetría de titulación isotérmica se obtuvieron los parámetros termodinámicos que rigen la asociación de Imatinib a Abl a diferentes temperaturas. La formación del complejo Abl-Imatinib fue favorable y fue dirigida entálpicamente. El componente entrópico fue desfavorable. EL cambio en la capacidad calorífica obtenido mediante la dependencia del cambio de entalpía de asociación con respecto a la temperatura mostró fuerte dependencia térmica revelando que a temperaturas por arriba de 22.5 °C, Abl sufre cambios conformacionales de diferente magnitud conforme se aumenta la temperatura. La caracterización termodinámica de la asociación Abl-MgATP a 25 °C mostró virtualmente la misma firma termodinámica que para Abl-Imatinib, pero con una constante de asociación dos órdenes de magnitud menor. El análisis detallado de los parámetros energéticos de interacción Abl-Imatinib reveló que Abl sufre una rigidización importante tras la unión de Imatinib caracterizada por el ocultamiento de área superficial accesible al solvente.

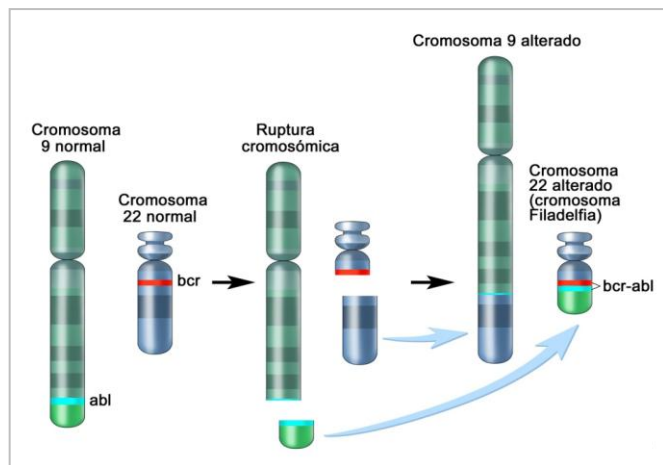
1. MARCO TEÓRICO

1.1. Bcr-Abl y leucemia mieloide crónica.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un síndrome clonal mieloproliferativo de células troncales hematopoyéticas que es originada en aproximadamente el 90% de las veces por un único evento genético de translocación recíproca $t(9;22)(q34;q11)$ originando un cromosoma 22 anormalmente más corto denominado cromosoma filadelfia (Ph).^{1,2,3} Esta leucemia afecta alrededor de 1.2 a 1.5 millones de pacientes a nivel mundial de los cuales más de 900 000 son Ph+.⁴ La LMC progresa a través de distintos estados clínicos, la fase más temprana denominada fase crónica evoluciona en un periodo variable (que va de pocos meses a tres años) a una fase aguda denominada crisis blástica que generalmente es fatal.⁵

El producto del cromosoma Ph resulta en la fusión de los genes *BCR* (del inglés, *Breakpoint Cluster Region*) y *ABL* (del inglés, *ABelson Leukemia virus homologue*) que crea un gen híbrido el cual es transcripcionalmente activo a la oncoproteína Bcr-Abl (**Figura 1**), la cual se encuentra constitutivamente activa y se localiza en citoplasma, en contraste con Abl nativa la cual se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma.^{6,7} El gen *BCR* en el cromosoma 22 puede romperse en diferentes sitios y fusionarse con el gen *ABL* del cromosoma 9 para formar un cromosoma 22 alterado. Si la ruptura en el cromosoma 22 ocurre en el exón 1 dará origen a una proteína de 190 kDa ($p190^{Bcr-Abl}$) asociada a leucemia linfocítica aguda, si la ruptura ocurre en el exón 12/13 dará origen a una proteína de 210 kDa ($p210^{Bcr-Abl}$) asociada a LMC (ocurre en el 90 a 95 % de las veces) y si ocurre en el exón 19 dará origen a una proteína de 230 kDa ($p230^{Bcr-Abl}$) asociada a leucemia neutrofilica crónica.^{3,8}

Figura 1. Translocación $t(9;22)(q34;q11)$ que origina el cromosoma filadelfia. Segmentos de los brazos largos (q) de ambos cromosomas 9 y 22 sufren una ruptura en los sitios de los genes *ABL* y *BCR* respectivamente, los cuales son intercambiados recíprocamente para dar origen a un cromosoma 9 alterado (gen quimérico *ABL-BCR*) y a un cromosoma 22 alterado (gen quimérico *BCR-ABL*) denominado cromosoma filadelfia.



Las proteínas tirosina cinasas han sido divididas en dos grandes clases, las tirosina cinasas receptoras que son proteínas transmembranales con un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular con la actividad catalítica de cinasa. Las tirosina cinasas no receptoras son proteínas que se encuentran en el citoplasma, el núcleo y la superficie interna de la membrana plasmática.⁹ En estas proteínas el dominio cinasa es una estructura altamente conservada y consta de aproximadamente 300 aminoácidos, este sitio cataliza la transferencia del fosfato- γ del ATP al grupo hidroxilo de un residuo de tirosina contenido en un péptido sustrato específico. Abl es una proteína tirosina cinasa no receptora que interacciona con una gran cantidad de proteínas celulares, incluidas proteínas de señalización, otras cinasas, fosfatasas, proteínas reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, entre otras. A su vez se ve involucrada de forma importante en gran variedad de procesos biológicos fundamentales como crecimiento y supervivencia celular, respuesta ante estrés celular ocasionado por daño al DNA, estrés oxidativo, dinámica del citoesqueleto de actina, migración celular, adhesión celular, entre otros, por lo que cualquier alteración en la función de Abl a nivel molecular traerá consecuencias a nivel celular.^{10,11}

Bajo condiciones normales la tirosina cinasa Abl se encuentra finamente controlada por varios mecanismos autorregulatorios que se pierden debido a la fusión con la proteína Bcr en LMC. Un dominio de oligomerización en el fragmento Bcr (residuos 1-72) esencial para la transformación neoplásica, promueve la formación de di- o tetrámeros sobre-activando la actividad tirosina cinasa de Bcr-Abl.¹² La desregulación también se ve favorecida por la pérdida de un grupo miristoilo autoinhibitorio presente en la región CAP de Abl nativa (isoforma 1b) (**Figura 2**). En general, al estar Abl involucrada en una gran variedad de procesos celulares fundamentales, debido a la fusión con Bcr, el dominio cinasa de Bcr-Abl queda permanentemente activo, desregulado y con su actividad catalítica incrementada derivando en transformación neoplásica, establecimiento y progreso de la enfermedad.¹⁰

1.2. Estructura general de Abl y Bcr-Abl

La organización estructural de Abl está conformada desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal por los siguientes elementos: una región CAP que se puede encontrar miristoilada o no, según la isoforma 1b o 1a respectivamente, un dominio SH3, un dominio SH2, un *linker* que enlaza el dominio SH2 con el dominio cinasa y a continuación posee secuencias ricas en prolina (PXXP), motivos de localización nuclear, un dominio de unión a DNA y termina con una secuencia de exportación nuclear flanqueada por dos dominios de unión a actina (**Figura 2A**). En la proteína quimérica Bcr-Abl se pierde parte de la CAP y en consecuencia en la isoforma 1b es eliminado el grupo miristoilo autoregulatorio (**Figura 2B**).¹⁰

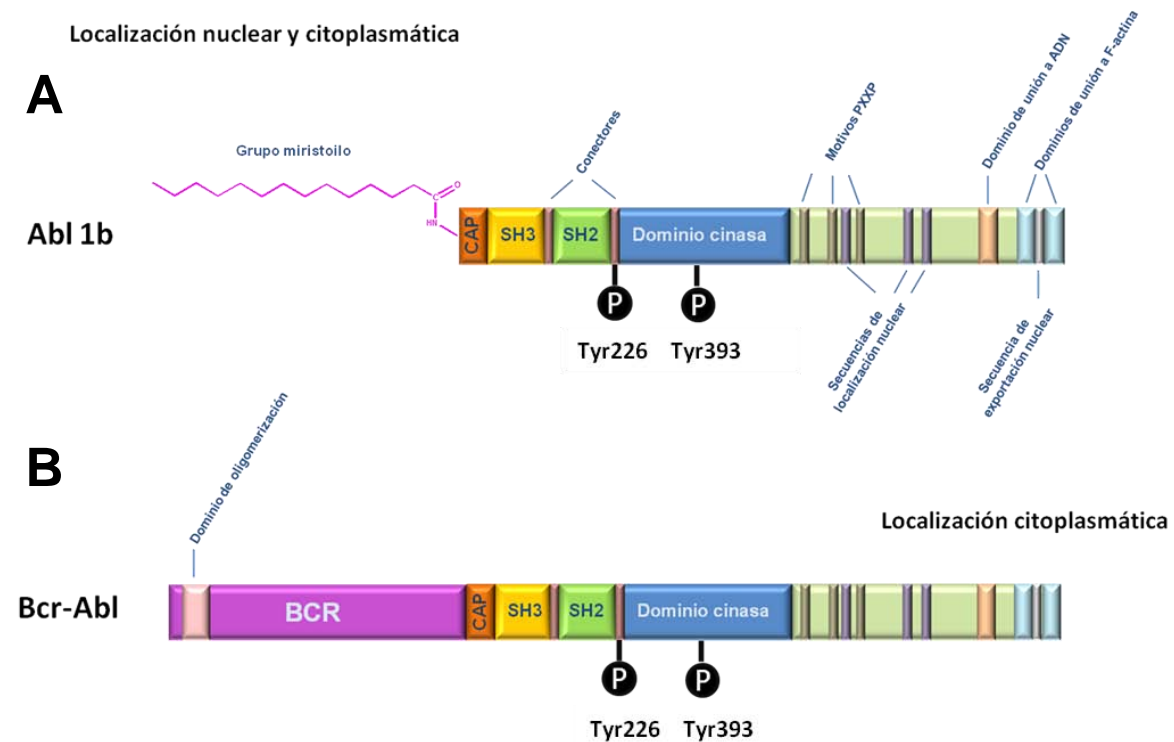


Figura 2. A) Organización estructural de la proteína Abl isoforma 1b donde se muestran sus diferentes regiones y dominios así como las tirosinas 226 y 393 que pueden ser fosforiladas y son claves en su regulación. B) Organización estructural de la oncoproteína quimérica Bcr-Abl en donde se observa el dominio de oligomerización en el segmento Bcr que favorece su actividad transformante y además se muestra la pérdida del grupo miristoilo autorregulatorio (Adaptado de Hantschel O¹⁰).

De forma normal la proteína Abl es capaz de oscilar entre dos conformaciones, una cerrada o autoinhibida y otra abierta o activa. Al ser una proteína con arquitectura modular posee varios elementos estructurales con conformaciones características en sus formas abierta o cerrada (**Figura 3**).¹³

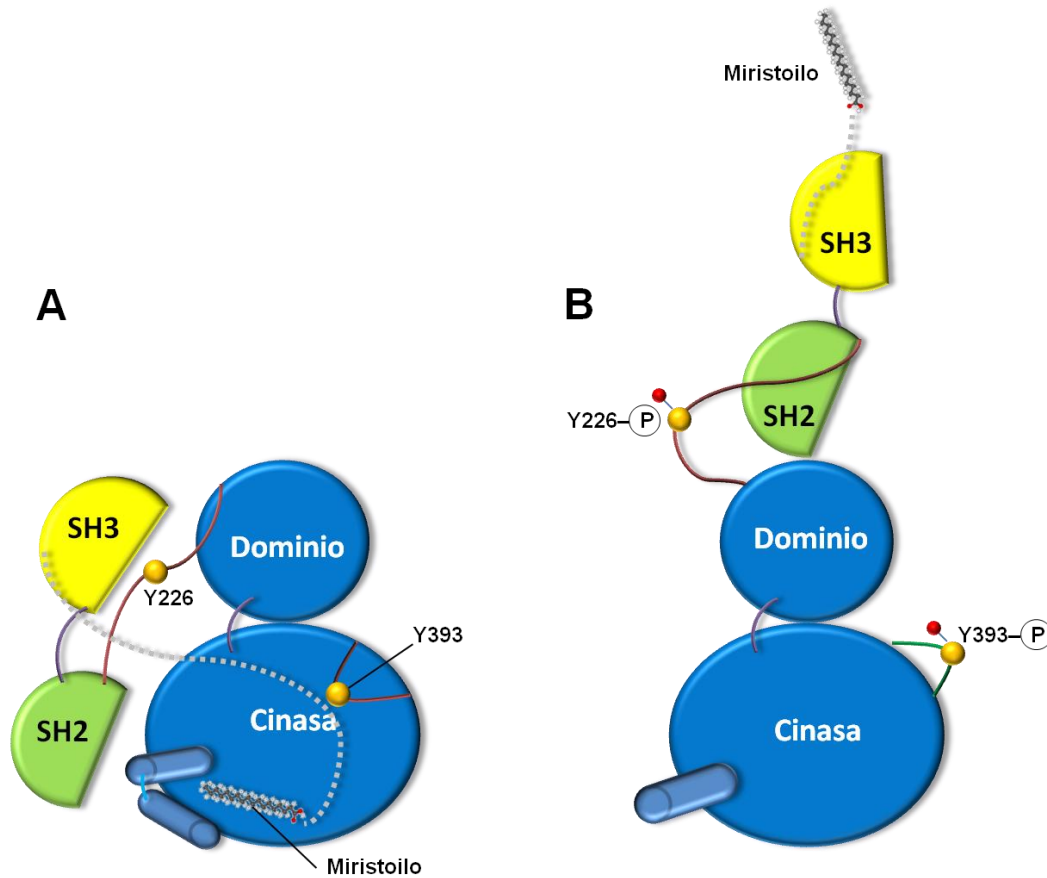


Figura 3. Esquema de las conformaciones de Abl. **A)** Conformación cerrada estabilizada por una interacción del grupo miristoilo de la CAP (línea punteada) con el dominio cinasa (azul). **B)** Conformación abierta favorecida por la fosforilación de los residuos Y226 y Y393.

Los elementos estructurales que rigen su conformación (abierto o cerrado) son el grupo de miristoilo en la región CAP (residuos 1-64), el dominio SH3 (residuos 65-118), el dominio SH2 (residuos 128-217) y el *linker* entre SH2 y el dominio cinasa al que denominamos LPXXP en este escrito (residuos 218-235). En la **Figura 4** se muestra la estructura cristalográfica de una construcción que contiene los elementos estructurales mencionados anteriormente y que corresponden a la conformación cerrada de Abl. Estructuralmente el dominio SH3 está conformado por 2 láminas- β antiparalelas y es capaz de reconocer secuencias ricas en prolina que tienden a adoptar conformaciones helicoidales poliprolina tipo II (PPII) de tal modo que

SH3 interacciona con LPXXP. El principal contacto que contribuyen a estabilizar la unión entre SH3 y LPXXP son los residuos Y70 y Y115 contenidos en SH3 que interaccionan con un residuo P223 de LPXXP. El dominio SH2 está conformado por una lámina- β antiparalela central flanqueada por dos hélices- α (una en cada lado). El residuo Y139 del dominio SH2 forma una interacción hidrofóbica de apilamiento con el residuo Y342 la cual estabiliza la conformación autoinhibida de Abl. Un elemento clave para la conversión a su conformación abierta es la fosforilación del residuo Y226 localizado en el LPXXP, que permite la separación de los dominios SH3 y SH2 del dominio cinasa, este último evento es estabilizado por la interacción de un residuo I145 contenido en el SH2 con el dominio cinasa (**Figura 4**).¹⁴

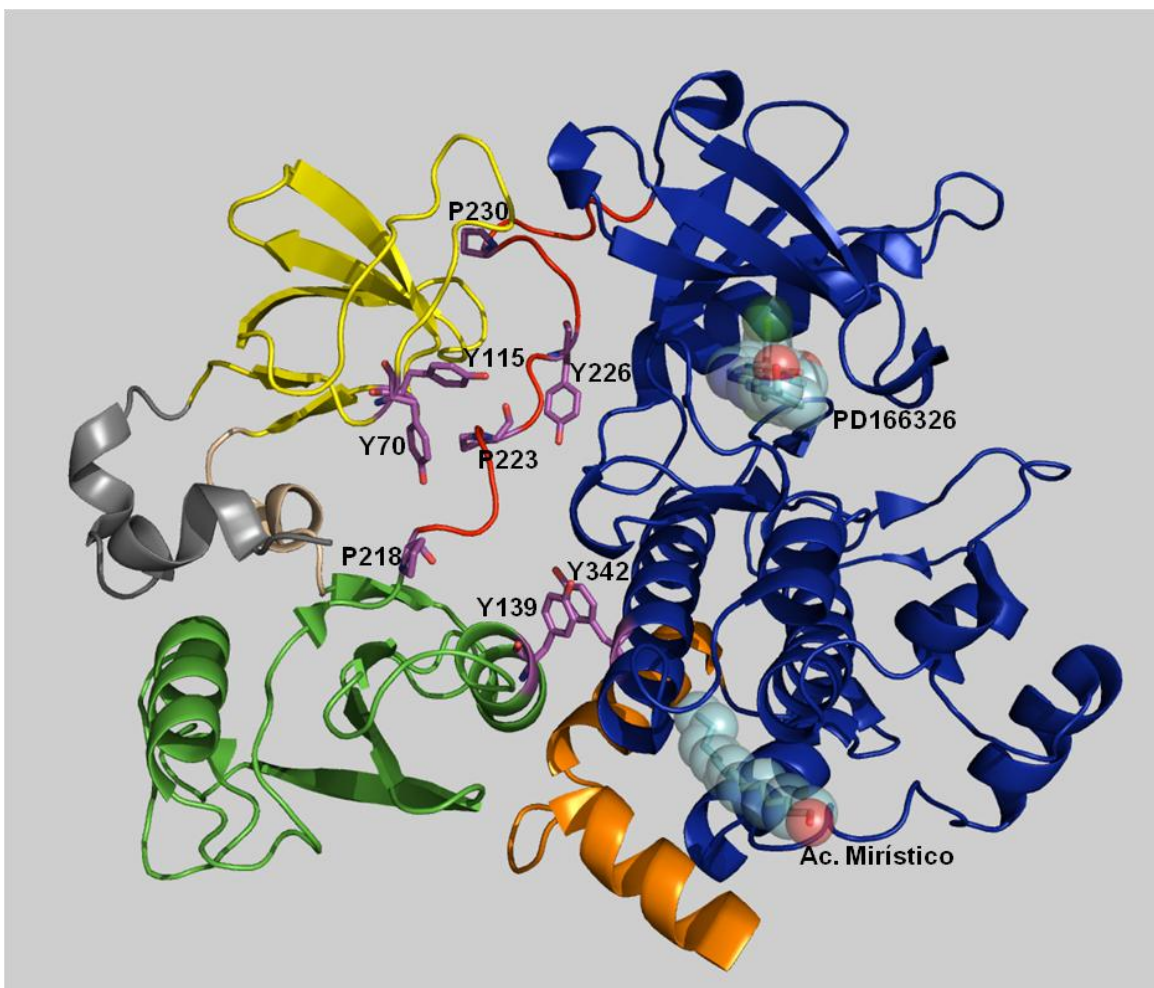


Figura 4. Estructura cristalográfica de Abl en conformación cerrada elaborada a partir del PDB 2FO0. En color azul se muestra el dominio cinasa unido al inhibidor PD166326 y a una molécula de ácido mirístico (ambos azul claro), en rojo se muestra el *linker* LPXXP que une al dominio cinasa con el dominio SH2 (verde), este último con un residuo Y139 interacciona hidrofóbicamente con el residuo Y342 del dominio cinasa, los residuos Y70 y Y115 del dominio SH3 (amarillo) interaccionan con el residuo P223 del *linker* LPXXP que adopta una estructura PPII gracias a los residuos P218, P223 y P230.

1.3. Descripción estructural del dominio cinasa de Abl

Estructuralmente el dominio cinasa de Abl (Abl) consiste en una forma bilobulada, los residuos 236-316 conforman al subdominio N-terminal (subdominio N) el cual está formado por cinco hebras- β antiparalelas y una destacada hélice- α . Los residuos 322-500 conforman al subdominio C-terminal (subdominio C) formado principalmente por hélices- α y es el responsable de la unión al péptido sustrato. En la interfase de ambos subdominios se encuentra el sitio catalítico donde se lleva a cabo la transferencia del fosfato- γ del complejo MgATP al grupo hidroxilo de una tirosina contenida en el péptido sustrato (**Figura 5A**).³

El dominio cinasa posee elementos estructurales importantes para su funcionamiento. Un segmento altamente flexible rico en glicinas entre las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ del subdominio N (residuos 248-257) denominado *P-loop* o asa-P participa en la unión cubriendo a los fosfatos- β y - γ del complejo MgATP.¹⁵ Los residuos 317-321 forman un pequeño lazo que conecta al subdominio N con el subdominio C, este elemento sirve de plataforma para el correcto posicionamiento de la adenina del ATP en el sitio catalítico (**Figura 5B**).¹⁶

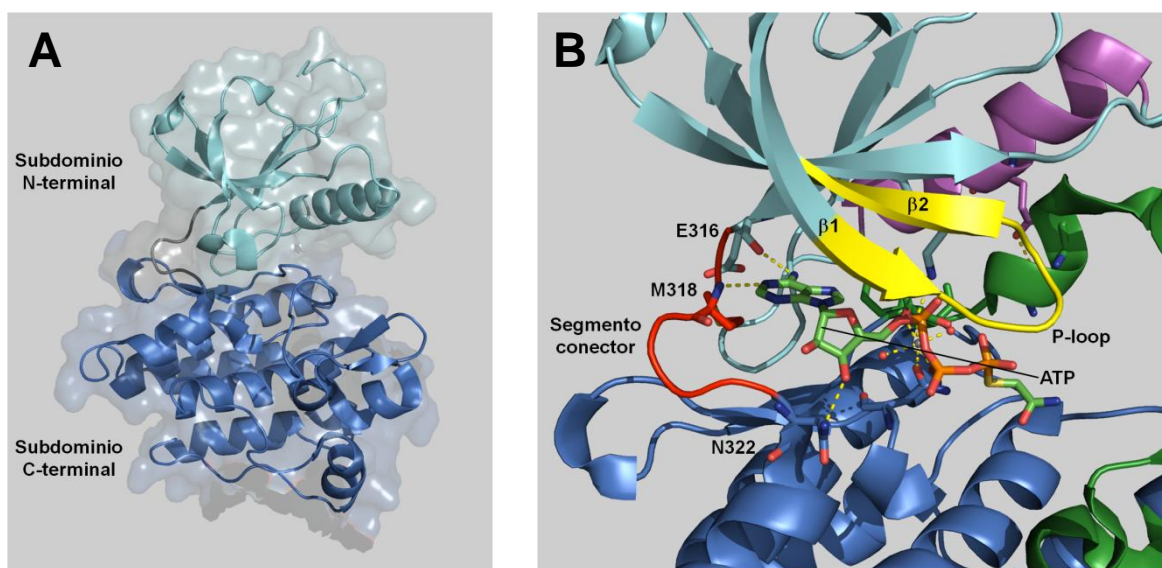


Figura 5. A) Estructura bilobulada del dominio cinasa de Abl (PDB 1IEP). **B)** Estructura de Abl en complejo con un análogo de ATP y Mg(II) (PDB 2G1T), donde se muestra que el segmento conector (rojo) sirve de plataforma para el correcto posicionamiento del fragmento de adenina del ATP mediado por una interacción donde participa el residuo M318. El *P-loop* (amarillo) se posiciona sobre los fosfatos del ATP favoreciendo su unión. Los residuos E316 y N322 que flanquean el segmento conector interaccionan con el fragmento de adenina y con el hidroxilo de la ribosa respectivamente.

En Abl la hélice- α del subdominio N denominada αC contiene un residuo E286 que forma un puente salino con un residuo K271 estabilizando una orientación particular denominada αC -*in* (**Figura 6**).¹⁴ Esta interacción es muy conservada en otras cinasas como Src y cinasas dependientes de ciclina (Cdk), en donde la hélice- αC adopta dos conformaciones distintas dependiendo del estado activo o inactivo de la cinasa, αC -*in* y αC -*out* respectivamente.¹⁷ En el caso de Abl, varias estructuras cristalográficas han mostrado que la conformación de la hélice- αC es de tipo αC -*in* tanto en su estado activo como inactivo. Sin embargo, Levinson y colaboradores lograron captar una estructura en donde la hélice- αC de Abl adquiere una conformación similar a Src/Cdk denominada Src/Cdk-*like* (αC -*out*). La conformación αC -*out* en Abl resulta de la ruptura de la interacción glutamato-lisina de tal forma que la hélice- αC gira 31° hacia afuera del sitio activo con respecto a la conformación αC -*in* y rota 34° sobre su propio eje situando al glutamato hacia el exterior del sitio activo, esta conformación es estabilizada por nuevos pares iónicos K271 con D381 y E286 con R386 (**Figura 7**). Se ha sugerido que el significado biológico de esta conformación intermedia de la hélice- αC (αC -*out*) de Abl es facilitar la interconversión dinámica entre sus estados activo e inactivo así como permitir el acceso adecuado del complejo cosustrato MgATP,¹⁶ aunque aún existen informes buscando esclarecer su(s) implicación(es) adicional(es) en el funcionamiento de Abl.^{18,19}

En la **figura 8** se muestra la sobreposición de las conformaciones αC -*in* y αC -*out* en donde se muestra el gran cambio conformacional en la hélice- αC , en las hebras- $\beta 1$ y - $\beta 2$ y el *P-loop* mientras que el resto del subdomino N permanece prácticamente idéntico. Cabe mencionar que el residuo K271 es altamente conservado en proteínas cinasas y es esencial para la unión de los fosfatos- α y - β del MgATP (**Figura 9**).³

Figura 6. Estructura cristalográfica donde se muestra la conformación $\alpha C-in$ del dominio cinasa de Abl (PDB 1OPJ). En azul claro se muestra el subdominio N. La hélice $\alpha C-in$ (verde) es estabilizada por un puente salino entre E286 y K271. En amarillo se muestra el $P-loop$ que conecta a las hebras- $\beta 1$ y $-\beta 2$. En color azul oscuro se muestra al subdominio C. Los residuos que interaccionan se muestran de forma explícita en color naranja.

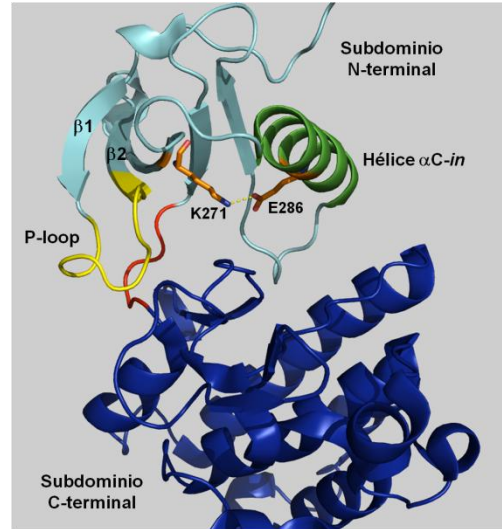


Figura 7. Estructura cristalográfica donde se muestra la conformación $\alpha C-out$ del dominio cinasa de Abl (PDB 2G1T). La hélice $\alpha C-out$ es estabilizada por un nuevo puente salino entre E286 y R386. El residuo altamente conservado K271 voltea hacia el sitio activo contactando con un puente salino al residuo D381 del subdominio C. El código de colores es el mismo que en la figura 6.

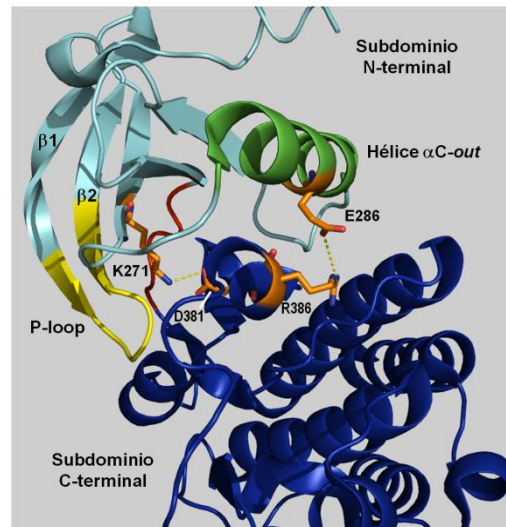
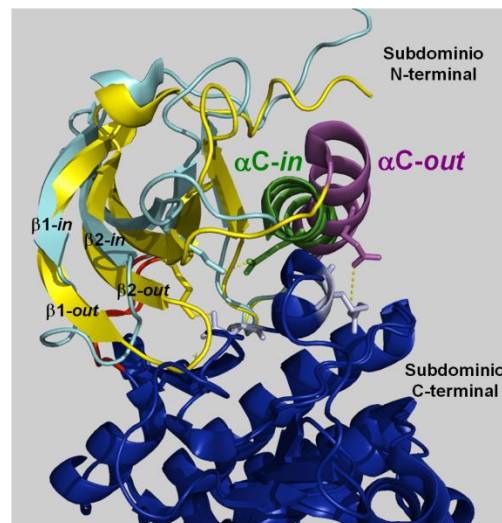


Figura 8. Sobreposición de las estructura cristalográfica en conformaciones $\alpha C-in$ (PDB 1OPJ) y $\alpha C-out$ (PDB 2G1T) de Abl. En azul claro se muestra el subdominio N de la conformación $\alpha C-in$ y en amarillo se muestra el subdominio N de la conformación $\alpha C-out$. En la conformación $\alpha C-out$ las hebras- $\beta 1$ y $-\beta 2$ se alargan mientras que el $P-loop$ se acorta con respecto a la conformación $\alpha C-in$.



El subdominio C contiene un lazo o *loop* de activación (en este escrito se referirá como *loop* de activación) y es un elemento estructural altamente conservado entre proteínas cinasas y clave en su funcionamiento. El *loop* de activación inicia con un motivo DFG (residuos 381, 382 y 383) y termina con una secuencia APE (residuos 407, 408 y 409). El *loop* de activación puede oscilar entre dos conformaciones una activa y otra inactiva denominadas DFG-*in* y DFG-*out* respectivamente, en donde el motivo DFG se encuentra orientado de distintas maneras. En la conformación DFG-*in* el *loop* de activación adquiere una forma extendida sirviendo de plataforma para el adecuado acceso del péptido sustrato, en esta conformación el residuo D381 del motivo DFG es posicionado de tal forma que coordina correctamente el ion Mg(II) del complejo cosustrato MgATP (**Figura 9**). En el complejo MgATP el metal se encuentra coordinado por los grupos fosfatos del ATP. Un residuo de tirosina en el *loop* de activación al ser fosforilado (Y393- Φ) estabiliza esta conformación DFG-*in* por interacciones con el residuo R386 del mismo *loop* manteniendo a la proteína catalíticamente activa (**Figura 10**).^{3,14}

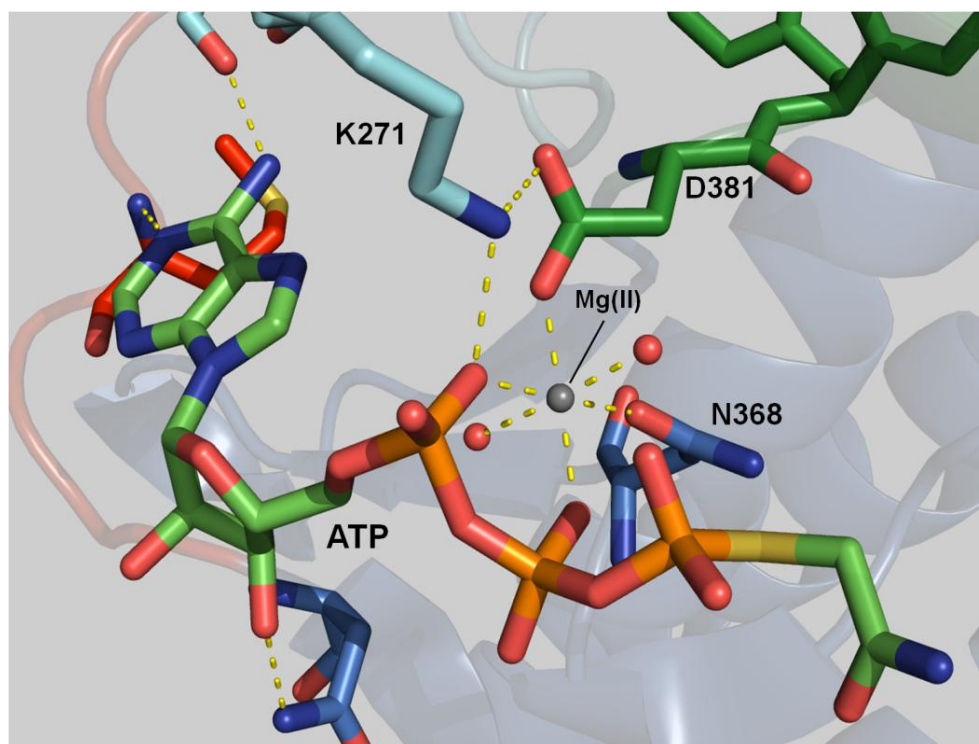


Figura 9. Residuos que participan en la interacción del ion Mg(II) del complejo Abl-MgATP de acuerdo a la estructura cristalográfica PDB 2G1T. El residuo D381 del motivo DFG-*in* está orientado permitiendo la correcta coordinación del Mg(II). Además de los residuos D381 y N368, en la coordinación del ion Mg(II) también participan dos moléculas de agua (esferas rojas) y los fosfatos- α y - β del nucleótido. El residuo K271 altamente conservado es esencial para la coordinación del fosfato- α del MgATP.

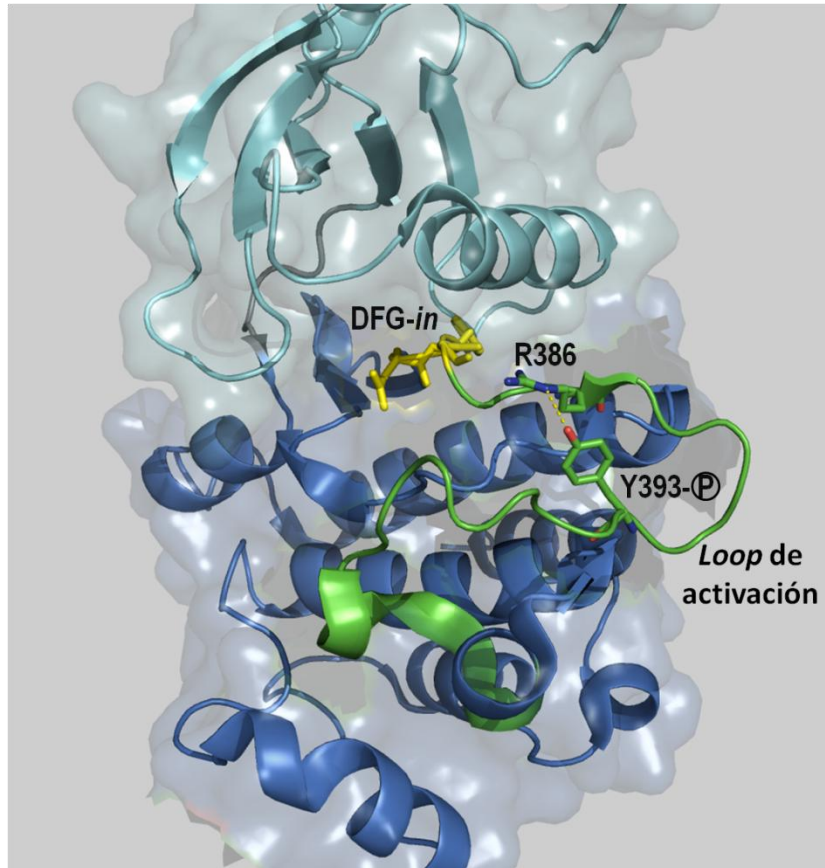


Figura 10. Dominio cinasa de Abl con el *loop* de activación en conformación DFG-*in* o activo (PDB 2GQG). Esta conformación se estabiliza por la interacción entre el residuo Y393-P con el residuo R386 dentro del mismo *loop* (verde).

En la conformación DFG-*out* el *loop* gira aproximadamente 180° con respecto a la conformación DFG-*in* y se encuentra compacto y plegado hacia el sitio activo mimetizando al péptido sustrato y bloqueando el sitio catalítico y la actividad cinasa, en esta conformación el residuo F382 se posiciona espacialmente en el lugar del residuo D381 de la conformación DFG-*in* evitando la coordinación del Mg(II) lo cual es crucial para la actividad catalítica. Esta conformación DFG-*out* es estabilizada por la interacción del residuo de tirosina no fosforilada Y393 con un residuo D363 del subdominio C (**Figura 11**).^{3,14}

Estas dos conformaciones se encuentran en equilibrio interconvirtiéndose dinámicamente (DFG-*in* \rightleftharpoons DFG-*out*), a este gran cambio conformacional se le denomina DFG *flip* (**Figura 12**).^{14,19}

Figura 11. Dominio cinasa con el *loop* de activación en conformación DFG-*out* o inactivo (PDB 1IEP). Esta conformación se estabiliza por la interacción entre el residuo Y393 del *loop* (rojo) con el residuo D363 dentro del subdominio C (azul marino).

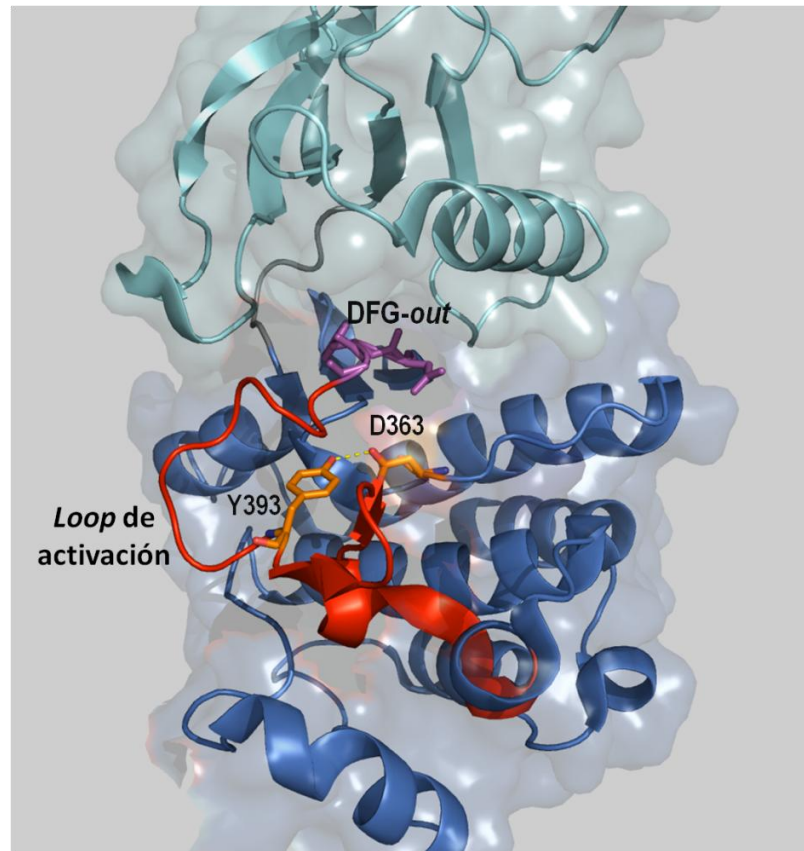
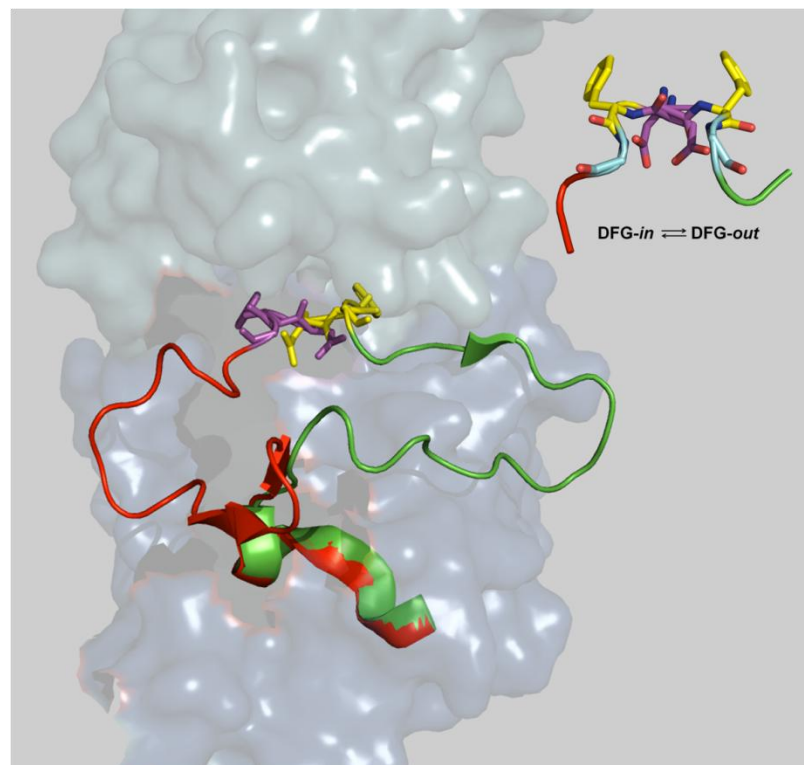


Figura 12. Conformaciones del *loop* de activación de las formas activa e inactiva (DFG-*in* y DFG-*out*) de Abl elaborado a partir de la sobreposición de los PDB 1IEP y 2GQG. En el inserto se muestra el equilibrio DFG-*in* \leftrightarrow DFG-*out* (DFG *flip*). Los residuos se muestran con el código de colores D-morado, F-amarillo y G-azul claro.



1.4. Imatinib

En el caso de la LMC donde la actividad cinasa de Bcr-Abl se encuentra sobreactivada lo que es crucial para su actividad transformante y la progresión de la enfermedad, se han desarrollado fármacos selectivos hacia el sitio de unión a ATP para inhibir su actividad cinasa e impedir la cascada de señalización que da origen y permite el mantenimiento de la enfermedad (Figura 13).

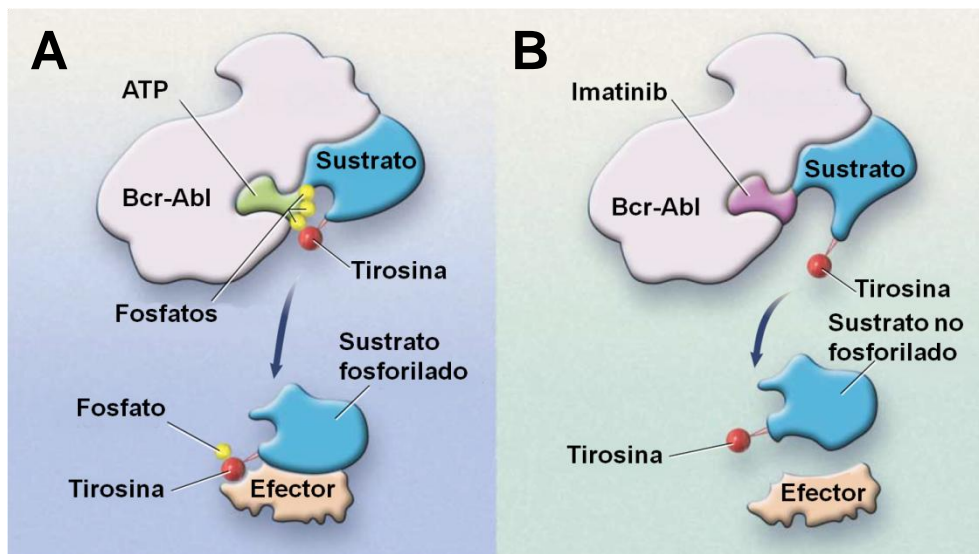


Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de Imatinib. **A)** En LMC la oncoproteína Bcr-Abl fosforila a un sustrato específico para que pueda interactuar con sus proteínas efectoras río abajo desencadenando la enfermedad. **B)** El Imatinib se une competitivamente al sitio de unión de ATP en Bcr-Abl lo que impide la fosforilación del sustrato el cual no puede interactuar con sus moléculas efectoras (adaptado de Goldman & Melo²⁰).

En este contexto el Imatinib (4-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida) (Figura 14), es uno de los primeros fármacos inhibidores de proteínas tirosina cinasa desarrollado para la terapia del cáncer, el cual es altamente eficaz inhibiendo varias cinasas como Abl, Kit y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGFR (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*). Su desarrollo partió en la búsqueda de inhibidores de la proteína cinasa C PKC (del inglés *Protein Kinase-C*) la cual es de la familia de las serin/treonin cinasas, encontrando que la estructura química más sencilla con actividad inhibitoria sobre PKC era el fragmento de fenilaminopirimidina (Figura 14, anillos B y C). Una de las ventajas del grupo

fenilaminopirimidinoilo es que puede ser sometido a transformaciones químicas relativamente sencillas para originar una gran diversidad de compuestos con mayor selectividad y/o actividad. La primera modificación realizada fue agregar el anillo de piridina (**Figura 14, anillo A**) en la posición 3' de la pirimidina, cuya consecuencia fue el incremento de su actividad celular en contra de PKC. La segunda modificación fue agregar el grupo amida en el fenilo (**Figura 14, anillo C**) el cual incrementaba su actividad inhibitoria sobre las proteínas tirosina cinasas. Durante esta etapa se observó en base a estudios estructura-actividad, que la introducción de un grupo metilo en la posición 6 del anillo diaminofenílico abatía por completo la actividad inhibitoria sobre PKC mientras que mantenía o incrementaba su actividad inhibitoria sobre tirosina cinasas. Finalmente la introducción del grupo *N*-bencil-*N*-metilpiperazina (**Figura 14, anillos D y E**) mejoró sus propiedades farmacocinéticas en términos de solubilidad y biodisponibilidad oral, resultando en el compuesto denominado Imatinib, también conocido como Gleevec, Glivec o STI571, aprobado por la FDA en el 2001 para el tratamiento de la LMC y actualmente comercializado por Novartis.²¹

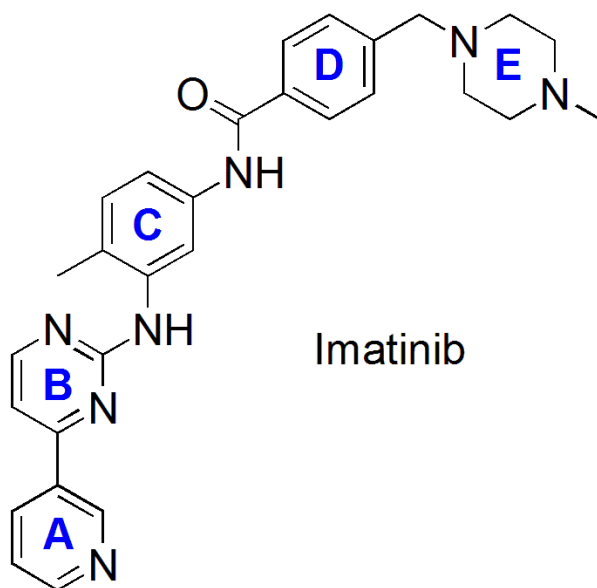


Figura 14. Estructura química del Imatinib, identificando los anillos característicos de los inhibidores tirosina cinasa.

1.5. Bases estructurales de la unión de Imatinib al dominio cinasa de Abl

El Imatinib se acopla atravesando la interfase entre los subdominios N y C del dominio cinasa uniéndose los anillos piridina y pirimidina cerca del segmento conector de ambos subdominios donde se une normalmente la adenina del nucleótido, el resto de compuesto se acopla en la cavidad hidrofóbica de la cinasa entre la hélice $\alpha C-out$ y el *loop* de activación. Es de gran importancia mencionar que el Imatinib se une únicamente en la conformación *DFG-out* (**Figura 15**).²²

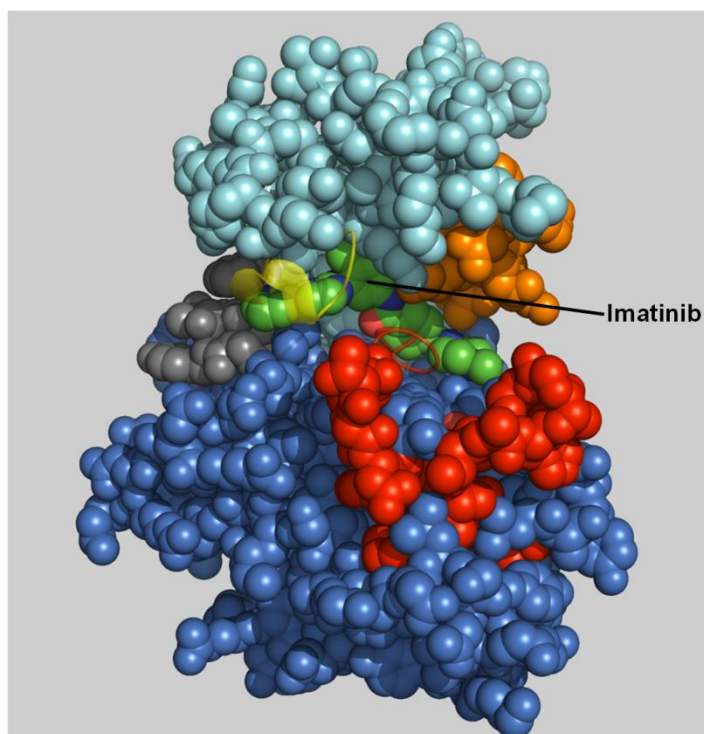


Figura 15. Estructura cristalográfica en modelo de esferas del complejo Abl-Imatinib (PDB 1IEP). El inhibidor Imatinib (verde) se une atravesando prácticamente toda la interfase hidrofóbica del dominio cinasa.

En la unión de Imatinib participan 22 interacciones que estabilizan el complejo Abl-Imatinib. Un total de seis puentes de hidrógeno son formados entre los residuos E286, T315, M318, I360, H361 y D381 con los átomos N21, N13, N3, N51, N51 y O29 de Imatinib respectivamente (**Figura 16**). El resto de las interacciones son dados por fuerzas de Van der Waals de tipo hidrofóbicas (**Figura 17**).²²

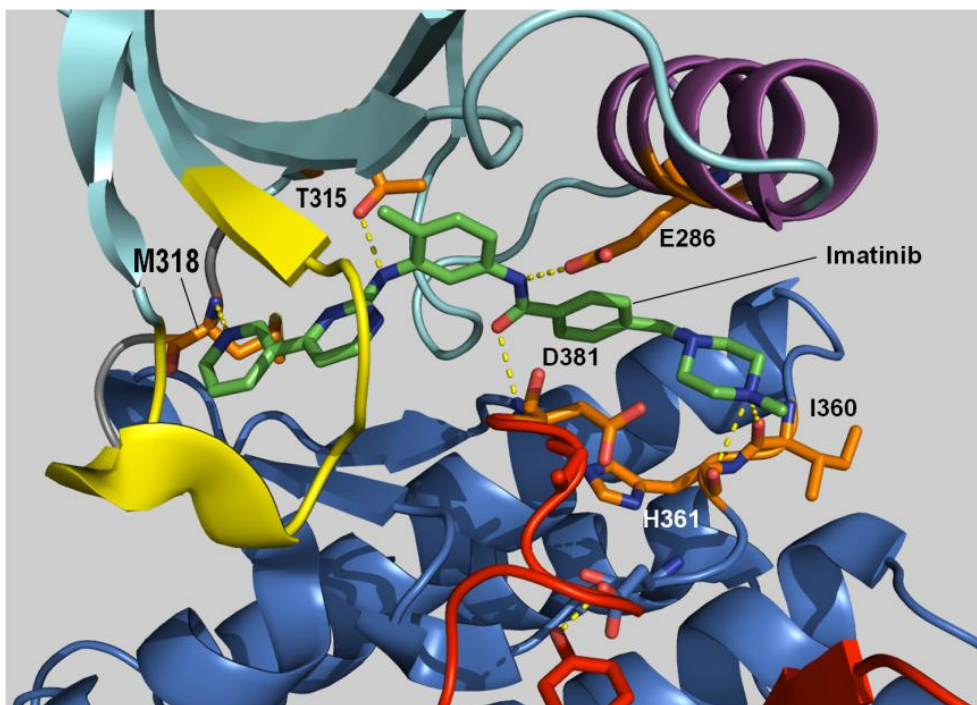


Figura 16. Residuos de la interfase del dominio cinasa que estabilizan el complejo Abl-Imatinib mediante puentes de hidrógeno (PDB 1IEP).

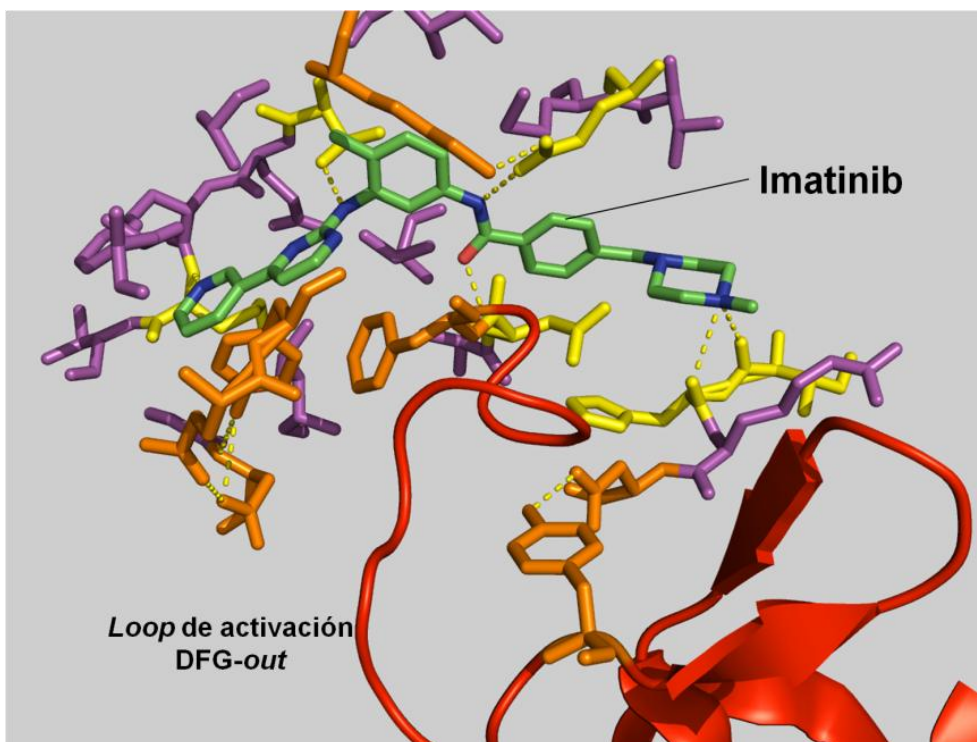


Figura 17. Red de interacciones que participan en la unión y estabilización del complejo Abl-Imatinib. En amarillo se muestran los residuos que forman interacciones directas con Imatinib, en morado los residuos que interaccionan mediante fuerzas de Van der Waals de tipo hidrofóbicas y en naranja los residuos que interaccionan entre sí estabilizando el complejo. PDB 1IEP.

El *P-loop* se encuentra plegado en dirección al subdominio C de tal forma que se crea un espacio libre de moléculas de agua que permite la correcta interacción con el fármaco. Las interacciones del *P-loop* que estabilizan al complejo Abl-Imatinib involucran al residuo Y253 que forma un puente de hidrógeno con el residuo N322 del subdominio C e interactúa hidrofólicamente con el anillo aromático del residuo F382 del motivo DFG mediante una interacción aromático-aromático en conformación T, el residuo Q252 también contacta al residuo N322 mediante un puente de hidrógeno (**Figura 18**).²³

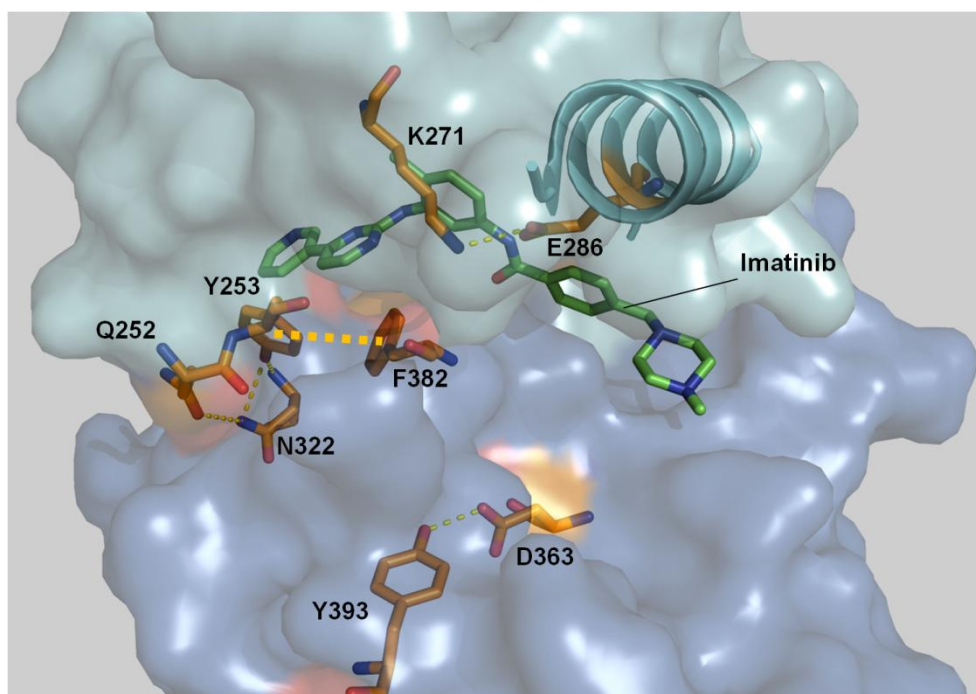
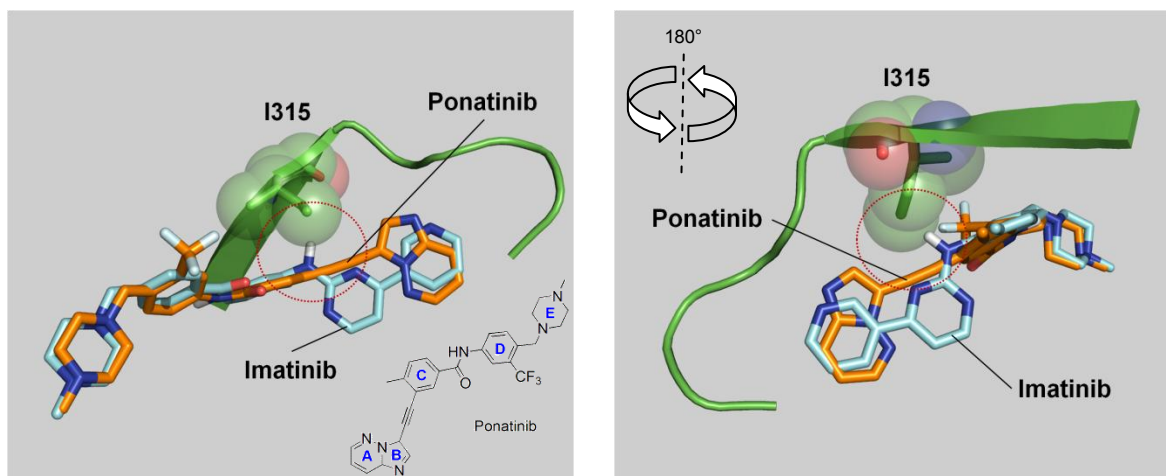


Figura 18. Interacciones de los residuos del *P-loop* que estabilizan el complejo Abl-Imatinib (PDB 1IEP). Los residuos Q252 y Y253 del *P-loop* interactúan con el residuo N322 del subdominio C mediante puentes de hidrógeno. El residuo Y253 interactúa hidrofólicamente en conformación T con el residuo F382 del motivo DFG.

1.6. Resistencia a Imatinib

Si bien el Imatinib ha resultado un agente eficaz en el tratamiento de LMC, una población importante de pacientes terminan por desarrollar resistencia al fármaco y por consiguiente una recaída clínica. Molecularmente, se han identificado varios mecanismos de resistencia a Imatinib como sobreexpresión génica de Bcr-Abl, incremento en la expulsión del fármaco por las células blanco, captación extracelular de moléculas del fármaco, sobreexpresión de tirosina cinasas de la familia Src, independencia oncogénica de células troncales leucémicas, mutaciones puntuales en el dominio cinasa de Bcr-Abl, entre otros.^{24,25} De todos los anteriores el más frecuente es la presencia de mutaciones puntuales que ocurre en alrededor del 75 % de los pacientes con resistencia a Imatinib.²⁶ Estas mutaciones en su mayoría mapean el sitio de unión a Imatinib por lo que impiden la correcta interacción proteína-fármaco. Cabe mencionar que son al menos 30 mutaciones puntuales que han sido identificadas.²⁷ Lo anterior ha motivado el desarrollo de inhibidores de segunda generación como Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib, Ponatinib, entre otros.²⁸ A pesar del desarrollo de nuevos inhibidores basados en la relación estructural Abl-Inhibidor, ninguno de ellos es capaz de inhibir eficazmente a la mutante T315I con excepción del Ponatinib. En esta mutación la sola sustitución de un residuo de treonina ubicada en el subdominio N por un residuo de isoleucina ocasiona la pérdida de un puente de hidrógeno esencial para la unión del Imatinib, además esta sustitución crea un impedimento estérico que impide el acoplamiento correcto del Imatinib (Figura 19).^{29,30}



1.7. Termodinámica de la interacción proteína-ligando

Existe una gran cantidad de información estructural recabada hasta la fecha sobre Abl y sus inhibidores, estas estructuras cristalográficas (más de 30) han constituido la plataforma sobre la cual se han desarrollado nuevos fármacos inhibidores constituyendo un diseño de fármacos estructuralmente dirigidos.^{16,31}

Sin embargo, no solo el factor estructural gobierna la interacción proteína-fármaco. Canónicamente existen dos factores que gobiernan una interacción biomolecular el factor estructural que depende de la complementariedad de la proteína con su ligando y el factor energético asociado a la interacción que dicta la fuerza y la estabilidad del complejo. En este sentido la definición formal de estabilidad la provee la termodinámica mediante la función de estado energía libre (ΔG). A la fecha el proceso de unión a nivel energético de la cinasa Abl no ha sido descrita para ningún fármaco inhibidor inclusive ni a nucleótidos de adenina (MgADP y MgATP), lo que nos deja sin comprender una parte fundamental del sistema Abl-fármaco/nucleótido. Es claro que la correlación de la información estructural combinada con la información de la energética involucrada en el proceso de unión nos permitirá conocer a detalle las bases moleculares de las interacciones involucradas en este sistema. El objetivo de conocer la termodinámica de un proceso de unión no está solo enfocado a incrementar el conocimiento sobre los factores subyacentes que contribuyen a la relación estructura-estabilidad-función proteica, triada central en la lógica molecular de la vida, a su vez permitirá la construcción de un marco lo suficientemente cuantitativo que nos permita el desarrollo de modelos energético-estructurales útiles en el diseño racional de fármacos e ingeniería de proteínas.^{32,33,34,35,36,37}

En nuestro grupo de trabajo sostenemos que el conjunto de los parámetros estructurales, termodinámicos y aplicando herramientas de dinámica molecular nos permitirá llegar a un diseño energético-estructural de nuevos fármacos cada vez más eficaces y selectivos. Esto es particularmente importante ya que existen más de 25 tirosina cinasas involucradas en el desarrollo de más de 35 tipos de cáncer tanto hematológicos como sólidos.^{9,13,38,39,40,}

El marco cuantitativo que permite develar las bases energéticas de un proceso de unión biomolecular puede ser descrito en términos de los parámetros termodinámicos de cambio de energía libre ΔG_a , cambio de entalpia ΔH_a , cambio de entropía ΔS_a y cambio en la capacidad calorífica ΔC_p .⁴¹

En la formación de un complejo Proteína-Fármaco (PF), la constante de asociación K_a es dada por la energía que une a un complejo (ecs. 1 y 2).



$$K_a = 1/K_d = [PF]/[P][F] \quad (\text{ec. 2})$$

Termodinámicamente, la estabilidad de un complejo proteico está dada por la diferencia en energía libre de Gibbs (ΔG_a) del complejo y de las moléculas libres, por lo que, la distribución de las especies en el equilibrio depende directamente de esta función de estado:⁴¹

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a \quad (\text{ec. 3})$$

donde R es la constante de los gases ($R=1.98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T es la temperatura en Kelvin.

Si bien el valor de K_a determina que tantas moléculas libres y en complejo coexisten en el equilibrio, es importante reconocer que la dependencia del proceso de unión a las interacciones moleculares dentro de la proteína, entre proteína-solvente y proteína-fármaco, hacen necesaria una caracterización energética, para poder entender las fuerzas moleculares que actúan en las interacciones afectadas durante la unión.⁴²

El valor de ΔG_a da la condición de equilibrio y determina la espontaneidad del proceso de unión y aporta información sobre la magnitud de la fuerza con que se une un complejo. En un proceso que se lleva a cabo a T constante, el ΔG_a está dado por la expresión:

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad (\text{ec. 4})$$

Por tanto, para obtener una caracterización energética completa, es necesaria la disección del ΔG_a en sus componentes de entalpía (ΔH_a) y entropía (ΔS_a) y poder establecer el parámetro termodinámico que dirige la reacción de unión.

En las reacciones de asociación biomolecular que se llevan a cabo en un medio acuoso, el ΔH_a es aproximadamente igual al cambio en la energía interna de los solutos y del solvente. Debido a la alta complementariedad estereoquímica, las interacciones electrostáticas (ΔH_{elec}) y contactos de Van der Waals (ΔH_{vdW}) que se establecen entre las moléculas interactuantes genera una contribución entálpica favorable, también denominado como ΔH intrínseco (ΔH_{int}). En

cambio, la solvatación de grupos polares y no polares (ΔH_{solv}) es un proceso entálpicamente desfavorable (ec. 5).⁴³

$$\Delta H_a = \Delta H_{intrínseco} + \Delta H_{solvatación} \quad (\text{ec. 5})$$

La entropía está relacionada con la pérdida o ganancia de grados de libertad. Los grados de libertad son las trayectorias necesarias para describir un sistema termodinámico. Las principales contribuciones a la entropía de asociación (ec. 6) son la entropía de solvatación (ΔS_{solv}), la entropía conformacional (ΔS_{conf}) y la entropía roto-traslacional ($\Delta S_{roto-tras}$). El primero de ellos es favorable para la unión, y se origina de la liberación de las moléculas de agua al existir una desolvatación parcial o completa del sitio de unión y el ligando. Este efecto es la fuerza predominante en la asociación de grupos hidrofóbicos simples. El ΔS_{conf} casi siempre es desfavorable, ya que el proceso de unión por lo general involucra la rigidificación de enlaces rotables de la proteína y el ligando. El $\Delta S_{roto-tras}$ está asociado a la reducción del número de partículas en el medio debido a la unión, por lo que es una contribución siempre desfavorable y aproximadamente de la misma magnitud independientemente del tipo de complejo formado.⁴³

$$\Delta S_a = \Delta S_{conf} + \Delta S_{solv} + \Delta S_{roto-tras} \quad (\text{ec. 6})$$

De acuerdo a la ecuación 4, la asociación entre dos moléculas puede ser favorecida por contribuciones negativas de ΔH (entálpicamente dirigida) y/o positivas de ΔS (entrópicamente dirigida). Cuando los dos términos son favorables, pero uno de ellos es mucho más favorable que el otro, se dice que el parámetro que dirige la reacción es el que posee el valor más alto. El cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) es otra propiedad clave en la caracterización termodinámica de la asociación molecular, al ser un importante sensor de los rearrreglos del solvente inducidos por cambios en la exposición de los solutos, lo que nos habla sobre los cambios conformacionales que sufre la proteína como resultado de la asociación.⁴³

1.8. Principios de ITC

La herramienta más poderosa en la actualidad para determinar las propiedades energéticas de una reacción de asociación proteína-fármaco es la calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés *Isothermal Titration Calorimetry*).⁴⁴ Esta herramienta es capaz de determinar en un solo experimento los valores de constante de unión (K_a), estequiometría (n), ΔG_a , ΔH_a , ΔS_a . El ΔC_p puede ser determinado mediante la dependencia del ΔH_a con respecto a la temperatura, ya sea realizando mediciones independientes a diferentes temperaturas o en un solo experimento a través del método de calorimetría de titulación multitérmica.⁴¹

El calorímetro de titulación isotérmica está compuesto de dos celdas idénticas rodeadas por una cubierta adiabática. Un sensor detecta la diferencia de temperatura entre las celdas y a su vez entre las celdas y la cubierta. En el experimento, la muestra de proteína por lo general es colocada en la celda de muestra y la celda de referencia es llenada con solución amortiguadora o agua. En una jeringa acoplada se coloca el ligando. Antes de comenzar la titulación, una potencia constante es aplicada a la celda de referencia, esta señal activa el circuito de alimentación eléctrica localizado en la celda de muestra y representa la línea base. Experimentalmente, se observa directamente el calor aplicado para mantener la temperatura de las dos celdas igual (isotérmicamente) dependientes del tiempo. Durante la titulación, después de cada adición de pequeñas alícuotas de ligando, el calor absorbido o liberado en la celda de muestra es medido con respecto a la celda de referencia. Para una reacción exotérmica, la T de la celda de muestra se incrementará, y la potencia de alimentación será desactivada para mantener la T entre las dos celdas igual. Para una reacción endotérmica, la T de la celda de muestra disminuye, por lo que el instrumento incrementa el poder de alimentación.^{41,42}

Para cada inyección es posible obtener el calor asociado (Q) a la reacción integrando el área de la señal medida bajo cada pico, que es proporcional a la fracción de ligando unido (ecuación 7). El análisis de este calor en función de la concentración de los reactantes provee una caracterización termodinámica completa, determinándose la constante de asociación K_a , el cambio en la entalpía de asociación ΔH_a , y la estequiometría n en un solo experimento (**Figura 20**).^{41,42}

$$Q = [V_0 \Delta H_b [P]_t K_b] / [1 + K_b [L]] \quad (\text{ec. 7})$$

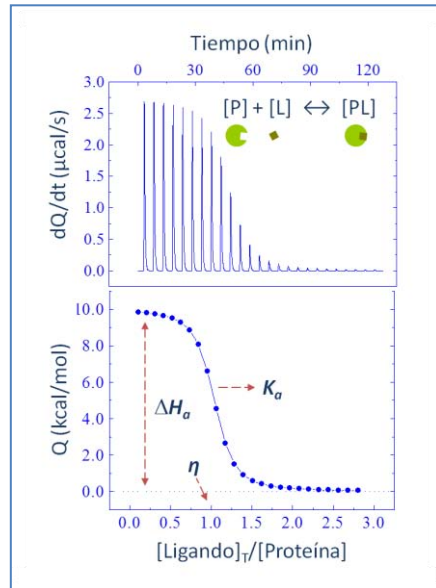


Figura 20. Experimento típico de ITC. En la parte superior se muestran los datos crudos obtenidos mediante la titulación de una proteína [P] con un ligando [L]. Al normalizar estos datos en función de la concentración se obtiene una isoterma de unión. El ajuste no lineal de un modelo de unión permite determinar directamente el valor de ΔH_a (que determina la altura de la isoterma), la estequiometría n (la cual ocurre en el punto de inflexión de la curva), y la K_a (que determina lo abrupto del cambio de pendiente instantánea de la curva).

El ΔG_a se calcula a partir de la K_a según la ecuación 3 y el valor de ΔS_a se calcula a partir de la ecuación 4. Adicionalmente, el análisis del ΔH_a a diferentes T nos permite calcular el valor de ΔC_p (ecuación 8).^{41,42}

$$\Delta C_p = \delta \Delta H / \delta T \quad (\text{ec. 8})$$

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LMC es una enfermedad mieloproliferativa que afecta a más de 1 millón de pacientes, esta enfermedad se desarrolla por la translocación que da origen al cromosoma filadelfia que tiene como producto transcripcional a la oncoproteína Bcr-Abl responsable de esta enfermedad. El Imatinib fue el primer fármaco desarrollado blanco dirigido a Bcr-Abl, sin embargo la generación de resistencia por mutaciones de la enzima elimina la eficacia clínica del Imatinib, esto ha motivado el desarrollo de nuevos fármacos inhibidores optimizados a partir de las propiedades estructurales de Abl y el Imatinib. Sin embargo estos fármacos aun no son eficaces contra todos los mecanismos de resistencia particularmente mutaciones puntuales en Bcr-Abl. Es necesario combinar las propiedades estructurales y energéticas de la interacción proteína-fármaco para permitir el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces y selectivos. A la fecha no existen estudios detallados sobre la energética de la interacción de Abl con Imatinib y en general con ningún inhibidor. A su vez tampoco se han descrito los cambios conformacionales que tienen lugar en Abl tras la unión de Imatinib. Es claro que esta información permitirá comprender las bases energético-estructurales de la interacción Abl-Imatinib y contribuir a generar un marco cuantitativo para el desarrollo racional de fármacos.

3. JUSTIFICACIÓN

Existe mucha información estructural recabada hasta la fecha sobre las propiedades estructurales de Abl y diversos fármacos inhibidores entre ellos el Imatinib. Esto nos ha permitido comprender en gran medida los factores subyacentes que contribuyen a la inhibición de la actividad cinasa de Bcr-Abl. Sin embargo aun no se han descrito las bases energéticas que rigen la asociación entre Imatinib y Abl, ni los cambios conformacionales que tienen lugar en Abl tras la unión de Imatinib. Esta información debe ser tomada en cuenta para el desarrollo racional de fármacos cada vez más eficaces y selectivos. Por lo que en este trabajo se plantea describir a detalle el mecanismo energético que gobierna la formación del complejo Abl-Imatinib mediante calorimetría de titulación isotérmica.

4. OBJETIVO GENERAL

-Caracterizar detalladamente los determinantes energéticos (ΔG_a , ΔS_a , ΔH_a y ΔC_p) de la interacción entre Imatinib y el dominio cinasa de Abl mediante calorimetría de titulación isotérmica para comprender las bases energético-estructurales de la asociación Abl-Imatinib.

4.1. Objetivos particulares

- Sobreexpresar el dominio tirosina cinasa de Abl recombinante en sistema de bacteria.
- Purificar el dominio cinasa de Abl mediante las técnicas de cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de intercambio aniónico
- Caracterizar a Abl mediante espectrometría de masas y dicroísmo circular para conocer el plegamiento y la estabilidad térmica.
- Determinar mediante calorimetría de titulación isotérmica los parámetros energéticos de interacción (K_a , ΔG_a , ΔS_a , ΔH_a y ΔC_p) a diferentes temperaturas.
- Analizar profundamente los parámetros energéticos determinados experimentalmente en el objetivo anterior.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Soluciones amortiguadoras y reactivos

Medio LB (Luria-Bertani)	Aforar en 1 L de agua destilada las siguientes cantidades de polvos: 10 g de Triptona. 10 g de NaCl. 5 g de extracto de levadura. 15 g de agar (solo para medio solido). Esterilizar en autoclave
Amortiguador de Lisis	50 mM TRIS HCl pH 8.0 150 mM de NaCl 5 % de Glicerol 5 mM de MgCl ₂ 30 mM de Imidazol 1 mM de PMSF (inhibidor de proteasas) Filtrar por 0.45 µm
Amortiguador A-Ni	50 mM TRIS HCl pH 8.0 150 mM de NaCl 5 % de Glicerol 5 mM de MgCl ₂ 30 mM de Imidazol Filtrar por 0.45 µm
Amortiguador B-Ni	50 mM TRIS HCl pH 8.0 150 mM de NaCl 5 % de Glicerol 5 mM de MgCl ₂ 500 mM de Imidazol Filtrar por 0.45 µm
Amortiguador A-Q	15 mM TRIS HCl pH 8.0 50 mM de NaCl 1.5 % de Glicerol 1.5 mM de MgCl ₂ Filtrar por 0.45 µm
Amortiguador B-Q	50 mM TRIS HCl pH 8.0 1 M de NaCl 5 % de Glicerol 5 mM de MgCl ₂ Filtrar por 0.45 µm
Amortiguador de Calorimetría	50 mM TRIS HCl pH 8.0 150 mM de NaCl

	5 % de Glicerol 5 mM de MgCl ₂ 0.5 mM de DTT Filtrar por 0.45 µm
Amortiguador de tanque 10X	250 mM TRIS base 200 mM de Glicina 1% SDS
Amortiguador de carga 4X	200 mM TRIS HCl pH 8.0 400 mM de DTT 40% de Glicerol 8% de SDS 0.4% de Azul de bromofenol
Antibióticos (Estreptomomicina y Kanamicina)	Se preparó la solución patrón de cada antibiótico pesando 2.5 g de polvo y aforando a 100 mL y cada solución fue filtrada en esterilidad mediante una membrana de 0.22 µm.
IPTG	Se preparó la solución patrón 1 M de IPTG disolviéndolo en agua destilada y filtrándolo en ambiente de esterilidad mediante una membrana de 0.22 µm.

5.2. Vectores de expresión pET28a-TKD-Abl y pCDFDuet-1-YopH

Los vectores de expresión pET28a-TKD-Abl y pCDFDuet-1-YopH codifican para el dominio cinasa de la proteína Abl y una fosfatasa respectivamente, fueron proporcionados por el Dr. John Kuriyan de la Universidad de California en Berkeley, EU. Como marcadores de selección el pET28a-TKD-Abl tiene la resistencia a kanamicina y el pCDFDuet-1-YopH la resistencia a estreptomomicina. Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®, US) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La secuenciación fue realizada por la empresa Laragen, Inc (California, US) por el método de Sanger.

5.3. Transformación de bacterias

La cepa de *Escherichia coli* DH5α fue utilizada para replicar y purificar los vectores de expresión mientras que la cepa BL21(DE3) de la misma bacteria fue cotransformada con ambos vectores para la sobreexpresión del dominio cinasa de Abl recombinante. La cepa DH5α es ampliamente utilizada en tecnología de DNA recombinante y sirve para multiplicación de

vectores o plásmidos con alta eficiencia, tiene dos mutaciones importantes, la mutación *endA1* que elimina la actividad de una endonucleasa intracelular que degrada el DNA plasmídico en los pasos de purificación y la mutación *hsdR17* que elimina la actividad endonucleasa de *EcoKI* (www.mclab.com/Dh5-Alpha-Competent-E.-Coli.html). La cepa BL21(DE3) que contiene el lisógeno DE3 es utilizada para la expresión de proteínas recombinantes en alta cantidad, es deficiente en las proteasas Lon y OmpT (www.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli). Las cepas BL21(DE3) y DH5 α fueron creadas químicamente competentes por la Dra. Patricia Cano del Instituto de Química, UNAM. La transformación fue realizada por el método de choque térmico.⁴⁵ Brevemente, alícuotas de 50 μ L de células competentes almacenadas a -70 °C fueron descongeladas en hielo por 5 min, se adicionó 1 μ L de DNA plasmídico (\approx 50 ng) y se incubaron en un baño de hielo por 30 min. Al cabo de este tiempo fueron incubadas a 42 °C por 45 s en un equipo *thermoblock* (Accublock digital dry bath, Labnet, US) y enterradas en hielo por 2 min (choque térmico), a continuación se adicionaron 200 μ L de medio LB y se dejaron recuperar por 1 h a 37 °C. Finalmente las células fueron plaqueadas en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C hasta el desarrollo visible de colonias transformantes (\approx 18 h).

5.4. Sobreexpresión del dominio cinasa Abl

Un preinóculo preparado a partir de una colonia de células cotransformantes BL21(DE3) resuspendida en 30 mL de medio LB suplementado con kanamicina (25 μ g/mL) y estreptomycinina (25 μ g/mL) (medio LB+KS) se incubó a 37 °C/200 rpm alrededor de 6 h. A continuación el preinóculo fue repartido en cuatro matraces de 2 L de capacidad conteniendo 1.5 L de medio LB+KS cada uno. Estos cultivos fueron crecidos a 37 °C/250 rpm alrededor de 6-8 h hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 1.0 ($OD_{600}\approx$ 1). Al cabo de este tiempo fueron incubados a 18 °C durante 1 h bajo las mismas condiciones de agitación. A continuación, los cultivos fueron inducidos con 1 mM de IPTG y se incubaron a 18 °C durante 18 h (sobreexpresión). Al término de las 18 h, las células fueron colectadas por centrifugación, repartidas en cuatro tubos Falcon® de 50 mL con la misma cantidad de paquete celular y almacenadas en el congelador de un refrigerador común para su posterior uso o lisadas para la purificación inmediata.

5.5 Purificación del dominio cinasa de Abl

La purificación del dominio cinasa de Abl procedió de acuerdo al método reportado por Seelinger y col. con pequeñas modificaciones.⁴⁶ Los paquetes celulares obtenidos de la sobreexpresión fueron resuspendidos en 25 mL de amortiguador de lisis. Las células fueron lisadas mediante sonicación en un equipo Sonicator 3000 (Misonix, Inc, US) con una potencia de 5.5 watts y ciclos de 10 s en encendido y 60 s en apagado hasta acumular un total de 5 min de encendido. El lisado fue aclarado por centrifugación a 14000 rpm durante 20 min para separar el detrito celular de nuestro extracto crudo (sobrenadante). El extracto crudo fue filtrado por una membrana de 0.45 μm y aplicado a una columna de afinidad a níquel HisTrap FF (GE Healthcare) de 5 mL siguiendo el siguiente protocolo:

- i. 3 vol. de agua Milli-Q
- ii. 4 vol. de amortiguador A-Ni (para equilibrar la columna)
- iii. Extracto crudo (se colectó la fracción No Retenido)
- iv. 4 vol. de amortiguador A-Ni (se colectó la fracción Lavado del No Retenido)
- v. 5 vol. de amortiguador B-Ni (se colectó la fracción Elución-Ni)
- vi. 4 vol. de amortiguador B-Ni (para lavar la columna)
- vii. 3 vol. de agua desionizada (para eliminar el último amortiguador aplicado)
- viii. 2 vol. de EtOH al 20 % (para almacenar y evitar el crecimiento de bacterias)

La fracción Elución-Ni se diluyó 3 veces con agua desionizada y fue aplicada a una columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF (GE Healthcare) de 5 mL siguiendo el siguiente protocolo:

- i. 3 vol. de agua desionizada
- ii. 4 vol. de amortiguador A-Q (para equilibrar la columna)
- iii. Elución-Ni (se colectó la fracción No Retenido-Q)
- iv. 4 vol. de amortiguador A-Q (se colectó la fracción Lavado del No Retenido-Q)
- v. 5 vol. de amortiguador B-Q (se colectó la fracción Elución-Q)
- vi. 4 vol. de amortiguador B-Q (para lavar la columna)
- vii. 3 vol. de agua desionizada (para eliminar el último amortiguador aplicado)
- viii. 2 vol. de EtOH al 20 % (para almacenar y evitar el crecimiento de bacterias)

Todas las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes.

5.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación de Abl fueron analizadas empleando un gel de poliacrilamida al 10 % con una fracción concentradora al inicio del gel que contenía una concentración de poliacrilamida del 4 %. El marcador de peso molecular empleado fue BLUEstain 2 Protein ladder (Gold Bio, US). Las muestras fueron preparadas mezclando 20 μ l de cada fracción colectada con 20 μ l de amortiguador de carga y calentadas en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Una vez aplicadas las muestras la migración electroforética procedió a 150 V con la cámara de electroforesis sumergida en un baño de hielo hasta que el indicador de bromofenol llegara aproximadamente 1 cm antes del final del gel (\approx 40-50 min).

Posteriormente el gel fue fijado con una solución que contenía 10 % de ácido acético glacial, 50 % de MeOH y 40 % de agua destilada durante 15 min y teñido con una solución de azul de Comassie al 0.1 %. Una vez teñido se lavó con agua hasta eliminar el colorante en exceso.

5.7. Cuantificación y preparación de las muestras

La fracción Elución-Q se dializó en una membrana de corte de 12-14 kDa/25 mm (Spectra/Por[®] 2 Dry Standard RC Dialysis Tubing, Spectra Labs, US) contra amortiguador de calorimetría a 4 °C por alrededor de 18 h. La proteína dializada se filtró por una membrana de 0.45 μ m y el filtrado fue diafiltrado y concentrado en tubos centricones con membrana de 10 kDa de corte de peso molecular (Amicon[®] Ultra 15 mL Centrifugal Filters Merck Millipore, US) mediante centrifugación a 4500 rpm y periodos de 10-15 min por tres ocasiones intercambiando con amortiguador de calorimetría. Las concentraciones utilizadas fueron del rango de 10-30 μ M de proteína recombinante.

La cuantificación se realizó por lectura de la absorbancia a 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, US) empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. El cálculo se realizó utilizando un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{280} = 65320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

calculado mediante el servidor Expasy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) asumiendo que todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos. La muestra a cuantificar se preparó diluyendo la proteína 1:5 con amortiguador de calorimetría y obteniendo la lectura directamente del equipo el cual descuenta de forma automática el blanco, ya que cuenta con un espacio para el blanco y otro para la muestra. La fórmula utilizada para el cálculo de la concentración de la proteína [P] a partir de la A_{280} y tomando en cuenta el factor de dilución fue

$$[P] = A_{280}/\epsilon_{280} \quad (\text{ec. 9})$$

5.8. Espectrometría de masas

El espectro de masas fue obtenido en el sistema MALDI-TOF (del inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) en un instrumento MALDI-TOF (Microflex Bruker Daltonics) a cargo de la Q. Eréndira García Ríos del Instituto de Química, UNAM. La muestra se preparó diluyendo 1:20 la proteína purificada (sección 5.7) con agua desionizada y se suspendió en una matriz de ácido sinapínico para tomar la lectura.

5.9. Dicroísmo circular (DC)

Los espectros de DC se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco-J700 (Jasco Inc, Easton, MD, US) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier a 20 °C y empleando una celda de cuarzo de 1 mm de paso de luz. Las mediciones fueron realizadas a una velocidad de barrido de 20 nm/min con una resolución de 1 nm en el intervalo de 250 a 190 nm (región del UV lejano). El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales.

Para la obtención de los perfiles de desplegamiento térmico se realizaron barridos de temperatura en un intervalo de 20-90 °C a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min monitoreando el cambio de elipticidad a 208 nm (longitud de onda constante) con una resolución de 1 °C. El perfil de replegamiento térmico se realizó bajo el mismo esquema anterior con una velocidad de enfriamiento de 5 °C/min.

La muestra proteica para estos ensayos fue preparada diluyendo la proteína purificada (sección 5.7) con agua desionizada ajustando a una concentración final de 0.03 mg/mL apropiada para los experimentos.

Para procesar los datos se transformó el valor de elipticidad observada a elipticidad molar ($\text{grado cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) utilizando la formula:

$$\theta \text{ Molar} = \frac{\text{obs} * \text{MW}}{[\text{P}] * d} \quad (\text{ec. 10})$$

Donde *Molar* es la elipticidad molar, *obs* es la elipticidad observada en miligrados (mdeg), MW es el peso molecular promedio de los aminoácidos, [P] es la concentración de proteína en mg/cm^3 y *d* es el paso óptico en cm.

5.10. Calorimetría de titulación isotérmica

Las mediciones calorimétricas fueron obtenidas en un microcalorímetro MicroCal ITC200 (GE Healthcare, US). Para los experimentos de unión se utilizaron concentraciones de Abl de 10-20 μM (sección 5.7) en la celda y la concentración de Imatinib y MgATP en la jeringa fueron 150-200 μM y 3 mM respectivamente. El Imatinib fue preparado a partir de una solución madre de 2.86 mM en agua desionizada. El MgATP fue preparado a partir de una solución madre 10 mM de ATP en amortiguador de calorimetría. El pH de los ligandos fue ajustado al mismo valor de pH de la proteína empleando NaOH 1 M. El esquema de titulación fue de 18 inyecciones consecutivas de 2 μL de ligando con intervalos de 2 a 5 min entre inyecciones a agitación constante de 750 rpm. El calor de dilución del ligando fue obtenido por adición del ligando a una solución del amortiguador de calorimetría bajo el esquema anterior. Todas las muestras fueron degasadas mediante alto vacío durante 20 min antes de cada experimento. Los datos fueron analizados y ajustados a un modelo de un sitio de unión empleando el software Origin 7.0.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis de la construcción pET28a-TKD-Abl

El vector de expresión pET28a-TKD-Abl (**Figura 21A**) codifica para los residuos 229-512 que constituyen el dominio cinasa de Abl humana, la numeración de aminoácidos de este trabajo se basa en la isoforma 1a que carece de los primeros 19 residuos del extremo N-terminal de la isoforma 1b (**Figura 21B**).

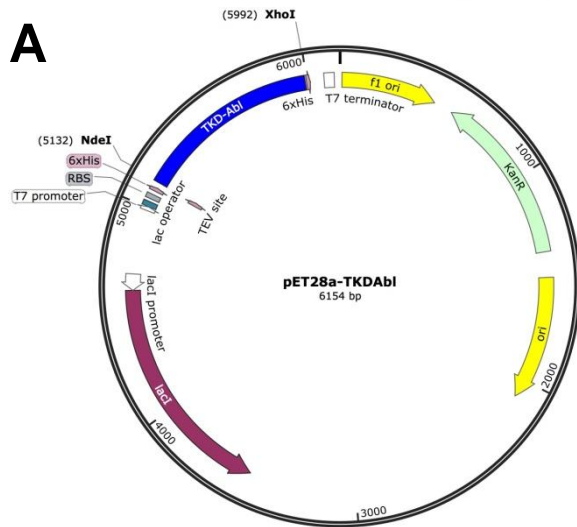


Figura 21. A) Mapa de la construcción del vector de expresión pET28a-TKD-Abl elaborado con el programa SnapGene (GSL Biotech LLC). El pET28a tiene un marcador de resistencia a kanamicina (verde). En azul se ve el gen del dominio cinasa de Abl que fue subclonado entre los sitios de restricción NdeI y XhoI. Rio arriba se encuentra una secuencia que codifica para una etiqueta de hexahistidina y una secuencia de unión a ribosoma, todo esto se encuentra bajo el control del promotor y terminador T7. **B)** Estructura primaria de la proteína Abl (GenBank GI:109658752). Se muestran en color rojo los 19 aminoácidos faltantes en la isoforma 1a y el inicio de la numeración que se toma en cuenta en este trabajo. En verde se muestran los aminoácidos que se encuentran codificados en el vector de expresión que corresponden al dominio cinasa.

B

Numeración de la isoforma 1b		Inicio de la numeración isoforma 1a				
1	MGQQPGKVLG	DQRRPSLPAL	HFIKAGGKKE	SSRHGGPHCN	VFVEHEALQR	PVASFDFEPQG
61	LSEARWNSK	ENLLAGPSEN	DPNLFVALYD	FVASGDNTLS	ITKGEKLRVL	GYNHNGEWCE
121	AQTKNGQGWV	PSNYITPVNS	LEKHSWYHGP	VSRNAAEYLL	SSGINGSFLV	RESESSPGQR
181	SISLRYEGRV	YHYRINTASD	GKLYVSESR	FNTLAEVLVH	HSTVADGLIT	TLHYPAKRN
241	KPTVYGVSPN	YDKWEMERTD	ITMKHKLGGG	QYGEVYEGVW	KKYSLTVAVK	TLKEDTMEVE
301	EFLKEAAVMK	EIKHPNLVQL	LGVCTREPPF	YIITEFMTYG	NLLDYLRECN	RQEVNAVLL
361	YMATQISSAM	EYLEKKNFIH	RDLAARNCLV	GENHLVKVAD	FGLSRLMTGD	TYTAHAGAKF
421	PIKWTAPESL	AYNKFSIKSD	VWAFGVLLWE	IATYGMSPYP	GIDLSQVYEL	LEKDYRMERP
481	EGCPEKVYEL	MRACQWNPS	DRPSFAEIHQ	AFETMFQESS	ISDEVEKELG	KQGVRGAVST
541	LLQAPELPTK	TRTSRRAAEH	RDTTDVPEMP	HSKQGQESDP	LDHEPAVSPL	LPRKERGPPE
601	GGLNEDERLL	PKDKKTNLFS	ALIKKKKTA	PTPPKRSSSF	REMDGQPERR	GAGEEEGRDI
661	SNGALAFPL	DTADPAKSPK	PSNGAGVPNG	ALRESGGSGF	RSPHLWKKSS	TLTSSRLATG
721	EEEGGGSASK	RFLRSCSASC	VPHGAKDTEW	RSVTLPRDLQ	STGRQFDSST	FGGHKSEKPA
781	LPRKRAGENR	SDQVTRGTVT	PPRRLVKKNE	EAADVEFKDI	MESSPGSSPP	NLTPKPLRRQ
841	VTVPASGLP	HKEEAGKGS	LGTAAAEPV	TPTSKAGSGA	PGGTSKGP	ESRVRRHKHS
901	SESPGRDKGK	LSRLKPAPPP	PPAASAGKAG	GKPSQSPSQE	AAGEAVLGAK	TKATSLVDAV
961	NSDAAKPSQP	GEGLKKVPLP	ATPKPQSAKP	SGTPISPAPV	PSTLPSASSA	LAGDQPSSTA
1021	FIPLISTRVS	LRKTRQPPER	IASGAIKGV	VLDSTEALCL	AISRNSEQMA	SHSAVLEAGK
1081	NLYTFCVSYV	DSIQQMRNKF	AFREAIKLE	NNLRELQICP	ATAGSGPAAT	QDFSLLSSV
1141	KEISDIVQR					

Cuando se recibió el DNA del vector de expresión se disolvió en 30 μL de agua desionizada estéril y se replicó en células de *E. coli* DH5 α empleando 1 μL de DNA sin cuantificar para la transformación bacteriana (sección 5.3). Una colonia de las células transformantes fue seleccionada y cultivada por 18 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en 5 mL de medio LB suplementado con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina el cual es el marcador de selección del pET28a y posteriormente se purificó el DNA plasmídico (sección 5.2). Para verificar la secuencia del gen clonada en el vector se envió a secuenciar (200 ng de DNA) a la empresa Laragen, Inc (California, US). En la **figura 22** se muestra el cromatograma obtenido de la secuenciación. A continuación los resultados crudos de la secuenciación fueron alineados contra el gen *ABL1* obtenido del GenBank GI:109658752 (**Figura 23A**) en donde se observó que 15 nucleótidos no concuerdan con el alineamiento. Estos nucleótidos fueron asignados en base al análisis del código de colores al observar el cromatograma de la secuenciación, ya que existen ocasiones en que el equipo no puede asignar correctamente el nucleótido. Después de la asignación se volvieron a alinear las secuencias obteniendo un 100 % de identidad (**Figura 23B**) comprobando que nuestra construcción es correcta.

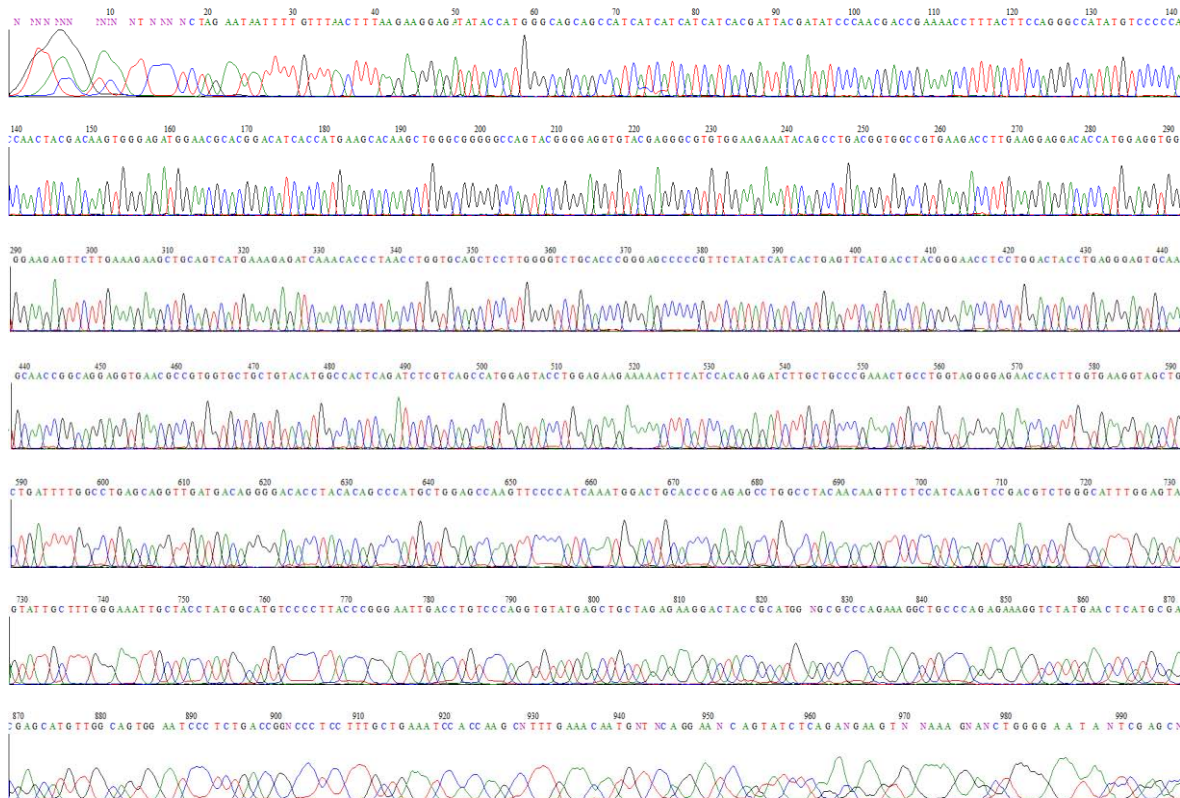


Figura 22. Cromatograma de la secuenciación del gen contenido en el pET28a-TKD-Abl.

A

Sequence ID: Icl|Query_199763 Length: 1000 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1511 bits(818)	0.0	841/856(98%)	5/856(0%)	Plus/Plus
Query 805	TGTCCTCCCAACTACGACAGTGGGAGATGGAACGACGACATCACCATGAAGCACAAAGC			864
Sbjct 133	TGTCCTCCCAACTACGACAGTGGGAGATGGAACGACGACATCACCATGAAGCACAAAGC			192
Query 865	TGGCCGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGGGGGTGTGGAAGAAATACAGCTGACGG			924
Sbjct 193	TGGCCGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGGGGGTGTGGAAGAAATACAGCTGACGG			252
Query 925	TGCCCTGAAGACCTTGAAGGAGACACCATGGAAGTGTGAAGAGTCTTGAAGAGCTG			984
Sbjct 253	TGCCCTGAAGACCTTGAAGGAGACACCATGGAAGTGTGAAGAGTCTTGAAGAGCTG			312
Query 985	CAGTCATGAAGAGATCAAAACCCCTAACCTGGTGCAGCTCTTGGGTCTGCACCCGG			1044
Sbjct 313	CAGTCATGAAGAGATCAAAACCCCTAACCTGGTGCAGCTCTTGGGTCTGCACCCGG			372
Query 1045	AGCCCCCGTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCTGGACTACTGA			1104
Sbjct 373	AGCCCCCGTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCTGGACTACTGA			432
Query 1105	GGAGTGCACCCGGCAGGAGTGAACCCCTGGTGCCTGTACATGGCCACTCAGATCT			1164
Sbjct 433	GGAGTGCACCCGGCAGGAGTGAACCCCTGGTGCCTGTACATGGCCACTCAGATCT			492
Query 1165	CGTCAGCTAGGATACCTGGAGAGAAAAAATTCATCCACAGAGATCTTGTCTGCCGAA			1224
Sbjct 493	CGTCAGCTAGGATACCTGGAGAGAAAAAATTCATCCACAGAGATCTTGTCTGCCGAA			552
Query 1225	ACTGCTGTGGAGAGAACCTTGGTGAAGTGTGATTTGGCTGACGAGGTGA			1284
Sbjct 553	ACTGCTGTGGAGAGAACCTTGGTGAAGTGTGATTTGGCTGACGAGGTGA			612
Query 1285	TGACAGGGACACCTACACAGCCATGCTGGAGCAGTCCCCATCAATGGACTGCAC			1344
Sbjct 613	TGACAGGGACACCTACACAGCCATGCTGGAGCAGTCCCCATCAATGGACTGCAC			672
Query 1345	CCGAGAGCTGGCTACAACAAGTCTCCATCAAGTCCGAGCTCTGGCATTGGAGTAT			1404
Sbjct 673	CCGAGAGCTGGCTACAACAAGTCTCCATCAAGTCCGAGCTCTGGCATTGGAGTAT			732
Query 1405	TGCTTTGGGAAATGCTACTATGGCATGTCCCTTACCCTGGGAAATGACCTGTCCAG			1464
Sbjct 733	TGCTTTGGGAAATGCTACTATGGCATGTCCCTTACCCTGGGAAATGACCTGTCCAG			792
Query 1465	TGTATGAGCTGTAGAGAGGACTACCGCATGGAGCCGAG- AAGCTGCCAGAG- AA			1524
Sbjct 793	TGTATGAGCTGTAGAGAGGACTACCGCATGGAGCCGAGAGGCTGCCAGAGAAA			852
Query 1523	GGTCTATGAACCTATGGAGATGTTGGCAGTGGAAATCCCTCTGACCGG- CCCTCTTTG			1584
Sbjct 853	GGTCTATGAACCTATGGAGATGTTGGCAGTGGAAATCCCTCTGACCGHCCCTCTTTG			912
Query 1582	CTGAATCCACCAAGCTTTGAAACAATGTTCCAGAAATCCAGATCTCAGACGAAGTGG			1644
Sbjct 913	CTGAATCCACCAAGCTTTGAAACAATGTTCCAGAAATCCAGATCTCAGACGAAGTGG			971
Query 1642	AAAAAGAGCTGGGGAA 1658			
Sbjct 972	AAAAANACTGGGGAA 986			

B

Sequence ID: Icl|Query_146293 Length: 933 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1578 bits(854)	0.0	854/854(100%)	0/854(0%)	Plus/Plus
Query 805	TGTCCTCCCAACTACGACAGTGGGAGATGGAACGACGACATCACCATGAAGCACAAAGC			864
Sbjct 77	TGTCCTCCCAACTACGACAGTGGGAGATGGAACGACGACATCACCATGAAGCACAAAGC			136
Query 865	TGGCCGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGGGGGTGTGGAAGAAATACAGCTGACGG			924
Sbjct 137	TGGCCGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGGGGGTGTGGAAGAAATACAGCTGACGG			196
Query 925	TGCCCTGAAGACCTTGAAGGAGACACCATGGAAGTGTGAAGAGTCTTGAAGAGCTG			984
Sbjct 197	TGCCCTGAAGACCTTGAAGGAGACACCATGGAAGTGTGAAGAGTCTTGAAGAGCTG			256
Query 985	CAGTCATGAAGAGATCAAAACCCCTAACCTGGTGCAGCTCTTGGGTCTGCACCCGG			1044
Sbjct 257	CAGTCATGAAGAGATCAAAACCCCTAACCTGGTGCAGCTCTTGGGTCTGCACCCGG			316
Query 1045	AGCCCCCGTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCTGGACTACTGA			1104
Sbjct 317	AGCCCCCGTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCTGGACTACTGA			376
Query 1105	GGAGTGCACCCGGCAGGAGTGAACCCCTGGTGCCTGTACATGGCCACTCAGATCT			1164
Sbjct 377	GGAGTGCACCCGGCAGGAGTGAACCCCTGGTGCCTGTACATGGCCACTCAGATCT			436
Query 1165	CGTCAGCTAGGATACCTGGAGAGAAAAAATTCATCCACAGAGATCTTGTCTGCCGAA			1224
Sbjct 437	CGTCAGCTAGGATACCTGGAGAGAAAAAATTCATCCACAGAGATCTTGTCTGCCGAA			496
Query 1225	ACTGCTGTGGAGAGAACCTTGGTGAAGTGTGATTTGGCTGACGAGGTGA			1284
Sbjct 497	ACTGCTGTGGAGAGAACCTTGGTGAAGTGTGATTTGGCTGACGAGGTGA			556
Query 1285	TGACAGGGACACCTACACAGCCATGCTGGAGCAGTCCCCATCAATGGACTGCAC			1344
Sbjct 557	TGACAGGGACACCTACACAGCCATGCTGGAGCAGTCCCCATCAATGGACTGCAC			616
Query 1345	CCGAGAGCTGGCTACAACAAGTCTCCATCAAGTCCGAGCTCTGGCATTGGAGTAT			1404
Sbjct 617	CCGAGAGCTGGCTACAACAAGTCTCCATCAAGTCCGAGCTCTGGCATTGGAGTAT			676
Query 1405	TGCTTTGGGAAATGCTACTATGGCATGTCCCTTACCCTGGGAAATGACCTGTCCAG			1464
Sbjct 677	TGCTTTGGGAAATGCTACTATGGCATGTCCCTTACCCTGGGAAATGACCTGTCCAG			736
Query 1465	TGTATGAGCTGTAGAGAGGACTACCGCATGGAGCCGAG- AAGCTGCCAGAG- AA			1524
Sbjct 737	TGTATGAGCTGTAGAGAGGACTACCGCATGGAGCCGAGAGGCTGCCAGAGAA			796
Query 1523	GGTCTATGAACCTATGGAGATGTTGGCAGTGGAAATCCCTCTGACCGG- CCCTCTTTG			1584
Sbjct 797	TGTATGAGCTGTAGAGAGGACTACCGCATGGAGCCGAGAGGCTGCCAGAGAA			856
Query 1585	AAATCCACCAAGCTTTGAAACAATGTTCCAGAAATCCAGATCTCAGACGAAGTGGAA			1644
Sbjct 857	AAATCCACCAAGCTTTGAAACAATGTTCCAGAAATCCAGATCTCAGACGAAGTGGAA			916
Query 1645	AGAGCTGGGGAAA 1658			
Sbjct 917	AGAGCTGGGGAAA 930			

Figura 23. A) Análisis de las secuencias del gen *ABL1* y la secuencia del gen secuenciado crudo. Se observa que 15 nucleótidos no coinciden con el alineamiento que tiene un 98 % de identidad. **B)** Análisis de las secuencias del gen *ABL1* y la secuencia del gen secuenciado y asignado correctamente. La identidad fue de un 100 % la cual fue lograda con el asignamiento correcto de los nucleótidos en base al cromatograma de la figura 22.

En la **figura 24** se muestra la estructura primaria de nuestra construcción del dominio cinasa de Abl en donde se muestra que hacia el extremo N-terminal tiene una etiqueta de seis histidinas para permitir su purificación por cromatografía de afinidad.

```

10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHH DYDIPTTENL YFQGHMSPNY DKWEMERTDI TMKHKLGGGQ YGEVYEGVWK

70      80      90      100     110     120
KYSLTVAVKT LKEDTMEVEE FLKEAAVMKE IKHPNLVQLL GVCTREPPFY IITEFMTYGN

130     140     150     160     170     180
LLDYLRECNR QEVNAVLLY MATQISSAME YLEKKNFIHR DLAARNCLVG ENHLVKVADF

190     200     210     220     230     240
GLSRLMTGDT YTHAGAKFP IKWTAPESLA YNKFSIKSDV WAFGVLLWEI ATYGMSPPYG

250     260     270     280     290     300
IDLSQVYELL EKDYRMERPE GCPEKVYELM RACWQWNPSP RPSFAEIHQA FETMFQESSI

310
SDEVEKELGK

```

Figura 24. Estructura primaria del dominio cinasa de la proteína Abl recombinante que se obtiene en la sobreexpresión. Al inicio de esta en los primeros 10 aminoácidos encontramos la etiqueta de seis histidinas que sirve para la purificación de la proteína.

6.2 Purificación del dominio cinasa de Abl

Con la finalidad de obtener cantidades necesarias para los experimentos biofísicos planteados en este proyecto, se realizó la sobreexpresión y purificación de Abl empleando la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) cotransformada con dos plásmidos, uno que codifica para Abl y otro que codifica para la fosfatasa YopH. Al cabo del tiempo de inducción (sección 5.4), coleccionar y lisar los paquetes celulares, el primer paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad a níquel, en la cual nuestra proteína Abl recombinante es retenida debido a que presenta una etiqueta de seis histidinas consecutivas en el N-terminal. En la **figura 26A** se muestra el seguimiento de los pasos de purificación empleados en la cromatografía de afinidad a níquel. En la elución se obtuvieron dos bandas, una a la altura del peso molecular de 48 kDa y otra en 35 kDa, siendo la fosfatasa YopH y Abl respectivamente (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parametros fisicoquímicos del dominio cinasa Abl y de la fosfatasa YopH

Proteína	PM (kDa)	pI	ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)	No. de residuos
Abl	35969.9	5.41	65320	310
YopH	50939.4	8.92	18910	468

Debido a que en la elución proveniente de la columna de afinidad a níquel se obtuvo una mezcla tanto de Abl como de YopH, la mezcla fue aplicada a una cromatografía de intercambio iónico debido a que la diferencia entre los puntos isoeléctricos de ambas proteínas difieren considerablemente (**Tabla 1**). A un pH 8.0 las cargas de las proteínas serán positiva y negativa para YopH y Abl respectivamente por lo que la columna de intercambio aniónico la cual contiene una resina cargada positivamente permitió la unión de Abl y la exclusión de la fosfatasa YopH como se muestra en la **figura 26B**, obteniendo finalmente nuestro dominio cinasa de Abl recombinante puro.

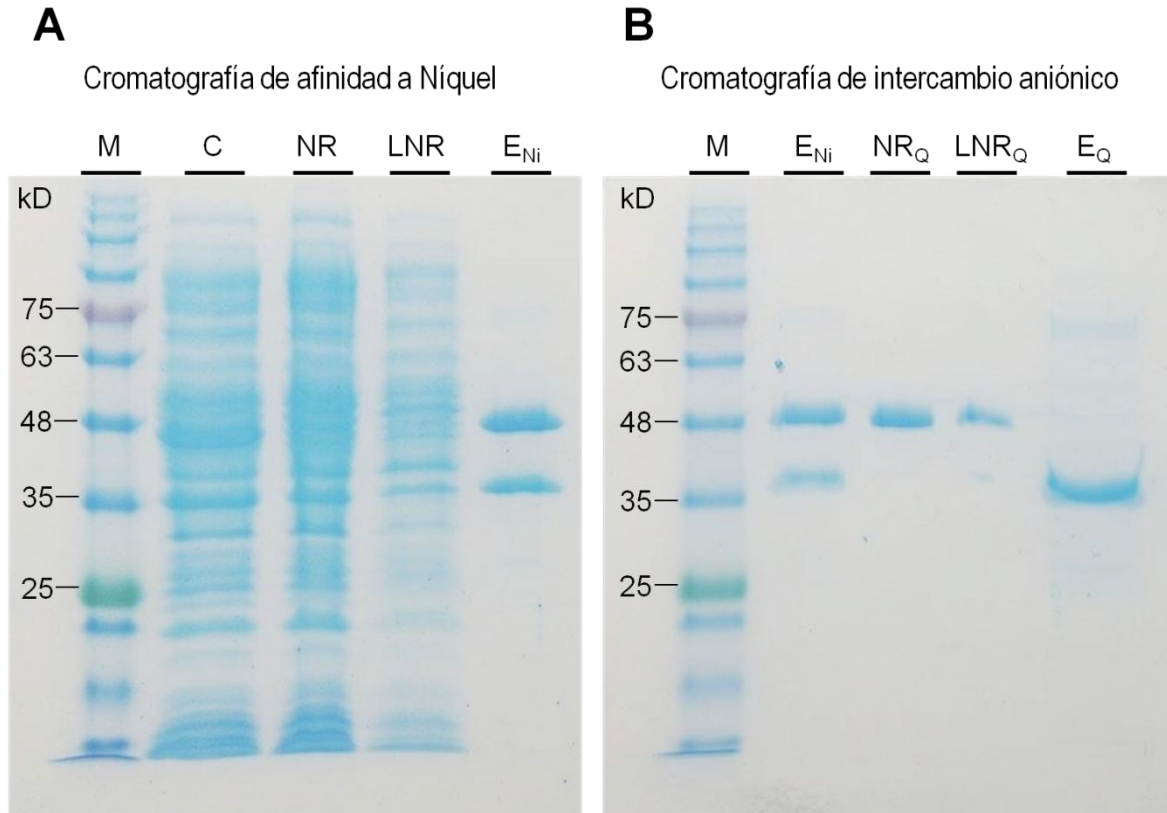


Figura 26. Geles SDS-PAGE representativos del análisis de la purificación del dominio cinasa de Abl. **A)** Fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad a níquel del extracto crudo proteico. M, marcador de peso molecular; C, extracto crudo; NR, no retenido; LNR, lavado de no retenido; E_{Ni}, elución de la níquel. **B)** Fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico (Q). M, marcador de peso molecular; E_{Ni}, elución de la níquel; NR_Q, no retenido de la Q; LN_Q, lavado no retenido de la Q; E_Q, elución de la Q.

Con la finalidad de comprobar la pureza y que efectivamente es el dominio cinasa de Abl la proteína que estamos obteniendo, se realizó un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF para lo cual la fracción E_Q se dejó dializando en la membrana de corte de 12-14 kDa/25 mm por 18 h lo que permitió eliminar las impurezas menores a 14 kDa que pudiera tener la muestra y se concentró la proteína hasta 10-30 mM con membrana de corte de 10 kDa empleando el sistema Amicon. El espectro MALDI-TOF mostró un ion molecular m/z correspondiente al peso molecular de Abl con solo una diferencia de 0.1 kDa ($PM_{teórico} = 35969.9$, ion molecular (m/z) = 35863.8 kDa) por lo que se concluye que la proteína si es Abl y además al no observarse otros picos en otras regiones m/z, se encuentra con una pureza $\geq 98\%$ (**Figura 27**), lo cual coincide con el análisis de SDS-PAGE (**Figura 26B**) donde se observa

solo una banda a la altura de 35 kDa. El rendimiento obtenido para Abl recombinante fue del orden de 25-30 mg/1.5 l.

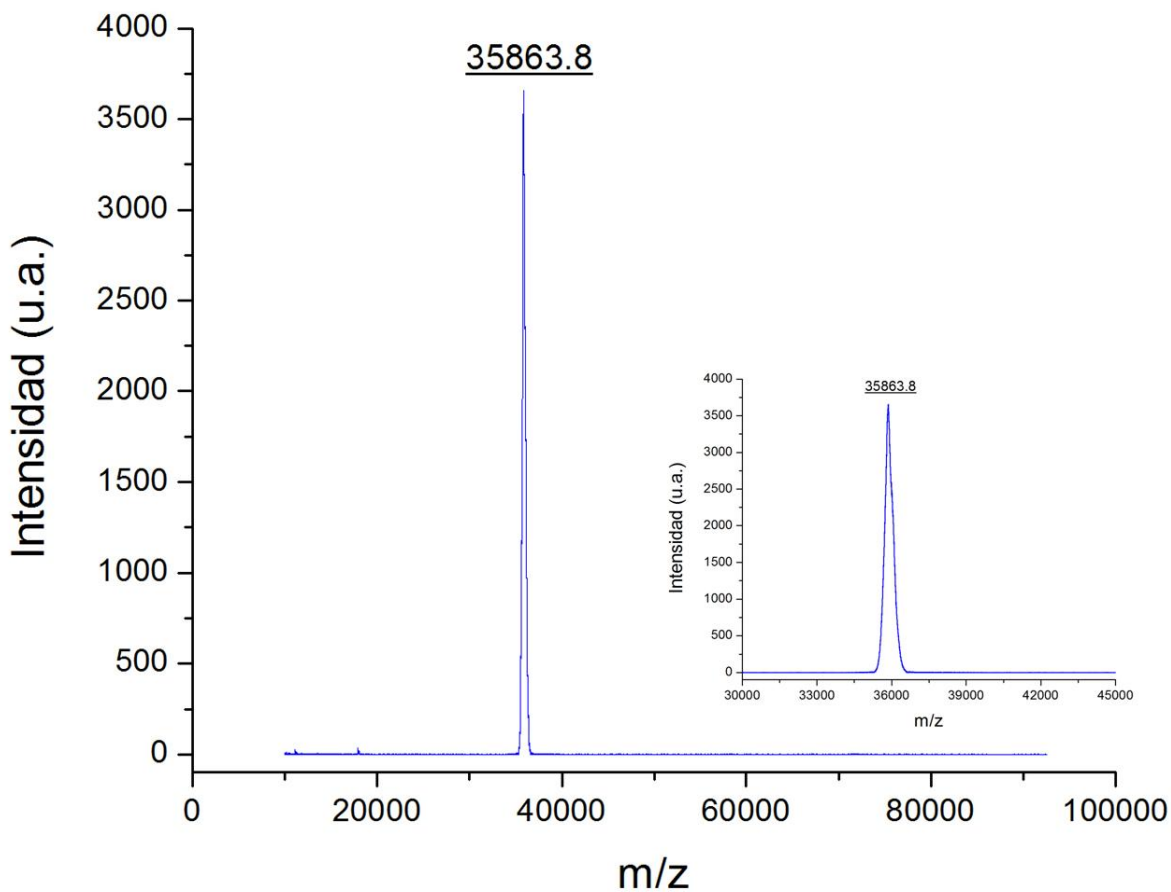


Figura 27. Espectro de masas MALDI-TOF para el dominio cinasa de Abl recombinante. La masa molecular teórica para la proteína es de 35969.9 kDa y la relación fue de 35863.8 kDa para el ion molecular (MH^+). Fuera del pico que corresponde al ion MH^+ no se observan bandas con amplitud significativa lo que sugiere una pureza mayor o igual al 98 %. En el inserto se muestra la ampliación de la ventana entre 30000 y 45000 m/z que muestra que la señal corresponde a un solo pico.

6.3. Dicroísmo circular (DC)

Con la finalidad de comprobar que Abl se encuentra plegada, se realizaron experimentos de dicroísmo circular. El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que provee información a nivel estructural de proteínas como estimación del contenido de estructura secundaria, procesos de plegamiento y desplegamiento y en general permite monitorear cambios conformacionales inducidos por diferentes factores como pH, temperatura, fármacos, ligandos, entre otros. El fenómeno de DC se define como la diferencia entre la absorción de un componente de luz polarizada circularmente a la izquierda y otro componente de luz polarizada circularmente hacia la derecha por compuestos ópticamente activos, es decir, una sustancia presenta dicroísmo circular cuando la absorción de un componente es diferente a la absorción del componente opuesto. En proteínas el DC permite estimar la estructura secundaria y su conformación debido a que el enlace peptídico es capaz de actuar como cromóforo en la región del UV lejano (180-250 nm) (**Figura 28 inserto**). De tal forma que permite diferenciar el contenido relativo de hélices- α , hebras- β y secuencias no repetitivas. El DC se presenta sólo en proteínas con estructura tridimensional definida de tal forma que permite diferenciar entre una estructura proteica plegada de una desplegada y en ciertos casos o bajo ciertas condiciones las transiciones presentes en el proceso de desplegamiento/plegamiento, esto último permite conocer las especies que se encuentran involucradas en la vía de plegamiento.⁴⁷

Las amidas como cromóforos tienen dos transiciones electrónicas denominadas $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ que muestran DC en 210-220 nm y en 190 nm, respectivamente. En el caso de las hélices- α la transición $n \rightarrow \pi^*$ es causante de una banda negativa con un mínimo a 222 nm y en el caso de las hebras- β una banda negativa con un mínimo a 216-218 nm. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es responsable en el caso de hélices- α de una banda positiva con un máximo a 190 nm y una banda negativa con un mínimo a 208 nm, así mismo es causante de una banda positiva con máximo a 198 nm, característica de hebras- β (**Figura 28**). Una banda sin DC que tiende al negativo con un mínimo alrededor de 200 nm indica la ausencia de estructura secundaria como lo es una proteína desplegada. En un ensayo de DC una señal negativa significa que se absorbe luz polarizada a la izquierda y una señal positiva que se absorbe luz polarizada a la derecha.⁴⁸

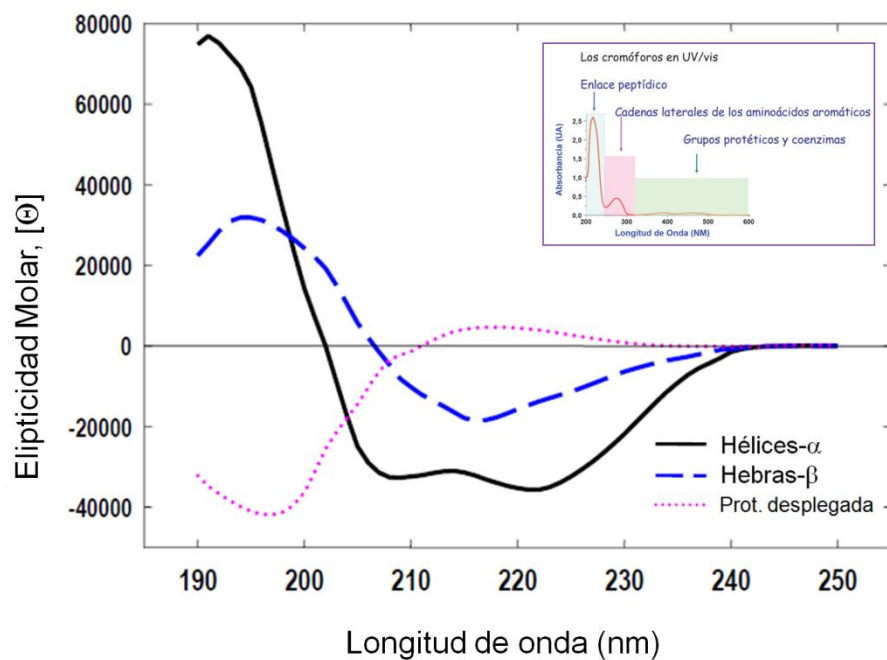


Figura 28. Espectros de DC característicos para hélices- α , hebras- β y secuencias no repetitivas. El espectro para una proteína con estructura predominante de hélices- α (línea negra) presenta dos bandas negativas de magnitud similar con mínimos en 222 y 208 nm, y una banda positiva con un máximo en 190 nm. El espectro para una proteína con estructura predominantemente hebras- β (línea discontinua azul) presenta una banda negativa con un mínimo en 216-220 nm, y una banda positiva con un máximo alrededor de 195 nm. El espectro para una proteína desplegada o secuencias no repetitivas (p. ej. giros, lazos) presenta una banda que tiende al negativo con un mínimo alrededor de 200 nm (línea punteada rosa). En el inserto se muestran los cromóforos de las proteínas en la región del espectro electromagnético del UV/visible.

En la **figura 29A** se muestra el espectro de DC a 20 °C del dominio cinasa de Abl recombinante el cual muestra que se encuentra plegada. Se observa la tendencia de un máximo positivo alrededor de 190 nm y un mínimo negativo a 208 nm característicos de hélices- α mientras que el mínimo negativo a 222 nm desaparece seguramente por la presencia de hebras- β como se ha observado para la lisozima que tiene composición proporcionada de ambas estructuras secundarias (**Figura 29A inserto**) por lo que nuestro dominio cinasa es una α/β -proteína lo que corresponde con la estructura cristalográfica PDB 2G1T del dominio cinasa humano el cual muestra una composición de estructura secundaria de 15 hélices- α y 11 hebras- β . El objetivo de este trabajo es describir la interacción del complejo Abl-Imatinib por lo que se procedió a realizar un espectro de DC a 20 °C del complejo el cual se muestra en la **figura 29B** en superposición con el espectro del dominio cinasa donde se observa que la unión del ligando no produce cambios en la estructura secundaria que sean relevantes.

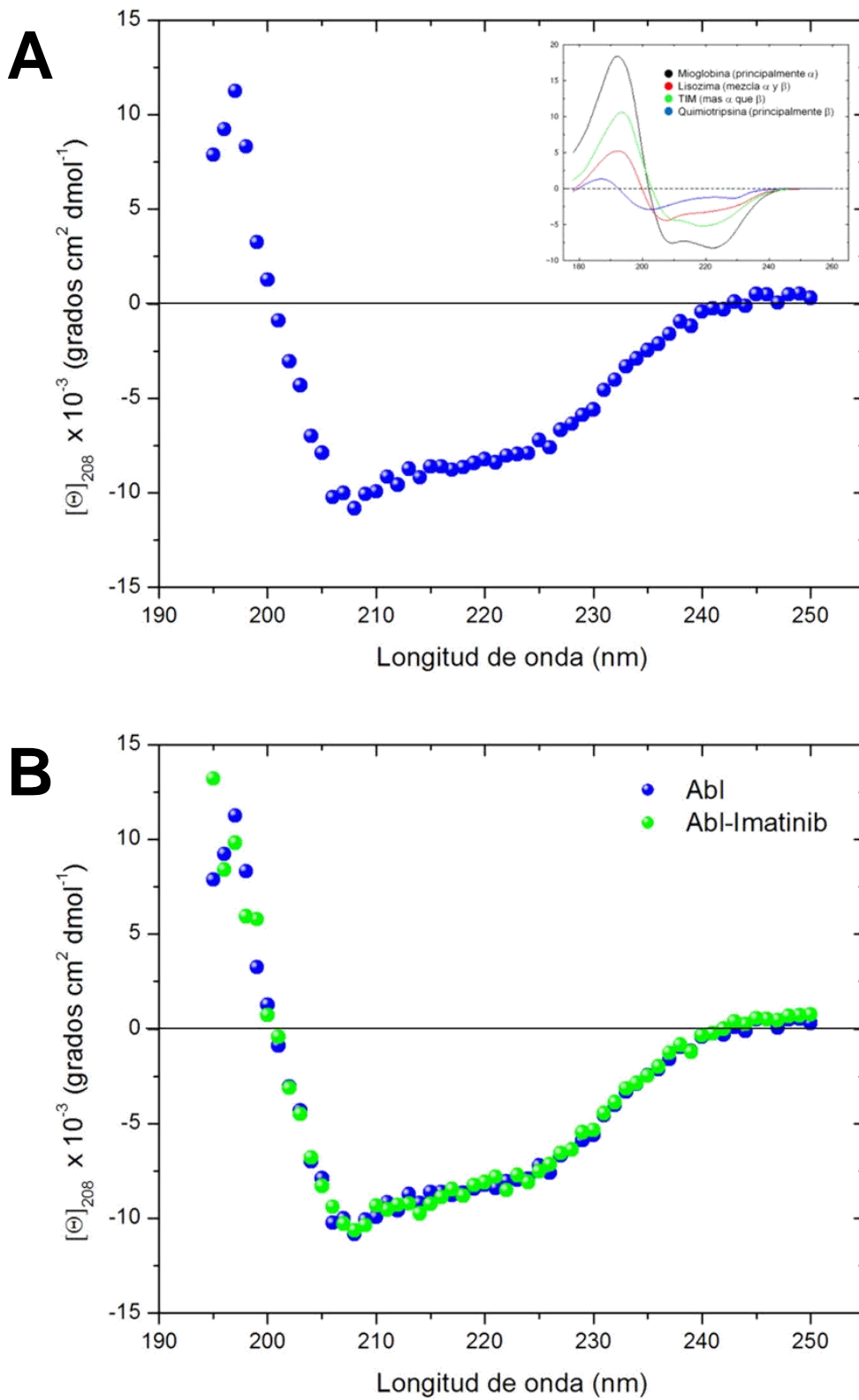
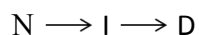


Figura 29. **A)** Espectro de DC a 20 °C de Abl y espectros característicos de proteínas con diferente composición de estructura secundaria (Inserto). **B)** Sobreposición de los espectros de DC a 20 °C de Abl (azul) y el complejo Abl-Imatinib (verde).

Una prueba adicional del plegamiento de Abl es que exhiba una perturbación térmica, es decir, despegamiento térmico para lo cual la muestra fue sometida a un barrido de temperatura de 20 a 90 °C siguiendo el proceso a una longitud constante de 208 nm (el mínimo característico) donde se observó una transición bifásica donde la primera transición va de 45 a 55 °C y una segunda transición que va de 65 a 75 °C que indica un modelo de despegamiento:



donde N es el estado nativo o plegado, I es al menos un intermediario y D es el estado desplegado (**Figura 30A**).

Para determinar si el despegamiento térmico es reversible se realizó un barrido disminuyendo la temperatura de 90 a 20 °C (**Figura 30B inserto**) observando que el despegamiento es irreversible al menos parcialmente debido a que existe una reversibilidad en la segunda transición del estado desplegado al intermediario sugiriendo un modelo de despegamiento:



El mismo experimento de despegamiento térmico (barrido de 20 a 90 °C) se realizó en presencia de Imatinib (**Figura 31**) mostrando una transición aparentemente monofásica que inicia en 50 °C y termina en 75 °C. Comparando el despegamiento de Abl con el complejo Abl-Imatinib existe una diferencia de 5 °C en el inicio del despegamiento lo que indica que el Imatinib le confiere cierta estabilidad a Abl. Es importante mencionar que en el barrido del complejo no se resuelven las dos transiciones como en el caso de solo Abl.

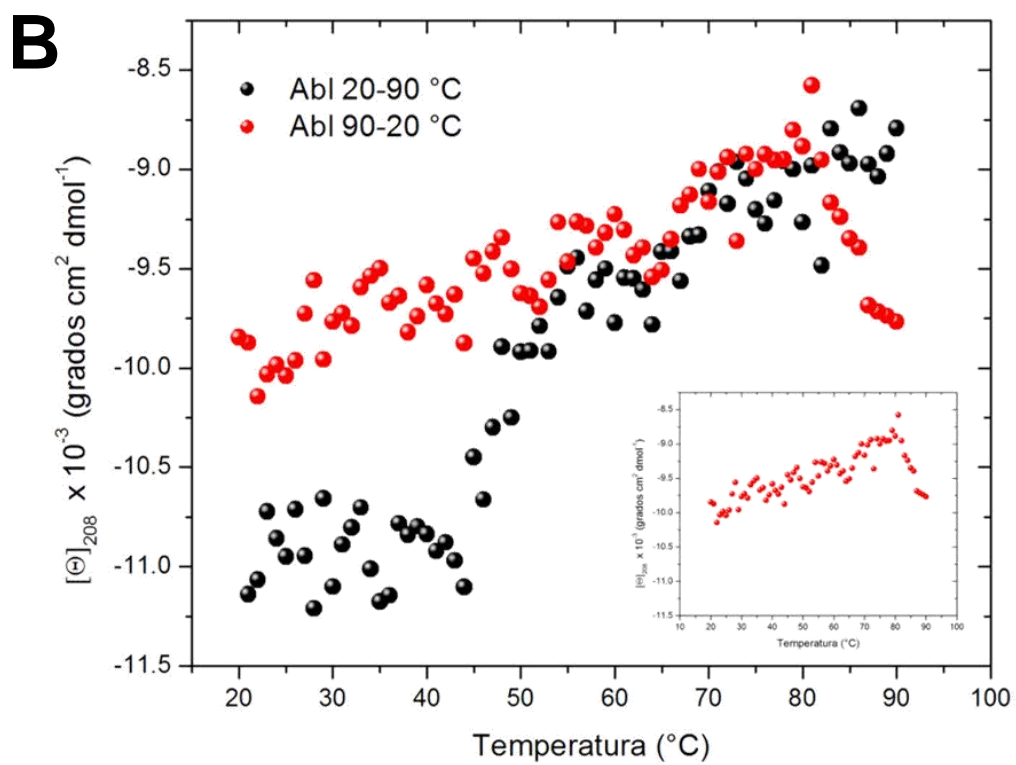
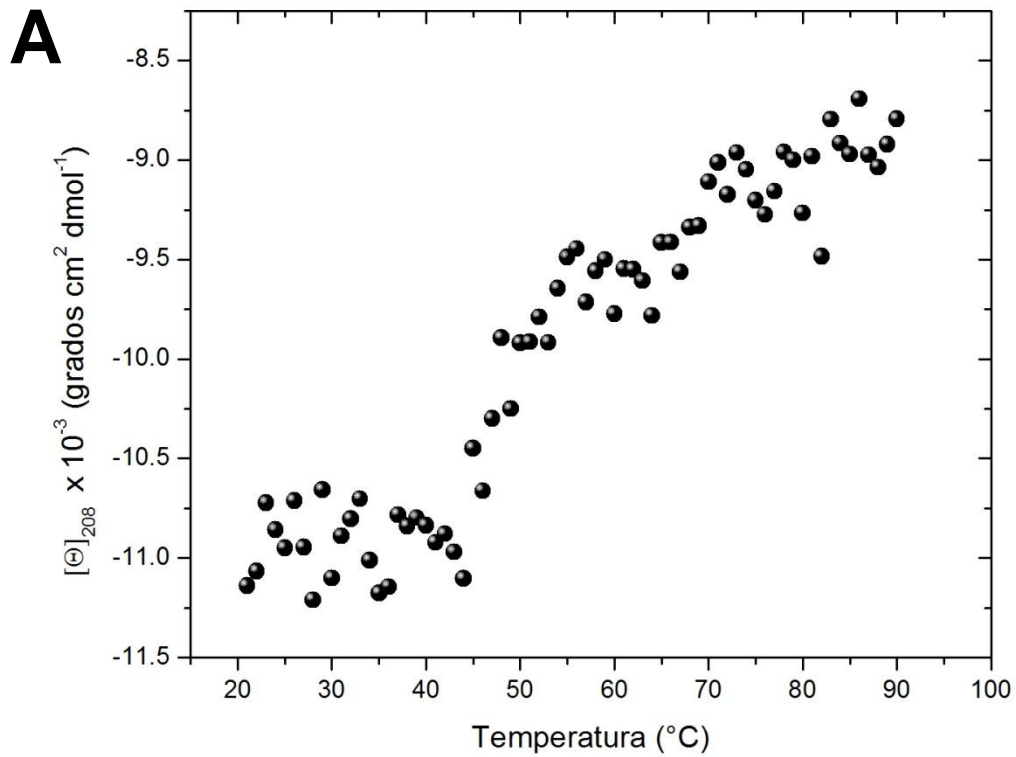


Figura 30. A) Despliegamiento térmico de Abl monitoreado a 208 nm barriendo la temperatura de 20 a 90 $^{\circ}\text{C}$ a 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y una resolución de 1 $^{\circ}\text{C}$. **B)** Despliegamiento/plegamiento térmico de Abl monitoreado a 208 nm. Inseto: Barrido de temperatura de 90 a 20 $^{\circ}\text{C}$ a 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y una resolución de 1 $^{\circ}\text{C}$.

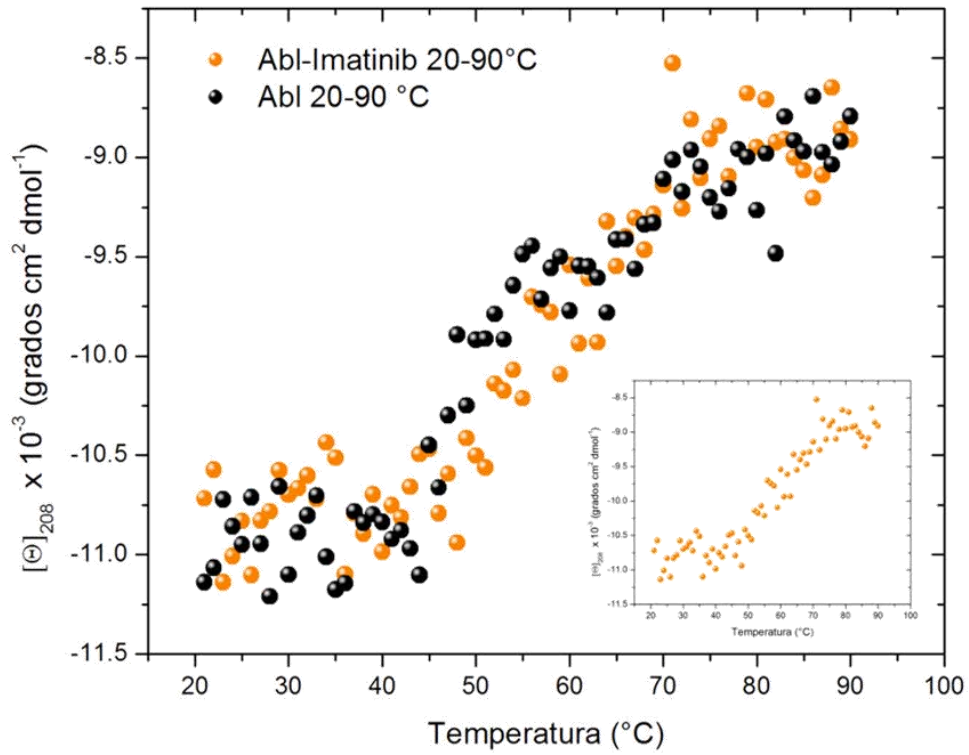


Figura 31. Superposicion de las curvas de desplegamiento térmico de Abl-Imatinib (inserto) y Abl monitoreado a 208 nm barriendo la temperatura de 20 a 90 °C a 1 °C/min y una resolución de 1 °C.

6.4. Calorimetría de titulación isotérmica

Para dar marcha con el objetivo principal de este proyecto se inicio la caracterización termodinámica de la asociación de Abl con Imatinib en un rango de temperaturas de 20 a 35 °C cada 2.5 °C. La **figura 32** muestra los termogramas (paneles superiores) y las isothermas de unión (paneles inferiores) para titulación de Abl con Imatinib a diferentes temperaturas. Los valores de K_a y ΔH_a fueron determinados mediante el ajuste no lineal a un modelo de un solo sitio de unión (estequiometria 1:1). La **tabla 2** resume el conjunto de valores termodinámicos para la formación del complejo Abl-Imatinib.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos para la unión de Abl a Imatinib a diferentes temperaturas determinados mediante ITC.^a

$T, ^\circ\text{C}$	K_a ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}$)	K_d (nM)	ΔH_a (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S_a$ (kcal mol ⁻¹)	ΔG_a (kcal mol ⁻¹)	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
20	1.9 ± 0.2	521	-8.2 ± 0.2	-0.1	-8.4	-331
22.5	10.6 ± 2.3	93	-9.1 ± 0.1	-0.3	-9.5	-421
25	4.5 ± 0.5	218	-10.1 ± 0.1	1.0	-9.0	-511
27.5	15.2 ± 2.0	65	-11.6 ± 0.1	1.7	-9.8	-601
30	21.0 ± 2.5	47	-13.0 ± 0.1	2.9	-10.1	-691
32.5	15.5 ± 0.8	64	-15.8 ± 0.06	5.7	-10.0	-781
35	23.5 ± 2.0	42	-16.8 ± 0.09	6.4	-10.3	-871

^a K_d , constante de disociación, fue calculado como $1/K_a$. ΔG_a , energía libre de Gibbs de asociación, fue calculada mediante la ecuación $\Delta G_a = -RT \ln K_a$. $-T\Delta S_a$, componente entrópico, fue calculado a partir de la ecuación $\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a$. ΔC_p , cambio en la capacidad calorífica, fue calculado a partir de la ecuación $\Delta C_p = \delta\Delta H/\delta T$, la cual ajustó a una función polinomial de 2do grado $\delta\Delta H/\delta T = A+B_1T+B_2T^2$ derivando se obtiene que $\Delta C_p = B_1+2CT$ donde B y C son constantes y T, es la temperatura en °C.

La formación del complejo Abl-Imatinib se caracterizó por ser un proceso exotérmico en todas las temperaturas de estudio. A 27.5 °C, la afinidad de Abl por Imatinib fue de $15.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, lo que indica que el Imatinib como es de esperarse es un fármaco con alta afinidad por Abl. Energéticamente el proceso de unión fue favorable ($\Delta G_a = -9.8 \text{ kcal/mol}$) dirigido exclusivamente por el componente entálpico ($\Delta H_a = -11.6 \text{ kcal/mol}$) con el componente entrópico desfavorable ($-T\Delta S_a = 1.7 \text{ kcal/mol}$).

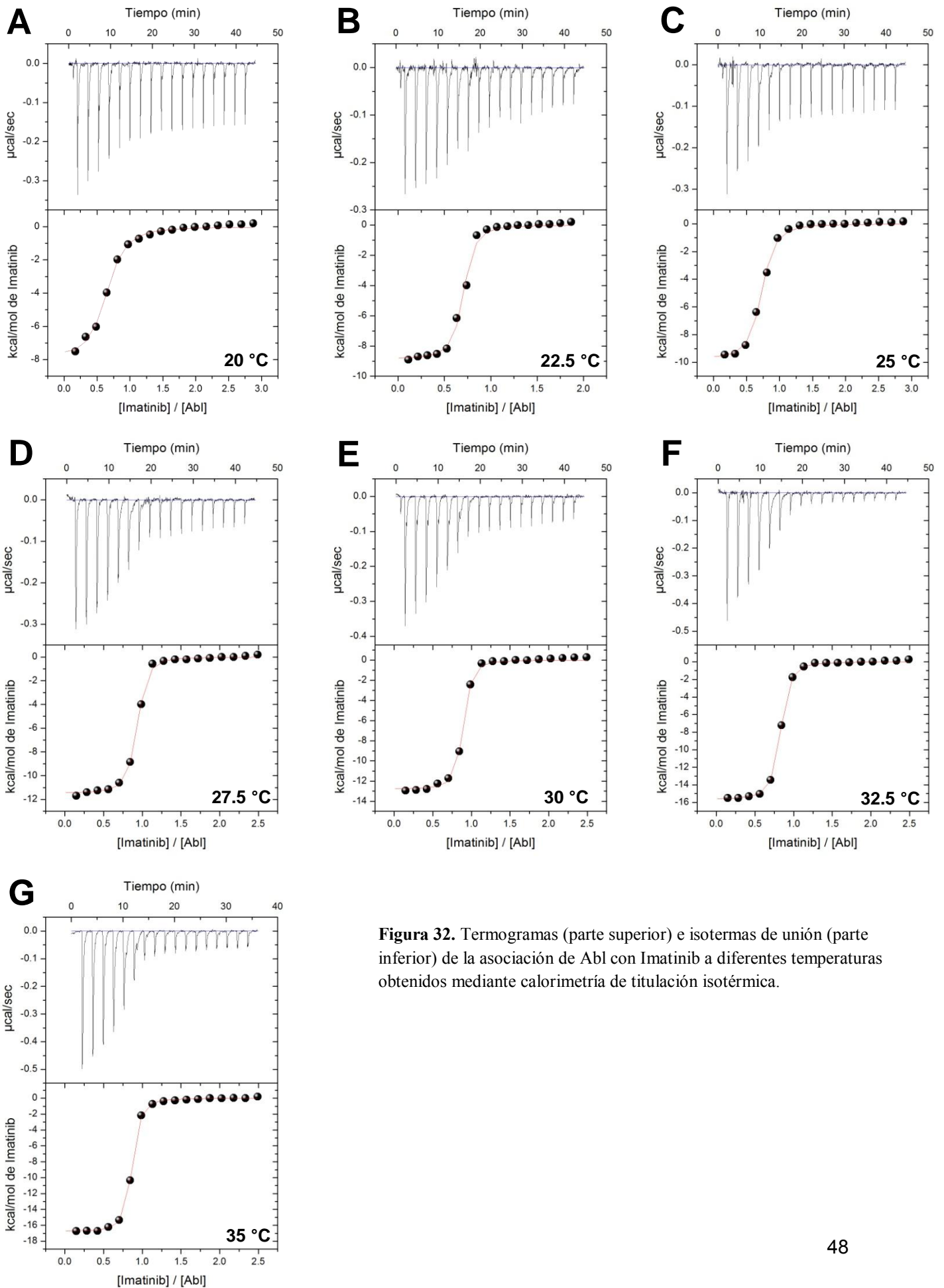


Figura 32. Termogramas (parte superior) e isotermas de unión (parte inferior) de la asociación de Abl con Imatinib a diferentes temperaturas obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica.

De forma general al variar la temperatura la afinidad mostró valores del orden de 15 a $23 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ con excepción de los valores obtenidos a 20 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en donde existe una disminución de la constante de afinidad en aproximadamente un orden de magnitud, de tal forma que por debajo de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ la K_a tiende a disminuir. Energéticamente los componentes entálpico y entrópico mostraron una marcada dependencia de la temperatura en la formación del complejo Abl-Imatinib. Conforme se incrementa la temperatura el ΔH_a se vuelve más favorable (más negativo) mientras que el $-T\Delta S_a$ se vuelve más desfavorable (más positivo). La energía libre de Gibbs fue prácticamente similar en todos los casos abarcando valores de -8.4 a -10.3 kcal/mol .

El análisis de la dependencia del ΔH_a en función de la temperatura ajustó a una función polinomial de segundo orden (**Figura 33**), indicando una fuerte dependencia del ΔC_p con respecto a la temperatura.⁴⁹ De tal forma que el ΔC_p fue calculado para cada temperatura (**Tabla 2**) mediante $\Delta C_p = \delta\Delta H_a/\delta T$ (ec.8), donde el cambio de ΔH_a con respecto al cambio de T sigue un modelo polinomial de segundo orden, de tal forma que $\delta\Delta H_a/\delta T = A+BT+CT^2$ (ec.11). Resolviendo la diferencial y sustituyendo en la ecuación 8 se obtiene $\Delta C_p = B+2CT$ (ec. 12).

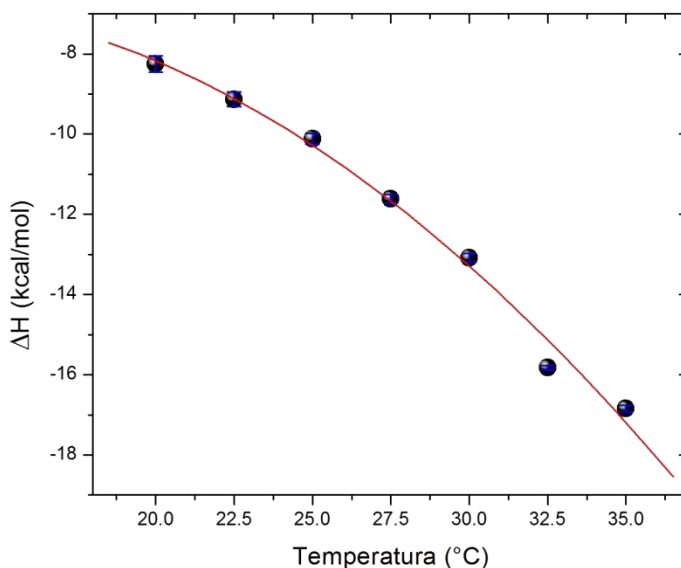


Figura 33. Entalpías de asociación en función de la temperatura para la interacción de Abl con Imatinib. La línea roja es el ajuste a una función polinomial de segundo orden.

Para poder comparar la asociación de Imatinib a Abl se realizó un experimento de calorimetría entre la asociación de Abl con su ligando natural MgATP (**Tabla 3**). Los resultados obtenidos demuestran que a 25 °C el MgATP tiene una afinidad menor de dos órdenes de magnitud en comparación con el Imatinib a la misma temperatura lo que demuestra un ΔG_a mucho menos favorable para el proceso de unión. El proceso de asociación es dirigido entálpicamente con el componente entrópico ligeramente favorable.

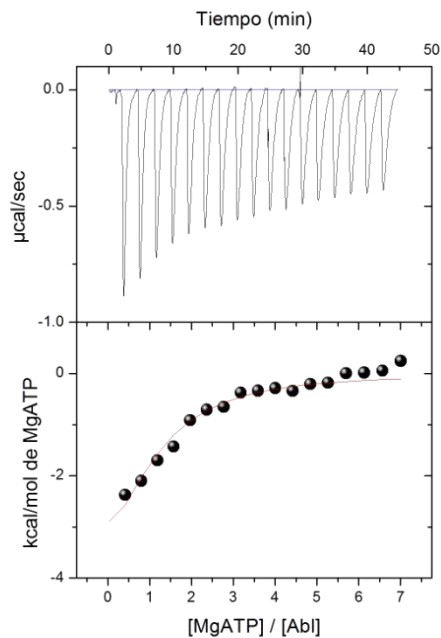


Figura 34. Termograma (parte superior) e isoterma de unión (parte inferior) de la asociación de Abl con MgATP a 25 °C obtenido mediante ITC.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos para la unión de Abl a MgATP a 25°C determinados mediante ITC.

T , °C	K_a ($\times 10^4 M^{-1}$)	K_d (nM)	ΔH_a (kcal mol $^{-1}$)	$-T\Delta S_a$ (kcal mol $^{-1}$)	ΔG_a (kcal mol $^{-1}$)
25	2.6 \pm 0.4	37878	-5.6 \pm 0.9	-0.7	-6.3

7. DISCUSIÓN

7.1. Obtención del dominio cinasa de Abl recombinante

El desarrollo de nuevos fármacos blanco-dirigidos para proteínas cinasas requiere comprender tanto el funcionamiento como su interacción con los fármacos mediante estudios *in vivo* complementados con experimentos bioquímicos, biofísicos y estructurales para lo cual se requieren cantidades del orden de miligramos de proteína con suficiente pureza además de ser funcional. En este trabajo la obtención de Abl recombinante se realizó empleando el método descrito por Seelinger y col. con menores modificaciones obteniendo Abl en gran escala (25-30 mg) y con adecuada pureza $\geq 98\%$.⁴⁶ En este sentido fue necesario cotransformar la cepa *E. coli* BL21(DE3) tanto con el vector de expresión pET28a-TKD-Abl que codifica para Abl y el vector pCDFDuet-1-YopH que codifica para la fosfatasa YopH, ya que la sobreexpresión de solo Abl no es tan eficiente. Seelinger y col. adjudican que esto se debe a que la actividad no controlada de Abl en la bacteria, resulta en toxicidad de tal forma que las células se van deteriorando y se favorece la formación de cuerpos de inclusión al momento de la purificación y por tanto la obtención de proteína recombinante mal plegada o con bajos rendimientos.

El hecho anterior fue solucionado incluyendo también un plásmido codificante para la fosfatasa específica de residuos de tirosina YopH, sin embargo, esta fosfatasa a pesar de no tener etiqueta de histidinas presenta afinidad a la resina de la columna de afinidad a níquel, probablemente por un factor estructural intrínseco de YopH o debido a que contenga en su estructura secuencias ricas en residuos de histidinas expuestas al solvente. Debido a lo anterior es necesaria la purificación de Abl por una segunda cromatografía, de intercambio aniónico que aprovecha la gran diferencia entre los puntos isoeléctricos de las proteínas para su separación (**Tabla 1**). Finalmente el análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación y la obtención de espectros MALDI-TOF concluyen que logramos obtener Abl recombinante de forma pura ($\geq 98\%$) y con un rendimiento considerable para continuar con los experimentos de este trabajo (25-30 mg/ 1.5L).

7.2. Plegamiento y estabilidad de Abl

El dicroísmo circular es una técnica biofísica que nos permite estudiar el plegamiento de una proteína así como estimar el contenido de estructura secundaria. En este sentido con la finalidad de conocer que nuestra proteína recombinante tiene un adecuado plegamiento se realizaron experimentos de dicroísmo circular, además del hecho de que si se encontraba en una conformación plegada exhibiría una perturbación térmica que sería evidenciada al realizar barridos de temperatura. Estos experimentos también nos permitieron conocer la estabilidad térmica y por tanto conocer el rango adecuado para realizar nuestros experimentos sin que la proteína sufra alteración estructural debido a la temperatura.

El espectro de DC obtenido a 20 °C mostró señales características para una α/β proteína (**Figura 29A**) lo cual corresponde con la composición del dominio cinasa de Abl de 15 hélices- α y 11 hebras- β , lo cual sugiere que nuestra proteína recombinante está adecuadamente plegada, además del hecho de que la medición obtenida no corresponde al espectro que debería arrojar una proteína desplegada (**Figura 28**). La realización de un barrido de temperatura de 20 a 90 °C monitoreando el cambio de elipticidad molar a 208 nm (el mínimo característico en nuestro espectro de la **figura 29A**) mostró un desplegamiento térmico caracterizado por dos transiciones, lo que sugiere que el desplegamiento se da en dos etapas (**Figura 30A**). La etapa 1 de 45-55 °C que corresponde a la transición del estado nativo a un estado parcialmente desplegado (intermediario, I) y la etapa 2 de 65-70 °C que correspondería al paso del estado I al estado desplegado o desnaturalizado D, lo que sugiere un modelo de desplegamiento $N \rightarrow I \rightarrow D$.

Para conocer la reversibilidad del desplegamiento térmico realizamos un barrido de regreso (90 \rightarrow 20 °C), el cual mostró que el desplegamiento no es totalmente revertido sin embargo en la superposición de los barridos de 20 \rightarrow 90 °C y de 90 \rightarrow 20 °C se observa que la segunda etapa si es reversible (**Figura 30B**). Lo que sugiere un modelo de desplegamiento $N \rightarrow I \leftrightarrow D$. En base a lo anterior podría ser que se despliegue primero el subdominio N y que el subdominio C se mantenga plegado o viceversa, ya que en la segunda etapa se termina de desplegar la proteína a un estado totalmente desplegado.

Actualmente en nuestro laboratorio seguimos estudiando que subdominio es el que se despliega primero y si existen condiciones para lograr un desplegamiento totalmente reversible

y poder realizar estudios termodinámicos que nos permitan conocer la vía de plegamiento. Los datos anteriores nos permiten conocer que Abl puede soportar de forma íntegra hasta temperaturas no mayores de 40 °C.

Con la finalidad de conocer el efecto de Imatinib tanto en el plegamiento como en la estabilidad de Abl se realizó una medición de DC y un barrido de temperatura (**Figura 29B** y **figura 31** respectivamente) observando que el Imatinib no altera el contenido de estructura secundaria de Abl y que incrementa de forma marginal su estabilidad ocultando parcialmente la observación de la segunda etapa de desplegamiento que se ve claramente en el barrido de apo-Abl.

7.3. Energética de la interacción entre Abl e Imatinib

Las interacciones biomoleculares juegan un papel fundamental en los procesos biológicos. El reconocimiento de antígenos, el transporte de moléculas pequeñas dentro de la célula, la comunicación sináptica, la diferenciación celular, los sistemas de homeostasis corporal, la percepción sensorial, la interacción fármaco-receptor y la regulación hormonal son solo algunos ejemplos cuyo andamiaje procesal se sustenta en las interacciones no covalentes en donde las proteínas juegan un papel protagónico. Por lo tanto, la comprensión de cómo las proteínas son capaces de formar complejos estables a través de fuerzas no covalentes es, ha sido y seguirá siendo un aspecto sustantivo en la comprensión de las bases moleculares de la vida.

A pesar del gran avance tecnológico y la exactitud para determinar estructuras tridimensionales de proteínas y sus complejos, nuestra habilidad para predecir la afinidad en una interacción biomolecular aun permanece sobremanera limitada. Una razón de esta limitación es que la afinidad involucra la forma en la cual las fuerzas moleculares se combinan para hacer de la interacción biomolecular un proceso espontaneo. Además, la estructura congelada de un complejo proteico no aporta información sobre la interacción proteica que ocurre en solución como sucede en los sistemas biológicos, por lo que también hay que tomar en cuenta los rearrreglos del solvente como resultado de la unión. Una de las grandes ventajas del ITC y por lo que sobresale en comparación de otras técnicas biofísicas existentes para el estudio de interacciones proteicas, es que permite obtener información de la interacción proteína-fármaco en solución midiendo una señal universal, el calor, por lo que no se necesita de etiquetas reporteras como cromóforos o fluoróforos.⁵⁰

Englobando lo anterior, uno de los mejores ejemplos actuales es el paradigma de la unión de Imatinib a Abl y a Src, esta última es una cinasa involucrada en otros tipos de cáncer. Estructuras cristalográficas han mostrado que Imatinib se une a ambas cinasas con una estructura tridimensional sorprendentemente idéntica, sin embargo la afinidad de Abl por Imatinib es 3000 veces mayor que Src por Imatinib.^{23,51} Esto da cuenta de los modelos actuales de diseño de fármacos deben reconstruirse a partir de tomar en cuenta las propiedades energéticas de la interacción proteína-fármaco.

El papel central de las cinasas en procesos fisiológicos fundamentales ha provocado extensos estudios tanto bioquímicos como a nivel celular sobre las cascadas de señalización en

las que se ven involucradas y dado su activo papel en algunos tipos de cáncer, han funcionado como obvios blancos terapéuticos. Sin embargo, todas las cinasas muestran alto grado de similitud tanto en estructura como en secuencia, lo cual dificulta el diseño de inhibidores con alto grado de selectividad.

En este trabajo se describe por primera vez y a detalle la energética completa del proceso de asociación de Abl con Imatinib. En las mediciones realizadas en el rango de temperaturas de 27.5 a 35 °C, la formación del complejo Abl-Imatinib presentó valores de K_a del orden de $15.2 - 23.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ que en términos de $K_d = 42 - 65 \text{ nM}$, lo que concuerda con diferentes reportes en la literatura a 25 °C ($K_d = 37-57$,¹⁹ 80 ,²³ 50^{46} nM) también obtenidos mediante ITC, sin embargo cabe mencionar que ningún informe muestra o discute datos termodinámicos de la asociación. A temperaturas de 25 y 20 °C la tendencia de la K_a fue disminuir hasta 4.5 y $1.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($K_d = 218$ y 521 nM) respectivamente. De tal forma que la K_a se muestra independiente de la temperatura.

Energéticamente, la formación del complejo Abl-Imatinib presentó valores de ΔG_a favorables del orden de -8.4 a -10.3 kcal/mol , lo cual indica la alta estabilidad del complejo y la espontaneidad de su formación.

En la interacción Abl-Imatinib, participan fuerzas no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals de tipo hidrofóbicas. Estas interacciones nos dan parte del componente entálpico denominado entalpia intrínseca (ΔH_{int}) la cual es favorable. El otro componente llamado entalpia de solvatación (ΔH_{solv}) refiere a las moléculas de agua que deben ser desplazadas para que la interacción proteína-fármaco se lleve a cabo, por lo que este componente es desfavorable. Con esto comprendemos que $\Delta H_a = \Delta H_{\text{int}} + \Delta H_{\text{solv}}$. Nuestros resultados muestran valores de ΔH_a favorables que se incrementan conforme se aumenta la temperatura, este fenómeno es evidente incluso a partir de la superposición de las isotermas de unión obtenidas en este estudio (**Figura 35**). Esta dependencia térmica del ΔH_a es debido a que a temperaturas más bajas las moléculas del solvente que también tienen interacciones entre sí, tienen una energía cinética más débil y una asociación estructural entre ellas más fuerte, por lo que hay que pagar un costo energético mayor para desplazarlas de la interfase de interacción cuando se forma el complejo Abl-Imatinib. Conforme se incrementa la temperatura las moléculas de agua contienen una energía cinética mayor y una interacción estructural entre ellas más lábil promoviendo que su remoción de la interfase de unión del

complejo Abl-Imatinib, tenga un costo energético menor y la asociación sea más favorable en términos de ΔH_a , resultando en una entalpia favorable a menores temperaturas, pero en una entalpia aun más favorable a mayores temperaturas. También se debe al número tan grande de interacciones no covalentes que se establecen entre Abl e Imatinib (ΔH_{int}), ya que a temperaturas mayores la estabilidad de los contactos electrostáticos en el complejo proteico son más favorecidos.

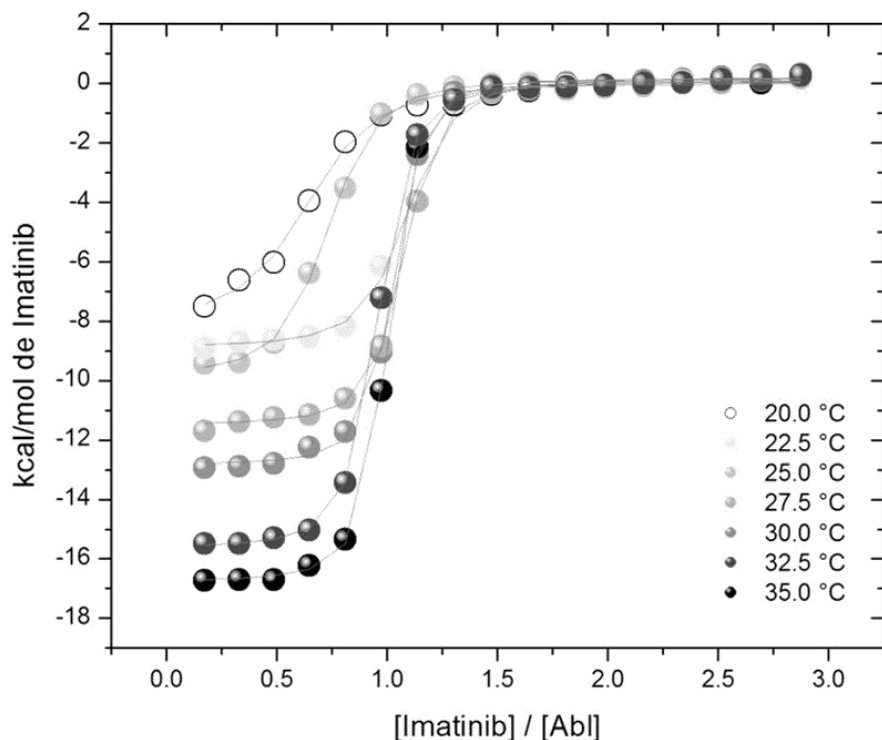


Figura 35. Superposición de las isotermas de unión del complejo Abl-Imatinib obtenidas a diferentes temperaturas en donde se observa la dependencia térmica del ΔH_a .

El otro componente termodinámico involucrado en la asociación Abl-Imatinib es el componente entrópico ΔS_a que a su vez está formado por otros tres componentes $\Delta S_a = \Delta S_{conf} + \Delta S_{solv} + \Delta S_{roto-tras}$. Considerando a una proteína y a un ligando por separado, cada uno tiene tres grados de libertad tanto traslacional como rotacional, y al quedar en complejo proteína-ligando se pierden tres grados de libertad lo que es desfavorable en términos de entropía, ya que se pierden grados de libertad ($\Delta S_{roto-tras}$), cabe mencionar que este componente es constante y relativamente pequeño y corresponde aproximadamente a $-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para una unión

bimolecular o 1:1.⁵² Además de tener movimientos libres, en particular los ligandos tienen movimientos intramoleculares de torsión libres entre sus átomos componentes, los cuales al interactuar con la proteína son congelados o rigidificados lo cual es desfavorable en términos de entropía, este componente se denomina entropía conformacional (ΔS_{conf}). La entropía de solvatación (ΔS_{solv}) (en analogía con el ΔH_{solv}), se refiere al reordenamiento de las moléculas del solvente alrededor del complejo Abl-Imatinib. Debido al desplazamiento y reordenamiento de moléculas de solvente se ganan grados de libertad, lo cual resulta en un componente entrópico favorable para la unión biomolecular. Este efecto es predominante en las asociaciones de tipo hidrofóbicas donde al existir una interacción entre dos compuestos hidrofóbicos vecinos (proteína y ligando) hay un desplazamiento y reordenamiento de moléculas de agua minimizando la exposición al solvente de ambos, lo que crea una entropía favorable.

A temperaturas de 20 y 22.5 °C, los valores del componente entrópico para la interacción Abl-Imatinib fueron ligeramente favorables debido a que las moléculas de solvente al ser más estables en términos de interacciones entre ellas, son desplazadas más efectivamente de la interfase de unión Abl-Imatinib. Conforme se incrementa la temperatura la entropía de asociación se vuelve más desfavorable hasta llegar a un $-T\Delta S = 6.4$ kcal/mol en el caso de 30 °C, lo que sugiere que en la unión de Abl con Imatinib el componente de entropía conformacional (ΔS_{conf}) es más grande que la entropía de solvatación. Esto indica que tras la unión de Abl con Imatinib existe una rigidificación muy fuerte del complejo Abl-Imatinib debido a que las interacciones no covalente del complejo Abl-Imatinib son muy fuertes y/o numerosas. Lo anterior correlaciona con los valores favorables y grandes de ΔH_a los cuales se incrementan conforme se incrementa la temperatura. En base a lo anterior, la formación del complejo Abl-Imatinib es un proceso gobernado entálpicamente.

Debido a que el ITC provee la firma termodinámica completa de fármacos candidatos a optimización, en el diseño de fármacos, afinidades altas requieren contribuciones tanto entálpica- como entrópicamente favorables. Un ejemplo importante de la optimización entálpico-entrópica es la optimización de inhibidores de la proteasa HIV-1 del virus del VIH en donde se mostró que la afinidad es optimizada a través de una compensación entálpico-entrópica.^{53,54} Otro ejemplo es la optimización entálpica de las estatinas.⁵⁵ Chaires recapitula importantes ejemplos de la optimización energética de fármacos.³⁷

Debido a que conocemos con suficiente detalle los orígenes moleculares de la entalpía y la entropía, así como el papel de los grupos polares y no polares en la formación de complejos proteicos (**Figura 36**), podríamos construir un modelo energético-estructural de diseño de fármacos lo suficientemente cuantitativo para proponer modificaciones químicas pertinentes y lograr un desarrollo racional de fármacos más efectivo, maximizando la selectividad y la afinidad,⁵⁶ seguramente el ITC constituirá la técnica clave para lograr este objetivo.

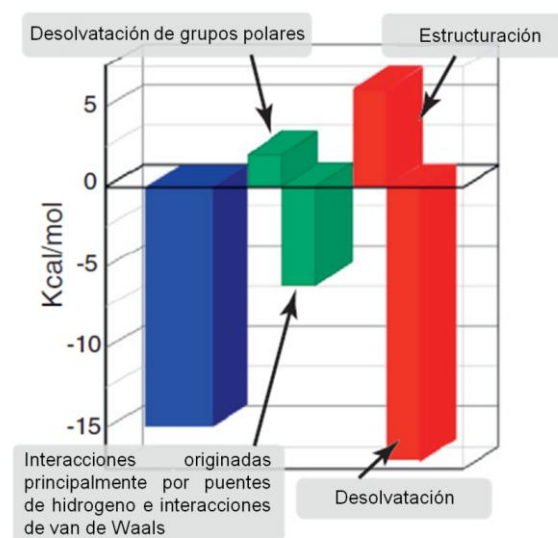


Figura 36. Contribución de las interacciones proteicas a la firma termodinámica.

En la **figura 37** se muestra la firma termodinámica para la formación del complejo Abl-Imatinib a diferentes temperaturas y para el complejo Abl-MgATP. La formación del complejo Abl-Imatinib es dirigida exclusivamente por el componente entálpico lo cual se debe a la abundante formación de interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, puentes salinos) mientras que el componente entrópico es desfavorable debido a la estructuración o rigidificación del complejo. Aunque el Imatinib tiene alta afinidad por Abl, el hecho de que sea solo dirigido por uno de los dos componentes elementales del ΔG_a , podría hacer que disminuya en alguna de sus otras propiedades biológicas como por ejemplo la selectividad, solubilidad, etc. La firma termodinámica de la formación del complejo Abl-MgATP a 25 °C hace evidente la superioridad del Imatinib en la asociación con Abl, lo que explica el alto grado de inhibición de la actividad tirosina cinasa de Abl. El complejo MgATP se une a Abl de una forma entálpicamente dirigida con el componente entrópico ligeramente favorable.

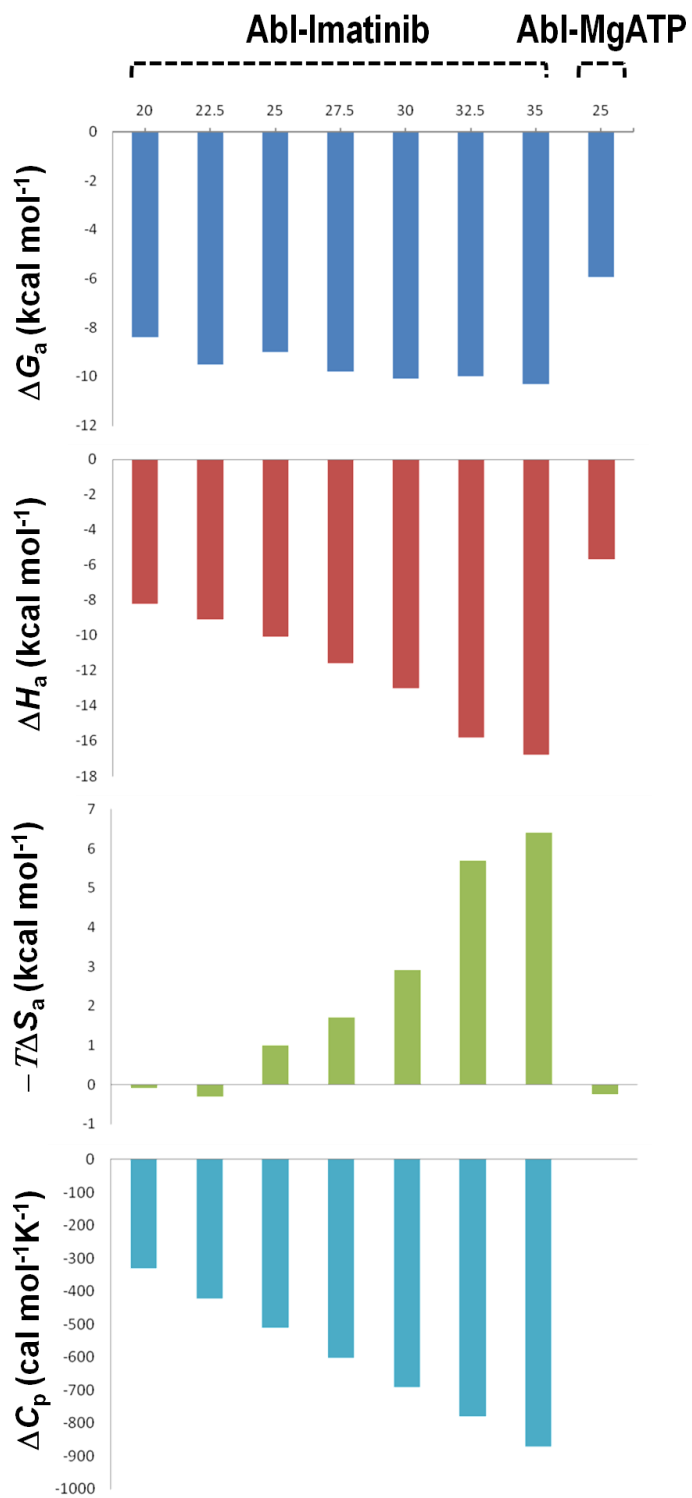


Figura 37. Firmas termodinámicas de la asociación de Abl-Imatinib a diferentes temperaturas y de Abl-MgATP a 25 °C obtenidas mediante ITC

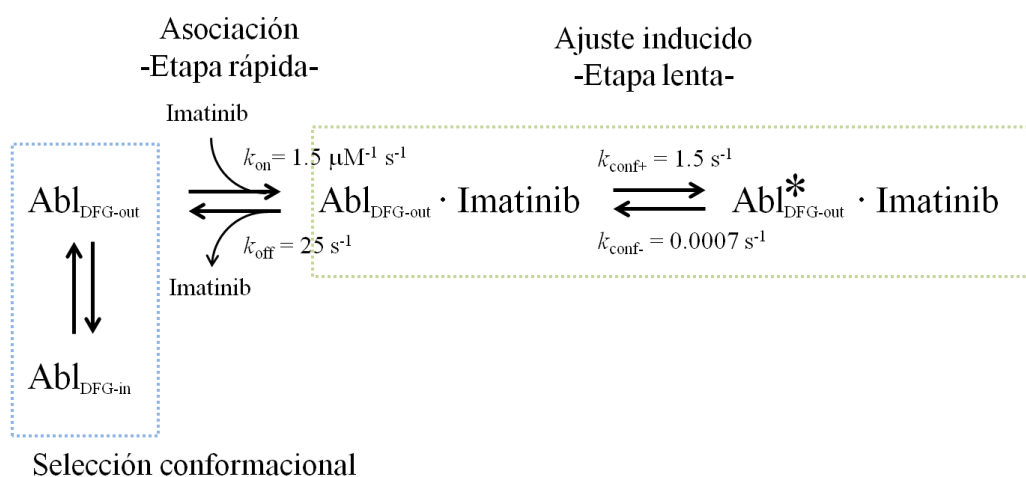
7.4. Cambios conformacionales de Abl tras la unión de Imatinib

Los cambios conformacionales acoplados a la interacción proteína-ligando constituyen las bases estructurales y energéticas fundamentales de la cooperatividad, alosterismo y en general de la regulación de las proteínas. En este sentido el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) juega un papel primordial en la determinación de la energética asociada al plegamiento proteico y al reconocimiento molecular o interacción proteína-ligando, ya que es un sensor de los rearrreglos del solvente alrededor de los solutos. La dependencia del ΔH_a con respecto a la temperatura nos proporciona directamente el valor de ΔC_p el cual es asociado al cambio de áreas superficiales accesibles al solvente tanto polares como no polares (ΔASA_p y ΔASA_{np} respectivamente), es decir, el ocultamiento o exposición al solvente de residuos no polares y polares. Lo anterior se traduce en la determinación del cambio conformacional que sufre la proteína tras la unión de un ligando.^{57,58}

Grandes cambios en el ΔC_p dan evidencia de la existencia de interacciones hidrofóbicas en un proceso de unión biomolecular. En el caso de la exposición de un residuo hidrofóbico u ocultamiento de un residuo polar en un medio acuoso, la estructuración de moléculas de agua alrededor del residuo son desestabilizadas a medida que se aumenta la temperatura absorbiendo la energía térmica lo que resulta en un aumento de la capacidad calorífica ($\Delta C_p > 0$) y experimentalmente será más difícil el incremento de la T del medio acuoso. Por el contrario el ocultamiento de residuos hidrofóbicos o exposición de residuos polares da lugar a un ΔC_p negativo debido a que los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura del agua son tan energéticos que no pueden absorber la energía térmica y la T aumenta más fácilmente.⁴³

El *loop* de activación en el dominio cinasa de Abl es capaz de oscilar entre las conformaciones DFG-*in* y DFG-*out* y se sabe que el Imatinib se une a la conformación DFG-*out*. Sin embargo debido a que el *loop* de activación presenta una alta flexibilidad conformacional no se ha logrado obtener de forma exitosa la estructura cristalográfica en su forma apo. Experimentos de resonancia magnética nuclear tampoco han sido exitosos en la resolución de la estructura apo-Abl debido a que las señales que corresponden al *loop* de activación son ausentes en el espectro. De este modo no existe evidencia experimental que nos aporte información profunda sobre los cambios conformacionales o rearrreglos estructurales que tienen lugar en Abl tras la unión de Imatinib.

Recientemente Kern y colaboradores, combinaron técnicas de fluorescencia cinéticas con resolución de milisegundos y resonancia magnética nuclear con precisión residuo-específica para elucidar y proponer un novedoso mecanismo cinético para la formación del complejo Abl-Imatinib, descubriendo que la unión a Imatinib tiene lugar en dos etapas tras sufrir una selección conformacional debido a que Imatinib solo se une a Abl en su conformación DFG-out. Las dos etapas consisten en, una etapa rápida que implica solamente la asociación física del complejo Abl-Imatinib: $\text{Abl}_{\text{DFG-out}} + \text{Imatinib} \leftrightarrow \text{Abl}_{\text{DFG-out}} \cdot \text{Imatinib}$, seguida de una etapa lenta donde ocurre una transición estructural denominada ajuste inducido: $\text{Abl}_{\text{DFG-out}} \cdot \text{Imatinib} \leftrightarrow \text{Abl}^*_{\text{DFG-out}} \cdot \text{Imatinib}$, donde Abl* es la proteína en un estado conformacional que estabiliza la interacción con Imatinib, esta segunda etapa corresponde a un reordenamiento estructural después de la asociación del fármaco, cuyo modelo se muestra a continuación.⁵¹



Sin embargo este modelo no nos aporta información sobre la magnitud de los cambios conformacionales. En este trabajo haciendo uso de la calorimetría presentamos por primera vez la caracterización energético-estructural detallada que devela la magnitud de los cambios conformacionales en la formación del complejo Abl-Imatinib. Como se mencionó anteriormente la medición de la interacción de Abl-Imatinib a diferentes temperaturas nos permitió la obtención del ΔC_p , que es un indicador de los cambios conformacionales en la formación de complejos proteicos.

En la formación del complejo Abl-Imatinib, se mostró que conforme se incrementa la temperatura el ΔH_a se va incrementando de forma clara como se observa en las isotermas de unión (**Figura 35, Tabla 2**).

El análisis de la dependencia del ΔH_a en función de la temperatura ajustó a una función polinomial de segundo orden (**Figura 33**), indicando una fuerte dependencia del ΔC_p con respecto a la temperatura de tal modo que obtenemos un ΔC_p para cada valor de T (**Tabla 2**), con valores de ΔC_p que van incrementándose negativamente de $-331 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $-871 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Esto sugiere que la cantidad de ASA tras la formación del complejo cambia conforme al incremento de temperatura.⁴⁹

A continuación para comprender la magnitud del cambio conformacional en base a los valores de ΔC_p se realizó la determinación del cambio de área superficial accesible al solvente (ΔASA) polar y no polar basada en la estructura cristalográfica del complejo Abl-Imatinib (PDB: 2HYY) empleando el software NACCESS de acuerdo a Bello y colaboradores.⁵⁹ Este programa nos permite calcular las áreas polares y no polares de los componentes de un complejo proteína-ligando por separado obtenidos a partir de la estructura cristalográfica y determinar los valores de ΔASA correspondientes (**Tabla 4**).

Tabla 4. Valores obtenidos de áreas superficiales (A) en Å^2 para los componentes del complejo Abl-Imatinib (PDB: 2HYY) y los respectivos ΔASAs calculados mediante la ecuación $\Delta\text{ASA} = A_{\text{Abl-Imatinib}} - A_{\text{Abl}} - A_{\text{Imatinib}}$.

	$A_{\text{Abl}} (\text{Å}^2)$	$A_{\text{Imatinib}} (\text{Å}^2)$	$A_{\text{Abl-Imatinib}} (\text{Å}^2)$	$\Delta\text{ASA} (\text{Å}^2)$
Área polar	5056	90	4969	-177
Área no polar	7756	710	7501	-966
Área total	12814	800	12470	-1144

De acuerdo a Murphy y Freire⁶⁰ la transferencia de áreas no polares de un estado expuesto al solvente a un estado no expuesto ocasiona un decremento del ΔC_p de $0.45 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} (\text{Å}^2)^{-1}$ mientras que el ocultamiento de áreas polares genera un aumento de ΔC_p de $-0.27 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} (\text{Å}^2)^{-1}$ y mediante la parametrización:

$$\Delta C_p = -0.27 \Delta\text{ASA}_p + 0.45 \Delta\text{ASA}_{np} \quad (\text{ec. 11})$$

determinamos el ΔC_p calculado ($\Delta C_{p, \text{cal}}$) para una asociación de Abl con Imatinib tipo cuerpo rígido:

$$\Delta C_{p, \text{cal}} = -0.27 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} (\text{Å}^2)^{-1} (-177 \text{ Å}^2) + 0.45 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} (\text{Å}^2)^{-1} (-966 \text{ Å}^2) = \mathbf{-388 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}}$$

este es valor de $\Delta C_{p,cal}$ para la asociación de Imatinib con Abl sin cambio conformacional de tal forma que sirvió como referencia para interpretar en parte nuestros resultados. Este valor concuerda con los valores de ΔC_p experimentales obtenidos a 20 y 22.5 °C (-331 y -421 cal mol⁻¹ K⁻¹ respectivamente) lo que sugiere que a estas temperaturas la asociación de Imatinib no induce cambios conformacionales importantes mientras que a partir de 25 °C el ΔC_p al irse incrementando indica cambios conformacionales que se van evidenciando al aumentar la temperatura, es decir, que la cantidad de ASA se va incrementando.

Para estimar la cantidad de ASA que se va incrementando conforme se aumenta la temperatura calculamos el ΔASA a partir de los valores de ΔC_p experimentales (**Tabla 5**) mediante la misma parametrización mostrada en la ecuación 11, asumiendo las contribuciones del 15 y 85 % para los grupos polares y apolares respectivamente en base a los cambios de áreas calculados a partir de la estructura cristalográfica del complejo Abl-Imatinib de acuerdo a la **Tabla 4**.⁴⁹ A partir de los valores obtenidos de ΔASA se estimó la cantidad de residuos a los que corresponden estas áreas conforme a Paleskava y colaboradores.⁶¹

Tabla 5. Valores de ΔASA calculados a partir de la ecuación $\Delta ASA = \Delta C_p / [(-0.27) (0.15) + (0.45) (0.85)]$ y se asumió un área de 45 Å² por residuo.⁶¹

T, °C	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔASA (Å)	No. de residuos
20	-331	968	22
22.5	-421	1231	27
25	-511	1494	33
27.5	-601	1757	39
30	-691	2020	45
32.5	-781	2283	51
35	-871	2547	57

Una posible explicación para este fenómeno en base a los reportes previos que indican la alta flexibilidad del *loop* de activación es que a altas temperaturas este *loop* se encuentra con mayor movilidad de tal forma que se exponen más residuos hidrofóbicos los cuales debido a la asociación con Imatinib se ocultan por lo que existe un mayor ocultamiento de ASA (**Figura 38**). En este sentido lo que estaríamos evidenciando mediante los estudios calorimétricos sería

la magnitud del cambio conformacional debido a la rigidificación del *loop* de activación en Abl tras la asociación con Imatinib.

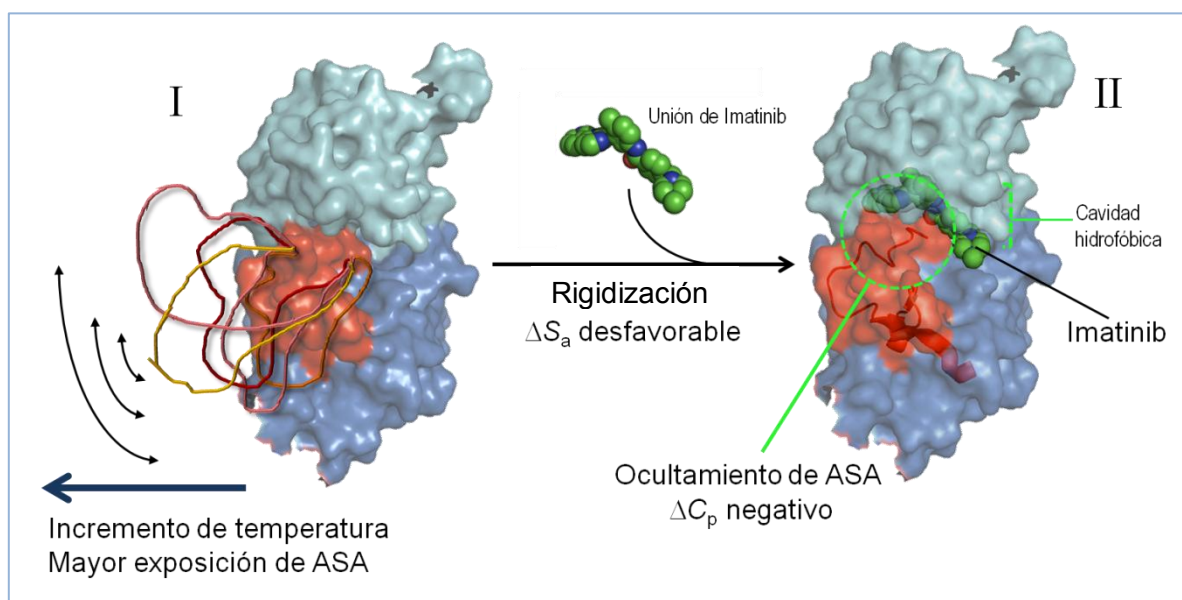


Figura 38. Ocultamiento de ASA tras la unión del Imatinib. **I)** La movilidad del *loop* de activación se incrementa dependientemente de la temperatura, a mayor temperatura existirá una mayor flexibilidad y por lo tanto una mayor exposición de residuos. **II)** Tras la unión del Imatinib existe una rigidificación del *loop* de activación y en consecuencia un ocultamiento de ASA.

Nuestros resultados mostraron que la asociación de Abl con Imatinib es un proceso caracterizado por ser entrópicamente desfavorable es decir el componente ΔS_{conf} es el dominante en la disección del ΔS_a . Para comprender más a fondo la magnitud del cambio conformacional se realizó la deconvolución de los componentes que contribuyen al ΔS_a de acuerdo a Paleskava y col.,⁶¹ de esta forma es posible conocer el número de residuos que son afectados por la interacción Abl-Imatinib, es decir que pierden grados de libertad debido al congelamiento de sus enlaces covalentes sencillos.

La contribución entrópica total (ΔS_a) en la unión de un ligando es originada a partir de sus componentes ΔS_{conf} , ΔS_{solv} y $\Delta S_{\text{rot-tras}}$. Para aproximarnos al término ΔS_{solv} para cualquier temperatura empleamos la siguiente ecuación de acuerdo con Baldwin:⁶²

$$\Delta S_{\text{solv}} = \Delta C_p \ln (T/T_s) \quad (\text{ec. 12})$$

en donde T_s es la temperatura a la cual la contribución del solvente al cambio de entropía es igual a cero y cuyo valor es 112 °C. El término $\Delta S_{\text{rot-tras}}$ contribuye con aproximadamente $-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para eventos de asociación de complejos binarios. Finalmente el componente ΔS_{conf} lo calculamos de forma sencilla a partir de su despeje de la ecuación 6 (**Tabla 7**).

La deconvolución de los componentes entrópicos mostró valores desfavorables relativamente grandes en el componente ΔS_{conf} . Debido a que el ΔS_{conf} se origina a partir de la pérdida de movilidad de los residuos que están en contacto directo con el ligando y por un incremento en la rigidificación de los dominios principalmente en el área de unión al fármaco, calculamos el número de aminoácidos que participan en la interacción mediante la ecuación:

$$X_{\text{residuos}} = \Delta S_{\text{conf}} / -4.3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \quad (\text{ec. 13})$$

donde X_{residuos} es el número de residuos que pierden grados de libertad, y $-4.3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ es la contribución del cambio de entropía conformacional promedio por aminoácido (**Tabla 7**).⁶³

Tabla 7. Deconvolución de los cambios de entropía para la asociación de Abl-Imatinib a diferentes temperaturas.*

$T, \text{ }^\circ\text{C}$	ΔS_a $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	ΔS_{conf} $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	ΔS_{solv} $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	$\Delta S_{\text{rot-tras}}$ $\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	No. de residuos
20	0.3	-82.0	90.3	-8	19
22.5	1.0	-102.3	111.3	-8	24
25	-3.3	-126.1	130.8	-8	29
27.5	-5.6	-146.5	148.8	-8	34
30	-9.5	-166.9	165.4	-8	39
32.5	-18.6	-191.2	180.5	-8	44
35	-20.7	-207.0	194.2	-8	48

* ΔS_a , cambio de entropía total; ΔS_{solv} , cambio de entropía de solvatación; ΔS_{conf} , cambio de entropía conformacional; $\Delta S_{\text{rot-tras}}$, cambio de entropía roto-traslacional.

Los resultados muestran que a 20 °C hay 19 residuos que son rigidizados, este número se incrementa conforme se incrementa la temperatura hasta un total de 48 residuos a 35 °C. Esto concuerda con el número de residuos que son ocultados del solvente conforme se incrementa la temperatura calculados en base al ΔC_p (**Tabla 6**). Estos resultados proveen una estimación consistente que da cuenta de la magnitud del cambio conformacional que tiene lugar en Abl tras la unión de Imatinib. Lo anterior ayuda a reafirmar nuestro modelo propuesto, en donde antes de la asociación de Imatinib existen numerosos residuos en el loop de activación con mucha movilidad conformacional que se incrementan conforme aumenta la temperatura de tal forma que mientras más movilidad exista, más exposición tendrá lugar y tras la asociación de Imatinib más residuos serán ocultados y rigidificados (**Figura 38**).

Es indispensable conocer los parámetros termodinámicos de la asociación proteína-fármaco lo que implica conocer a fondo el comportamiento y la naturaleza de la interacción, incluyendo los cambios conformacionales que resultan del proceso de asociación. En este trabajo se mostró por primera vez la energética involucrada y los cambios conformacionales en la formación del complejo Abl-Imatinib. Esto es solo el comienzo, es necesario tener un set de varias firmas termodinámicas que incluyan a otros compuestos como dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib, entre otros para poder establecer un modelo energético-estructural que nos dirija hacia nuevos inhibidores optimizados tanto energético como estructuralmente.

Pero ¿Cómo podemos optimizar los componentes entálpico y entrópico de un fármaco? Las características buscadas para un fármaco son la potencia la cual está dada por la afinidad, es decir el aumento de su ΔG_a , y la selectividad es decir que los fármacos deben unirse exclusivamente a sus blancos. Para lograr la máxima potencia de un fármaco ambos componentes de ΔG_a deben ser favorables. La entalpía se puede optimizar con la incorporación o reacomodo de grupos polares, lo que tiende a aumentar la especificidad y la solubilidad del compuesto además de disminuir la distribución a ambientes no deseados. La entropía se puede optimizar eliminando o sustituyendo enlaces rotables mediante la fijación de grupos funcionales disminuyendo la entropía conformacional.

8. CONCLUSIONES

-El dominio cinasa de Abl recombinante fue sobreexpresado y purificado en bacteria exitosamente con un rendimiento (25-30 mg/mL) y pureza ($\geq 98\%$) adecuados para nuestros experimentos.

-El análisis de DC de Abl reveló un plegamiento característico de una α/β proteína, los barridos de temperatura mostraron una estabilidad térmica adecuada por debajo de 40 °C, así como dos transiciones en el desplegamiento térmico el cual fue solo parcialmente reversible. El complejo Abl-Imatinib mostró una estabilidad marginalmente mayor (aprox. 5 °C).

-Los determinantes energéticos de la interacción entre Imatinib y Abl fueron entálpicamente dirigidos y entrópicamente desfavorables con constantes de asociación de orden nM. La formación del complejo Abl-MgATP presentó prácticamente la misma firma termodinámica que para Imatinib, con un valor de K_a significativamente menor.

-Mediciones a diferentes temperaturas de la interacción Abl-Imatinib mostraron que el ΔC_p es fuertemente dependiente de la temperatura. Estas determinaciones nos permitieron conocer que tras la unión de Imatinib existe un reordenamiento conformacional el cual es mayor conforme se incrementa la temperatura.

-Este trabajo constituye el primer reporte detallado de la energética asociada a la interacción de Abl-Imatinib, aportando información sobre las bases energético-estructurales que rigen la inhibición de Abl por Imatinib.

9. PERSPECTIVAS

Este trabajo es parte de un proyecto global encaminado hacia la comprensión de los factores subyacentes al funcionamiento de proteínas con arquitectura modular. Particularmente nuestro modelo de estudio, la interacción de la tirosina cinasa Abl con inhibidores nos permitirá comprender a nivel energético las bases moleculares de la formación de complejos Abl-fármaco. Esto permitirá establecer el marco cuantitativo para el diseño racional de inhibidores tirosinas cinasas aumentando su selectividad y afinidad.

En este contexto se realizará la colección de firmas termodinámicas para los inhibidores de segunda generación más eficaces: dasatinib, nilotinib, bosutinib y más recientemente ponatinib, este último es activo sobre la mutante T315I por lo que será valiosa la información obtenida a partir de experimentos de ITC de Abl^{T315I} vs ponatinib.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Corrado C, Raimondo A, Flugy AM, Fontana S, Santoro A, Stassi G, et al. Carboxamidotriazole inhibits cell growth of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia cells including T315I Bcr–Abl mutant by a redox-mediated mechanism. *Cancer Lett.* 2011; 300: 205-214.
- ² Cervera-Cevallos EE. Biología molecular y tratamiento de la leucemia mieloide crónica. *Gac Méd Méx.* 2002; 138 suppl 1: S102-S105.
- ³ Roskoski R. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309: 709-717.
- ⁴ Experts in Chronic Myeloid Leukemia. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood.* 2013; 121: 4439-4442.
- ⁵ Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao N, Sawyers C. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001; 293: 876-880.
- ⁶ Sirvent A, Benistant C, Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell.* 2008; 100: 617–631.
- ⁷ Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCRABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 345-356.
- ⁸ Li S, Li D. Stem cell and kinase activity-independent pathway in resistance of leukemia to BCR-ABL kinase inhibitors. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 1251-1262.
- ⁹ Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005; 353: 172-187
- ¹⁰ Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 33-44.
- ¹¹ Pendergast AM. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res.* 2002; 85: 51-100.
- ¹² Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol.* 2002; 9: 117-120.
- ¹³ Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13: 559-569.
- ¹⁴ Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smigthgall TE. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J Biol Chem.* 2013; 288: 5443-5450.

-
- ¹⁵ Reddy EP, Aggarwal AK. The ins and outs of Bcr-Abl inhibition. *Genes Cancer*. 2012; 3: 447-454.
- ¹⁶ Wang q, Zorn J, Kuriyan J. A structural atlas of kinases inhibited by clinically approved drugs. *Methods Enzymol*. 2014; 548: 23-67
- ¹⁷ Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. 2002; 109: 275-282.
- ¹⁸ Levinson NM, Kuchment O, Shen K, Young MA, Koldobskiy M, Karplus M, et al. A Src-like inactive conformation in the Abl tyrosine kinase domain. *PLoS Biol*. 2006; 4: e144.
- ¹⁹ Shan Y, Seeliger MA, Eastwood MP, Frank F, Xu H, Jensen MO, et al. A conserved protonation-dependent switch controls drug binding in the Abl kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 139-144.
- ²⁰ Goldman JM, Melo JV. Targeting the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1084-1086.
- ²¹ Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1: 493-502.
- ²² Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-517). *Cancer Res*. 2002; 62: 4236-4243.
- ²³ Seelinger MA, Nagar B, Frank F, Cao X, Henderson MN, Kuriyan J. c-Src binds to the cancer drug Imatinib with an inactive Abl/c-Kit conformation and distributed thermodynamic penalty. *Structure*. 2007; 15: 299-311.
- ²⁴ Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to Imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009; 16: 122-131.
- ²⁵ Daub H, Specht K, Ullrich A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3: 1001-1010.
- ²⁶ Shah NP. Loss of response to Imatinib: Mechanisms and management. *Hematology ASH Educ Program*. 2005; 183-187.
- ²⁷ Hochhaus A, La Rosée P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid an overcome resistance. *Leukemia*. 2004; 18: 1321-1331.
- ²⁸ Weisberg E, Manley P, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of Bcr-Abl for the treatment of Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 345-356.

-
- ²⁹ Zhou T, Commodore L, Huang WS, Wang Y, Thomas M, Keats J, et al. Structural mechanism of the Pan-Bcr-Abl inhibitor Ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des.* 2011; 77: 1-11.
- ³⁰ Tanneeru K, Guruprasad L. Ponatinib is a Pan-Bcr-Abl kinase inhibitor: MD simulations and SIE study. *PLoS One.* 2013; 8: e78556.
- ³¹ Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-Approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36: 422-439.
- ³² Velazquez-Campoy A, Luque I, Freire E. The application of thermodynamic methods in drug design. *Thermochim Acta.* 2001; 380: 217-227.
- ³³ Davis AM, St-Gallay SA, Kleywerdt J. Limitations and lessons in the use of X-ray structural information in drug design. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 831-841.
- ³⁴ Kawasaki Y, Freire E. Finding a better path to drug selectivity. *Drug Discov Today.* 2011; 16: 985-990.
- ³⁵ Freire E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 869-874.
- ³⁶ Filguerira de Azevedo Jr W, Dias R. Experimental Approaches to evaluate the thermodynamics of protein-drug interactions. *Current Drug Targets.* 2008; 9: 1071-1076.
- ³⁷ Chaires JB. Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annu Rev Biophys.* 2008; 37: 135-151.
- ³⁸ Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase-role and significance in cancer. *Int J Med Sci.* 2014; 1: 101-115.
- ³⁹ Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist.* 2003; 8: 531-538.
- ⁴⁰ Arora A, Scholar EM. Role of tyrosines kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315: 971-979.
- ⁴¹ Pulido NO, Chavelas EA, Torner FJ, García-Hernández E. Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. In: García-Hernández E, Fernández-Velasco A, editors. *Advances in protein physical chemistry.* Kerala, India: Transworld Research Network; 2008. 115-138.
- ⁴² Perozzo R, Flokers G, Scapozza L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Sig Transd.* 2004; 24: 1-52.
- ⁴³ Homans SW. Dynamics and thermodynamics of ligand-protein interactions. *Top Curr Chem.* 2007; 272: 51-82.

-
- ⁴⁴ Freire E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discov Today Technol.* 2004; 1: 295-299.
- ⁴⁵ Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007; 6: 253.
- ⁴⁶ Seelinger MA, Young M, Henderson MN, Pellicena P, King DS, Falick AM, et al. High yield bacterial expression of active c-Abl and c-Src tyrosine kinases. *Prot Sci.* 2005; 14: 3135-3139.
- ⁴⁷ Correa D, Ramos C. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *J Biomed Res.* 2009; 3: 164-173.
- ⁴⁸ Kelly S, Price N. The use circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* 2000; 1: 349-384.
- ⁴⁹ Kuhle B, Ficher R. eIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining. *EMBO J.* 2014; 33: 1177-1191.
- ⁵⁰ Freyer MW, Lewis EA. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analyse, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol.* 2008; 84: 79-113.
- ⁵¹ Agafonov RV, Wilson C, Otten R, Buosi V, Kern D. Energetic dissection of gleevec's selectivity toward human tyrosine kinases. 2014; 21: 848-853.
- ⁵² Hard T. Dissecting the thermodynamics of DNA-protein interactions. En: Ladbury JE, Doyle ML, editores. West Sussex, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd; 2004. 81-92.
- ⁵³ Ohtaka H, Velazquez-Campoy A, Xie D, Freire E. Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: the binding thermodynamics of amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease. *Protein Sci.* 2002; 11: 1908-1916.
- ⁵⁴ Ohtaka H, Schon A, Freire E. Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations. *Biochemistry.* 2003; 42: 13659-13666.
- ⁵⁵ Carbonell T, Freire E. Binding thermodynamics of statin to HMG-CoA reductase. *Biochemistry.* 2005; 44: 11741-11748.
- ⁵⁶ Freire E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?. *Drug Discov.* 2008; 13: 869-874.
- ⁵⁷ Vega S, Abian O, Velazquez-Campoy A. On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochim Biophys Acta.* 2015; doi: 10.1016/j.bbagen.2015.102010. In press.
- ⁵⁸ Prabhu NV, Sharp KA. Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem.* 2015; 56: 521-548.

⁵⁹ Bello M, Pérez-Hernández G, Fernández-Velasco DA, Arreguín-Espinosa R, García-Hernández E. Energetic of protein homodimerization: effects of wáter sequestering on the formation of β -lactoglobulin dimer. *Proteins*. 2008; 70: 1475-1487.

⁶⁰ Murphy KP, Freire E. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem*. 1992; 43: 313-361.

⁶¹ Paleskava A, Konevega AL, Rodnina MV. Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocystein-specific translation factor SelB. *J Biol Chem*. 2012; 287: 27906-27912.

⁶² Baldwin RL. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 83: 8069-8072.

⁶³ Murphy KP, Xie D, Thompson KS, Amzel LM, Freire E. Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins*. 1994; 18: 63-67.