



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinantes energéticos de la interacción entre moléculas inhibitorias y el dominio cinasa de la oncoproteína Bcr-Abl

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:
MARIO ALBERTO TREJO PÉREZ

TUTOR
Dr. Enrique García Hernández
Instituto de Química

COMITÉ TUTOR
Dra. Lilian González Segura Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
Facultad de Química Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. diciembre, 2018



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.



La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través de los Proyectos PAPIIT IN200115 e IN205018, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 235831 y 166472; así como al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP). Este trabajo contó con el apoyo técnico de la Dra. Patricia Cano Sánchez, Q. Eréndira García Ríos y Q. Roció Patiño Maya para realizar las técnicas de biología molecular, la determinación de los espectros MALDI-TOF y de dicroísmo circular, respectivamente.

Dedicatorias

A mi familia

A mis padres **Sofía** y **Roberto** que me han demostrado que siempre que se quiere se puede y me han apoyado a lo largo de mi camino a pesar de todo... quienes han sido luz en la oscuridad en este camino de la vida los quiero mucho.

A mi hermana **Les** que ha sido mi amiga y cómplice en las muchas aventuras que hemos vivido juntos, eres alguien en quien puedo confiar siempre.

A mis abuelitos **Guille** y **Mario** quienes me han cuidado, criado y soportado cariñosamente durante toda mi vida. Y por ser el favorito.

A mis tías, tío y primos por siempre estar presentes en las buenas y las malas, y hacer mi vida un poco mejor.

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

...A mí por siempre pequeñita **Ailyn**, el mi razón de ser.

A mis amigos

Los gemelos y mis segundos hermanos **Robert** y **Vlado** quienes fueron mis primeros amigos en la FES y a quienes siempre les tendré un lugar en mi corazón. Muchas gracias por el apoyo y los consejos dados por más malos que sean.

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

A las ñoñas, **Magie**, **Mary**, **Thali** (no tan ñoña) y **Yas**. Por que me hacen ver el lado bonito y feo de la vida desde una perspectiva nada machista y soportarme en muchas cosas.

A **Dante** y **Chino** gracias por los momentos divertidos que hemos compartido son unos sujetos muy agradable par de manquitos.

A **Josh**, **Baruc** y **Lidia**... los extraño amigos, gracias por todo.... Josh eres el ñoño que más quiero a pesar de la distancia; Baruc gracias por ser mi sensei y enseñarme el lado divertido de todo; Lidia hola... te quiero mucho y sin ti no hubiera salido de la prepa, has crecido tanto que ya ni te reconoces.

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 mí, y que a pesar de no hablar entendemos que queremos decir.

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 platicas 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 sabes que siempre estaré a tu lado para lo que quieras.

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

A Brenda realmente sin ti no hubiera hecho muchas cosas en estos últimos meses, muchas gracias por todo; los regaños y los consejos y las pláticas raras. Dicen que las personas llegan (en este caso regresan) en los momentos indicados, de verdad gracias por tu apoyo.

Finalmente y no menos importante a Axel... sin palabras... gracias por todo, sabes la estima que te tengo eres un amigo especial y dramático. Me has demostrado que tarde o temprano todo llega.

Agradecimientos

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. Gracias por todo el apoyo dado.

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: Dra. Alejandra Cobarrubias, Dr. Alfredo Torres, Dra. Antonieta Chavéz, Dra. Cecilia Saavedra y Dr. Rogelio Rodríguez por sus valiosas enseñanzas, comentarios y sugerencias durante la maestría 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

Una vida sin examen no merece la pena ser vivida -Sócrates

Yo no estudio para saber más, sino para saber menos -Sor juana

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | 8 |
| RESUMEN | 9 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 10 |
| 1.1 BCR-ABL y leucemia mieloide crónica | 10 |
| 1.2 Estructura de ABL y BCR-ABL | 13 |
| 1.3 Domino de oligomerización de BCR | 18 |
| 1.4 Descripción estructural del dominio cinasa | 20 |
| 1.5 Bases estructurales de la unión de imatinib y dasatinib al dominio TK-ABL | 26 |
| 1.6 Termodinámica de la interacción proteína-ligando | 29 |
| 1.7 Principios de ITC | 33 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 37 |
| 3. HIPÓTESIS | 38 |
| 4. OBJETIVOS | 39 |
| 4.1 Objetivo general | 39 |
| 4.2 Objetivos particulares | 39 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 40 |
| 5.1 Expresión de proteína y purificación | 40 |
| 5.2 Espectrometría de masas | 41 |
| 5.3 Dicroísmo circular (DC) | 41 |
| 5.4 Calorimetría de titulación isotérmica | 41 |
| 6. RESULTADOS | 43 |
| 6.1 Sobre-expresión y purificación | 43 |
| 6.2 Dicroísmo circular | 44 |
| 6.3 Calorimetría de titulación isotérmica | 46 |
| 6.3.1 Energética de unión de TK-ABL a imatinib y dasatinib | 46 |
| 7. DISCUSIÓN | 53 |
| 8. CONCLUSIONES | 57 |
| 9. REFERENCIAS | 62 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

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

ASA: Área superficial accesible al solvente

ATP: Adenosin trifosfato

Bcr: Breakpoint Cluster Region

DC: Dicroísmo Circular

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

DFG-*in*: Asa de activación hacia afuera, conformación activa

DFG-*out*: Asa de activación hacia adentro, conformación inactiva

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 leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad que afecta a gran parte de la población, en la mayoría de los casos es causada por una translocación cromosómica generando como producto transcripcional una proteína quimérica llamada Bcr-Abl la cual se encuentra constitutivamente activa. El imatinib y el dasatinib son fármacos utilizados para el tratamiento de la LMC inhibiendo su actividad catalítica. Existen muchos estudios estructurales sobre la interacción entre el dominio cinasa de Bcr-Abl (TK-Abl) y sus inhibidores sin embargo los determinantes energéticos de la interacción aún no han sido descritos.

En este trabajo se realizó la sobreexpresión y purificación del dominio cinasa de Abl recombinante, el cual se obtuvo con una alta pureza y rendimiento. La caracterización de la proteína recombinante por dicroísmo circular mostró un espectro de una α/β -proteína. Mediante calorimetría de titulación isotérmica se obtuvieron los parámetros termodinámicos que rigen la asociación de imatinib y dasatinib a Abl a diferentes temperaturas. La formación de los complejos TK-Abl con imatinib y dasatinib, fue favorable y fue dirigida entálpicamente con el componente entrópico desfavorable. La afinidad de Abl por imatinib resulto ser ocho veces mayor a la de dasatinob. El cambio en la capacidad calorífica en la unión de imatinib mostró una dependencia térmica revelando que a temperaturas por arriba de 22.5 °C, Abl sufre cambios conformacionales de diferente magnitud conforme se aumenta la temperatura influyendo en la interacción con este fármaco, a las cuales dasatinib no es sensible.

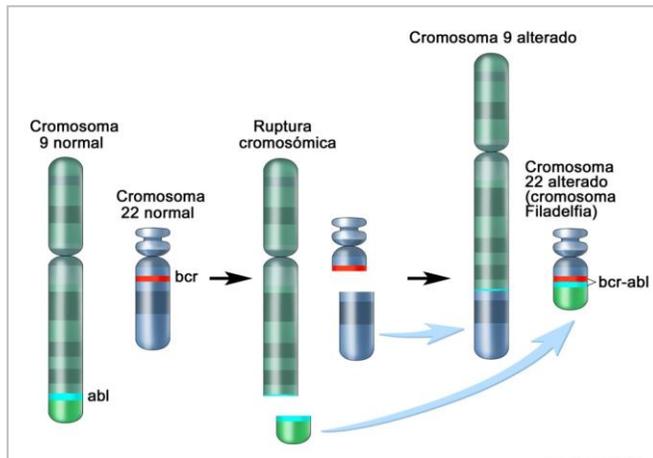
1. MARCO TEÓRICO

1.1 BCR-ABL y leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) se debe a la aparición del cromosoma filadelfia en células hematopoyéticas, que resulta en un incremento no solo de células mieloides sino también de células eritroides, monocitos y megacariocitos ¹. La LMC se origina en aproximadamente el 90% de las veces por un único evento genético de translocación recíproca t(9;22)(q34;q11), formando un cromosoma 22 anormalmente más corto, denominado cromosoma filadelfia (Ph).^{2,3,4} Esta leucemia afecta alrededor de 3 millones de pacientes a nivel mundial, de los cuales más de 900 000 son Ph+.⁵ En México, existen más de 8,000 casos diagnosticados de LMC, con una incidencia de dos casos/100,000 hab/año.⁶ 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.⁷

La formación del cromosoma Ph deriva en la fusión de los genes *BCR* (del inglés, *Breakpoint Cluster Region*) y *ABL* (del inglés, *ABelson Leukemia virus homologe*). El gen híbrido resultante es activo, traducándose a la oncoproteína BCR-ABL (**Figura 1**). La proteína de fusión se encuentra constitutivamente activa, y se acumula en citoplasma, a diferencia de ABL, la cual se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma.^{8,9} El gen *BCR* en el cromosoma 22 puede romperse en diferentes sitios. Si el procesamiento ocurre en el exón 12/13, se origina una proteína de 210 kDa (p210^{Bcr-Abl}), la cual se asocia a LMC (ocurre en el 90 a 95 % de las veces).^{4,10}

Figura 1. Translocación t(9;22) (q34;q11) que origina el cromosoma filadelfia. Segmentos de los brazos largos (q) de los cromosomas 9 y 22 sufren una ruptura en los sitios de los genes *ABL* y *BCR* respectivamente, los cuales se intercambian 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 (Adaptada de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cromosoma-filadelfia>).



ABL presenta un dominio cinasa altamente conservado entre las tirosina cinasas, que consta de ~300 aminoácidos. Este dominio cataliza la transferencia del fosfato- γ del ATP al grupo hidroxilo de un residuo de tirosina contenido en un péptido sustrato específico. ABL interacciona con una gran cantidad de proteínas celulares, incluidas proteínas de señalización, otras cinasas, fosfatasas, proteínas reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción, y proteínas del citoesqueleto. A su vez, se ve involucrada de forma importante en gran variedad de procesos biológicos fundamentales relacionados al crecimiento y supervivencia celular, por lo que cualquier alteración en la función de ABL a nivel molecular traerá consecuencias a nivel celular (Tabla 1).^{11,12,13}

Tabla 1. Comparación de ABL y BCR-ABL en activación y señalización. Adaptado de Greuber *et al.*¹³

| Proteína cinasa | ABL | BCR-ABL |
|---|--|---|
| Localización celular | -Citosólica -Citoesqueleto de actina -Nuclear | -Citosólica -Citoesqueleto de actina |
| Mecanismos de activación | -Disrupción regulada de interacciones intramoleculares -Fosforilación reversible de tirosinas | -Disrupción de interacciones inhibitorias por BCR -Fosforilación constitutiva de tirosinas -Oligomerización |
| Procesos celulares río arriba | -Estrés oxidativo -Activación por tirosinas cinasa receptoras -Estimulación de quimiocinas -Interacción con integrina -Interacción con cadherina -Daño al DNA -TGF β | -No aplica |
| Procesos celulares regulados río abajo | -Migración e invasión -Adhesión -Morfogénesis -Respuesta al daño al DNA -Senescencia -Proliferación y supervivencia -Endocitosis | -Supervivencia e inhibición de la apoptosis -Inhibición de la diferenciación -Auto renovación -Incremento de la motilidad -Pérdida de supresores de tumores |

Bajo condiciones normales, ABL se encuentra finamente controlada por varios mecanismos autorregulatorios. Estos mecanismos se han perdido debido a la fusión con la proteína BCR en la LMC. Un dominio de oligomerización en el fragmento BCR (residuos 1-72), esencial para la transformación neoplásica, promueve la formación de oligómeros, sobre-activando la actividad transfosforilante de BCR-ABL.¹⁴ La desregulación también se ve favorecida por la pérdida del grupo miristoilo autoinhibitorio presente en la región CAP de la ABL nativa. Por tanto, debido a la fusión con BCR, el dominio cinasa de BCR-ABL queda permanentemente activo, desregulado y con su actividad catalítica incrementada derivando en una transformación neoplásica, y el establecimiento y progresión de la enfermedad.¹¹

La fusión de ABL con otras proteínas está asociada a varios tipos de leucemias y tumores sólidos.^{14,16} Estas fusiones crean versiones oncogénicas de ABL cuya característica principal es la fusión con proteínas que aportan motivos que promueven la oligomerización y actúan incrementando la actividad cinasa, rompiendo interacciones intramoleculares de autoinhibición, y en consecuencia favoreciendo la sobre-activación y su actividad transformante a versiones celulares malignas. Algunos ejemplos de lo anterior es la fusión de ABL con ETV6 asociada a LMC, leucemia linfocítica aguda de células B (LLA-B), LLA de células T (LLA-T) y leucemia mieloide aguda (LMA). Estas traslocaciones pueden ocurrir tanto en células hematopoyéticas unipotentes, así como en células hematopoyéticas comprometidas. Las fusiones con las proteínas NUP214 (*Nucleoporin 214*) y EML1 (*Human Echinoderm Microtubule-associated Protein-like 1*) se asocian principalmente a LLA-T, y las fusiones con RCSD1, SFPQ (*Splicing Factor Proline and Glutamine rich*), ZMIZ1 (*Zinc Finger MIZ-Type Containing 1*), FOXP1 (*Forkhead box protein P1*) Y SNX2 (*Sorting Nexin 2*) están asociadas a LLA-B (**Figura 2**).¹³

Además de leucemias, ABL está involucrada de forma importante en diversos tipos de tumores sólidos como cáncer de mama, ovario, pulmón, colorrectal, renal y melanoma.¹⁵ En este sentido, la participación de ABL es muy poco conocida en contraste con la LMC. Los mecanismos moleculares de ABL que se han encontrado en tumores sólidos incluyen una alta expresión y/o activación de esta cinasa debido a amplificación génica, incremento en el mRNA y mutaciones somáticas (**Anexo 1**).^{13,16}

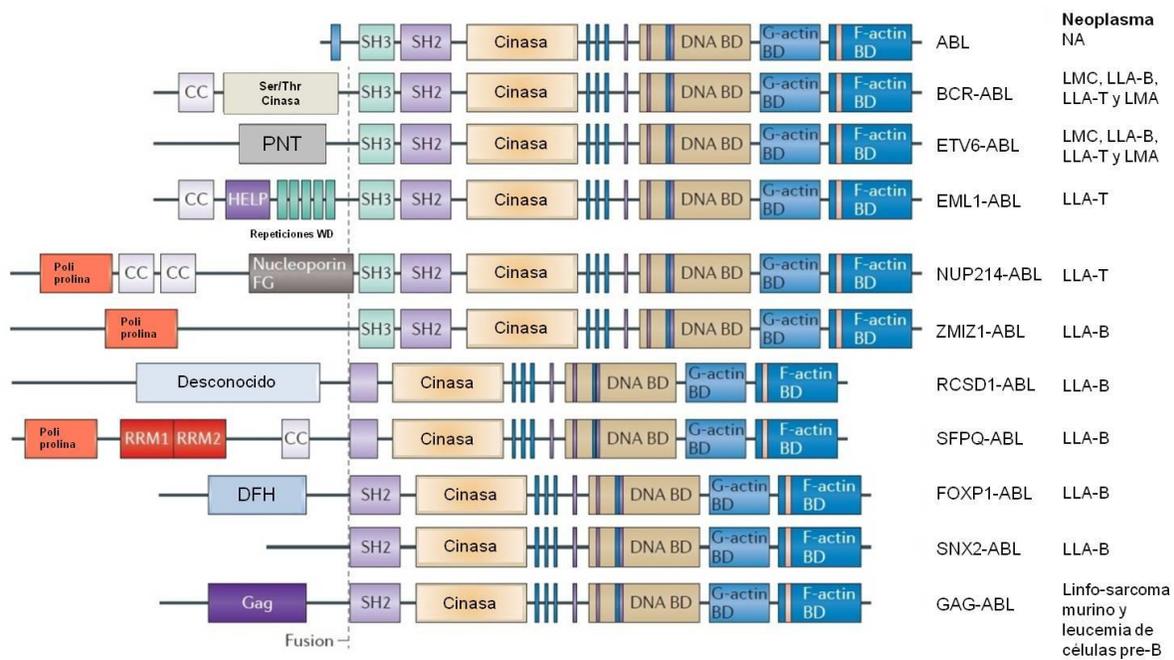


Figura 2. Versiones activadas de ABL por distintas translocaciones cromosómicas en leucemia. Dominio de unión a DNA (DNA BD), dominio de unión a G-actina (G-actin BD), Dominio de unión a F-actina (F-actin BD), dominio de oligomerización coiled-coil (CC), Dominio *pointed* (PNT), Dominio hidrofóbico parecido a proteínas EMAP (HELP, *hidrophobic EMAP-like proteins*), Triptófano-Aspartato (WD), nucleoporina con repeticiones de fenilalanina y glicina (Nucleoporin FG), motivo de reconocimiento de RNA (RRM), dominio *forkhead* (DFH), secuencias GAG (Gag). Adaptado de Greuber *et al.*¹³

1.2 Estructura de ABL y BCR-ABL

Desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal, ABL está conformada por los siguientes elementos: 1) una región CAP (residuos 2-60) que se puede encontrar miristoilada dependiendo de la isoforma de la enzima, 2) un dominio SH3 (residuos 61-121), 3) un dominio SH2 (residuos 127-217), 4) un *linker* de poliprolinas (LPXXP) (residuos 218-241) que enlaza el dominio SH2 con el dominio cinasa (residuos 242-515), 5) el dominio cinasa (TK-ABL) que consiste en un subdominio N (residuos 242-335) y un subdominio C (residuos 341-512), 6) secuencias ricas en prolina (PXXP), 7) motivos de localización nuclear, 8) un dominio de unión a DNA y 9) una secuencia de exportación nuclear flanqueada por dos dominios de unión a actina (**Figura 3A**). En la proteína quimérica BCR-ABL, se pierde parte de la CAP y, en consecuencia, el grupo miristoilo autorregulatorio está ausente (**Figura 3B**).^{11,17}

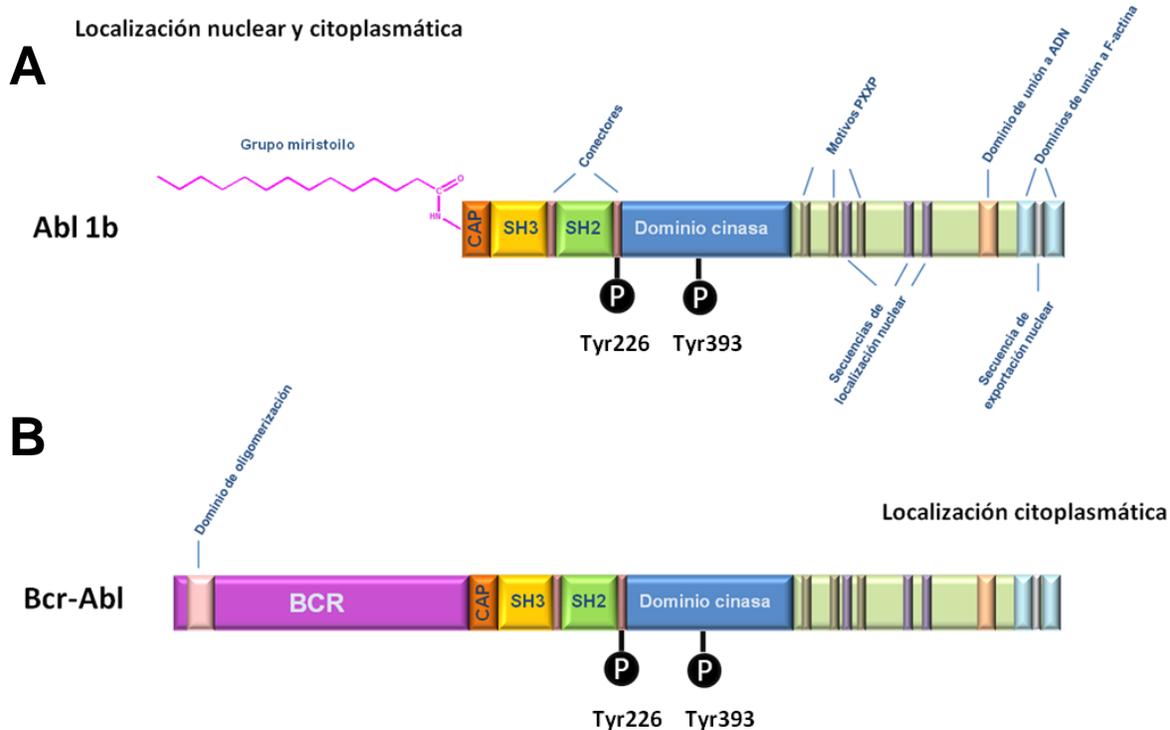


Figura 3. **A)** Esquema que muestra la organización estructural de la proteína ABL isoforma 1b, donde se pueden distinguir sus diferentes regiones y dominios, así como las tirosinas 226 y 393 que pueden ser fosforiladas y son claves en su regulación. **B)** Organización estructural de la oncoproteína 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 *et al.*¹¹

ABL es capaz de oscilar entre una conformación cerrada y otra abierta (**Figura 4**). La solución de diferentes estructuras cristalográficas de una construcción que contiene los dominios SH3-SH2-dominio cinasa ha permitido describir con detalle atómico el papel que juegan distintos elementos regulatorios en la adquisición de las dos conformaciones de la cinasa.¹⁸

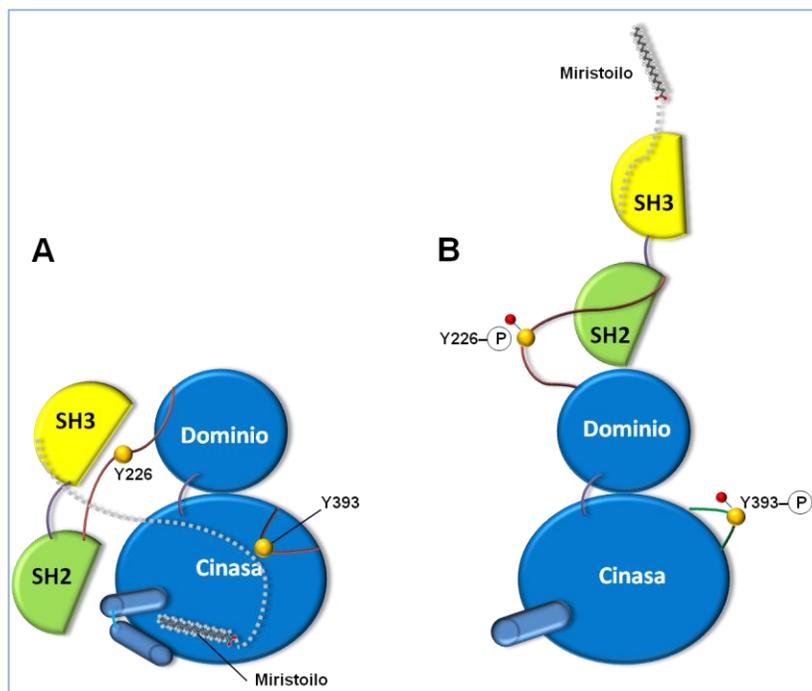


Figura 4. Esquema de las conformaciones de ABL. **A)** Conformación cerrada estabilizada por una interacción del grupo miristoilo de la CAP (línea punteada) con el dominio cinasa (azul). **B)** Conformación abierta favorecida por la fosforilación de los residuos Y226 y Y393. Adaptada de Saleh *et al.*¹⁹

En la **Figura 5** se muestra la estructura cristalográfica de una construcción que contiene los elementos SH3, SH2 y TK-ABL, que corresponde a la conformación cerrada de ABL. Estructuralmente, el dominio SH3 está conformado por dos 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 contribuye a estabilizar la unión entre SH3 y LPXXP está dado por la interacción de los residuos Y70 y Y115 en SH3 con un residuo P223 del motivo LPXXP. El dominio SH2 está conformado por una lámina- β antiparalela central flanqueada por dos hélices- α . El residuo Y139 del dominio SH2 forma una interacción hidrofóbica de apilamiento con el residuo Y342 que estabiliza la conformación cerrada de ABL. Esta interacción es posible solo cuando el grupo miristoilo se acopla en una región hidrofóbica del subdominio C, gracias a un cambio estructural en la hélice- α I que, unida al grupo miristoilo se divide en dos hélices- α más pequeñas denominadas α I y α I'. Esta conformación unida al miristoilo estabiliza por los residuos I540, V544 y L548 de la α I' que contactan con el miristoilo provocando la ruptura de la α I.¹⁸ Un elemento importante para la conversión a la conformación abierta es la fosforilación del residuo Y226 localizado en el motivo LPXXP, que permite la separación de los dominios SH3 y SH2 del

dominio cinasa, este último evento la lleva a su conformación abierta.²⁰ Estudios de NMR (del inglés, *Nuclear Magnetic Resonance*) y SAXS (del inglés, *Small-Angle X-ray Scattering*) revelan que apo-ABL se encuentra en una conformación cerrada y la principal interacción ocurre a través del dominio SH3 y el motivo LPXXP.^{21,22}

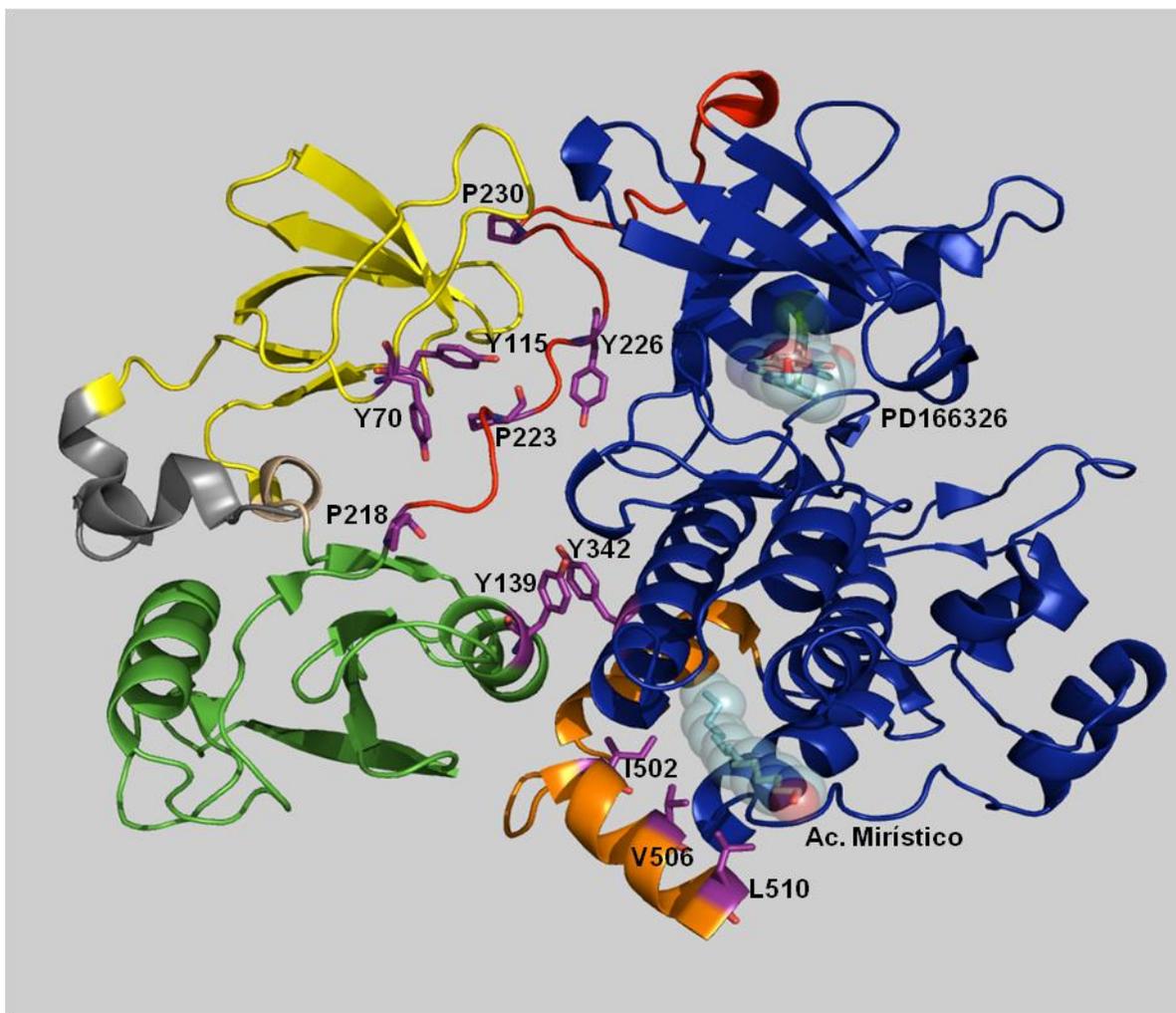


Figura 5. Estructura cristalográfica de ABL en conformación cerrada. En color azul muestra el dominio cinasa unido al inhibidor PD166326 y a una molécula de ácido mirístico (ambos azul claro), en rojo se muestra el *linker* LPXXP que une al dominio cinasa con el dominio SH2 (verde), este último con un residuo Y139 interacciona hidrofólicamente 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, la unión del miristoilo y la hélice- α I' (anaranjado) esta mediada por los residuos I502, V506 y L510. En púrpura se muestran los residuos de forma explícita. Figura elaborada con el software PyMOL a partir del PDB 2FO0 (Nagar *et al.*).¹⁸

En la conformación abierta (**Figura 6A**), ABL sufre un gran cambio conformacional, donde el dominio SH2 que interactúa con el subdominio C en la conformación cerrada, se posiciona acoplándose en una zona hidrofóbica denominada αC patch del subdominio N (**Figura 6B**). La principal interacción que estabiliza este acoplamiento de SH2 con el subdominio N está dada por el residuo I145 presente en el dominio SH2. En esta conformación las hélices αI y $\alpha I'$ se convierten en un solo elemento estructural denominado hélice- αI , el cual representa un impedimento estérico que evita la interacción de las tirosinas Y139 y Y342 y que en consecuencia evita el contacto del dominio SH2 con el subdominio C (**Figura 6C**).²³

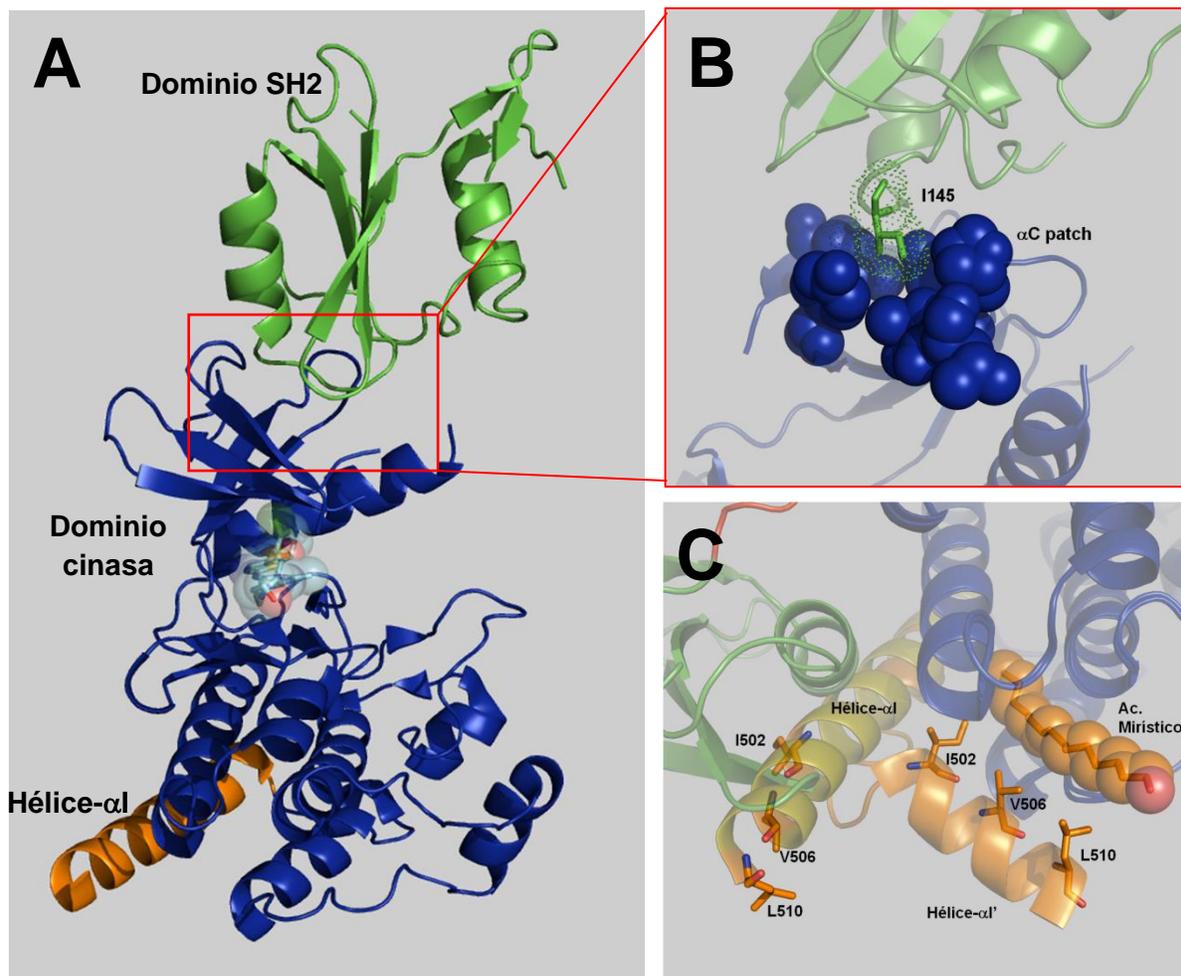


Figura 6. A) Estructura cristalográfica de ABL en conformación abierta, elaborada con el software PyMOL a partir del PDB 4XEY.²⁴ B) Interacción mediada por la I145 del dominio SH2 con la región αC patch del subdominio N del dominio cinasa. C) Impedimento estérico de la hélice αI para el acoplamiento del dominio SH2 con el subdominio C. En la figura se muestra la sobreposición de la hélice- αI en una estructura libre de miristoilo (PDB 3PYY) y las hélices- αI y $\alpha I'$ unidas a ácido mirístico mediante contactos hidrofóbicos establecidos por los residuos I502, V506 y L510 (PDB 2FOO).^{18, 24} Estos residuos rotan con respecto a la hélice- αI de la forma no unida a miristoilo. El código de colores para los dominios es el mismo que en la **Figura 5**.

1.3 Domino de oligomerización de BCR

El dominio de oligomerización (OLI) de BCR comprende los residuos 1-72. Al igual que el dominio TK-ABL, el dominio OLI es esencial para la actividad transformante de BCR-ABL. El dominio OLI se conforma de dos hélices- α , una pequeña denominada hélice- α 1 (residuos 5-15) y una más grande denominada hélice- α 2 (residuos 28-67) (**Figura 7A**); esta última contiene la región *coiled-coil* (residuos 30-65) basado en repeticiones de un patrón de siete aminoácidos con residuos hidrofóbicos en las posiciones 1 y 4 (repeticiones *heptad*).¹⁴

La oligomerización se da cuando dos monómeros se asocian para formar un dímero con sus hélices- α 2 antiparalelas, posicionando las hélices- α 1 junto a la hélice- α 2 del otro monómero. La formación del dímero se estabiliza por un total de 217 contactos de tipo van der Waals, siete puentes salinos y tres puentes de hidrógeno. Más de la mitad de la interfase está dada por las repeticiones *heptad* que incluyen a los residuos I31, L35, I42, L45, V49, M56, L59 y L63 que se empaquetan a modo de “cierre”. Estudios previos han demostrado que solo la α 2 es suficiente para llevar a cabo la oligomerización; sin embargo, la hélice- α 1 le ayuda a tener una mayor estabilidad y solubilidad dado que se une a la hélice- α 2, creando una región aromática y ocultándola de la superficie (**Figura 7B**).¹⁴

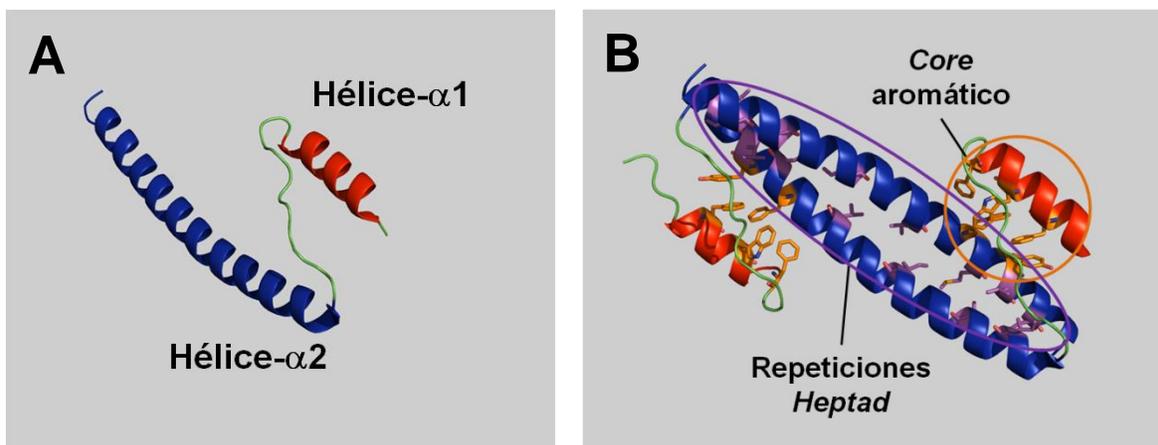


Figura 7. A) Estructura del dominio de oligomerización de BCR. En azul se muestra la hélice α 1 y en rojo la hélice α 2 que conforman al dominio. B) Interacciones que estabilizan el dímero. En púrpura se observan los residuos de las repeticiones *heptad* y en anaranjado los residuos que estabilizan a la hélice α 2 formando un *core* aromático. Elaborado con el software PyMOL a partir del PDB 1K1F (Zhao *et al.*).¹⁴

En la unión de dímeros para formar un tetrámero, la superficie de contacto entre ambos dímeros es significativamente menos polar que la expuesta al solvente. Los dímeros se asocian formando un ángulo de aproximadamente 130° entre los ejes de las hélices- $\alpha 2$ (**Figura 8**).¹⁴

En varios estudios se ha visto que la fusión de ABL con otras proteínas como ETV6, que también contiene un dominio de oligomerización (motivo hélice-loop-hélice), actúa de manera similar que el dominio OLI de BCR, sobre-activándola y jugando un papel esencial para la transformación maligna, originando así otros tipos de leucemias.^{13,14} La activación por dimerización en estos casos es parecida al modo en que se activan las tirosinas cinasas receptoras por la acción de sus ligandos, sugiriendo que la formación de tetrámeros es más eficiente en la activación de dominios funcionales río abajo.¹⁴

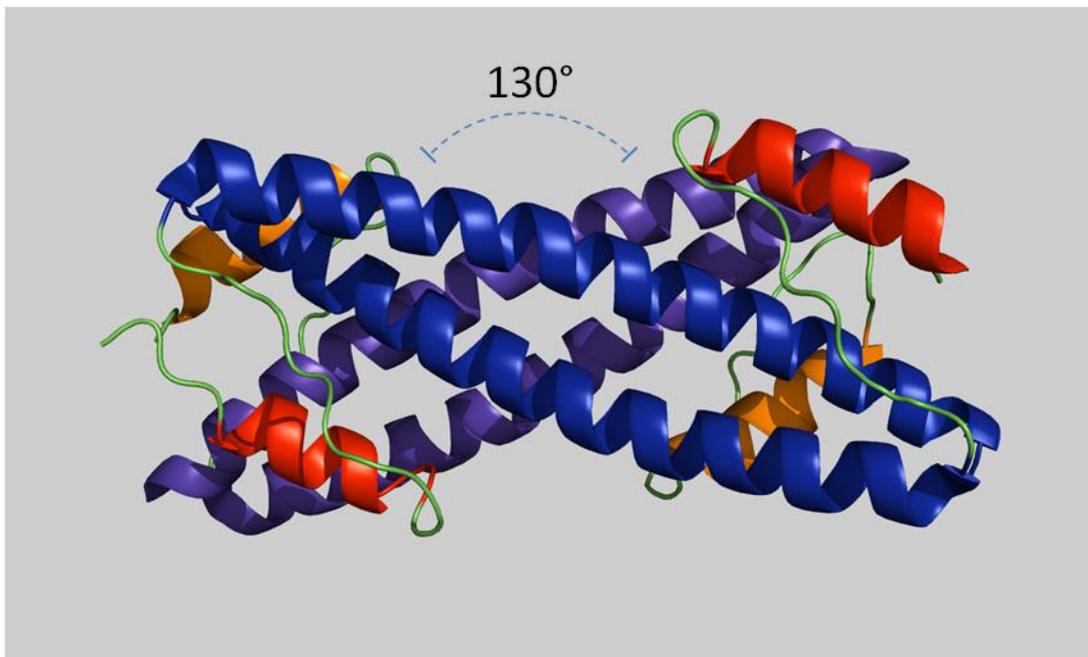


Figura 8. Estructura cristalográfica del tetrámero del dominio de oligomerización de BCR. Elaborado con el software PyMOL a partir del PDB 1K1F (Zhao *et al.*).¹⁴

1.4 Descripción estructural del dominio cinasa

El dominio cinasa de ABL (TK-ABL) presenta una forma bilobulada compuesta por un subdominio N-terminal (subdominio N) formado por cinco hebras- β antiparalelas y una prominente hélice- α , y un subdominio C-terminal (subdominio C) formado principalmente por hélices- α , siendo el responsable de la unión al péptido sustrato. En la interfase de ambos subdominios se encuentra el sitio catalítico, en 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 9A**).⁴ 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 denominado *P-loop* (residuos 248-257) que participa en la unión cubriendo a los fosfatos- β y - γ del complejo MgATP.²⁵ 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 9B**).²⁶

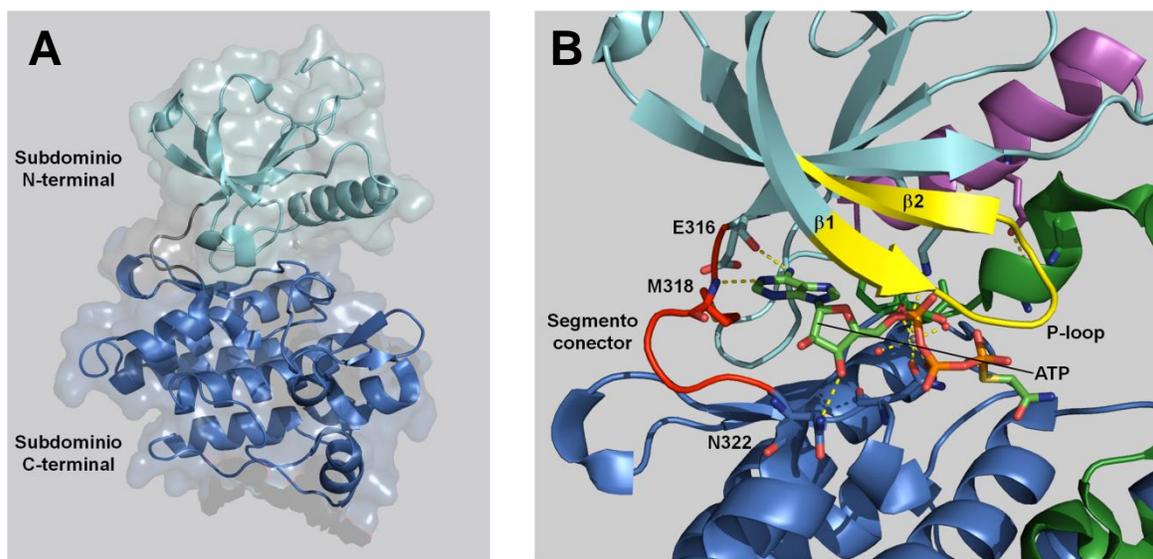


Figura 9. A) Estructura bilobulada del dominio cinasa de ABL (PDB 1IEP, Nagar *et al.*).²⁷ **B)** Estructura de ABL en complejo con un análogo de ATP y Mg(II) (PDB 2G1T, Levinson *et al.*),²⁸ endonde se muestra que el segmento conector (rojo) sirve de plataforma para el correcto posicionamiento del fragmento 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. Elaborado con el software PyMOL.

En el dominio TK-ABL, la hélice- α del subdominio N, denominada α C, contiene un residuo E286 que forma un puente salino con un residuo K271, estabilizando una orientación particular denominada α C-*in* (**Figura 10**).²⁰ Esta interacción está muy conservada en otras cinasas como Src y cinasas dependientes de ciclina (Cdk), en donde la hélice- α C adopta dos conformaciones distintas dependiendo del estado activo o inactivo de la cinasa, α C-*in* y α C-*out*, respectivamente.²⁹ En el caso de ABL, varias estructuras cristalográficas han mostrado que la conformación de la hélice- α C es de tipo α C-*in* tanto en su estado activo como inactivo. Sin embargo, en una estructura cristalográfica unida a un análogo de ATP y Mg(II), la hélice- α C adquiere una conformación similar a Src denominada Src-*like* (α C-*out*). La conformación α C-*out* en ABL resulta de la ruptura de la interacción glutamato-lisina, de tal forma que la hélice- α C gira 31° hacia afuera del sitio activo con respecto a la conformación α C-*in* y rota 34° sobre su propio eje situando al glutamato hacia el exterior del sitio activo. Esta conformación es estabilizada por los nuevos pares iónicos K271 con D381 y E286 con R386 (**Figura 11**). Se ha sugerido que el significado biológico de esta conformación intermedia de la hélice- α C (α C-*out*) de ABL es facilitar la interconversión dinámica entre sus estados activo e inactivo, así como permitir el acceso adecuado del complejo cosustrato MgATP.^{23,30} En la **Figura 12** se muestra la sobreposición de las conformaciones α C-*in* y α C-*out*, en donde se muestra el gran cambio conformacional en la hélice- α C, en las hebras- β 1 y - β 2 y el *P-loop*, mientras que el resto del subdominio N permanece prácticamente idéntico. Cabe mencionar que el residuo K271 está altamente conservado en proteínas cinasas y es esencial para la unión de los fosfatos- α y - β del MgATP (**Figura 13**).⁴

Figura 10. Estructura cristalográfica en la que se muestra la conformación αC -in del dominio cinasa de ABL (PDB 1OPJ, Nagar *et al.*).¹⁸ En azul claro se muestra el subdominio N. La hélice αC -in (verde) se estabiliza 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 interactúan se muestran de forma explícita en color naranja. Elaborada con el software PyMOL.

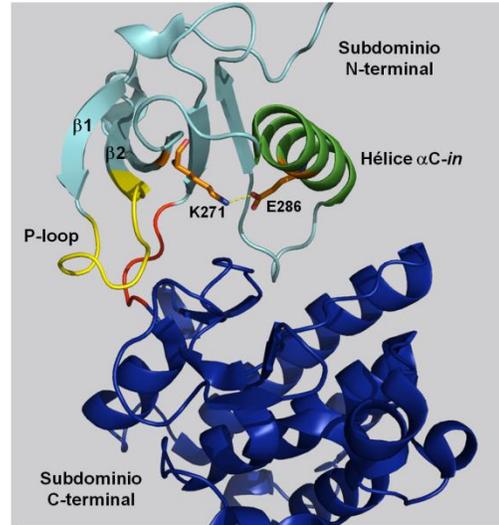


Figura 11. Estructura cristalográfica en donde se muestra la conformación αC -out del dominio cinasa de ABL (PDB 2G1T, Nagar *et al.*).²⁷ La hélice αC -out se estabiliza por un nuevo puente salino entre E286 y R386. El residuo altamente conservado K271 voltea hacia el sitio activo contactando con un puente salino al residuo D381 del subdominio C. El código de colores es el mismo que en la **Figura 8**. Elaborada con el software PyMOL.

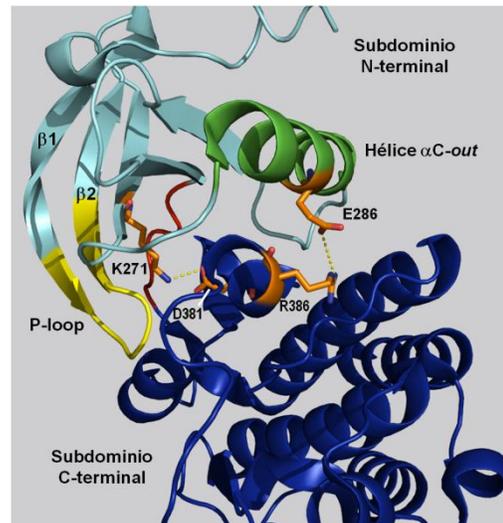
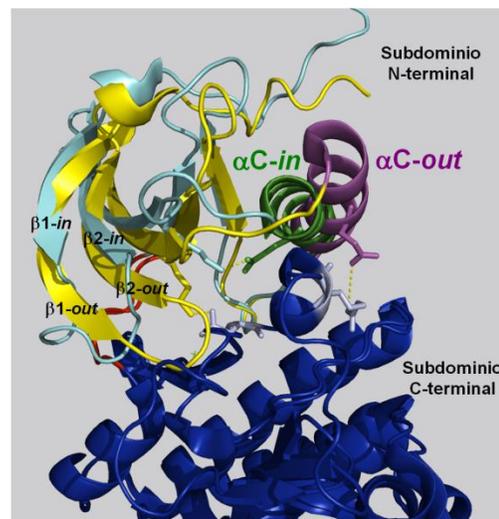
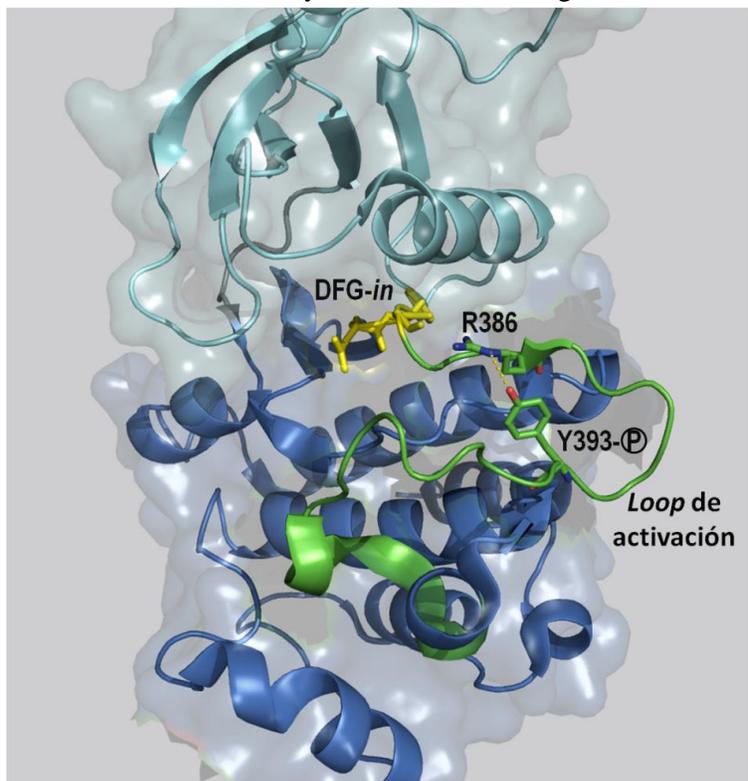


Figura 12. Esquema de la sobreposición de las estructuras cristalográficas en conformaciones αC -in (PDB 1OPJ)¹⁸ y αC -out (PDB 2G1T, Nagar *et al.*)²⁷ de ABL. En azul claro se muestra el subdominio N de la conformación αC -in y en amarillo se muestra el subdominio N de la conformación αC -out. En la conformación αC -out las hebras- $\beta 1$ y $-\beta 2$ se alargan mientras que el *P*-loop se acorta con respecto a la conformación αC -in. Elaborada con el software PyMOL.



Otro elemento estructural perteneciente al subdominio C es el *loop* o asa de activación, el cual está altamente conservado entre proteínas cinasas y es 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). Cabe mencionar que al igual que otras cinasas, la conformación final del *loop* de activación de ABL está dirigida por el ligando y, a la fecha no se ha resuelto la estructura en su forma apo. El *loop* de activación de ABL se ha caracterizado estructuralmente en tres conformaciones distintas. Una conformación activa o DFG-*in* unida a dasatinib, una conformación inactiva o DFG-*out* unida a imatinib y otra conformación inactiva DFG *Src-like* unida a MgATP; en esta última conformación inactiva la hélice- α C está en conformación hacia adentro (**Figura 11**). En las conformaciones activa e inactiva las orientaciones del motivo DFG difieren considerablemente. En la conformación DFG-*in* el *loop* de activación adquiere una forma extendida sirviendo de plataforma para el adecuado acceso del péptido sustrato y/o del complejo cosustrato MgATP. Un residuo de tirosina en el *loop* de activación al ser fosforilado (Y393- P) estabiliza esta conformación DFG-*in* por interacciones con el residuo R386 de la misma asa, manteniendo a la proteína catalíticamente activa (**Figura 13**).^{4,20} En esta conformación, el residuo D381 del motivo DFG es posicionado de tal forma que puede coordinar correctamente el ion Mg(II) del MgATP, el cual al acoplarse provoca una pequeña rotación de los residuos D381 y N368 volteando hacia el ion Mg(II) y coordinándolo adquiriendo ahora la conformación *Src-like* (**Figura 14**). Además de los residuos D381 y N368, el metal también es coordinado por los grupos fosfatos del nucleótido y dos moléculas de agua.

Figura 13. Dominio cinasa de ABL con el *loop* de activación en conformación DFG-*in* o activo (PDB 2GQG, Tokaski *et al.*).³¹ Esta conformación se estabiliza por la interacción entre el residuo Y393- P con el residuo R386 dentro del mismo *loop* (verde). Elaborada con el software PyMOL.



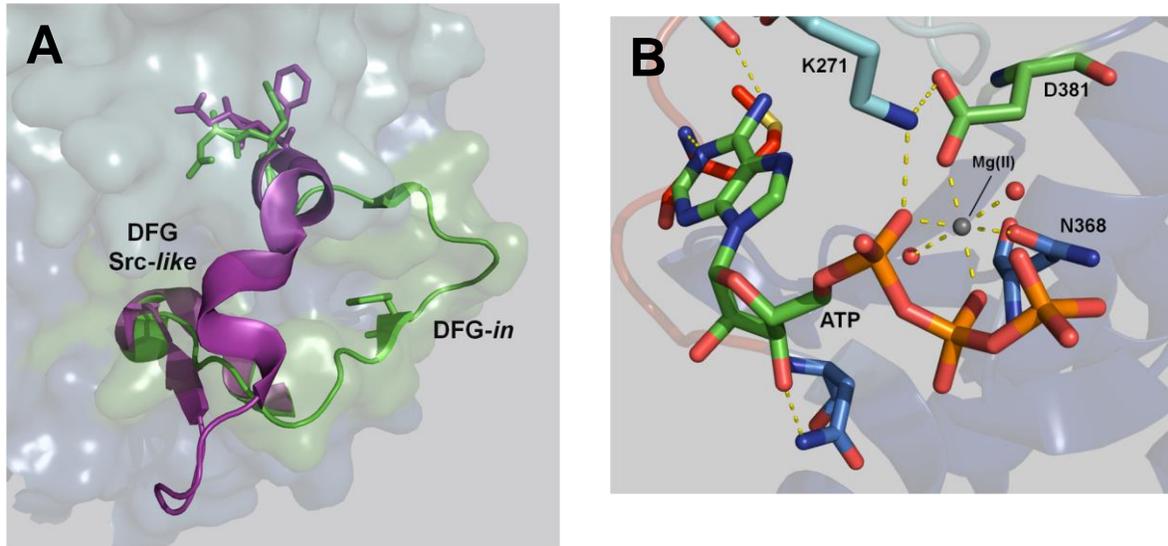


Figura 14. **A)** Sobreexposición de los PDB 2GQG (Tokaski *et al.*)³¹ (DFG-*in*) y 2G1T (Levinson *et al.*)²⁸ (Src-like) donde se ven las diferentes conformaciones del *loop* de activación y del motivo DFG. **B)** Residuos que participan en la interacción del ion Mg(II) del complejo ABL-MgATP. El residuo D381 del motivo DFG-*in* está orientado permitiendo la correcta coordinación del Mg(II) dando una conformación DFG Src-like. 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. Elaborado y modificado con el software PyMOL a partir del PDB 2G1T,²⁸ los átomos de la cadena lateral del derivado de ATP no se muestran, un azufre del fosfato- γ fue cambiado por un oxígeno en la figura.

En la conformación DFG-*out*, el asa 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. La conformación DFG-*out* es estabilizada por una tirosina Y393 que interacciona con un residuo D363 de la diada catalítica del subdominio C (**Figura 15A**). La inactivación de la enzima en esta conformación se debe a que el *loop* mimetiza al péptido sustrato, incluso parece ser que la tirosina Y393 simula a la tirosina fosforilable del péptido sustrato (**Figura 15B**).^{4,20} Dependiendo del estado conformacional de los distintos elementos de regulación, las conformaciones DFG-*in* y DFG-*out* pueden encontrarse en equilibrio, interconvirtiéndose dinámicamente (DFG-*in* \rightleftharpoons DFG-*out*). A este cambio conformacional se le denomina DFG *flip* (**Figura 16**).^{20,29}

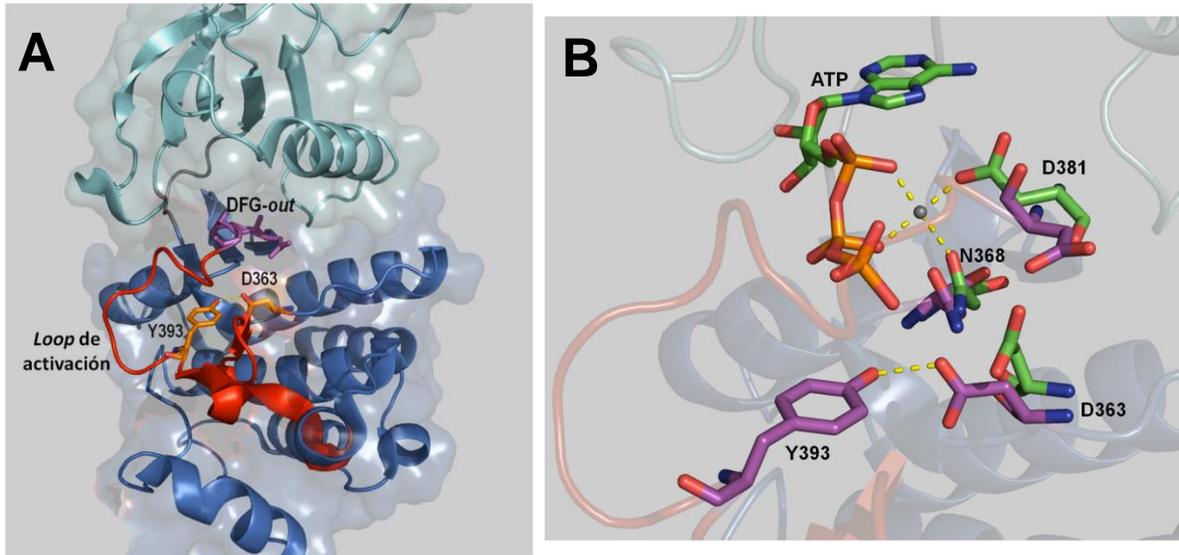
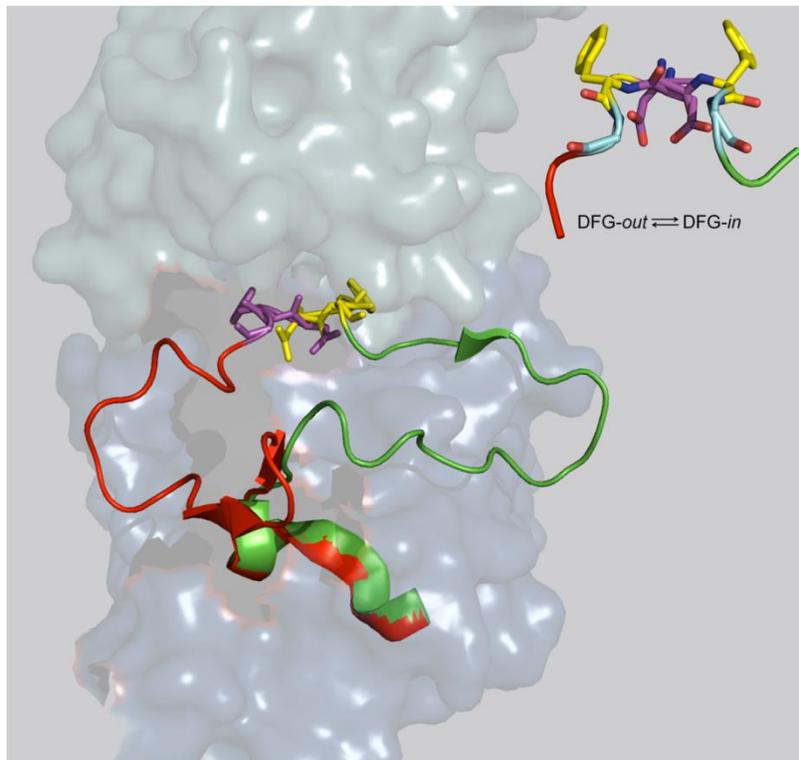


Figura 15. A) Dominio cinasa con el *loop* de activación en conformación DFG-out o inactivo (PDB 1IEP). Esta conformación se estabiliza por la interacción entre el residuo Y393 del asa (rojo) con el residuo D363 dentro del subdominio C (azul marino). B) La tirosina Y393 mimetiza el péptido sustrato. Los residuos en púrpura se encuentran en una conformación DFG-out, mientras que los residuos en verde se encuentran en una conformación DFG-in al unir MgATP. Se puede apreciar como los residuos de la diada catalítica D363 y N368 se desplazan al unir MgATP. Elaborado a partir de los PDB 1IEP y 2G1T (Nagar *et al.*²⁷ y Levinson²⁸).

Figura 16. Conformaciones del *loop* de activación de las formas activa e inactiva (DFG-in y DFG-out) de Abl. En el inserto se muestra el equilibrio DFG-in ↔ DFG-out (DFG flip). Los residuos se muestran con el código de colores D-morado, F-amarillo y G-azul claro. Elaborado a partir de la sobreposición de los PDB 1IEP y 2GQG (Nagar *et al.*²⁷ y Tokaski *et al.*³¹).



1.5 Bases estructurales de la unión de imatinib y dasatinib al dominio TK-ABL

La estrategia farmacológica actual consiste en inhibir el sitio de unión a ATP de forma competitiva con ligandos obtenidos por síntesis química. El imatinib (Gleevec, Novartis), aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, USA) para el tratamiento de la LMC en 2001, es la primera molécula obtenida capaz de inhibir a la proteína BCR-ABL de forma clínicamente eficaz y selectiva. El dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb), aprobado por la FDA en 2006, es un fármaco de segunda generación siendo, 300 veces más potente que el imatinib y efectivo contra algunas mutaciones resistentes a imatinib, sobre todo del *p-loop*.^{28,31,32}

El imatinib y el dasatinib se acoplan atravesando la interfase entre los subdominios N y C del dominio cinasa, uniéndose a las conformaciones *DFG-out* y *DFG-in*, respectivamente. A pesar de su semejanza estructural, ambos inhibidores se unen de forma distinta al sitio catalítico, acoplándose de forma contraria a partir del anillo piperazina. El anillo N-metilpiperazina del imatinib se encuentra orientado mirando hacia la hélice- α C (**Figura 18A**), mientras que el anillo N-hidroxiethylpiperazina del dasatinib se encuentra mirando hacia el lado opuesto de esta hélice- α C (**Figura 18B**). El anillo amino tiazol del dasatinib y los anillos piridina y pirimidina del imatinib se unen cerca del segmento conector de ambos subdominios, en donde se une normalmente la adenina del nucleótido.

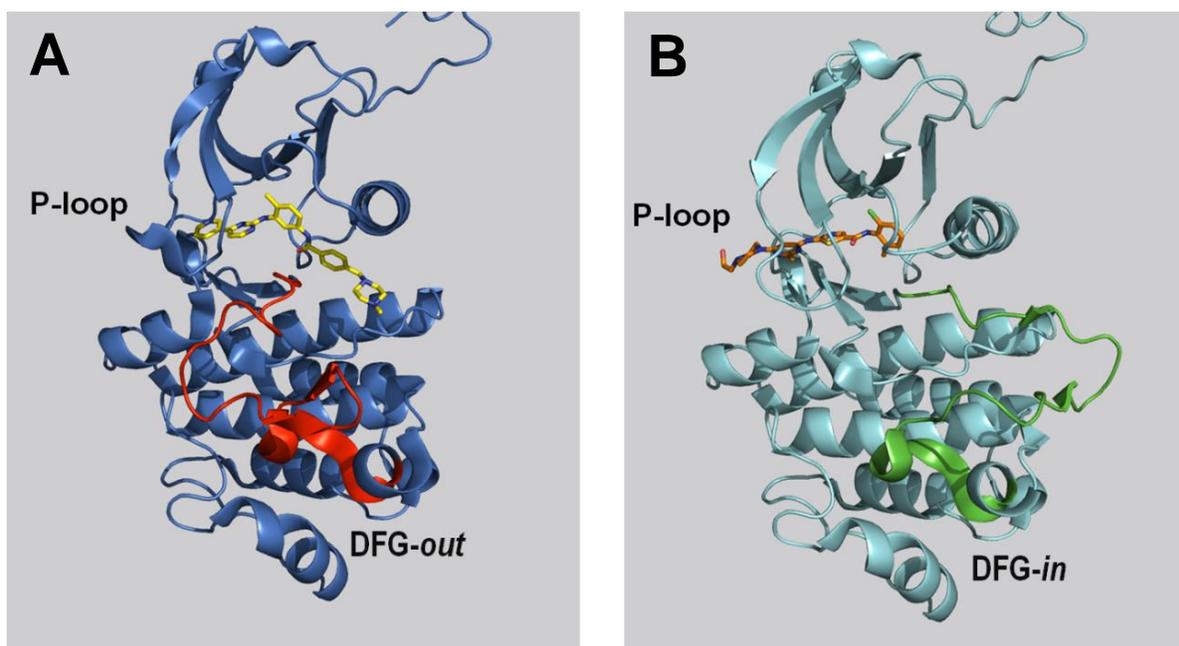


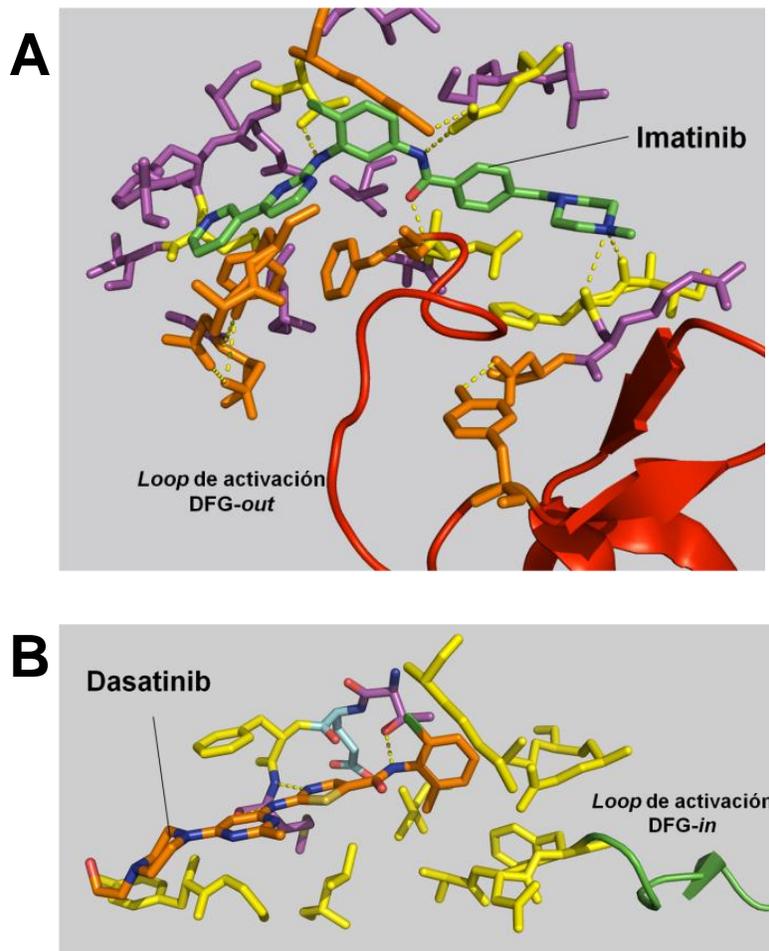
Figura 18. **A)** Unión de imatinib con el dominio TK de ABL en conformación *DFG-out*. Elaborado en base al PDB 1IEP (Nagar et al 2002).²⁷ **B)** Unión de dasatinib con el dominio TK de ABL en conformación *DFG-in*. Elaborado con el software PyMOL en base al PDB 2GQG (Tokaski *et al.*).³¹

En resumen, en la unión del imatinib participan 22 interacciones que estabilizan el complejo ABL-imatinib con un total de seis puentes de hidrógeno (**Figura 19A**), mientras que en la unión del dasatinib participan 16 interacciones que estabilizan el complejo ABL-dasatinib con tres puentes de hidrógeno (**Figura 19B**). El dasatinib es resistente a mutaciones puntuales del P-loop ya que no forma ninguna interacción con este. 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 y el dasatinib; además, esta sustitución crea un impedimento estérico para el acoplamiento correcto de los inhibidores (**Figura 20**).^{32,33,34,35}

Figura 19. A) Red de interacciones que participan en la unión y estabilización del complejo ABL-imatinib (PDB 1IEP, Nagar *et al.*).²⁷ Residuos que interaccionan por: puentes de hidrogeno (amarillo), Van der Walls (purchura), interacciones intraproteicas (anaranjado).

B) Red de interacciones que participan en la unión y estabilización del complejo Abl-dasatinib (PDB 2GQG, Tokaski *et al.*).²⁷ Residuos que interaccionan por: puentes de hidrogeno (purchura), Van der Walls (amarillo), interacciones heteroatómicas (azul).

Figuras elaboradas con el software PyMOL.



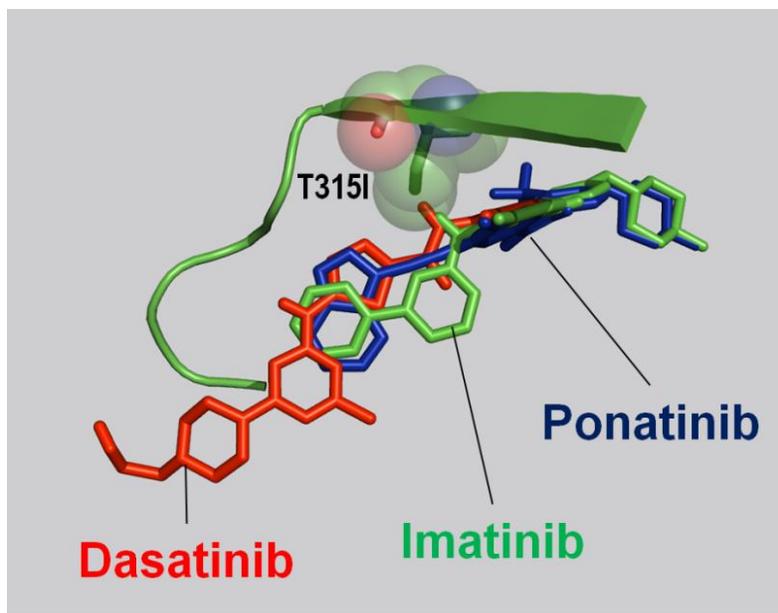


Figura 20. Efecto de la mutante T315I en la resistencia al imatinib y dasatinib, e inhibición de la mutante por Ponatinib. El residuo I315 de la mutante forma un impedimento estérico con el nitrógeno del grupo amida del imatinib (verde) y amina del dasatinib (rojo). El Ponatinib (azul) no tiene impedimento estérico debido a su *linker* etinilo entre los anillos fusionados piridazina-imidazol con el anillo bencénico. Elaborada con el software PyMOL en base a las estructuras cristalográficas PDB 1IEP (imatinib),²⁷ PDB 2GQG (dasatinib),³¹ PDB 3OY3 (Proteína mutante)³³ y PDB 3OXZ (Ponatinib).³³

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 guiado estructuralmente de los fármacos.^{22,36} A la fecha, el proceso de unión a nivel energético de la cinasa ABL no ha sido descrito 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. En nuestro grupo de trabajo proponemos que la correlación de parámetros estructurales y termodinámicos, acoplada al uso de herramientas de dinámica molecular, nos permitiría 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.^{10,13,37,38,39}

1.6 Termodinámica de la interacción proteína-ligando

Todos los procesos biológicos son finamente regulados por eventos de asociación molecular no covalente. Procesos como la replicación de DNA, la comunicación celular, la sinapsis neuronal, la acción de las hormonas, el ingreso y degradación de fuentes de energía son solo algunos ejemplos en los cuales las interacciones proteicas tienen un papel protagónico. El conocer a detalle la forma en que interactúan las proteínas con sus ligandos tanto cualitativa como cuantitativamente, constituye una herramienta clave para la comprensión de las bases moleculares de los procesos celulares fundamentales, del funcionamiento proteico, de las enfermedades y del mecanismo de acción de fármacos. En este sentido, la Biología estructural mediante cristalografía de rayos X ha jugado un papel fundamental en revelar la forma en que interactúan las moléculas con detalle atómico, mediante la alta resolución de estructuras tridimensionales de un gran número de proteínas y sus complejos. Sin embargo, información incompleta se puede recabar sobre los cambios conformacionales que tienen lugar en las proteínas al unir sus ligandos a partir de estructuras estáticas.^{40,41}

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 cómo las fuerzas moleculares se combinan para hacer de la interacción proteica un proceso espontáneo, es decir la termodinámica del proceso de asociación. El objetivo de conocer la termodinámica de un proceso de asociación 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 permite la construcción de un marco lo suficientemente cuantitativo que conlleva al desarrollo de modelos energético-estructurales útiles en el diseño racional de fármacos e ingeniería de proteínas.^{42,43,44,45} El marco cuantitativo que permite develar las bases energéticas de un proceso de asociación biomolecular puede ser descrito en términos de los parámetros termodinámicos a través de determinar los cambios de energía libre ΔG_a , de entalpía ΔH_a , de entropía ΔS_a y de la capacidad calorífica ΔC_{p_a} .⁴⁶

La formación de un complejo Proteína-Ligando se puede expresar de la forma más simple por la relación $[P] + [L] \leftrightarrow [PL]$, donde $[P]$ y $[L]$ son las concentraciones de las especies reactantes de proteína y ligando libres, respectivamente, y $[PL]$ es la concentración del complejo formado en condiciones de equilibrio. Bajo estas condiciones, la distribución del complejo y de

las moléculas libres se define por la constante de asociación de equilibrio K_a o su expresión recíproca en términos de disociación K_d :

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad \text{Ec. 1}$$

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{1}{K_a} \quad \text{Ec. 2}$$

A su vez, la estabilidad de un complejo proteico está dada por la diferencia en la energía libre de Gibbs (ΔG_a) de las moléculas interactuantes y del complejo formado, por lo que la K_a/K_d depende directamente de esta función de estado mediante la relación:^{44,47}

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad \text{Ec. 3}$$

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

El valor de ΔG_a dicta la condición de equilibrio y determina la espontaneidad del proceso de unión, aportando información sobre como las fuerzas moleculares se combinan para hacer de la asociación un proceso favorable. En un proceso de asociación que se lleva a cabo a T constante, el ΔG_a puede ser disecado en sus componentes termodinámicos ΔH_a y ΔS_a mediante la relación:⁴⁸

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad \text{Ec. 4}$$

En un proceso de asociación molecular en medio acuoso, el ΔH_a se puede disectar en dos componentes, uno intrínseco (ΔH_{intr}) y otro de solvatación (ΔH_{solv}):

$$\Delta H_a = \Delta H_{intr} + \Delta H_{solv} \quad \text{Ec. 5}$$

El primero de ellos, ΔH_{intr} es relativo a la creación de nuevas interacciones electrostáticas y contactos de Van der Waals entre P y L debido a su afinidad química, por lo que resulta un componente favorable en la formación del complejo proteico. El segundo componente (ΔH_{solv}) es relativo a la desolvatación de grupos polares y no polares del sitio de unión debido a la interacción P-L, en el que se pierden interacciones electrostáticas establecidas entre moléculas del solvente y los reactantes, **al tiempo que se ganan interacciones agua-agua entre las moléculas desplazadas de la esfera de solvatación y el bulto de disolvente.** El costo energético de remover estas moléculas del solvente resulta en un componente desfavorable, **en tanto que la reintegración**

de las moléculas de agua al bulto de disolvente puede resultar favorable o no, dependiendo de la afinidad de los sitios solvatados por el agua, respecto a la afinidad del agua por otras aguas. Para un proceso de asociación exotérmico, el ΔH_a es negativo e implica la formación de interacciones no covalentes energéticamente favorables entre la proteína y el ligando. En cambio, para un proceso endotérmico, el ΔH_a es positivo debido a que domina la eliminación de interacciones no covalentes entre los solutos y el solvente.⁴⁹

La entropía está relacionada con la pérdida o ganancia de grados de libertad. Los grados de libertad son el número total de estados accesibles necesarios para describir un sistema termodinámico. Las principales contribuciones al ΔS_a son la entropía de solvatación (ΔS_{solv}), la entropía conformacional (ΔS_{conf}) y la entropía roto-traslacional ($\Delta S_{r/t}$):

$$\Delta S_a = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r/t} \quad Ec. 6$$

El ΔS_{solv} es favorable para la asociación, y se origina de la liberación de las moléculas de agua al existir una desolvatación parcial o completa de la interfase de unión de la proteína y el ligando. Este efecto es el componente predominante en la asociación de grupos hidrofóbicos. El ΔS_{conf} casi siempre es desfavorable, ya que el proceso de unión por lo general involucra el congelamiento de enlaces rotantes covalentes sencillos en la proteína y el ligando. El $\Delta S_{r/t}$ está asociado a la reducción del número de partículas en el medio debido a la asociación P-L, por lo que es una contribución siempre desfavorable y de la misma magnitud independientemente del tipo de complejo formado. Para un proceso de asociación bimolecular, diversos estudios tanto empíricos como teóricos han calculado el valor $\Delta S_{r/t}$ entre -4 y $-10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. De acuerdo con otros autores, un valor de -8 cal/mol K es aceptable para interacciones proteicas.⁴⁸

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. Cuando los dos términos son favorables y de valores similares se dice que la asociación es tanto entálpica como entrópicamente dirigida.⁴⁹

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 (ΔCp)

juega un papel primordial en la determinación de la energética asociada al plegamiento proteico y al reconocimiento molecular o interacción proteína-ligando (ΔCp_a), ya que es un sensor de los rearrreglos del solvente inducidos por cambios en la exposición de solutos como producto de la interacción; en otras palabras, indica los cambios conformacionales que tienen lugar en la proteína tras la unión del ligando.

El ΔH_a y el ΔS_a se relacionan con el ΔCp_a de forma dependiente de la temperatura mediante:⁴⁶

$$\Delta H_a^T = \Delta H_a^{T_0} + \Delta Cp_a(T - T_0) \quad Ec. 7$$

$$\Delta S_a^T = \Delta S_a^{T_0} + \Delta Cp_a \ln \frac{T}{T_0} \quad Ec. 8$$

Donde ΔH_a^T y ΔS_a^T son los cambios de entalpía y entropía de asociación a una determinada temperatura, respectivamente, $\Delta H_a^{T_0}$ y $\Delta S_a^{T_0}$ son los cambios de entalpía y entropía de asociación a una temperatura de referencia T_0 , respectivamente. Debido a que el ΔH_a es una función lineal simple con respecto a la T , la dependencia térmica del ΔH_a nos proporciona directamente el valor de ΔCp_a , que corresponde al valor de la pendiente en una regresión lineal.⁴⁸

En el caso de la exposición de un residuo hidrofóbico, se da la formación de capas de solvatación en donde las interacciones agua-agua son capaces de absorber mayor cantidad de energía térmica, provocando por lo tanto un cambio positivo en el ΔCp_a . En cambio, la exposición de grupos polares da lugar a un ΔCp_a 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.⁴⁷

En interacciones P-L, el ΔCp_a conecta los parámetros termodinámicos con información estructural debido a que está asociado al cambio de áreas superficiales accesibles al solvente polares (ΔASA_p) y no polares (ΔASA_{np}); en otras palabras, el ocultamiento o exposición al solvente de residuos no polares y polares.⁵⁰

Diversos estudios sobre compuestos modelo y datos de proteínas han relacionado la solvatación de ASA_{np} y ASA_p con el incremento y decremento del valor ΔCp_a , respectivamente, de acuerdo con la parametrización:⁵¹

$$\Delta C p_a = \alpha \Delta A S A_{np} + \beta \Delta A S A_p \quad \text{Ec. 9}$$

donde α y β son coeficientes de área para la solvatación de grupos no polares y polares, respectivamente. De acuerdo con Murphy y Freire,⁵² la transferencia de áreas no polares de un estado expuesto al solvente a un estado no expuesto (α) ocasiona un decremento del $\Delta C p_a$ de $0.45 \text{ cal (K mol \AA}^2)^{-1}$, mientras que el ocultamiento de áreas polares (β) genera un aumento de $\Delta C p_a$ de $-0.26 \text{ cal (K mol \AA}^2)^{-1}$.

1.7 Principios de ITC

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés *Isothermal Titration Calorimetry*)⁵³ es una herramienta capaz de determinar en un solo experimento los valores de la constante de unión (K_a), de la estequiometría (n), del ΔG_a , ΔH_a , y ΔS_a . El $\Delta C p_a$ se puede determinar 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.⁴⁷

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 se coloca en la celda de muestra y, la celda de referencia se llena con solución amortiguadora o agua. En una jeringa acoplada se coloca el ligando. Antes de comenzar la titulación, una potencia constante se aplica 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 igual la temperatura de las dos celdas (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 se mide 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.^{47,48}

Al inicio del experimento la celda de reacción se llena con un volumen efectivo (V_0) de proteína (P) que se detecta calorimétricamente. En cada inyección de ligando (L) un volumen de

líquido sale de la celda de referencia que es igual al volumen de la inyección (v) disminuyendo ligeramente la concentración de la proteína. Para el análisis de las isotermas hay que corregir el total de las concentraciones, tanto de la proteína $[P]_t$ como del ligando $[L]_t$ después de cada inyección (i). Esto se realiza mediante las ecuaciones 10 y 11 para la corrección del ligando y la proteína.⁵⁴

$$[L]_{t,i} = [L]_0 \left(1 - \left(1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \right) \quad \text{Ec. 10}$$

$$[P]_{t,i} = [P]_0 \left(1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \quad \text{Ec. 11}$$

donde $[P]_0$ y $[L]_0$ son las concentraciones iniciales de la proteína y el ligando respectivamente.

Con cada inyección se adiciona una concentración de ligando $[L]_{t,i}$ al total de volumen de proteína en la celda $[P]_{t,i}$ y, como resultado de la unión, la concentración del ligando libre $[L]$ y del complejo $[PL]_i$ cambian (ec. 12).

$$[PL]_i = \frac{1 + K_a([L]_{t,i} + [P]_{t,i}) - \sqrt{\left(1 + K_a([L]_{t,i} + [P]_{t,i}) \right)^2 - 4K_a^2[P]_{t,i}[L]_{t,i}}}{2K_a} \quad \text{Ec. 12}$$

En la interacción hay un intercambio de calor medido por el equipo como la energía necesaria para mantener la temperatura constante en $\mu\text{cal/s}$. (q_i)

El calor molar medido (ΔH) en el volumen de la celda de reacción (V_0) está dado por la formación del complejo que ocurre tras cada inyección $[PL]_i$:

$$dq_i = \Delta H V_0 d[PL]_i \quad \text{Ec. 13}$$

Al normalizarlo por la concentración de ligando total contenido en la celda ($[L]_{t,i}$) y, considerando la estequiometría de la reacción (n) para una unión molecular 1:1 obtenemos para un modelo de un solo sitio de unión:

$$\frac{dq_i}{d[L]_{t,i}} = \Delta H V_0 \frac{d[PL]_i}{d[L]_{t,i}} \therefore Q_i = \Delta H V_0 n [P]_{t,i} \Theta_i \quad \text{Ec. 14}$$

Donde para cada inyección, Q_i es el calor diferencial normalizado debido a la reacción que se obtiene integrando el área bajo la curva de cada pico, y es proporcional a la fracción de ligando unido en cada inyección (Θ_i), calculado mediante:⁵¹

$$\Theta_i = \frac{1 + \frac{[L]_{t,i}}{n[P]_{t,i}} + \frac{1}{nK_a[P]_{t,i}} - \sqrt{\left(-1 - \frac{[L]_{t,i}}{n[P]_{t,i}} - \frac{1}{nK_a[P]_{t,i}}\right)^2 - \frac{4[L]_{t,i}}{n[P]_{t,i}}}}{2} \quad \text{Ec. 15}$$

Sustituyendo Θ_i en el modelo:

$$Q_i = \frac{n[P]_{t,i}V_0\Delta H}{2} \left[1 + \frac{[L]_{t,i}}{n[P]_{t,i}} + \frac{1}{nK_a[P]_{t,i}} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_{t,i}}{n[P]_{t,i}} + \frac{1}{nK_a[P]_{t,i}}\right)^2 - \frac{4[L]_{t,i}}{n[P]_{t,i}}}\right] \quad \text{Ec. 16}$$

A medida que la proteína se satura con el ligando, las magnitudes de los picos disminuyen hasta que el tamaño del pico refleja el calor de solo la dilución, dando como resultado una curva sigmoidea para un modelo de un solo sitio de unión de acuerdo con Wiseman y col.⁵⁵ De esta curva, denominada isoterma de unión, se extraen los parámetros termodinámicos: constante de asociación K_a , el cambio en la entalpía de asociación ΔH_a , y la estequiometría n en un solo experimento (**Figura 21**).^{47,48}

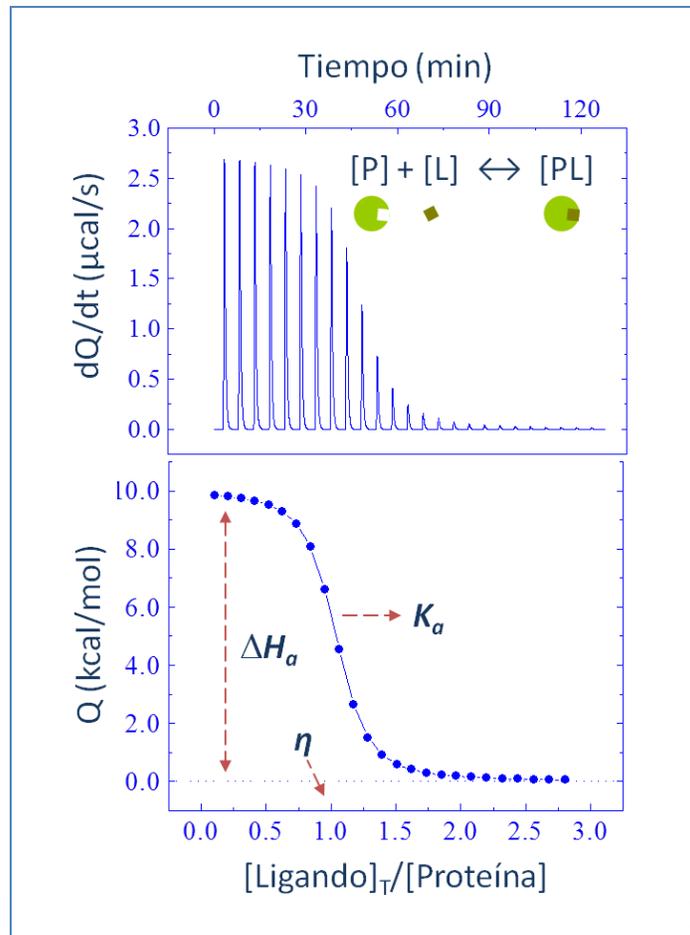


Figura 21. Experimento típico de ITC. En la parte superior se muestran los datos crudos obtenidos mediante la titulación de una proteína [P] con un ligando [L]. Al normalizar estos datos en función de la concentración de los reactantes se obtiene una isoterma de unión. El ajuste no lineal de un modelo de unión permite determinar directamente el valor de ΔH_a (relacionado con la altura de la isoterma), la estequiometría n (determinada por el punto de inflexión de la curva), y la K_a (dada por 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 y ΔS_a a diferentes T nos permite calcular el valor de ΔC_p (ecuación 17 y 18).^{47,48}

$$\Delta C_p^{\Delta H} = \frac{\partial \Delta H_a}{\partial T} \quad \text{Ec. 17}$$

$$\Delta C_p^{\Delta S} = T \frac{\partial \Delta S_a}{\partial T} \quad \text{Ec. 18}$$

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LMC es una enfermedad mieloproliferativa que afecta a más de 3 millones de personas en el mundo. La actividad desregulada de la proteína oncogénica BCR-ABL es el principal desencadenante de la aparición de esta enfermedad, por lo que el tratamiento farmacológico depende de la inhibición de esta tirosina-cinasa. Hasta el momento, la estrategia farmacológica principal para inhibir la actividad de BCR-ABL ha consistido en el desarrollo de fármacos que se unen de manera competitiva al sitio activo de la enzima. Al inhibirse la actividad transfosforilante de la cinasa, queda interrumpida la vía de señalización río abajo que origina la enfermedad. El fármaco de primera línea para los pacientes con LMC es imatinib. El desarrollo de este inhibidor competitivo representa un parteaguas en la lucha contra el cáncer, por ser el primer fármaco dirigido a una proteína oncogénica. La terapia con imatinib ha logrado extender la sobrevida hasta por 10 años. No obstante, numerosas mutaciones puntuales generan resistencia al imatinib en una parte significativa de pacientes con LMC, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevos fármacos. El dasatinib se ha establecido como un tratamiento de segunda línea. Este inhibidor competitivo presenta actividad sobre 14 de las 15 mutaciones que causan resistencia a imatinib. Sin embargo, ~15% de pacientes desarrollan resistencia tanto a imatinib como a dasatinib. Dado que ninguno de los fármacos para el tratamiento de la LMC logra erradicar en su totalidad la enfermedad, sigue existiendo la necesidad de buscar alternativas que amplíen las opciones terapéuticas. En este estudio, nos proponemos entender el funcionamiento de ABL, con el fin de sentar bases para la búsqueda de nuevas estrategias para lograr una inhibición más efectiva de la enzima. A pesar de la vasta información estructural existente, la energética de unión con los inhibidores aprobados para el tratamiento de la LMC no ha sido descrita. A su vez, tampoco se conocen con detalle los cambios conformacionales que tienen lugar en ABL tras la unión de estos inhibidores. La posibilidad de establecer correlaciones entre propiedades estructurales y energéticas, por un lado, permitirá profundizar en el conocimiento de los mecanismos de reconocimiento e inactivación de los inhibidores usados contra BCR-ABL. Por otro lado, con la determinación del mecanismo energético que gobierna la formación de los complejos con imatinib o dasatinib, buscamos contribuir a la construcción de un marco cuantitativo para el desarrollo de nuevos fármacos.

3. HIPÓTESIS

Imatinib y dasatinib tienen diferentes tipos de firmas termodinámicas de unión al a oncoproteína BCR-ABL.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Elucidar las bases energéticas del reconocimiento de inhibidores farmacológicos por entre éstos y la tirosina cinasa ABL

4.2 Objetivos particulares

-Sobreexpresar en un sistema bacteriano y purificar a homogeneidad la construcción fragmentaria de ABL recombinante TK-ABL (que contiene al dominio cinasa aislado).

-Mediante mediciones de perturbación térmica seguidas por dicroísmo circular, caracterizar la estabilidad térmica y mecanismo de desplegamiento de TK-ABL.

- Caracterizar detalladamente los determinantes energéticos (ΔG_a , ΔS_a , ΔH_a y ΔC_{p_a}) de la interacción entre imatinib y dasatinib con el dominio cinasa de ABL mediante calorimetría de titulación isotérmica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Expresión de proteína y purificación

Los plásmidos pET28a-TK-ABL y pCDFDuet-1-YopH que codifican para el dominio cinasa de ABL (TK-ABL, residuos 229-512) y la fosfatasa YopH nativa, respectivamente, fueron una donación del Dr. John Kuriyan (Universidad de California, Berkeley). La sobre-expresión y purificación se realizó de acuerdo con Seelinger y col.⁵⁶ con modificaciones menores. Sucintamente, la construcción TK-ABL se coexpresó con la fosfatasa YopH en células *E. coli* BL21(DE3). Los inóculos de células transformantes en medio de expresión LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y estreptomycin (50 µg/ml) se crecieron por una noche a 37 °C. Al día siguiente, los inóculos se transfirieron a 1.5 L de medio para dejar con una OD₆₀₀ inicial de 0.1 y se crecieron a 37 °C, hasta una OD₆₀₀≈1. A continuación, las células se incubaron a 18 °C durante 1 h y la expresión del gen de interés se indujo con 1mM de IPTG durante 18 h. Las células se colectaron por centrifugación a 5000 rpm/5 minutos y se almacenaron en pastillas de 10 g a -4 °C; o bien, se resuspendieron en un amortiguador de lisis que contenía 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 5% de glicerol y 1 mM de PMSF, para proseguir con la purificación de la proteína.

Las células se lisaron por sonicación con un equipo Sonicator 3000 (Misonix, Inc, USA). El detrito celular se removió por centrifugación a 14000 rpm/30 min y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0.45 µm. El sobrenadante se suplementó con 30 mM de imidazol y se aplicó a una columna de cromatografía de afinidad con níquel para HisTrap FF (GE Healthcare). La elución se realizó con un amortiguador que contiene 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 5% de glicerol y 500 mM de imidazol. Los eluatos se diluyeron con 2 partes del mismo buffer sin NaCl para aplicarse a una columna de cromatografía de intercambio aniónico HiTrap Q FF (GE Healthcare), eluyendo con un amortiguador que contiene 50 mM Tris pH 8.0, 1 M de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 5% de glicerol. Ambas proteínas recombinantes se obtuvieron en cantidades de 10-20 mg por litro de cultivo.

5.2 Espectrometría de masas

Los espectros de masas se obtuvieron mediante la técnica de MALDI-TOF (del inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) en un espectrómetro 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 6.1) con agua desionizada y 1 μL se suspendió en una matriz de una solución saturada de ácido sinapínico en 40 % (v/v) de acetronitrilo acuoso, 0.1 % (v/v) de ácido trifluoroacético. Las muestras se analizaron con el software Flex analysis 3.0TM (Bruker).

5.3 Dicroísmo circular (DC)

Los espectros de DC de TK-ABL se colectaron a 20 °C en la región lejana del UV con un espectropolarímetro JASCO J-720 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con una celda de calentamiento tipo Peltier PTC-348WI para el control de la temperatura. Las soluciones proteicas con una concentración de 0.08 mg/ml fueron cargadas en celdas de cuarzo de 0.2 cm de paso. Cada espectro fue el promedio de tres escaneos repetitivos y corregidos por la señal del amortiguador. La elipticidad se reporta como elipticidad molar $[\theta]_{\text{mrw}}$. Las transiciones de desnaturalización térmica se siguieron por monitoreo continuo de la señal de elipticidad a 208 nm, usando una rapidez de calentamiento constante de 1 °C/min. La fracción de proteína desplegada respecto del total empleado en función de la temperatura ($f_U(T)$) se calcularon con:

$$f_U(T) = \frac{\theta(T) - \theta_N(T)}{\theta_U(T) - \theta_N(T)} \quad \text{Ec. 19}$$

En donde $\theta(T)$, $\theta_N(T)$ y $\theta_U(T)$ son las elipticidades correspondientes al valor observado, así como las formas nativa y desplegada, respectivamente.

5.4 Calorimetría de titulación isotérmica

Las mediciones calorimétricas de la construcción TK-ABL con los inhibidores se llevaron a cabo en un equipo MicroCalTM iTC₂₀₀ System (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). Todos los experimentos se realizaron con una solución amortiguadora 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 0.125 mM de DTT y 5% de glicerol, en un intervalo de temperaturas de 15 a 35 °C para el complejo TK-ABL·imatinib, de 20 a 30 °C para TK-ABL·dasatinib. En estos

intervalos de temperatura las mediciones fueron realizadas cada 2.5 °C. Las concentraciones proteicas fueron de 5 a 15 μM y las concentraciones de imatinib y dasatinib fueron de 150 μM y 80 μM , respectivamente. El esquema de titulación consistió en 19 inyecciones consecutivas de ligando con un intervalo de 100 s entre cada inyección con agitación constante de 750 rpm. El calor de dilución del ligando fue obtenido por adición del fármaco a la solución amortiguadora sin proteína bajo las mismas condiciones experimentales y esquema de inyección. Todas las muestras se desgasificaron durante 10 min antes de cada experimento en un equipo Termovac.

Los parámetros de interacción de los inhibidores con la proteína se determinaron mediante el ajuste no lineal utilizando un modelo de un solo sitio de unión normalizando los datos mediante la **ecuación 16**.

6. RESULTADOS

6.1 Sobre-expresión y purificación

La sobre-expresión de la construcción recombinante TK-ABL se realizó usando la cepa *E. coli* BL21(DE3) cotransformada con el plásmido de interés más otro que codifica para la fosfatasa YopH, enzima que evita la toxicidad en las bacterias debido a la hiperfosforilación ocasionada por la sobreexpresión de ABL. Al cabo del tiempo de inducción, las células se colectaron, y se almacenaron a -4°C ; o bien, se lisaron mediante sonicación para su purificación inmediata. La purificación se realizó mediante la aplicación del extracto crudo a una columna de cromatografía de afinidad a níquel que retuvo las proteínas de interés debido a la presencia de una etiqueta de hexa-histidina (**Figura 21**). En esta primera cromatografía coeluyeron tanto la construcción de ABL como la fosfatasa YopH, ya que esta última se une inespecíficamente a la resina de la columna. Un segundo paso cromatográfico de intercambio aniónico permitió la obtención de ABL recombinante con un alto grado de pureza, considerada por el análisis del gel SDS-PAGE y el espectro de masas MALDI-TOF que muestra un solo pico, correspondiente al ion molecular m/z de 35.8 kDa para TK-ABL (peso esperado = 35.9 kDa).

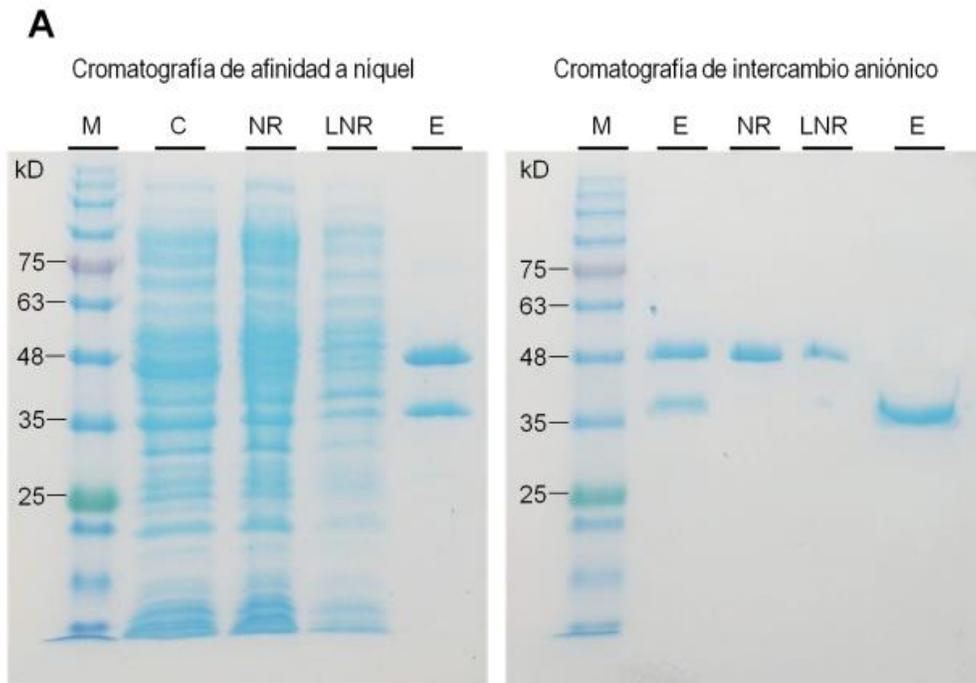


Figura 21. Geles SDS-PAGE representativos obtenidos del proceso de purificación de TK-ABL. M, marcador de peso molecular; C, extracto crudo; NR, no retenido; LNR, lavado de no retenido; E, elución.

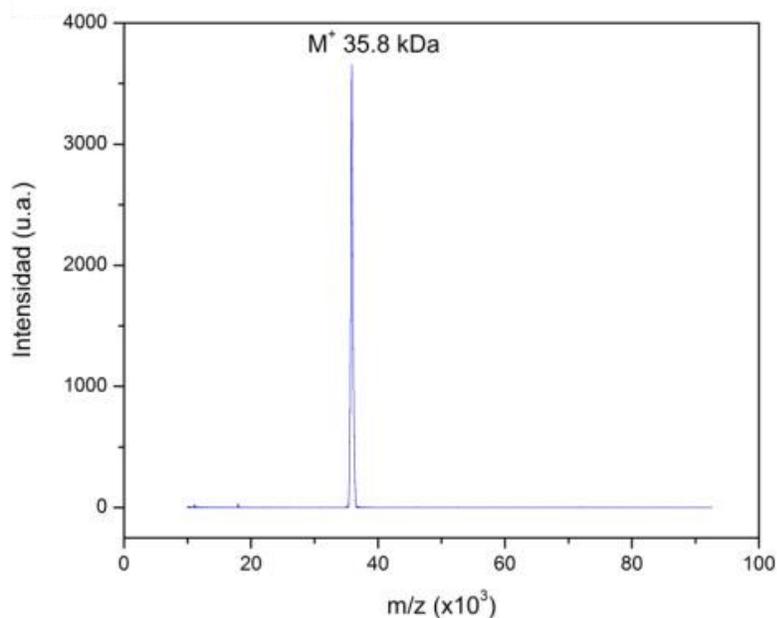


Figura 22. Espectro de masas MALDI-TOF de TK-ABL. Fuera del pico principal, no se observan picos con amplitud significativa, lo que sugiere un alto grado de pureza de la proteína recombinante.

6.2 Dicroísmo circular

Para verificar el plegamiento de la construcción TK-ABL, se realizaron mediciones de dicroísmo circular en la región del UV-lejano (195-250 nm). El espectro se obtuvo a 20 °C, mostrando un mínimo negativo a 208 nm característico de hélices α . Además, el mínimo negativo a 222 nm no se define claramente, lo cual sugiere la presencia de hebras β (**Figura 23**). Un espectro similar se ha observado para la lisozima de huevo de gallina,⁵⁷ la cual tiene una estructura bilobular de tipo α/β de composición. Por tanto, parece que el espectro de la proteína recombinante es consistente con las estructuras cristalográficas correspondientes.^{27,31}

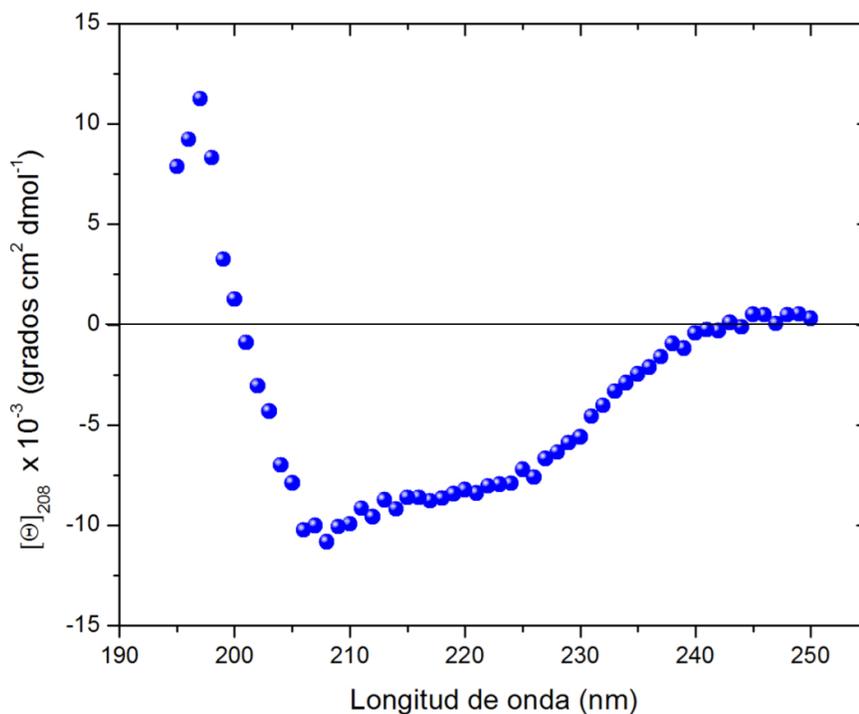


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular de TK-ABL a 20 °C en una solución amortiguadora de 20 mM de TRIS pH 8.0.

Con la finalidad de establecer la ventana térmica experimental para realizar determinaciones calorimétricas de unión de fármacos, se realizó un barrido de temperatura monitoreando el cambio de elipticidad molar a 208 nm (**Figura 24**). Además, el exhibir una perturbación térmica se puede tomar como un criterio del estado plegado de la proteína. Se observó un perfil de desplegamiento aparentemente bifásico, el cual anteriormente se había visto en el grupo de trabajo, donde la primera transición ocurre entre 40 y 60 °C, y la segunda transición entre 65 y 80 °C (**Figura 24**). Para comprobar la reversibilidad del desplegamiento térmico, se realizó el mismo experimento enfriando la muestra de 90 a 20 °C, mostrando un proceso irreversible, ya que no se recuperaron las señales de elipticidad de la forma nativa (Anexo 2). Con estos datos podemos utilizar una ventana experimental para los experimentos de titulación para temperaturas menores a 40 °C antes de que ocurra la primera transición y la proteína comience a desplegarse.

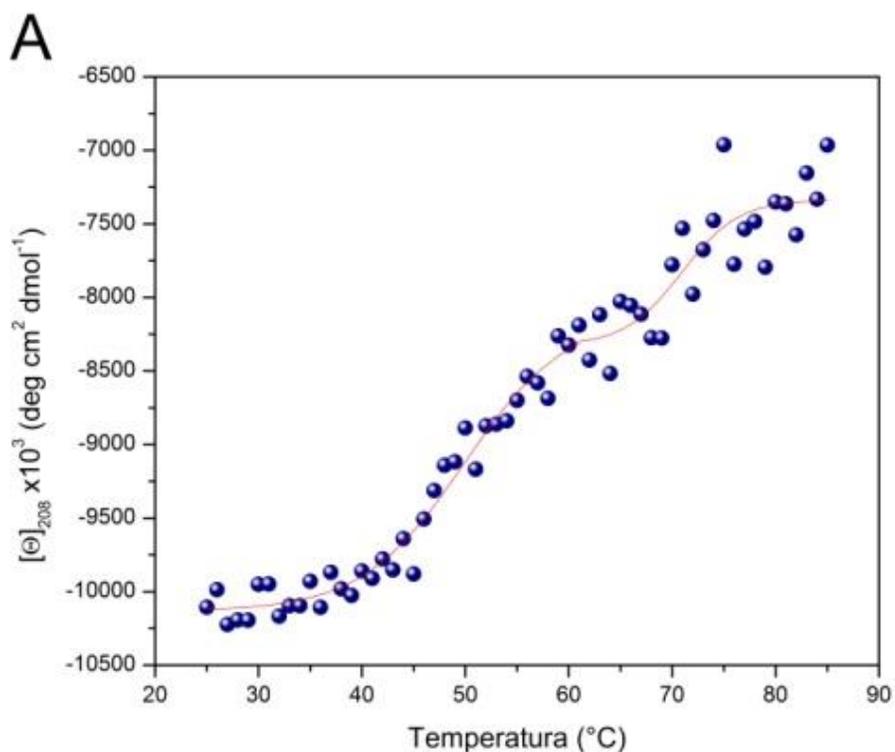


Figura 24. Barrido de desplegamiento térmico de TK-ABL en el intervalo de temperatura de 20 a 90 °C en una solución amortiguadora de 20 mM de TRIS pH 8.0 monitoreados a 208 nm con una velocidad de barrido de 1 °C/min. El barrido térmico de TK-ABL muestra lo que parecen ser dos transiciones.

6.3 Calorimetría de titulación isotérmica

6.3.1 Energética de unión de TK-ABL a imatinib y dasatinib

Las mediciones calorimétricas de la asociación de TK-ABL a imatinib y dasatinib, se realizaron en función de la temperatura. En todo el intervalo de temperatura, la asociación de TK-ABL a los inhibidores fue un proceso exotérmico ($\Delta H < 0$). Se empleó un modelo de un solo sitio de unión para ajustar las curvas calorimétricas (Anexo 3). La **Figura 25** muestra ejemplos de isotermas de unión de la interacción de TK-ABL con imatinib y dasatinib obtenidas a 30 °C. La **Tabla 2** muestra los parámetros termodinámicos para la formación de los complejos TK-ABL·imatinib y TK-ABL· dasatinib obtenidos del análisis de las isotermas de titulación.

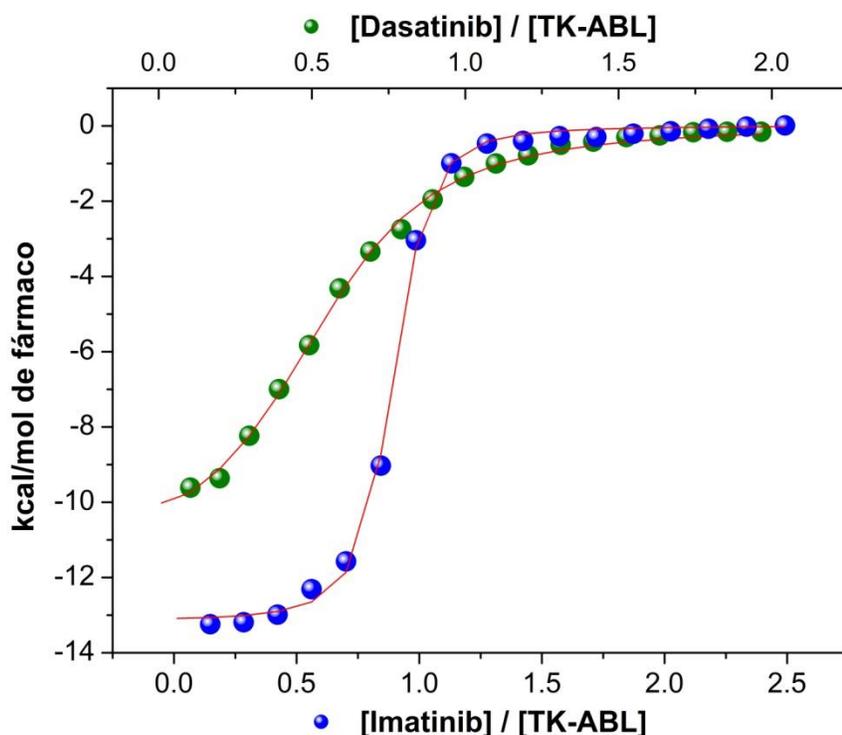


Figura 25. Isothermas de unión de los complejos TK-ABL con imatinib (símbolos azules) y dasatinib (símbolos verdes) obtenidos a 30 °C mediante ITC, en un amortiguador de 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 0.125 mM de DTT y 5% de glicerol. Un modelo de un solo sitio de unión fue usado para ajustar los datos (líneas rojas).

La formación del complejo TK-ABL·imatinib mostró constantes de afinidad del orden de 59 a 11 μM^{-1} ($K_d = 16$ a 86 nM), disminuyendo conforme se incrementó la temperatura. Estos valores son consistentes con valores reportados en la literatura mediante ITC a 25 °C ($K_d = 37$ -57,¹⁹ 80,²³ 50⁴⁶ nM). El ΔH_a se incrementó negativamente al aumentar la temperatura ($\Delta H_a = -7.3$ kcal/mol a 15 °C, -16.7 kcal/mol a 35 °C), mientras que el componente entrópico favorable a 15 °C ($-T\Delta S_a = -2.9$ kcal/mol) pasó a ser desfavorable a mayores temperaturas ($-T\Delta S_a = 6.8$ kcal/mol a 35 °C).

En la formación del complejo TK-ABL·con dasatinib, los valores de K_a disminuyeron en promedio alrededor de 8 veces con respecto a ·imatinib. A la fecha, no existen reportes en la literatura sobre la formación de este complejo. A 20 °C, la afinidad de TK-ABL por dasatinib está dirigida tanto por el componente entálpico como por el entrópico ($\Delta H_a = -4.1 \pm 0.1$ kcal/mol,

$-T\Delta S_a = -4.9$ kcal/mol). Al igual que en la unión con imatinib, la entropía de unión se volvió desfavorable conforme se incrementó la temperatura.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de la asociación de TK-ABL a imatinib y dasatinib obtenidos mediante ITC a diferentes temperaturas

| Ligando | n | T (°C) | K_a (μM^{-1}) | K_d (nM) | ΔH_a (kcal/mol) | $-T\Delta S_a$ (kcal/mol) | ΔG_a (kcal/mol) | $\Delta C p_a^{\Delta H}$ (cal/mol K) | $\Delta C p_a^{\Delta S}$ (cal/mol K) |
|-----------|---------|--------|------------------------------|------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| imatinib | 0.6±0.0 | 15 | 59.4±8 | 16±2 | -7.3±0.1 | -2.9 | -10.2 | -109 | -171 |
| | 0.6±0.0 | 17.5 | 45.2±6 | 22±3 | -7.7±0.1 | -2.4 | -10.1 | -202 | -254 |
| | 0.7±0.0 | 20 | 36.0±1.3 | 27±1 | -8.0±0.2 | -2.1 | -10.1 | -296 | -336 |
| | 0.6±0.0 | 22.5 | 23.0±3.7 | 43±7 | -9.1±0.1 | -0.8 | -9.9 | -389 | -417 |
| | 0.7±0.0 | 25 | 19.0±4.0 | 52±11 | -10.2±0.1 | 0.3 | -9.9 | -482 | -498 |
| | 0.9±0.0 | 27.5 | 15.2±2.0 | 66±8 | -11.6±0.1 | 1.8 | -9.8 | -575 | -578 |
| | 0.8±0.0 | 30 | 13.7±2.3 | 73±12 | -13.0±0.1 | 3.2 | -9.8 | -669 | -658 |
| | 0.8±0.0 | 32.5 | 12.4±1.8 | 80±11 | -15.1±0.1 | 5.2 | -9.9 | -762 | -736 |
| | 0.8±0.0 | 35 | 11.5±1.7 | 87±12 | -16.7±0.1 | 6.8 | -9.9 | -855 | -814 |
| dasatinib | 0.7±0.0 | 20 | 5.6±0.9 | 178±28 | -4.1±0.0 | -4.9 | -9.0 | | |
| | 0.8±0.0 | 22.5 | 5.1±0.6 | 196±23 | -6.3±0.1 | -2.7 | -9.0 | | |
| | 0.8±0.0 | 25 | 2.3±0.1 | 423±18 | -7.7±0.1 | -1.0 | -8.7 | | |
| | 0.6±0.0 | 27.5 | 1.9±0.1 | 529±28 | -9.5±0.3 | 0.9 | -8.6 | -770±23 | -800±17 |
| | 0.5±0.0 | 30 | 1.6±0.1 | 606±37 | -11.5±0.2 | 2.9 | -8.6 | | |
| | 0.8±0.0 | 32.5 | 1.4±0.2 | 714±102 | -14.1±0.4 | 5.5 | -8.6 | | |
| | 1.0±0.0 | 35 | 1.1±0.2 | 909±165 | -15.6±0.6 | 7.1 | -8.5 | | |

El cambio entálpico en la formación del complejo de TK-ABL con imatinib fue mayor con respecto a TK-ABL con dasatinib, lo que indica la participación de un mayor número de interacciones electrostáticas en la unión de imatinib. Esto es consistente con el número de interacciones observadas en estructuras cristalográficas de complejos con imatinib (6 puentes de hidrógeno) y dasatinib (3 puentes de hidrógeno).

Mediante la dependencia térmica del ΔH_a se determinaron los valores de $\Delta C p_a^H$. Como se muestra en la **Tabla 2**, la dependencia del ΔH_a con la temperatura para la unión de TK-ABL con imatinib mostró un comportamiento no lineal. Con el fin de corroborar dicha tendencia, se

realizaron mediciones a temperaturas adicionales, observándose consistencia en las mediciones. Los datos se ajustaron satisfactoriamente mediante una función polinomial de segundo orden (**Figura 26**), obteniéndose un valor de ΔC_p^H de -109 cal/molK a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ y de -855 cal/molK a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. En contraste, para la asociación de TK-ABL con dasatinib, los datos ajustaron a una función lineal, obteniéndose un valor de $\Delta C_p^{\Delta H} = -770 \pm 23 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (**Figura 26**). Valores similares se obtuvieron mediante la dependencia térmica del ΔS (**Tabla 2**).

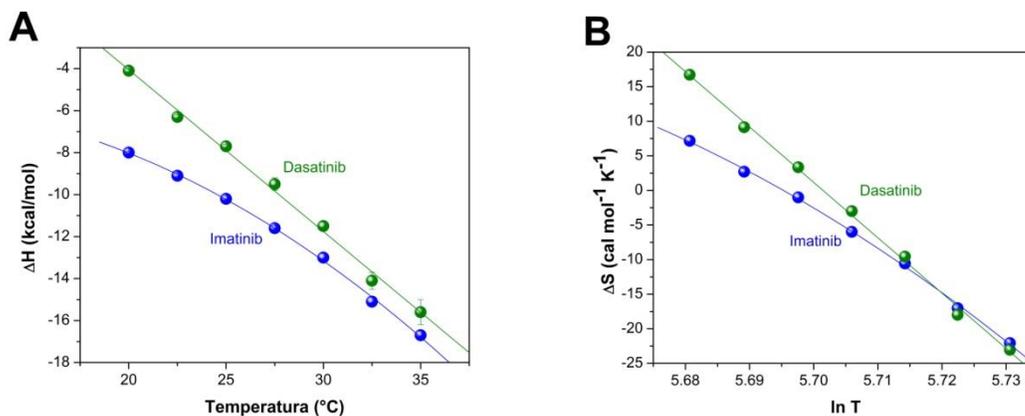


Figura 26. Cambios de entalpia (A) y entropía (B) en función de la temperatura para la interacción de TK-ABL con imatinib (azul) y dasatinib (verde).

El ΔC_p^a es un indicador poderoso de los cambios estructurales que sufre la proteína como resultado de una interacción molecular, de forma que valores negativos de ΔC_p^a indican un ocultamiento de ASA_{np} que es característico de las interacciones proteína-ligando y el plegamiento proteico.

Un análisis detallado de las contribuciones al ΔC_p^a global se obtiene disectándolo en sus componentes ΔC_p^{rig} y ΔC_p^{conf} :

$$\Delta C_p^a = \Delta C_p^{\text{conf}} + \Delta C_p^{\text{rig}} \quad \text{Ec. 20}$$

donde el ΔC_p^{rig} está relacionado con cambios de ASA debido al ocultamiento en la interfase de interacción debido solo a la ocupación del ligando (es decir, la unión tipo cuerpo rígido con el sitio de la proteína preformado), y el ΔC_p^{conf} relativo al cambio conformacional neto que sufre la proteína tras la unión de ligando.

El cálculo del ΔCp^{rig} se puede obtener directamente a partir de los valores de ΔASA_p y ΔASA_{np} de un complejo proteico determinado mediante la parametrización de Murphy y Freire (ec.9).⁴⁸ Con la finalidad de obtener los valores de ΔCp^{rig} , se usaron modelos de área superficial para determinar los valores de ΔASA_p y ΔASA_{np} , de los complejos TK-ABL·inhibidor a partir de las estructuras cristalográficas PDB 2HYY y PDB 2GQG para los complejos con imatinib y dasatinib, respectivamente, mediante el software NACCESS.⁵⁸

Los valores de ΔCp^{rig} fueron $-388 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para el complejo TK-ABL·imatinib y $-266 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para TK-ABL·dasatinib. Estos valores de ΔCp^{rig} corresponden a un 45 y 34 % del ΔCp_a a 35 °C para imatinib y dasatinib, respectivamente. Utilizando estos valores, los ΔCp^{conf} se calcularon mediante la **ecuación 20**. Estos últimos valores se utilizaron para determinar los cambios del área superficial accesible al solvente, correspondiente al cambio conformacional neto (ΔASA_t^{conf}), mediante la ecuación:

$$\Delta Cp^{conf} = \alpha f_{np} \Delta ASA_t^{conf} + \beta f_p \Delta ASA_t^{conf} \quad \text{Ec. 21}$$

donde f_{np} (0.677) y f_p (0.323) son las fracciones correspondientes al área no polar y polar en la interfase de asociación en la interacción proteica en cualquier complejo (por que no usar las de ABL??).⁵⁹

Finalmente, los valores de ΔASA_t^{conf} se transformaron a número de residuos que se ocultan tras la unión de ligando, asumiendo un área promedio de 47 \AA^2 por residuo:⁶⁰

$$\text{Número de residuos} = \frac{\Delta ASA}{47 \text{ \AA}^2} \quad \text{Ec. 22}$$

Los valores obtenidos del análisis del ΔCp_a anteriormente descrito se muestran en la **Tabla 3**. En el intervalo de 15 a 20 °C, la unión de imatinib implica exposición neta de ASA. A 22.5 °C la unión de imatinib parece ser de tipo cuerpo rígido, ya que los valores de ΔCp_a y ΔCp^{conf} son prácticamente idénticos. Conforme se incrementa la temperatura de 25 a 35 °C, el ΔCp^{conf} se vuelve negativo, correspondiendo a un ocultamiento de ΔASA_t^{conf} de $426\text{-}2116 \text{ \AA}^2$, lo que corresponde a 9-45 residuos. Para TK-ABL·dasatinib, el ΔASA_t^{conf} fue de -2284 \AA^2 , lo que corresponde al ocultamiento de 49 residuos. Por tanto, ΔASA_t^{conf} en la interacción de TK-ABL con dasatinib es ligeramente mayor al ocultamiento inducido por imatinib a 35 °C.

Tabla 3. Cambios de capacidad calorífica y área superficial accesible al solvente de la unión de ABL a imatinib y dasatinib.

| Proteína | Ligando | T (°C) | $\Delta C_p^{\Delta H}$ (cal / mol K) | ΔC_p^{rig} (cal / mol K) | ΔC_p^{conf} (cal / mol K) | ΔASA (Å ²) | Residuos |
|----------|-----------|--------|---------------------------------------|---|--|---------------------------------------|----------|
| TK-ABL | imatinib | 15 | -109 | -388 | 279 | 1264 | 27* |
| | | 17.5 | -202 | -388 | 186 | 842 | 18* |
| | | 20 | -296 | -388 | 92 | 419 | 9* |
| | | 22.5 | -389 | -388 | -1 | -4 | 0 |
| | | 25 | -482 | -388 | -94 | -426 | 9 |
| | | 27.5 | -575 | -388 | -187 | -849 | 18 |
| | | 30 | -669 | -388 | -281 | -1271 | 27 |
| | | 32.5 | -762 | -388 | -374 | -1694 | 36 |
| | 35 | -855 | -388 | -467 | -2116 | 45 | |
| | dasatinib | 20-30 | -770 | -266 | -504 | -2284 | 49 |

*Estos valores se refieren a exposición neta de residuos.

A temperaturas de 25 °C o mayores, el $-T\Delta S_a$ observado para la formación de los dos complejos de TK-ABL resulto desfavorable. Esto sugiere que de forma general se está produciendo una pérdida de movilidad del dominio cinasa tras la unión de los inhibidores. Con la finalidad de determinar los residuos que se rigidizan, se determinaron las contribuciones al ΔS_a de acuerdo con la **ecuación 6**.

El ΔS_{solv} es debido al ocultamiento de ASA_{np} , con la consecuente liberación de moléculas de agua. De tal forma que podemos aproximarnos a este término a cualquier temperatura de acuerdo con Baldwin:

$$\Delta S_{\text{solv}} = \Delta C p_a \left(\frac{T}{T_s} \right) \quad \text{Ec. 23}$$

en donde T_s es la temperatura a la cual la contribución del solvente al cambio de entropía es igual a cero (112 °C).⁶¹ El término ΔS_{vt} contribuye con aproximadamente $-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para eventos de asociación de complejos binarios.⁴⁸ Finalmente, el componente ΔS_{conf} lo calculamos de forma sencilla a partir de su despeje de la **ecuación 6**.

El ΔS_{conf} se origina a partir de la pérdida de grados de libertad conformacional de los residuos del dominio, seguramente con una participación significativa de aquellos localizados en

el área de unión al fármaco. Asumiendo una contribución de $-4.3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ por residuo, se calculó el número de residuos (X_{res}) que pierden grados de libertad en la interacción mediante (Tabla 4):⁶²

$$X_{\text{res}} = \frac{\Delta S_{\text{conf}}}{-4.3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}} \quad \text{Ec. 24}$$

Tabla 4. Deconvolución de los cambios de entropía para la interacción de TK-ABL con imatinib y dasatinib.

| Proteína | Ligando | T (°C) | ΔS_a (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | ΔS_{conf} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | ΔS_{solv} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | $\Delta S_{r/t}$ (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) | X_{res} |
|----------|-----------|--------|---|---|---|---|------------------|
| TK-ABL | imatinib | 15 | 10 | -14 | 32 | -8.0 | 3 |
| | | 17.5 | 8 | -41 | 57 | -8.0 | 9 |
| | | 20 | 7 | -66 | 81 | -8.0 | 15 |
| | | 22.5 | 3 | -92 | 103 | -8.0 | 21 |
| | | 25 | -1 | -116 | 123 | -8.0 | 27 |
| | | 27.5 | -6 | -140 | 142 | -8.0 | 33 |
| | | 30 | -11 | -163 | 160 | -8.0 | 38 |
| | | 32.5 | -17 | -185 | 176 | -8.0 | 43 |
| | 35 | -22 | -205 | 191 | -8.0 | 48 | |
| | dasatinib | 35 | -23 | -187 | 172 | -8.0 | 43 |

La contribución más importante a un ΔS_a favorable está dada por el ΔS_{solv} , el cual depende del $\Delta C p_a$ y la temperatura (Ec. 22). Como se muestra en la Tabla 3, al obtener un valor de $\Delta C p_a$ con notoria dependencia térmica para la formación del complejo TK-ABL·imatinib, se obtuvieron valores de ΔS_{conf} a cada temperatura. A diferencia de la formación del complejo TK-ABL·dasatinib, para el que solo obtenemos un valor de $\Delta C p_a$, en este caso, el cambio de ΔS_{solv} con la temperatura es despreciable, de tal modo que los valores de ΔS_{conf} son similares a las diferentes temperaturas. Para la asociación de TK-ABL·imatinib, se obtuvieron de 3 a 48 residuos con reducción de la movilidad a 15 y 35 °C, respectivamente, mientras que para TK-ABL·dasatinib se obtuvieron 43 residuos a lo largo del intervalo de temperatura probando.

7. DISCUSIÓN

Las tirosina-quinasas están involucradas en la regulación de procesos celulares tales como reparación del DNA, adhesión celular, dinámica del citoesqueleto, crecimiento y supervivencia. Mutaciones que afecten la regulación de su actividad pueden derivar en la progresión de distintos tipos de cáncer. En el caso de la LMC, la traslocación cromosómica que da origen a la proteína BCR-ABL es la causa molecular del 90 % de pacientes que sufren esta enfermedad. Debido a la fusión con BCR, la cinasa ABL, que de forma nativa se encuentra regulada, pierde su modulación intrínseca, encontrándose constitutivamente activa. El imatinib es el primer fármaco anticancerígeno blanco dirigido cuya acción es inactivar catalíticamente al dominio cinasa de ABL, estableciéndose como terapia de primera línea para el tratamiento de la LMC. Este fármaco inicialmente diseñado para la inhibición de la cinasa PKC se descubrió a partir de estudios de estructura-actividad dirigidos a la inhibición de ABL.²⁸ Sin embargo, un número importante de pacientes presentan fármaco-resistencia hacia el imatinib, por lo que se han desarrollado nuevos inhibidores de ABL contra fenotipos resistentes a imatinib. Los inhibidores de segunda generación se han optimizados a partir de datos estructurales de complejos ABL-inhibidor, obtenidos mediante cristalografía de rayos X, con el objetivo de incrementar la eficacia y abatir la fármaco-resistencia. El dasatinib es un fármaco de segunda generación activo contra algunas mutantes de ABL que son resistentes a imatinib. No obstante, hasta el momento sigue habiendo un número importante de pacientes con LMC que presentan resistencia farmacológica principalmente dada por mutaciones puntuales del dominio cinasa. Además, los tratamientos son extremadamente caros y se acompañan frecuentemente de severos efectos secundarios, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas para inhibir la actividad de ABL oncogénica.

El dominio cinasa aislado de ABL es el modelo sobre el cual se han realizado la mayoría de las investigaciones de tipo básico, enfocadas al desarrollo de inhibidores farmacológicos. Según Freire,⁶³ para lograr la máxima potencia de un fármaco ambos componentes del ΔG de interacción (entropía y entalpia) deben estar optimizados simultáneamente. En este sentido, resulta de interés determinar las firmas termodinámicas de interacción de ABL con sus inhibidores farmacológicos, dado que de esta manera se pueden tener nuevos indicios para optimizar la potencia inhibitoria. Además, las interacciones proteína-fármaco son fenómenos dinámicos que generalmente involucran cambios conformacionales que no siempre se pueden

elucidar mediante estudios cristalográficos, pero que parámetros como el ΔC_p como sensores sensibles en eventos de interacción molecular resultan más informativos. Ciertamente, ABL tiene una alta flexibilidad conformacional. Por ejemplo, el *loop* de activación puede oscilar en al menos dos conformaciones bien definidas, DFG-*out* y DFG-*in*. En este sentido, conocer los parámetros energéticos de la asociación proteína-fármaco permite estimar los cambios conformacionales que tienen lugar en la unión y contribuir a la construcción de un marco cuantitativo que contempla la energética de la unión molecular para optimizar y diseñar nuevos fármacos.

En el presente trabajo se determinaron los parámetros energéticos de la interacción del dominio cinasa aislado de ABL con los inhibidores imatinib que se une a una conformación DFG-*out* y con dasatinib que se une a una conformación DFG-*in*. Para lograr este objetivo, se sobreexpresaron las construcciones de ABL recombinante empleando el método descrito por Seelinger y col. con modificaciones menores, obteniendo cantidades de ambas construcciones con altos rendimientos (15-20 $\mu\text{g/L}$) y con alta pureza.⁵¹ La estructuración de TK-ABL fue confirmada mediante dicroísmo circular, obteniéndose una estructura de tipo α/β , (Figura 23). Para conocer el límite de temperatura para realizar titulaciones calorimétricas, se realizaron barridos de temperatura seguidos por DC, mostrando para TK-ABL un desplegamiento bifásico donde la primera y segunda transición inician alrededor de 40 y 60 °C, respectivamente (Figura 24). Previamente, nuestro grupo de trabajo mostró que la segunda transición corresponde al desplegamiento del subdominio C del dominio catalítico.⁶⁴ Para lograr el objetivo principal del trabajo, se realizaron titulaciones calorimétricas en el intervalo de temperaturas de 20 a 35 °C, cada 2.5 °C. En el caso de TK-ABL·imatinib, se realizaron mediciones adicionales a 15 y 17.5 °C para definir la tendencia polinomial de segundo orden de la dependencia térmica del ΔH .

Los valores de K_a obtenidos que TK-ABL es alrededor ocho veces más afín a imatinib que a dasatinib. Si esta diferencia fuera extrapolable a condiciones *in vivo*, se podría decir que el imatinib resulta tener una mejor potencia farmacológica que el dasatinib, en el caso de pacientes que no han desarrollado resistencia al primer inhibidor. Las firmas termodinámicas de ambos inhibidores resultaron ser muy similares a 35 °C, con entalpía favorable y entropía desfavorable. En este sentido, tanto el imatinib como el dasatinib tiene un potencial para ser optimizados en términos hidrofóbicos mejorando el valor entropico. La entropía desfavorable indica que la pérdida de grados de libertad por la rigidización de la proteína tras la unión de los fármacos no se compensa por la desolvatación de los inhibidores y de la proteína. En cambio, la entalpía

favorable revela la formación de un número significativo de interacciones electrostáticas favorables, incluyendo aquellas que le dan especificidad a la interacción (sección 1.6 de esta tesis). El comportamiento térmico de las firmas termodinámicas resultó ser muy diferente entre los dos inhibidores. La deconvolución del ΔC_{p_a} mostró que el número de residuos perturbados tras la unión con imatinib varía drásticamente conforme se incrementa la temperatura, pasando de la exposición neta de 27 residuos a 15 °C al ocultamiento neto de 45 residuos a 35 °C, es decir, una diferencia neta de 72 residuos. Resultados similares se derivan del análisis de la entropía de unión. En contraste, el dasatinib indujo el ocultamiento de un número constante de residuos en el intervalo de temperatura probado, ocultamiento semejante al observado para imatinib a la mayor temperatura estudiada. La diferencia en las dependencias térmicas de la entalpía de unión de imatinib y dasatinib revela con claridad que la proteína ocupa diferentes mecanismos para interactuar con los dos inhibidores. Esto no es de sorprender, dada la gran plasticidad estructural que posee TK-ABL.

Agafonov y colaboradores,⁶⁵ mediante el uso de espectrofluorometría siguiendo la cinética rápida en el rango de milisegundos y mediante NMR con precisión residuo específica, elucidaron un mecanismo cinético para la formación del complejo Abl-imatinib. Los autores descubrieron que la unión a imatinib tiene lugar a través de una selección conformacional seguida de un ajuste inducido (**Figura 27**). Experimentalmente, fue posible resolver que a baja temperatura (5 °C) coexisten dos conformaciones de la forma apo de TK-ABL, una semejante a DFG-*out* competente para unir imatinib y otra semejante a DFG-*in* que no lo puede unir. De entre estas dos conformaciones, el imatinib “selecciona” específicamente a la forma tipo DFG-*out*, favoreciendo el equilibrio hacia esa especie. La unión con DFG-*out* se da a través una etapa rápida que implica la asociación física de la proteína y el inhibidor: $\text{Abl}_{\text{DFG-out}} + \text{imatinib} \leftrightarrow \text{Abl}_{\text{DFG-out}} \cdot \text{imatinib}$, seguida de una etapa lenta donde ocurre una transición estructural por 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 (**Figura 27**)⁶⁵

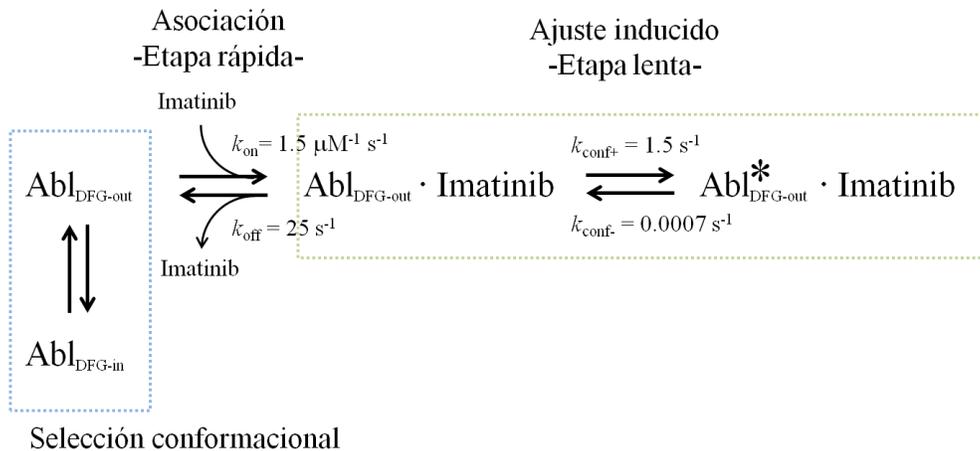


Figura 27. Modelo propuesto de unión de Abl con imatinib, en el que se involucran tres eventos: Selección conformacional, contacto directo entre las moléculas y ajuste inducido de la proteína.⁶⁵

Una forma de enmarcar nuestros resultados calorimétricos de unión con imatinib dentro del mecanismo descrito en la **Figura 27** es proponiendo que a bajas temperaturas la conformación DFG-*in* es la más abundante, mientras que conforme se incrementa la temperatura, el equilibrio se desplaza progresivamente hacia la conformación tipo DFG-*out* que es competente para unir imatinib. Esta propuesta es consistente con el hecho de que Agafonov y col. (2014) solo pudieron observar la selección conformacional a baja temperatura y no a temperatura ambiente. Además, estudios de dinámica molecular a 30 °C muestran que TK-ABL se encuentra mayoritariamente en una conformación que denominan semi-cerrada, la cual es muy cercana a la DFG-*out*.⁶⁶ El enriquecimiento del conformero competente para unir imatinib estaría también implicado en la mayor afinidad de TK-ABL por imatinib que por dasatinib a temperatura alta. Si ocurriera que conforme se incrementa la temperatura deja de existir la selección conformacional, a altas temperaturas se observaría exclusivamente el ajuste inducido de la proteína causada por imatinib. De ser el caso, la transición conformacional entre DFG-*in* y DFG-*out* estaría acoplada a la exposición neta de un número significativo de residuos de proteína, al menos de alrededor de 70 residuos, que es la diferencia global entre la unión de imatinib a baja y alta temperatura.

Por otro lado, el ΔH_a observado para la interacción de TK-ABL con dasatinib mostró una dependencia prácticamente lineal con respecto a la temperatura. Esto implicaría que la unión de este inhibidor no es sensible a las variaciones estructurales que hacen a TK-ABL competente o incompetente para unir imatinib.

8. CONCLUSIONES

-Las firmas termodinámicas de la interacción de TK-ABL con los inhibidores competitivos imatinib y dasatinib están caracterizados por una entalpía favorable a la cual se le opone una entropía desfavorable y de magnitud considerable.

-Estos resultados indican que existe margen para que ambos inhibidores puedan ser optimizados mediante su modificación hacia moléculas más hidrofóbicas, de manera que se pueda invertir la entropía desfavorable.

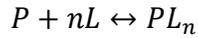
-La afinidad del dasatinib es ocho veces menor a la de imatinib.

-La interacción TK-ABL-imatinib mostro que el ΔC_p depende fuertemente de la temperatura, mientras que con dasatinib se observó una independendencia térmica. Existen mecanismos acoplados para la interacción con imatinib, con dos reordenamientos conformacionales, uno de los cuales tiende a desaparecer conforme se incrementa la temperatura. En cambio, tras la unión de dasatinib al parecer ocurre un gran cambio conformacional que se mantiene a lo largo de la temperatura.

-Este trabajo constituye un reporte detallado de la energética asociada a la interacción de TK-ABL con imatinib y con dasatinib, aportando información sobre las bases energético-estructurales que rigen la inhibición de la proteína oncogénica y probando la utilidad de este tipo de análisis para la selección y diseño de fármacos más efectivos.

Anexo 3 Deducción matemática del modelo a un solo sitio de unión

En un evento de asociación entre proteína (P) y ligado (L)



Donde n es el número de sitios donde el ligando puede unirse a la proteína. Para una unión equimolar la constante de asociación en el equilibrio es:

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n}$$

Donde la distribución de los reactantes en el equilibrio está descritas por:

$$[P]_t = [P] + [PL]$$

$$[L]_t = [L] + [PL]$$

La concentración total de los sitios de unión en un modelo de un solo sitio de unión es:

$$[P]_t = n[P]_t$$

La ecuación $[P]_t = [P] + [PL]$ puede ser descrita en términos de fracciones de sitios de unión ocupados (Θ) y libres ($1-\Theta$):

$$\frac{[P]}{[P]_t} + \frac{[PL]}{[P]_t} = \frac{[P]}{[P]_t} + \Theta = 1$$

Re arreglando la ecuación se obtiene

$$\frac{[P]}{[P]_t} + \Theta = 1$$

Multiplicando por $[P]_t$:

$$[P]_t \left(\frac{[P]}{[P]_t} + \Theta = 1 \right) \therefore [P] + [P]_t \Theta = [P]_t$$

Sustituyendo $[P]_t = n[P]_t$

$$[P]_t = [P] + n[P]_t \Theta$$

Estableciendo que $n[P]_t \Theta = [PL]$ nos dice que la concentración del complejo está dada por la fracción de la proteína total por cada sitio de unión disponible. La distribución de concentraciones del ligando es:

$$[L]_t = [L] + n[P]_t \Theta$$

La constante de equilibrio puede expresarse de la forma:

$$K_a = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)[L]}$$

Despejando [L] obtenemos:

$$[L] = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)K_a}$$

Sustituyendo en la ecuación $[L]_t = [L] + n[P]_t \Theta$:

$$[L]_t = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)K_a} + n[P]_t \Theta$$

Multiplicando por $(1 - \Theta)$:

$$(1 - \Theta) \left([L]_t = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)K_a} + n[P]_t \Theta \right) \therefore [L]_t (1 - \Theta) = \frac{(1 - \Theta)\Theta}{(1 - \Theta)K_a} + n[P]_t \Theta (1 - \Theta)$$

Re ordenando:

$$[L]_t - [L]_t \Theta = \frac{\Theta}{K_a} + n[P]_t \Theta - n[P]_t \Theta^2 \therefore [L]_t - [L]_t \Theta - \frac{\Theta}{K_a} - n[P]_t \Theta + n[P]_t \Theta^2 = 0$$

Dividiendo entre $n[P]_t$:

$$\frac{[L]_t - [L]_t \Theta - \frac{\Theta}{K_a} - n[P]_t \Theta + n[P]_t \Theta^2}{n[P]_t} = 0$$

$$\therefore \frac{[L]_t}{n[P]_t} - \frac{[L]_t \Theta}{n[P]_t} - \frac{\Theta}{n[P]_t K_a} - \frac{n[P]_t \Theta}{n[P]_t} + \frac{n[P]_t \Theta^2}{n[P]_t} = \frac{0}{n[P]_t}$$

$$\therefore \frac{[L]_t}{n[P]_t} - \frac{[L]_t \Theta}{n[P]_t} - \frac{\Theta}{n[P]_t K_a} - \Theta + \Theta^2 = 0$$

Agrupando como término semejante Θ :

$$\Theta^2 + \Theta \left(-\frac{[L]_t}{n[P]_t} - \frac{1}{n[P]_t K_a} - 1 \right) + \frac{[L]_t}{n[P]_t} = 0$$

Cuya única raíz cuadrada real es: (Wiseman T et al 1989)(Perozzo R et al 2004)

$$\Theta = \frac{1 + \frac{[L]_t}{n[P]_t} + \frac{1}{nK_a[P]_t} - \sqrt{\left(-1 - \frac{[L]_t}{n[P]_t} - \frac{1}{nK_a[P]_t} \right)^2 - \frac{4[L]_t}{n[P]_t}}}{2}$$

El calor acumulado o integrado del proceso después de la última inyección es dado por:

$$Q = n[P]_t V_0 \Delta H \Theta$$

Para cada inyección el calor asociado (q_i) a la reacción se obtiene integrando el área bajo la curva de cada pico, que es proporcional a la fracción de ligando unido Θ :

$$q_i = \frac{n[P]_t V_0 \Delta H}{2} \left[1 + \frac{[L]_t}{n[P]_t} + \frac{1}{nK_a[P]_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_t}{n[P]_t} + \frac{1}{nK_a[P]_t} \right)^2 - \frac{4[L]_t}{n[P]_t}} \right]$$

10. REFERENCIAS

- ¹ Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 340:1330-1340.
- ² Corrado C, Raimondo A, Flugy AM, Fontana S, Santoro A, Stassi G, *et al.* Carboxyamidotriazole 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.
- ³ Cervera-Cevallos EE. Biología molecular y tratamiento de la leucemia mieloide crónica. *Gac Méd Méx.* 2002; 138 suppl 1: S102-S105.
- ⁴ Roskoski R. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309: 709-717.
- ⁵ 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.
- ⁶ Avilés-Vázquez S, *et al.* Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LCM). *Gac Méd Méx.* 2013; 149: 646-654
- ⁷ 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.
- ⁸ 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.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 33-44.
- ¹² Pendergast AM. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res.* 2002; 85: 51-100.
- 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: 559-571.
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ Ganguly S, Plattner R. Activation of Abl Family Kinases in Solid Tumors. *Genes Cancer.* 2012; 3: 414-425.
- ¹⁶ www.cbioportal.org
- ¹⁷ The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45:D158-D169.
- ¹⁸ Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, *et al.* Structural basis of the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell.* 2003; 112: 859-871.
- ¹⁹ Saleh T, Rossi P, Kalodimos CG. Atomic view of the energy landscape in the allosteric regulation of Abl kinase. *Nat Struct Mol Biol.* 2017; 24: 893-901.
- ²⁰ Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smigthgall TE. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J Biol Chem.* 2013; 288: 5443-5450.
- ²¹ Skora L, Mestan J, Fabbro D, Jahnke W, Grzesiek S. NMR reveals the allosteric opening and closing of Abelson tyrosine kinase by ATP-site and myristoyl pocket inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; E4437-E4445.
- ²² Badger J, Grover P, Shi H, Panjarian S, Enger J, Smithgall T, Makowski L. c-Abl tyrosine kinase adopts multiple active conformational states in solution. *Biochem.* 2016; 55:3251-3260.
- ²³ Lorenz S, Deng P, Hantschel O, Superi-Furga G, Kuriyan J. Crystal structure of an SH2-kinase of c-Abl and effect of the SH2 domain on kinase activity. *Biochem.* 2015; 468: 253-291.

-
- ²⁴ Yang J, Campobasso N, Biju MP, Fisher K, Pan XQ, Cottom J, *et al.* Discovery and characterization of a cell-permeable, small-molecule c-Abl kinase activator that binds to the myristoyl binding site. *Chem Biol.* 2011; 18: 177-186.
- ²⁵ Reddy EP, Aggarwal AK. The ins and outs of Bcr-Abl inhibition. *Genes Cancer.* 2012; 3: 447-454.
- ²⁶ Wang q, Zorn J, Kuriyan J. A structural atlas of kinases inhibited by clinically approved drugs. *Methods Enzymol.* 2014; 548: 23-67
- ²⁷ 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.
- ²⁸ 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.
- ²⁹ Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 2002; 109: 275-282.
- ³⁰ 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.
- ³¹ Tokarski JS, Newitt JA, Chang CYJ, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, *et al.* The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 2006; 66: 5790-5797.
- ³² 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.
- ³³ 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.
- ³⁴ Tanneer K, Guruprasad L. Ponatinib is a Pan-Bcr-Abl kinase inhibitor: MD simulations and SIE study. *PLoS One.* 2013; 8: e78556.
- ³⁵ 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.
- ³⁶ Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-Approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36: 422-439.
- ³⁷ Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase-role and significance in cancer. *Int J Med Sci.* 2014; 1: 101-115.
- ³⁸ Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist.* 2003; 8: 531-538.
- ³⁹ Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315: 971-979.
- ⁴⁰ Velazquez-Campoy A, Luque I, Freire E. The application of thermodynamic methods in drug design. *Thermochim Acta.* 2001; 380: 217-227.
- ⁴¹ Davis AM, St-Gallay SA, Kleywegt J. Limitations and lessons in the use of X-ray structural information in drug design. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 831-841.
- ⁴² Kawasaki Y, Freire E. Finding a better path to drug selectivity. *Drug Discov Today.* 2011; 16: 985-990.
- ⁴³ Freire E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 869-874.
- ⁴⁴ Filgueira de Azevedo Jr W, Dias R. Experimental Approaches to evaluate the thermodynamics of protein-drug interactions. *Current Drug Targets.* 2008; 9: 1071-1076.
- ⁴⁵ Chaires JB. Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annu Rev Biophys.* 2008; 37: 135-151.
- ⁴⁶ 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.
- ⁴⁷ Perozzo R, Flokers G, Scapozza L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Sig Transd*. 2004; 24: 1-52.
- ⁴⁸ Homans SW. Dynamics and thermodynamics of ligand-protein interactions. *Top Curr Chem*. 2007; 272: 51-82.
- ⁴⁹ Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, *et al*. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:144.
- ⁵⁰ Vega S, Abian O, Velázquez-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.
- ⁵¹ Prabhu NV, Sharp KA. Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem*. 2015; 56: 521-548.
- ⁵² Murphy KP, Freire E. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem*. 1992; 43: 313-361.
- ⁵³ Freire E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discov Today Technol*. 2004; 1: 295-299.
- ⁵⁴ Brown A. Analysis of cooperativity by isothermal titration calorimetry. *Int J Mol Sci*. 2009; 10: 3457-3477.
- ⁵⁵ Wiseman T, Williston S, Brandts J, Lin L. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*. 1989; 179: 131-137.
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ García-Hernández E, Zubillaga RA, Chavelas-Adame EA, Vázquez-Contreras E, Rojo-Dominguez A, Costas M. Structural energetic of protein-carbohydrate interactions: insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors. *Pro Sci*. 2003; 12: 135-142.
- ⁵⁸ Pulido NO, Salcedo G, Pérez-Hernández G, José-Nuñez C, Velázquez-Campoy A, García-Hernández E. Energetic effects of Magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the F₁-ATPase α subunit. *Biochemistry*. 2010; 49: 5258-5268.
- ⁵⁹ García-Hernández E, Zubillaga RA, Rodríguez-Romero A, Hernández-Arana A. Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interaction: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology*. 2000; 10: 993-1000.
- ⁶⁰ Stites WE. Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutation analysis. *Chem Rev*. 1997; 97: 1233-1250.
- ⁶¹ Baldwin RL. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 83: 8069-8072.
- ⁶² 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.
- ⁶³ Freire E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discov Today Technol*. 2004; 1: 295-299.
- ⁶⁴ García M. Estabilidad termodinámica y bases energéticas de la unión del dominio tirosina quinasa bcr-abl a nucleótidos de adenosine y su inhibidor imatinib (sti-571). Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas. 2014.
- ⁶⁵ Agafonov RV, Wilson C, Otten R, Buosi V, Kern D. Energetic dissection of Gleevec's selectivity toward human tyrosine kinases. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; 21: 848-853.
- ⁶⁶ Lovera S, Sutto L, Boubeva R, Scapozza L, Dölker N, Gervasio F. The different flexibility of c-Src and c-Abl kinases regulates the accessibility of a druggable inactive conformation. *J Am Chem Soc*. 2012; 134: 2496-2499.