



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efectos energéticos del reconocimiento de nucleótidos del dominio catalítico de la tirosina-cinasa oncogénica BCR-ABL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Itzel López González

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique García Hernández
[Instituto de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna
[UAM-I](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Octubre, 2021



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 del Proyecto PAPIIT IN206221, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 235831. Se agradece el apoyo de las técnico laboratoristas Dra. Patricia Cano Sánchez, del Laboratorio de Biología Molecular y Rocío Patiño Maya, del Laboratorio de Polarimetría y Espectroscopía del Instituto de Química, UNAM. Itzel López González, alumna de este programa, recibió la beca de maestría 235831, otorgada por CONACyT.

Contenido

1.	Introducción.....	4
1.1	<i>Leucemia mieloide crónica</i>	4
1.2	<i>ABL y BCR-ABL</i>	6
1.2.1	<i>Organización estructural de ABL y BCR-ABL</i>	6
1.2.2	<i>Dominios SH₃ y SH₂</i>	9
1.2.3	<i>Dominio cinasa</i>	11
1.2.4	<i>Sito de unión de ATP</i>	13
1.3	<i>imatinib, el primer inhibidor farmacológica desarrollado contra una proteína oncogénica</i> 17	
1.3.1	<i>Bases estructurales de la unión de imatinib al dominio cinasa de ABL</i>	19
1.3.2	<i>Resistencia a imatinib</i>	20
2.	Planteamiento del problema	22
3.	Objetivos	23
3.1	<i>General</i>	23
3.2	<i>Particulares</i>	23
4.	Metodología	24
4.1	<i>Sobreexpresión de las construcciones TK-ABL y SH-ABL</i>	24
4.3	<i>Purificación por columna de intercambio aniónico</i>	25
4.4	<i>Cuantificación y preparación de las muestras</i>	26
4.5	<i>Dicroísmo circular</i>	27
4.6	<i>Calorimetría de titulación isotérmica</i>	27
5.	Resultados y discusión.....	31
5.1	<i>Purificación de las construcciones TK-ABL y SH-ABL</i>	31
5.2	<i>Dicroísmo circular de TK-ABL y SH-ABL</i>	32
5.3	<i>Calorimetría de titulación isotérmica del dominio TK-ABL</i>	36
5.4	<i>Análisis estructural del reconocimiento de nucleótidos por TK-ABL basado en propiedades energéticas</i>	42
6.	Conclusiones	45
7.	Referencias	47

1. Introducción

Las cinasas son enzimas esenciales en la señalización, que regulan diversos procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, el metabolismo, la diferenciación y la migración celular. La importancia de las cinasas se ve reflejada en el número de genes codificado en el genoma humano: 518 en total, divididas en 9 grupos, 134 familias y 201 subfamilias. Esto constituye alrededor del 2% del genoma humano. Las cinasas comparten un dominio catalítico conservado en secuencia y estructura, aunque son notablemente diferentes en cuanto a los elementos y mecanismos de regulación de su catálisis. La desregularización de su actividad subyace en varias enfermedades, incluyendo esquizofrenia, diabetes y varios tipos de cáncer (Manning, G. *et al.*, 2002; Noble, M. E., *et al.*, 2004; Cowan-Jacob *et al.*, 2009; Rosenblum *et al.*, 2013; Foda, *et al.*, 2014).

Uno de los grandes grupos de las cinasas son las proteínas tirosina-cinasa, las cuales se pueden clasificar en dos grandes clases: las receptoras transmembranales y las no receptoras. Alrededor de una tercera parte de las tirosina-cinasas pertenecen a la última clase. Tienen una localización citoplasmática, carecen de una región transmembranal y generalmente funcionan río abajo de las receptoras tirosina-cinasa (Cowan-Jacob, S, *et al.*, 2009; Noble, M.E., *et al.*, 2004). En este último grupo se encuentra la proteína ABL, la cual guarda una estrecha relación con el establecimiento y desarrollo de la leucemia mieloide crónica (LMC).

1.1 Leucemia mieloide crónica.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un tipo de cáncer poco frecuente. En México no se cuentan con estadísticas oficiales a cerca de la epidemiología de dicha enfermedad. Chávez-González y colaboradores (2009) reportan que, según datos de hematólogos nacionales, para 2009 existían 80, 000 casos de leucemia, de los cuales el 10% correspondieron a LMC. Además, la incidencia anual aproximada es de 1.5 casos por cada 100 mil habitantes, con una mediana de edad cercana a los 45 años al momento del diagnóstico (Chávez-González, *et al.*, 2009).

La LMC es originada por un desorden maligno clonal de las células germinales hematopoyéticas, lo que resulta en el incremento de las células mieloides, eritroides y plaquetas, así como en la hiperplasia mieloide en la médula ósea (Sawyers, 1999). Su diagnóstico está basado usualmente en la detección del cromosoma *Philadelphia* (Ph+), el cual corresponde al cromosoma 22 anormalmente corto. Esta alteración se describió primero en 1960 como un acortamiento del cromosoma 22 y, posteriormente, como la translocación recíproca t (9; 22) (q34; q11) entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. En este evento, los genes que codifican para BCR (*Breakpoint cluster region*) en el cromosoma 22 y ABL (*Abelson leukemia virus*) en el cromosoma 9 se fusionan (Fig. 1), teniendo como consecuencia la creación de un nuevo gen híbrido llamado BCR-ABL. La transcripción de BCR-ABL resulta en un mRNA híbrido que codifica para una proteína de fusión BCR-ABL, la cual es una tirosina-cinasa constitutiva citoplasmática (Kantarjian *et al.*, 1991; Sawyers, 1999; Noble, *et al.*, 2004; Greuber *et al.*, 2013).

Dependiendo del sitio donde ocurra la fusión en el gen de BCR, pueden expresarse tres diferentes proteínas de fusión con pesos moleculares de 185 kDa (P185), 210 kDa (P210) y 230 kDa (P230). Cada gen de fusión codifica para la misma porción de ABL, pero para diferentes longitudes de secuencia de BCR incorporadas en el N-terminal. Las proteínas de fusión resultantes están asociadas con distintos tipos de leucemia. P185 está presente en el 20%-30% de adultos y del 3%-5% de niños con leucemia aguda linfocítica de células B; P210 está asociada con el 90% de pacientes adultos con LMC, siendo el marcador molecular para dicha enfermedad, mientras que P230 ha sido

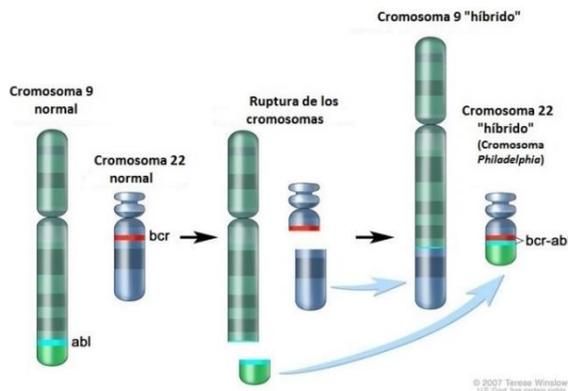


Figura 1. Translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22. De izquierda a derecha se muestran los cromosomas 9 y 22 en su forma normal, posteriormente la ruptura de ambos cromosomas, así como la translocación de los mismos, dando como resultado dos cromosomas híbridos: un cromosoma 9 más largo y el cromosoma *Philadelphia*, que posee el gen de la proteína quimérica BCR-ABL. (Imagen modificada de <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44179>).

encontrada en LMC neutrofílica y en casos raros de LCM (Kantarjian *et al.*, 1991; Advani & Pendergast, 2002; Greuber *et al.*, 2013).

1.2 ABL y BCR-ABL

La familia de la tirosina-cinasa ABL está constituida por ABL y su único parálogo ARG. La ABL de mamíferos se expresa de manera ubicua en diversos compartimentos subcelulares incluidos el núcleo, citoplasma, mitocondria y el retículo endoplasmático. Cuando se encuentra en su estado activo, regula una gran variedad de funciones biológicas, tales como la función citoesquelética, la diferenciación miogénica, regulación del ciclo celular y supervivencia, respuestas a estrés oxidativo y daños en el ADN, así como la muerte celular. Esta diversidad de actividades está dictada por varios dominios funcionales, los cuales determinan la localización subcelular y los patrones de interacción de ABL (Hantschel & Superti-Furga, 2004)

1.2.1 Organización estructural de ABL y BCR-ABL

ABL es una tirosina-cinasa del tipo no receptora que presenta una estructura modular. Consta de ~1150 residuos. La parte central de ABL presenta una organización de dominios similar a las cinasas de la familia de Src. Incluye un dominio SH3 (*Src homology 3 domain*), un dominio SH2 (*Src homology 2 domain*), un *linker* que enlaza al dominio SH2 con el dominio cinasa y un dominio cinasa bilobulado (TK-ABL). Este núcleo se encuentra flanqueado por una región CAP N-terminal de alrededor de 80 residuos. La región C-terminal posee secuencias ricas en prolina (PXXP), elementos de unión para dominios SH3, señales de localización celular y exportación, un dominio de unión a ADN y un dominio de unión a actina (Fig. 2).

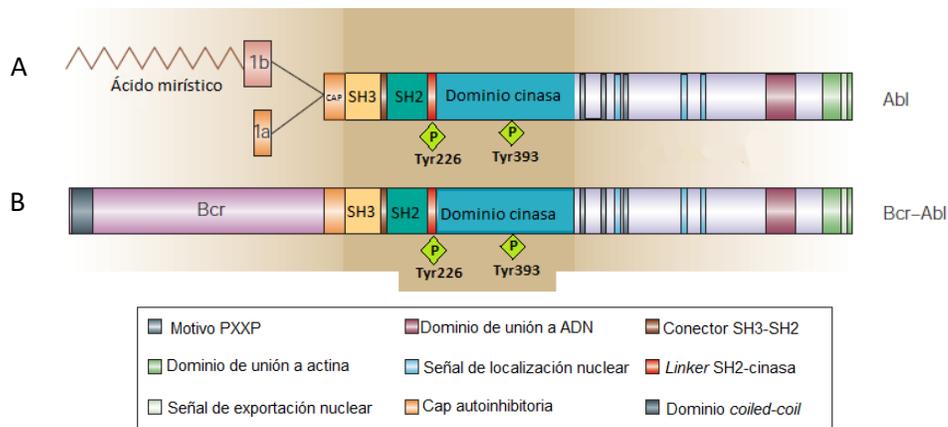


Figura 2. Organización estructural de ABL y BCR-ABL. A. Se muestran las dos variantes de ABL. La forma 1b presenta un grupo miristoilo en la región del CAP N-terminal. B. Proteína quimérica BCR-ABL. En ambos paneles se representan los residuos de tirosinas que pueden ser fosforilados (Tyr 226 y 393). Imagen modificada de Hantschel & Superti-Furga, 2004.

Las células humanas expresan dos variantes de ABL, ABL 1a y ABL 1b. La diferencia entre éstas se localiza en el extremo N-terminal. ABL 1b está miristoilada en un residuo de glicina, mientras que ABL 1a no presenta la modificación post-traducciona (Fig. 2A). En la proteína quimérica BCR-ABL, parte del CAP se pierde, lo que tiene como consecuencia que el grupo miristoilo en ABL 1b sea eliminado (Fig. 2B) (Nagar *et al.*, 2003,2006; Hantsche & Superti-Furga, 2004; Greuber *et al.*, 2013).

La actividad catalítica de ABL está altamente regulada por interacciones intermoleculares, intramoleculares y modificaciones post-traduccionales. De manera normal, ABL se puede encontrar en dos conformaciones, una cerrada o autoinhibida y otra abierta o activa. Debido a que se trata de una proteína modular, presenta diversos elementos estructurales con conformaciones características en sus formas activa o autoinhibida. En general, las interacciones que disgregan la conformación cerrada y que estabilizan la conformación abierta, promueven un incremento en la actividad enzimática (Figs. 3 y 4) (Greuber *et al.*, 2013).

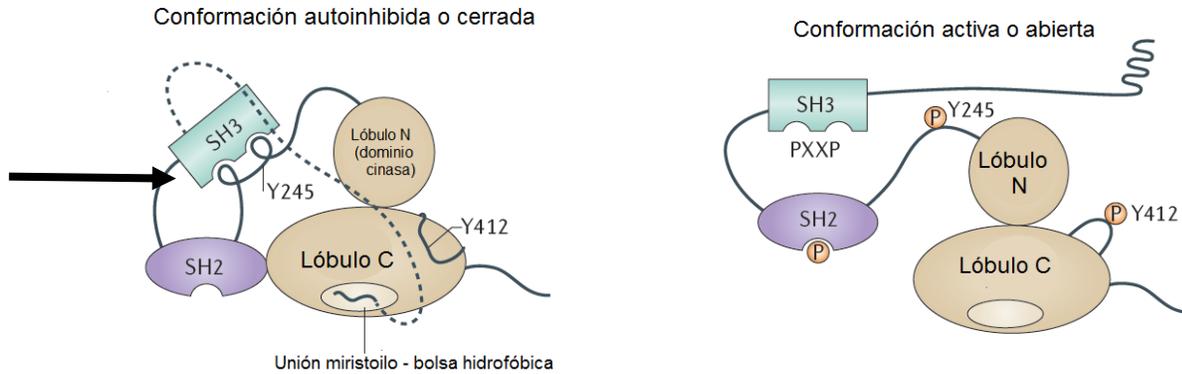


Figura 3. Representación de las conformaciones auto-inhibida y activa de ABL. Izquierda. En la conformación inactiva o cerrada, el dominio SH3 se une al *linker* que conecta los dominios SH2 y cinasa, y el dominio SH2 interactúa con el lóbulo C-terminal del dominio cinasa, formando una estructura tipo abrazadera entre SH3-SH2. El residuo miristoilado en el extremo N de la isoforma ABL 1b se une a una bolsa hidrofóbica dentro del lóbulo C del dominio cinasa, estabilizando la conformación cerrada. La línea discontinua representa la secuencia N-terminal río arriba del dominio SH3, la cual se pliega para promover la unión del grupo miristoilo a la bolsa en el lóbulo C del dominio cinasa. Derecha. En la conformación activa, se adquiere una conformación extendida, en la cual el dominio SH2 interactúa ahora con el lóbulo C del dominio catalítico, mientras que el dominio SH3, junto con el CAP y el grupo miristoilo, quedan expuestos al solvente. Imagen modificada de Greuber, *et al.*, 2013.

Los elementos estructurales que se requieren para la auto-inhibición involucran al grupo miristoilo en la región CAP, así como a los dominios SH3, SH2 y TK-ABL. El dominio SH3 se une a un “*linker*” que contiene secuencias PXXP; este “*linker*” une a los dominios SH2 y TK-ABL. El dominio SH2 interactúa con el lóbulo C-terminal de TK-ABL, de tal manera que se forma una estructura tipo abrazadera entre SH3, SH2 y TK-ABL. Por otro lado, el grupo miristoilo, en el extremo N-terminal, se une a una bolsa hidrofóbica dentro del lóbulo C-terminal del dominio TK-ABL, lo que induce una curvatura en la hélice α del lóbulo C, permitiendo que el dominio SH2 se acople al lóbulo C de TK-ABL. La interacción del ácido mirístico con el dominio TK-ABL favorece la conformación cerrada. La mutación en la secuencia de miristoilación tiene como resultado una actividad cinasa altamente incrementada (Fig. 4) (Panjarian *et al.*, 2013; Greuber *et al.*, 2013; Barilá & Supeti-Furga, 1999; Pluk *et al.*, 2002; Hantschel *et al.*, 2003).

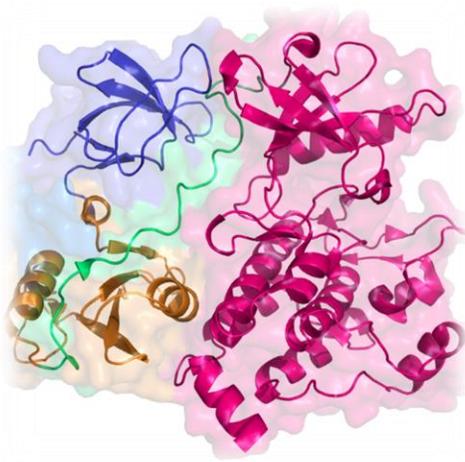


Figura 4. Estructura de ABL en conformación cerrada donde se muestran los dominios regulatorios. En color azul SH3, en anaranjado, SH2; en rosa TK-ABL y en verde el *linker* que enlaza SH2-TK-ABL (PDB 2FO0).

1.2.2 Dominios SH3 y SH2

El dominio SH3 (residuos 65-118) de ABL está compuesto por dos láminas β antiparalelas cortas que forman una estructura en forma de barril. Reconoce secuencias ricas en prolina que tienden a adoptar una conformación helicoidal de poliprolina tipo II (PPII); además, se une al conector que enlaza a los dominios SH2 y cinasa, ya que este último dominio forma una hélice PPII. El contacto principal que favorece la estabilización de la unión entre SH3 y el dominio TK-ABL se da entre los residuos Tyr70,115 en SH3 y Pro223 en el dominio cinasa (Fig. 5). El dominio SH2 (residuos 118-217) reconoce secuencias que poseen fosfo-tirosinas. Esta función contribuye al reconocimiento y fosforilación de algunas proteínas que son sustrato de ABL. Estructuralmente, consta de una lámina β antiparalela central flanqueada por hélices α en cada lado. La lámina central divide el dominio en dos bolsas funcionalmente distintas, una que reconoce la fosfotirosina y una segunda que se une a residuos específicos que se encuentran río abajo de la fosfotirosina (Hantschel & Superti-Furga, 2006; Panjarian *et al.*, 2013).

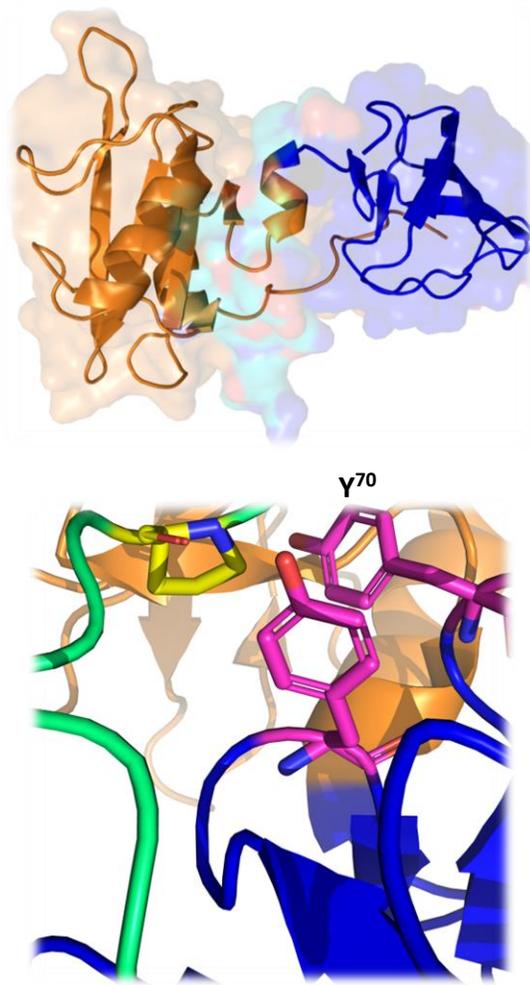


Figura 5. Dominios SH de ABL. Arriba. En color azul SH3 y anaranjado SH2. Abajo. Principales contactos que estabilizan la interacción entre SH3 y TK-ABL (PDB 2FO0)

El dominio SH2 se compacta contra el lóbulo C del dominio TK-ABL a través de una red de puentes de hidrógeno y una interacción única de apilamiento entre la Tyr¹⁵⁸ en SH2 y la Tyr³⁶¹ del lóbulo C del dominio cinasa. Además, puede experimentar una reorientación significativa durante la activación del dominio cinasa. En la conformación activa de ABL, el dominio SH2 se mueve desde la parte posterior del lóbulo C hasta una nueva posición en el lóbulo N del dominio cinasa. Esta orientación permite estabilizar la forma activa del dominio cinasa (Fig. 6) (Panjarian *et al.*, 2013).

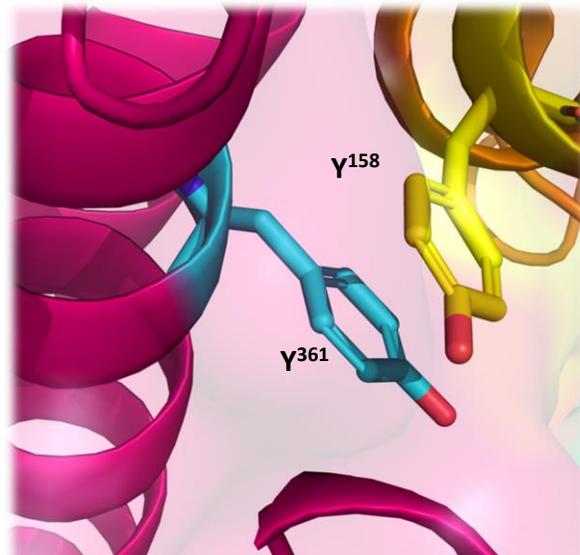


Figura 6. Interacción de apilamiento entre el residuo de Tyr¹⁵⁸ en el dominio SH2 y la Tyr³⁶¹ en el dominio TK-ABL (PDB 2FO0)

1.2.3 Dominio cinasa

El dominio cinasa cataliza la transferencia del fosfato- γ del ATP sobre residuos de tirosina en proteínas y péptidos cliente. Las orientaciones relativas de los lóbulos N y C, así como los residuos conservados en el sitio activo, coordinan la interconversión dinámica de las conformaciones activa e inactiva del dominio cinasa con la función catalítica. El lóbulo N está compuesto por una lámina β antiparalela de cinco hebras β y una única hélice α llamada hélice α C. Mientras que el lóbulo C es principalmente helicoidal y presenta el sitio de unión del sustrato peptídico. Ambos lóbulos aportan residuos conservados al sitio activo, el cual se encuentra en la interfaz de los mismos. Los aminoácidos que conectan a las hebras β 1 y β 2 en el lóbulo N forman un asa rica en glicinas (GXGX ϕ G; donde ϕ en ABL es Tyr²⁵³) y es llamada Asa P. Esta asa es altamente flexible y cubre los fosfatos β y γ del ATP. Es crucial en la coordinación del complejo ATP-Mg⁺². En la estructura cristalográfica del dominio cinasa con el inhibidor farmacológico imatinib (Nagar *et al.*, 2003), un residuo conservado de glutamato (Glu²⁸⁶) de la hélice α C forma un par iónico con la Lys²⁷¹ en el lóbulo N. Este apareamiento es relevante en la coordinación del grupo fosfato del ATP y se conserva

en prácticamente todas las estructuras de proteínas cinasa (Panjarian *et al.*, 2013; Reddy & Aggarwal, 2012) (Fig. 7)

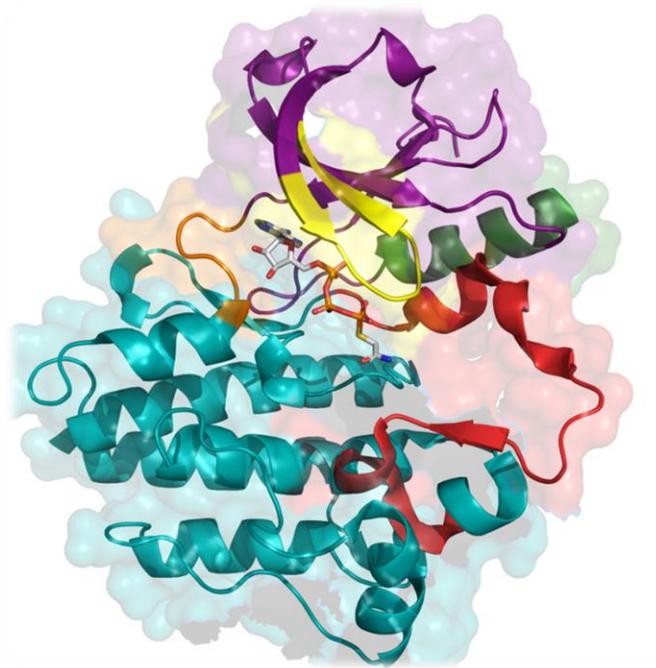


Figura 7. Estructura del dominio TK-ABL con ATP. En color púrpura se muestra el lóbulo N y en azul el lóbulo C. La hélice α C se muestra en color verde, el asa de activación en rojo, el conector de los lóbulos en anaranjado, mientras que el asa P en amarillo. La molécula de ATP está representada en bastones (PDB 2G1T).

El “asa de activación”, que se localiza en el lóbulo C y es esencial para la activación de la cinasa, también interactúa con el fosfato γ . Es el segmento más flexible de ABL. Contiene, en su extremo N-terminal, un motivo “DFG” conservado (Asp381-Phe382-Gly383), mientras que la parte media contiene un residuo de tirosina (Tyr393). La fosforilación de la Tyr393 tiene como consecuencia la interacción electrostática con un residuo de arginina, estabilizando el estado activo de la cinasa. En este estado, el asa de activación está en una conformación abierta o extendida; el aspartato del motivo DFG se orienta hacia el sitio de unión de ATP (conformación “DFG-in”), donde coordina al ion catalítico Mg^{+2} , mientras que la porción C-terminal del *loop* forma parte de la plataforma para la unión del sustrato peptídico. Esta conformación abierta o extendida del asa de activación es muy similar en todas las cinasas activas. En la conformación inactiva, la tirosina del asa de activación no está fosforilada, formando un puente de hidrógeno con el aspartato

catalítico (Asp³⁶³), alejándose del sitio activo, mientras la fenilalanina se mueve hacia adentro. Esta interacción hace que el asa de activación ocluya el sitio activo, imitando el modo de unión de los sustratos. Esta conformación denominada "DFG-out" o "DFG-flipped" es incompatible con la unión a Mg⁺² y la catálisis. Mediante simulaciones de dinámica molecular se ha observado que el estado de protonación del aspartato contribuye a controlar el *flip* del motivo DFG y, por tanto, los cambios conformacionales asociados con la activación de la cinasa y la unión a inhibidores (Fig. 8) (Panjarian *et al.* 2013; Reddy & Aggarwal, 2012; Shan *et al.* 2009).

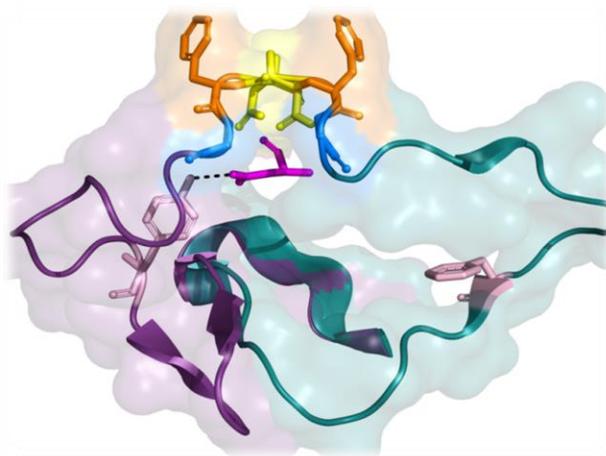


Figura 8. Conformaciones del asa de activación y del motivo DFG. En color amarillo se muestra el Asp³⁸¹, en anaranjado la Phe³⁸² y en azul la Gly³⁸³ (motivo DFG). En color rosa se señala la Tyr³⁹³ y en magenta el aspártico catalítico (Asp³⁶³). La fosforilación de la Tyr³⁹³ tiene como consecuencia la interacción electrostática con un residuo de arginina, estabilizando el estado activo de la cinasa. En este estado, el asa de activación está en una conformación abierta o extendida, el aspartato del motivo DFG está orientado hacia el sitio de unión de ATP (DFG-in). En la imagen, dicha conformación se muestra en color cian. En la conformación inactiva, la tirosina del asa de activación no está fosforilada, formando un puente de hidrógeno con el aspartato catalítico, alejándose del sitio activo, mientras la fenilalanina se mueve hacia adentro. En esta conformación el asa de activación imita el modo de unión de los sustratos.

1.2.4 Sitio de unión de ATP

Una amplia gama de inhibidores de cinasas presenta un alto potencial de unirse a un "bolsillo" farmacológico bien estudiado: el sitio de unión de ATP, el cual presenta características altamente conservadas. Estudios a nivel estructural han identificado varios residuos críticos dentro del sitio de unión de ATP útiles para el diseño de inhibidores moleculares pequeños (Li, Mungyu, *et.al.*, 2021).

Vulpetti & Bosotti (2004) definieron el bolsillo de unión de ATP de las cinasas como un set de 38 residuos capaces de interactuar con inhibidores ATP-competitivos. Este bolsillo se localiza entre los dos lóbulos del dominio cinasa y puede ser dividido en cinco regiones: (i) región de la adenina, (ii) región del azúcar, (iii) región de los grupos fosfato, (iv) región hidrofóbica I y (v) región hidrofóbica II (Fig.9).

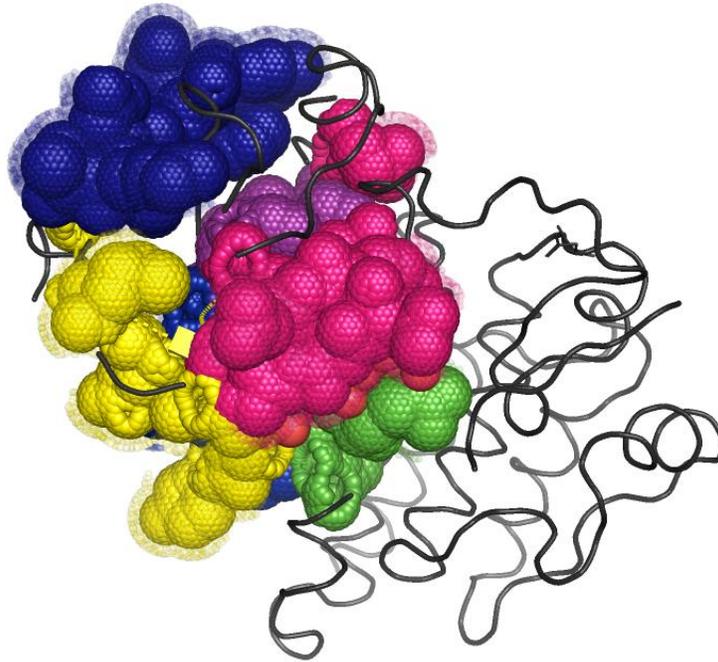


Figura 9. Sitio de unión al ATP. A la izquierda se muestra, en forma de esferas rellenas, cada una de las regiones del sitio de unión a ATP en la superficie de una cinasa. En color azul la región de la adenina, en amarillo la región hidrofóbica I, en morado la región hidrofóbica II, en verde la región del azúcar y en magenta la región de los fosfatos (PDB 2G1T).

La región de la adenina del sitio de unión del ATP es ocupada por un anillo heterocíclico planar, predominantemente hidrofóbico. Este centro hidrofóbico puede formar interacciones no polares con residuos hidrofóbicos al rededor del bolsillo. Aunado a lo anterior, al menos dos puentes de hidrógeno pueden formarse en la región de la bisagra entre el N1 y N5 de la adenina y el esqueleto peptídico (Fig. 10). Tales interacciones representan una significativa contribución a la ocupación de la molécula de ATP en el sitio de unión; por lo tanto, la región de la adenina parece ser una característica estándar para muchos inhibidores de las proteínas cinasas (Li, Mungyu, *et.al.*, 2021; Vulpetti & Bosotti, 2004).

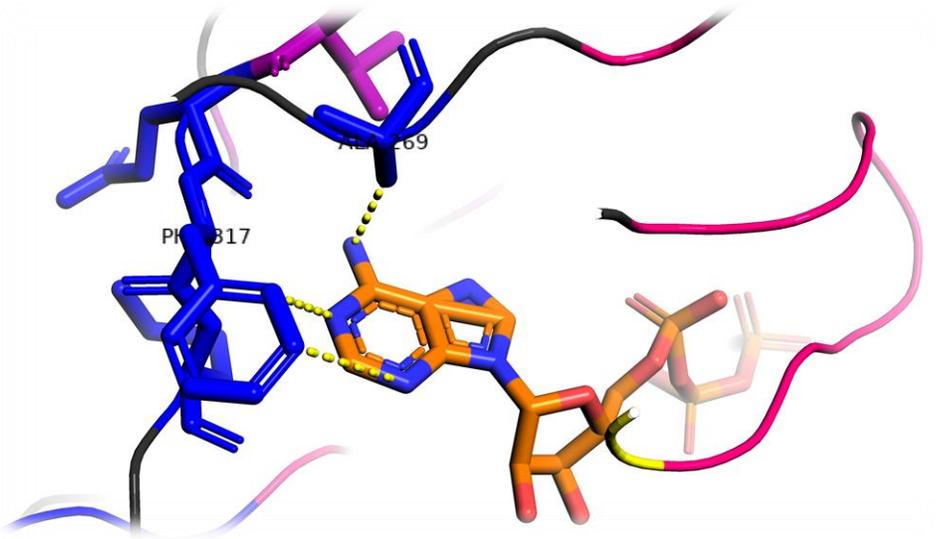


Figura 10. Región de la adenina. En líneas color azul se muestran los residuos Phe317 y Ala 269 del dominio TK-ABL, los cuales forman puentes de hidrógeno con la adenina del ATP. La molécula de ATP está representada en bastones. (PDB 2G1T).

La región del azúcar se acopla a la ribosa del ATP a través de dos grupos hidroxilo indispensables para la formación de puentes de hidrógeno (Fig. 11). Por lo tanto, se trata de una región predominantemente polar. El residuo Asn 322 forma un puente de hidrógeno con uno de los grupos hidroxilo ribosa de ATP (Li, Mungyu, *et.al.*, 2021).

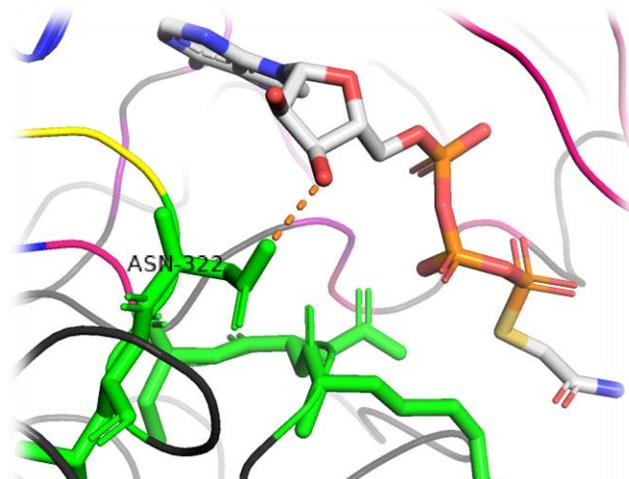


Figura 11. Región del azúcar. En TK-ABL, el residuo Asn322 forma un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo de la ribosa del ATP. La molécula de ATP está representada en bastones (PDB 2G1T).

La región de los fosfatos contiene varios residuos polares altamente conservados. Está conformada por dos mitades de estructuras secundarias: la asa P (Fig. 12), un asa rica en glicinas

(GXGX ϕ G; donde ϕ en ABL es Tyr²⁵³), y una hélice α llamada hélice α C, la cual presenta una gran flexibilidad. Adicionalmente, esta región contiene un motivo DFG altamente conservado en las cinasas, el cual se localiza en la región más flexible de ABL. Previamente, se describieron a detalle tanto α C como el motivo DFG (Figs. 7 y 8).

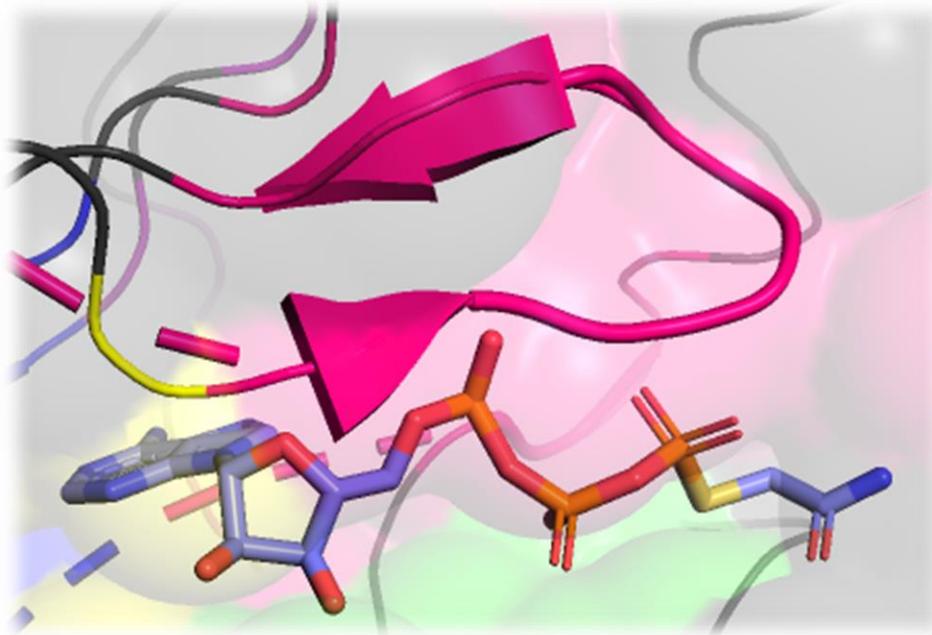


Figura 12. Región de los fosfatos. En color rosa se muestra el asa P, la cual cubre los fosfatos β y γ del ATP. En bastones se encuentra representada la molécula de ATP (PDB 2G1T).

Las regiones hidrofóbicas I y II, también conocidas como región enterrada y región con acceso al solvente, son dos regiones en el sitio de unión de ATP, que no son ocupadas por el nucleótido (Fig. 13). Constituyen la principal fuente de diversidad estructural y de secuencias entre los miembros de la superfamilia de las cinasas (Li, Mungyu, *et.al.*, 2021; Vulpetti & Bosotti, 2004). El residuo Thr 315, también conocido como *gatekeeper*, es determinante para el tamaño y forma de la región enterrada. De manera general, en las cinasas, cuando dicho residuo es lo suficientemente pequeño o flexible como para aumentar el tamaño de esta región, otros residuos pueden estar en contacto con el ligando (en ABL, estos residuos son Met290, Leu 301 e Ile 313). Por lo que dicha región se considera para mejorar la selectividad de un inhibidor potencial (Vulpetti & Bosotti, 2004).

En la región con acceso al solvente, la principal diferencia en la forma se debe a la presencia o ausencia de un residuo glicina entre las posiciones 85-86. La presencia de este residuo provoca un cambio conformacional entre la región de bisagra y el inicio del extremo C-terminal, lo cual

desfavorece la unión de compuestos que no sobresalgan del sitio de unión de ATP en forma planar. En el caso particular de ABL, no presenta este residuo de glicina (Vulpetti & Bosotti, 2004).

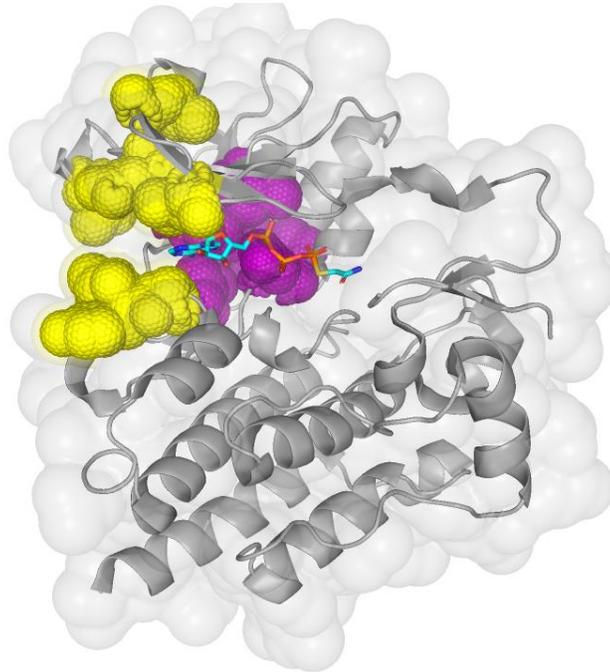


Figura 13. Regiones hidrofóbicas. En esferas color morado se muestra la región I o enterrada, mientras que en amarillo la región II o con acceso al solvente. Ninguna de estas zonas es ocupada por el ATP (PDB 2G1T).

1.3 imatinib, el primer inhibidor farmacológica desarrollado contra una proteína oncogénica

En la LCM, la actividad cinasa de la proteína quimérica BCR-ABL se ve sobre aumentada debido a que el grupo miristoilo en la región del CAP N-terminal del segmento de ABL no está presente y, como se detalló anteriormente, dicho grupo representa un elemento crucial de auto-regulación. Este aumento en la función cinasa es clave en la progresión de la enfermedad LCM. A lo largo de los años, se han desarrollado fármacos selectivos hacia el sitio de unión de ATP con el fin de inhibir la actividad cinasa de BCR-ABL, de tal manera que la cascada de señalización que da origen a la LMC y mantiene a la enfermedad se vea anulada (Fig. 14).

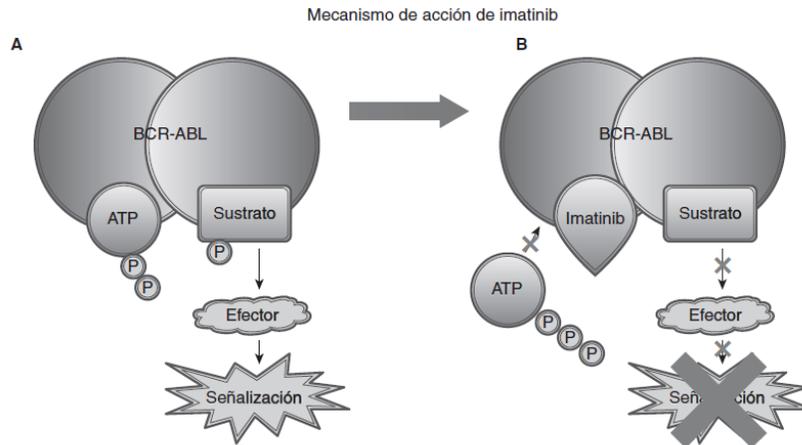
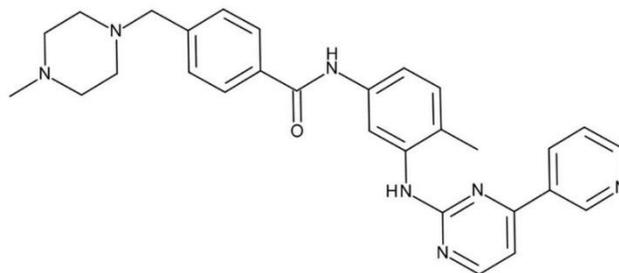


Figura 14. Mecanismo de acción de imatinib. **A.** En ausencia de tratamiento, la proteína BCR-ABL se une a una molécula de ATP, propiciando la fosforilación de diversos sustratos, lo que tiene como consecuencia la activación de vías de señalización a través de moléculas efectoras. **B.** Mecanismo de acción de imatinib. Al ocupar el sitio de unión de ATP, el inhibidor impide que el sustrato se pueda unir, de tal manera que las señales inducidas por la proteína se inhiben (Imagen adaptada de Áviles-Vázquez *et al.*, 2013).

El primer agente inhibidor desarrollado contra BCR-ABL fue el mesilato de imatinib (4-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida), también conocido como STI-571, CGP 57148, Gleevec (en Estados Unidos) y Glivec (en Europa). Es un inhibidor competitivo del sitio de unión a ATP. El precursor químico de STI-571 se descubrió en el proceso de ensayo fenotípico *in vitro* de un gran número de compuestos para la inhibición de la proteína cinasa C. La proteína cinasa C es una serina-treonina-cinasa, la cual participa en diversos procesos celulares, y está implicada en la formación de tumores. El producto químico inicial era una fenilaminopirimidina que inhibía tanto a las serina-treonina-cinasas como a las tirosina-cinasas. Posteriormente, se sintetizaron varios derivados de la fenilaminopirimidina para aumentar su eficacia contra el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGFR (por sus siglas en inglés *Platelet-derived growth factor receptor*), también una tirosina-cinasa. Finalmente, se realizaron modificaciones adicionales para aumentar la actividad celular, la solubilidad y la biodisponibilidad oral. El resultado fue STI-571 (Fig. 15). En mayo de 2001, fue aprobado para el tratamiento contra LMC (Roskoski Jr, 2003; Áviles-Vázquez *et al.*, 2013), tratándose del primer medicamento creado y aprobado para tratar un cáncer a través de la inhibición específica de una proteína oncogénica.



Imatinib (Gleevec, Novartis); $C_{29}H_{31}N_7O$; MW = 494

Figura 15. Estructura del imatinib.

1.3.1 Bases estructurales de la unión de imatinib al dominio cinasa de ABL

El imatinib es un inhibidor efectivo de la actividad cinasa de ABL y BCR-ABL, que, de acuerdo con evidencias cristalográficas, se une a la forma inactiva de ABL (*DFG-out*) (Nagar et al., 2002). El fármaco se une entre los lóbulos N y C del dominio cinasa. El anillo fenilo central del imatinib se encuentra en contacto con el residuo Thr315, mientras que los anillos de piridina y pirimidina se colocan en el sitio de unión de la adenina. El resto del compuesto penetra en la bolsa hidrofóbica del dominio cinasa, insertado entre el asa de activación, el cual se pliega hacia el sitio activo, manteniendo de este modo a la cinasa en una conformación inactiva, ya que el centro del asa impide la unión de cualquier sustrato (Roskoski Jr, 2003; Reddy & Aggarwal, 2012; Cohen, 2002).

En el complejo ABL-imatinib, la región N-terminal del asa de activación gira con respecto a la conformación activa, de tal manera que el residuo Phe382, en lugar de Asp381 del motivo DFG, queda orientado hacia el sitio de unión a ATP. Asp381 une al Mg^{+2} del sustrato MgATP en la conformación activa. La mayoría de las interacciones entre el fármaco y la proteína son de tipo van der Waals o de naturaleza hidrofoba, con aproximadamente $1,200 \text{ \AA}^2$ de área enterrada en la interface. El asa P se pliega sobre los anillos de piridina y pirimidina en una conformación "doblada", en contraste con la conformación extendida de cinasas activas. En particular, la Tyr253 del asa P "doblada" y la Phe382 del asa de activación forman parte de una bolsa hidrofóbica, junto con los residuos Leu248, Phe317 y Leu370. Como tal, los grupos piridina y pirimidina del imatinib se protegen de manera eficaz del disolvente. Por el contrario, los grupos benzamida y piperazina están más expuestos al solvente. Los contactos más notorios hacia estos últimos grupos proceden de Val289 y Met290 en la hélice αC , Asp381 del motivo DFG, Ile360 e His361 en el asa de activación.

Existen un total de 6 puentes de hidrógeno entre imatinib y ABL, que implican la (i) piridina N y la amida de cadena principal de la Met318, (ii) el grupo amino de la pirimidina y el hidroxilo de la cadena lateral de la Thr315, (iii) la amida NH y el carbonilo de cadena principal del Glu286, (iv) la amida CO y la amida de cadena principal de Asp381, y la piperazina protonada y los carbonilos de cadena principal de (v) Ile360 y (vi) His361 (Fig. 16)

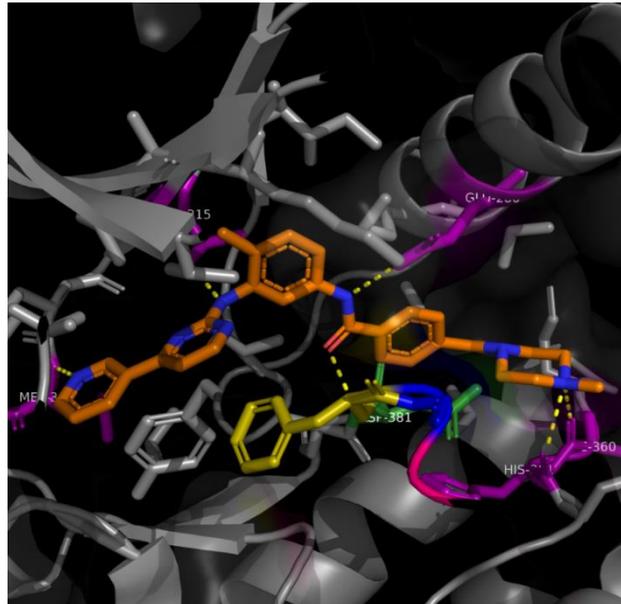


Figura 16. Interacción entre imatinib y el sitio activo de ABL. En color anaranjado/azul se representa el fármaco, en gris el esqueleto de carbono de los residuos del sitio activo. Las líneas discontinuas representan los puentes de hidrógeno entre el fármaco y la proteína. Imagen adaptada de Reddy & Aggarwal, 2012.

1.3.2 Resistencia a imatinib

Sin duda, imatinib produjo un cambio radical en el tratamiento de la LMC, mejorando la calidad de vida y supervivencia de los pacientes. Sin embargo, una población significativamente importante termina desarrollando resistencia al fármaco y, por consiguiente, una recaída clínica (Áviles-Vázquez et al., 2013). La resistencia al imatinib se ha clasificado de acuerdo con el momento en el que ésta se presenta. Resistencia primaria o intrínseca es una pérdida en la eficiencia desde el inicio del tratamiento. Mientras que la resistencia secundaria o adquirida está definida por una respuesta inicial favorable seguida de una pérdida de eficacia con el tiempo de exposición al fármaco. De acuerdo con los criterios clínicos y de laboratorio empleados para la detección, la resistencia puede subdividirse en resistencia hematológica, citogenética y molecular (Áviles-Vázquez et al., 2013; Hochhaus & La Rosée, 2004).

La causa más común de resistencia a imatinib es la presencia de mutaciones puntuales que tienen afecciones en los distintos puntos de contacto entre el fármaco y el dominio cinasa. Estas mutaciones pueden clasificarse en cuatro grupos: (i) aquellos que afectan de manera directa la unión del imatinib, (ii) las que se localizan dentro del sitio de unión del ATP, (iii) las que se encuentran dentro del asa de activación, impidiendo que la cinasa adopte la conformación requerida para unir al fármaco, y (iv) las que están dentro del sitio catalítico (Diamond & Melo, 2011).

A nivel molecular, las mutaciones dificultan la unión de imatinib a la proteína mediante un mecanismo directo o indirecto. En el caso de los mecanismos directos, las mutaciones mapean el sitio de unión a imatinib, el cual se superpone de manera parcial con el sitio de unión a ATP, de tal manera que la unión del fármaco se ve reducida como resultado de cambios en las cadenas laterales de aminoácidos que contribuyen a la formación de puentes de hidrógeno, o como resultado de cambios topográficos que provocan un impedimento estérico. Por otro lado, los mecanismos indirectos actúan sobre la forma de unión particular del fármaco a la proteína (Diamond & Melo, 2011; Weisberg *et al.*, 2007).

Actualmente, han sido descritas más de 100 mutaciones puntuales que afectan aproximadamente 70 residuos con distintos grados de importancia médica. Se han reportado diversas mutaciones en la región del asa P (Y253F y E255K, por ejemplo), las cuales modifican la flexibilidad de este elemento estructural que funciona como plataforma de acoplamiento para el imatinib mediante puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals, de tal manera que se desestabiliza la conformación requerida para la unión del fármaco. Pese al desarrollo de nuevos fármacos basados en la relación estructural ABL-inhibidor, ninguno de ellos ha sido capaz de inhibir de manera eficiente la mutación T315I, la cual confiere los niveles más altos de resistencia a imatinib. La sola sustitución de un residuo treonina en el lóbulo N por un residuo isoleucina, ocasiona la pérdida de un puente de hidrógeno, y, por medio de un impedimento estérico, evita la unión del imatinib (Weisberg *et al.*, 2007; Diamond & Melo, 2011; Áviles-Vázquez, *et al.*, 2013; Ernesr *et al.*, 2008).

2. Planteamiento del problema

El presente proyecto forma parte de un estudio global que hemos estado desarrollando en nuestro grupo de investigación, con el propósito de elucidar con mayor detalle el funcionamiento de la tirosina-cinasa ABL, como paso previo a la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas para lograr una inhibición más efectiva de la forma oncogénica de la enzima. Si bien existe una extensa cantidad de información bioquímica y estructural sobre el mecanismo de catálisis y de inhibición farmacológica, la termodinámica de reconocimiento molecular de BCR-ABL no ha sido esclarecida. Esta información es fundamental para entender aspectos básicos del funcionamiento e inhibición de la enzima, que pudieran ser valiosos para desarrollar fármacos con afinidad y especificidad mejoradas. En particular, en este proyecto estudiamos la interacción de nucleótidos de adenina con la construcción recombinante del dominio catalítico (TK-ABL) mediante calorimetría de titulación isotérmica. De esta manera, nos fue posible determinar las firmas termodinámicas completas de interacción con nucleótidos al sitio catalítico. Además, realizamos un análisis de correlación entre propiedades conformacionales y energéticas del proceso de reconocimiento molecular, con el fin de elucidar nuevos aspectos sobre las bases del funcionamiento de esta cinasa. Esta información, en conjunto con el estudio de otros estudios que se están realizando en el laboratorio con la construcción recombinante del dominio catalítico unido a los dominios de regulación SH3 y SH2, y con la caracterización de la unión a inhibidores farmacológicos ortostéricos y de ligandos alostéricos, eventualmente podrá conducir al descubrimiento de nuevas estrategias para inhibir a la forma oncogénica de esta tirosina-cinasa.

3. Objetivos

3.1 General

Caracterizar los determinantes energéticos que rigen el reconocimiento de nucleótidos por parte del dominio catalítico (TK-ABL) de la enzima oncogénica BCR-ABL humana.

3.2 Particulares

- Producir de manera recombinante el dominio TK-ABL.
- Caracterizar espectroscópicamente la conformación y termorresistencia de TK-ABL.
- Determinar mediante calorimetría de titulación isotérmica las firmas termodinámicas (ΔH , ΔS , ΔG y ΔC_p) de la interacción de TK-ABL con nucleótidos de adenina.
- Evaluar la contribución del magnesio al reconocimiento de nucleótidos de adenina por TK-ABL.
- A partir del análisis de las firmas termodinámicas de unión, inferir información sobre el arreglo conformacional de la proteína inducido por ADP y por ATP.

4. Metodología

4.1 Sobreexpresión de las construcciones TK-ABL y SH-ABL

La secuencia que codifica para la construcción del dominio cinasa (TK-ABL) unida a una cola de histidinas en el N-terminal seguida de una secuencia de corte de la proteasa TEV fue clonada en el vector pET28a (*Novagen*) entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* (Fig. 17). Dicha construcción fue cotransformada en células de *Escherichia coli* BL21DE3 (*Novagen*) con el gen de YopH, una fosfatasa clonada en el vector pCDFDuet entre los sitios de restricción *NcoI* y *AvrII*. Los marcadores de selección para los plásmidos utilizados fueron kanamicina para pET28a y estreptomycinina para pCDFDuet.

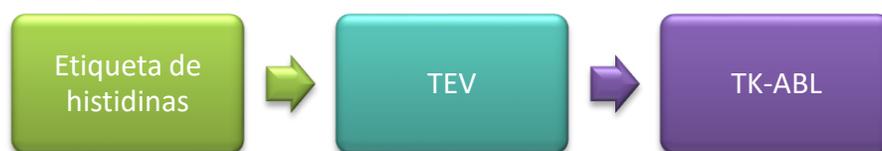


Figura 17. Esquema general de las construcciones TK-ABL como proteína de fusión. En color verde se muestra la región de la etiqueta de hexahistidinas, en azul el sitio de corte para TEV y en morado el inserto de la secuencia codificante para el dominio cinasa.

Para la expresión de TK-ABL recombinante, se inoculó una unidad formadora de colonias (UFC) aislada de la cepa *Escherichia coli* BL21DE3 cotransformada con los plásmidos pET28a (TK-ABL) y pCDFDuet (YopH) en 15 mL de medio Luria Broth (LB) suplementado con kanamicina (25 µg/mL) y estreptomycinina (100 µg/mL). Se incubó en agitación a 37°C durante 12 horas. Posteriormente, se escaló el cultivo a un matraz de 1.5 L. Una vez se alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀) cercana a 1.2, se indujo la expresión de la proteína con IPTG 1 mM y se incubó en agitación a 18°C por 16 horas. Concluido el tiempo de incubación, el paquete celular se obtuvo por centrifugación (5,500 rpm/10 min, 4°C). Las células se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5% glicerol). La fragmentación celular se realizó en presencia

de 1 mM de PMSF, mediante sonicación (Misonix 3000) con una potencia de 5.5 W y ciclos de 10 s de pulsos con 60 s de descanso, con un tiempo total de 7 min. La fracción soluble se separó de la insoluble mediante centrifugación (14,500 rpm/45 min, 4°C). La presencia de la proteína recombinante se determinó mediante geles de poliacrilamida con el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) tanto para la fracción soluble como para la insoluble, encontrándose en la primera.

4.2 Purificación de la construcción TK-ABL por columna de afinidad.

La fracción soluble obtenida por centrifugación se filtró a través de una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore) y se hizo pasar a través de una columna de níquel HisTrap HP (GE Healthcare) de 5 ml, a un flujo de 1ml/min siguiente el siguiente protocolo:

- I. 3 volúmenes de agua Milli-Q.
- II. 4 volúmenes buffer de unión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂,5% glicerol, 30 mM imidazol) para equilibrar la columna.
- III. Fracción soluble con 30 mM de imidazol (se colectó la fracción No retenida).
- IV. 4 volúmenes de buffer de unión (Lavado de columna).
- V. 4 volúmenes de buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂,5% glicerol, 300 mM imidazol, pH 8.0). Se colectó la fracción Elución-Ni.
- VI. 4 volúmenes de buffer de elución (Segundo lavado).
- VII. 3 volúmenes de agua Milli-Q (Retiro de buffer de elución).
- VIII. 2 volúmenes de EtOH 20%. (Almacenamiento y evitar crecimiento bacteriano).

4.3 Purificación por columna de intercambio aniónico.

Una vez realizada la purificación por columna de afinidad, la proteína fue purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico (pH 8.0) con el fin de remover la fostasa YopH. La

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

- I. 3 volúmenes de agua Milli-Q.
- II. 4 volúmenes buffer de unión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5mM MgCl₂,5% glicerol) para equilibrar la columna.
- III. Fracción soluble (se colectó la fracción No retenida).
- IV. 4 volúmenes de buffer de unión (Lavado de columna).
- V. 4 volúmenes de buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 5mM MgCl₂,5% glicerol, pH 8.0). Se colectó la fracción Elución-Q
- VI. 4 volúmenes de buffer de elución (Segundo lavado).
- VII. 3 volúmenes de agua Milli-Q (Retiro de buffer de elución).
- VIII. 2 volúmenes de EtOH 20%. (Almacenamiento y evitar crecimiento bacteriano).

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

4.4 Cuantificación y preparación de las muestras.

La fracción Elución-Q fue diafiltrada y concentrada en tubos centricones de 10 kDa de corte de peso molecular (Amicon[®] Ultra 15 mL Centrifugal Filters Merck Millipore, US) mediante centrifugación a 4,500 rpm en lapsos de 10 - 15 min. Se hizo por tres ocasiones el recambio por el buffer para calorimetría (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂,5% glicerol, 0.25 mM DTT).

La concentración de la proteína fue determinada midiendo su absorbancia a 280nm (A_{280}) en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, US) empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El cálculo se realizó utilizando un coeficiente de extinción molar $C_{\epsilon_{280nm}} 60 550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ determinado mediante el servidor Expasy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam>), asumiendo que todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos.

4.5 Dicroísmo circular.

Las mediciones de DC se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-720 (Jasco Inc, Easton, MD, US), acoplado a un sistema de control de temperatura Peltier. Los barridos se hicieron en el UV lejano de 250 nm a 195 nm en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico, a una velocidad de 20 nm/min y con un tiempo de integración de 16 s. Cada espectro de DC se obtuvo por triplicado. El espectro final representa el promedio de las tres acumulaciones individuales.

Para la obtención de los perfiles de desplegamiento térmico, se realizaron barridos de temperatura en el intervalo de 20 a 80 °C, a una velocidad de calentamiento de 1°C/min, monitoreando el cambio de elipticidad a 208 nm con una resolución de adquisición de datos de cada 1 °C. La concentración de la proteína empleado en estos experimentos estuvo dentro del intervalo de 3 a 5 µM.

Los espectros se expresaron en elipticidad molar por residuo, θ_{MRW} , en unidades de grado*cm²dmol⁻¹:

$$[\theta]_{mrw} = \frac{MRW * \theta_{obs}}{[P] * d * 10} \quad (1)$$

donde mrw es la masa molar promedio por residuo, [P] concentración de proteína en mg/ml y d, recorrido óptico de la celda en cm.

La mrw fue calculada acorde a la ecuación 10, obteniéndose 116.027 para TK-ABL.

$$mrw = \frac{PM_{proteína}}{residuos - 1} \quad (2)$$

4.6 Calorimetría de titulación isotérmica.

Una vez purificado el dominio cinasa, se centrifugó (14,500 rpm/10 min) y filtró a través de una membrana de 0.22 µm. Las mediciones calorimétricas fueron realizadas en un microcalorímetro MicroCal iTC₂₀₀ (GE Healthcare, US) a 20°C, 25°C, 30°C y 35°C. Las concentraciones de TK-ABL empleadas estuvieron dentro de un intervalo de 25 - 40 µM. Las concentraciones de los

nucleótidos ADP y ATP se mantuvieron entre 500 y 700 μM , mientras que la de los cofactores Mg^{+2} y Ca^{+2} fue de 5 mM.

Los nucleótidos de adenina fueron preparados a partir de una solución concentrada 10 mM de ATP o ADP en buffer para calorimetría (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% glicerol, 0.25 mM DTT) en presencia de 5 mM CaCl_2 o 5 mM MgCl_2 , respectivamente. El pH de los ligandos fue ajustado con NaOH 1M al mismo valor de pH de la proteína.

Las inyecciones realizadas durante la titulación se hicieron a un volumen constante de 2 μl . Se realizaron en promedio 20 adiciones con un espacio entre cada inyección de 120 a 300 s, con una agitación constante de 750 rpm. El calor de dilución del ligando se obtuvo de inyectar el ligando a la celda de reacción que sólo contenía buffer de calorimetría. Tanto la proteína como los ligandos se desgasificaron durante 20 min/4°C mediante alto vacío.

El instrumento empleado en los experimentos de ITC es un calorímetro de flujo de calor que funciona de acuerdo con el principio de compensación dinámica de potencia, es decir, mide la cantidad de potencia ($\mu\text{cal s}^{-1}$) requerida para mantener una diferencia de temperatura constante (cercana a cero) entre la muestra y la celda de referencia. En un experimento típico de ITC, una solución de ligando es titulada, en pequeños volúmenes, a una solución que contiene alguna macromolécula. Cada inyección del ligando desencadena la reacción de unión y, dependiendo de la afinidad de unión y la concentración de reactivos (macromolécula M y ligando L) en la celda, una cierta cantidad del complejo macromolécula / ligando (ML) se formará. La formación del complejo está acompañada de la liberación (reacción exotérmica) o de la absorción (reacción endotérmica) de calor, lo cual provoca una diferencia de temperatura entre las dos celdas. A continuación, el sistema de realimentación disminuye o eleva la potencia térmica aplicada para compensar dicho desequilibrio de temperatura. Después de cada inyección, el sistema alcanza el equilibrio y se restaura el equilibrio de temperatura (Velázquez Campoy, A., *et al.*, 2005; Leavitt & Freire, 2001; Bronowska, 2011).

Antes de que ocurra la primera inyección, se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia. Esto se hace con el fin de que la potencia aplicada a la celda de referencia active la alimentación a la celda de muestreo, y esta última se mantenga bajo un régimen de microcalentamiento, mientras no haya liberación o requerimientos de calor por efecto de una reacción. Dicha señal constituirá la línea base, y es importante que esta se mantenga constante a lo largo de todo el experimento. Por lo tanto, la señal registrada por efecto de la adición del ligando muestra un patrón típico de deflexión en forma de un pico. La integración del área bajo el pico, suponiendo la línea base como referencia, proporciona la cantidad de calor asociado con la inyección. Cuando el sistema proteína-ligando alcanza la saturación, los cambios de calor relacionados con la unión del ligando disminuyen y sólo son observables los calores de dilución. Una curva de unión se obtiene tras realizar varias inyecciones del ligando a la celda de reacción y medir los calores que se obtienen de la interacción del ligando con la macromolécula dentro de la celda (Fig. 14 B) (Velázquez Campoy, A., *et al.*, 2005; Leavitt & Freire, 2001; Bronowska, 2011).

Por cada inyección realizada en un experimento de ITC, el equilibrio químico se ve perturbado por los cambios en las concentraciones de reactivos y el sistema pasa por un conjunto de estados de equilibrio que difieren en su composición, ya que las fracciones de macromolécula libre y del complejo macromolécula-ligando dependen de la constante de equilibrio (asociación o disociación) y de las concentraciones totales de macromolécula y ligando. Para un modelo de unión de un solo sitio de interacción, la concentración de ligando formado después de la inyección i está dada por:

$$[ML]_i = \frac{1 + [M]_{T,i}K_a + K_a[L]_{T,i} - \sqrt{(1 + [M]_{T,i}K_a + [L]_{T,i})^2 - 4[M]_{T,i}K_a^2[L]_{T,i}}}{2K_a} \quad (3)$$

donde K_a es la constante de afinidad, y las concentraciones totales de macromolécula y ligando después de cada inyección están dadas por:

$$[M]_{T,i} = [M]_0 \left(1 - \frac{v}{V_0}\right)^i \quad (4)$$

$$[L]_{T,i} = [L]_0 \left[1 - \left(1 - \frac{v}{V_0}\right)^i\right] \quad (5)$$

$[M]_0$ y $[L]_0$ son las concentraciones iniciales de macromolécula dentro de la celda y de ligando en la jeringa, respectivamente; v es el volumen de inyección, V_0 es el volumen de la celda y $\left(1 - \frac{v}{V_0}\right)$ es el factor de la dilución que tiene lugar en una celda calorimétrica que funciona a volumen constante. Cada transición entre dos estados sucesivos desencadenada por inyección de ligando, se acompaña de la liberación o absorción de calor (a presión constante, relacionada con el cambio de entalpía global) que es proporcional al cambio en la concentración del complejo debido a esa inyección y a la entalpía molar:

$$Q_i = \frac{1}{v[L]_0} \left[Q_{T,i} - Q_{T,i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) \right] = \frac{V_0 \Delta H}{v[L]_0} \left[[ML]_i - [ML]_{i-1} \left(1 - \frac{v}{V_0} \right) \right] \quad (6)$$

Los valores de Ka y ΔH fueron obtenidos mediante la regresión no lineal de las isotermas de titulación calorimétrica, usando el modelo de un solo sitio de unión descrito por las ecuaciones 11 a 14, mediante el programa ORIGIN v7.0 (Origin Inc.).

El cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) se obtuvo a partir del valor de regresión de Ka :

$$\Delta G = -RT \ln Ka \quad (7)$$

donde R es la constante de los gases ideales ($1.98 \text{ cal mol}^{-1}$) y T es la temperatura en Kelvin. ΔS se obtuvo mediante la ecuación de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

Finalmente, ΔCp se determinó de la dependencia térmica de ΔH , de acuerdo con la ecuación de Kirchoff:

$$\frac{\partial \Delta H}{\partial T} = \Delta Cp \quad (9)$$

5. Resultados y discusión.

5.1 Purificación de las construcciones TK-ABL y SH-ABL.

Una vez obtenida la fracción soluble de TK-ABL, se purificó en dos pasos de cromatografía. El primer paso consistió en cromatografía de afinidad mediante una columna His-Trap HP previamente equilibrada con solución amortiguadora de unión. La elución se realizó con 30 ml de solución amortiguadora de elución. En el primer paso, se obtuvo a TK-ABL coeluida con la fosfatasa YopH. En la Fig. 18A se muestra el seguimiento de los pasos de purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. Tanto en el lavado como en la elución con solución de imidazol, se obtuvieron dos bandas enriquecidas con masas moleculares aproximadamente de 50 y 35 kDa, las cuales concuerdan con los pesos esperados a partir de la secuencia de aminoácidos de YopH y de TK-ABL, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de TK-ABL y YopH *

Proteína	Masa molecular (kDa)	pI	Carga (pH 8.0)
TK-ABL	35.9	5.6	-15.7
YopH	50.9	8.7	4.0

* Los parámetros fueron calculados a partir de la secuencia de la proteína respectiva, usando el servidor Protein Calculator v3.4 (<http://protcalc.sourceforge.net/>).

El segundo paso de cromatografía se realizó mediante intercambio aniónico empleando una columna HiTrap Q FF, la cual posee una resina cargada positivamente. Los puntos isoeléctricos de TK-ABL y YopH difieren considerablemente (Tabla 1). A pH de 8.0, TK-ABL posee una carga neta marcadamente negativa, mientras que YopH presenta una carga positiva pequeña. De tal manera, la fosfatasa no se unió a la columna a pH 8.0, permitiendo excluirla, como se muestra en la Figura 18B. Esta estrategia permitió obtener a TK-ABL recombinante sin impurezas, de acuerdo con el criterio brindado por la técnica de SDS-PAGE.

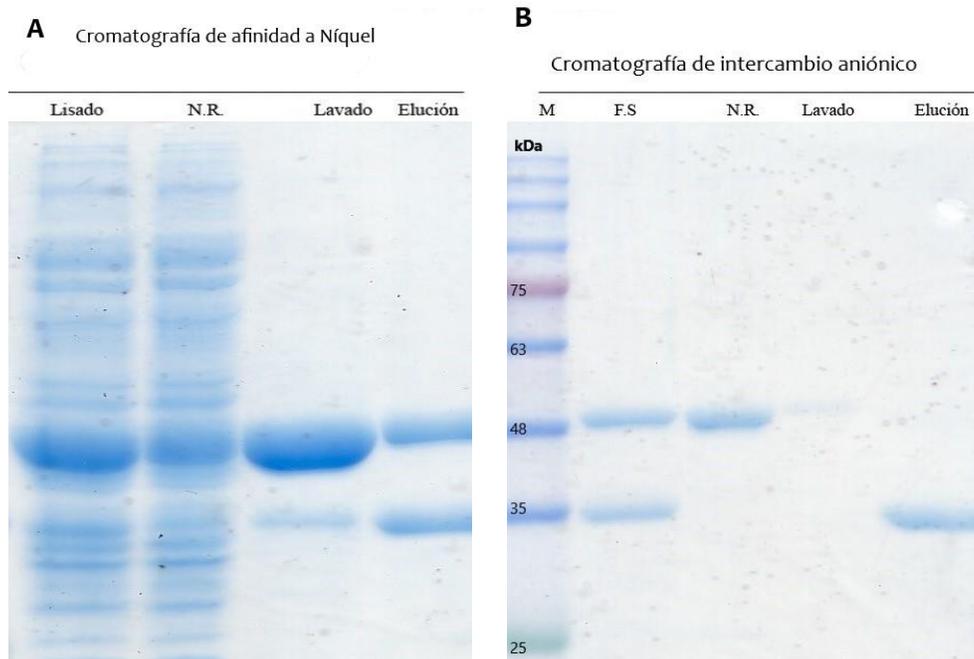


Figura 18. Geles SDS-PAGE representativos del análisis de la purificación del dominio TK-ABL. A) Fracciones obtenidas durante la cromatografía de afinidad a níquel. En el carril correspondiente a la elución, se obtuvieron dos bandas, una a la altura del peso molecular de 50 kDa y otra en 35 kDa, correspondiendo con YopH y TK-ABL, respectivamente. B) Fracciones obtenida en la cromatografía de intercambio aniónico. En el carril correspondiente a la elución se obtuvo una sola banda a la altura del peso molecular 35 kDa, la cual concierne a TK-ABL. M, marcador de peso molecular; F.S, Fracción soluble (lisado); NR, No retenido.

5.2 Dicroísmo circular de TK-ABL y SH-ABL.

Para verificar la integridad estructural de la proteína recombinante purificada, así como para determinar su termorresistencia, se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular (DC) en la región del UV-lejano. DC es una técnica que se basa en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada. Este efecto se produce cuando un cromóforo es quiral. Puede proporcionar información acerca de la estructura de biomacromoléculas, en particular de proteínas (Sharon & Priece, 2005). El espectro de DC en la región de UV-lejano se puede utilizar para proporcionar información, tanto cualitativa como cuantitativa, del contenido de estructura secundaria de una proteína. En esta región, el cromóforo de absorción es principalmente el enlace peptídico. Tanto los aminoácidos aromáticos, en especial el Trp, como los enlaces disulfuro, pueden contribuir minoritariamente al espectro de DC en el UV-lejano (Sharon & Priece, 2005). Las diferentes formas de estructura

secundaria regular de péptidos y proteínas plegadas exhiben espectros distintivos de DC en la región del UV-lejano (Fig. 19).

El DC es una técnica poderosa que nos permite esclarecer los mecanismos de desplegamiento y estabilidad de las proteínas. Los cambios en el espectro de DC en función de la temperatura pueden ser usados para determinar parámetros termodinámicos de desplegamiento. Si la temperatura media de transición (T_m) cambia en función de la concentración de proteína o de un ligando putativo, se toma como indicio positivo de reconocimiento molecular. Además, un espectro de DC en función de la temperatura puede ser útil para determinar si existen intermediarios de plegamiento o desplegamiento (Greenfield, N.J., 2006).

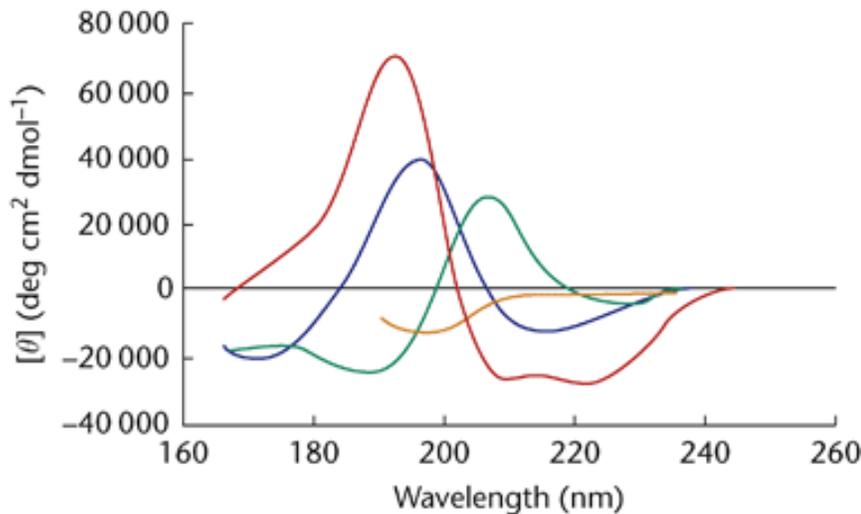


Figura 18. Espectros de DC en UV-lejano. Se muestran espectros para varios tipos de estructura secundaria. En rojo, α -hélice; en azul, láminas β antiparalelas; en verde, giros β tipo I; en naranja, estructura irregular (Tomado de Sharon & Preece, 2005).

En la Fig. 20 se muestran los espectros de TK-ABL a 20°C y 80°C, a un pH 8.0. A 20 °C, el espectro indica que la proteína se encuentra plegada, observándose una banda positiva intensa por debajo de 200 nm, y dos bandas negativas centradas alrededor de 208 y 222 nm, los cuales son característicos de estructuras enriquecidas con hélices- α y hebras β (Fig. 19). De acuerdo con lo observado en la estructura cristalográfica (PDB 2G1T), el dominio cinasa es una proteína α/β que consta de 15 hélices- α y 11 hebras- β . En la Fig. 20 también se muestran los espectros obtenidos a 80°C y a 20°C una vez enfriada la muestra proteica. El espectro a 80°C muestra pérdida de conformación debida a la perturbación térmica; al enfriar la solución, el espectro medido a 20°C fue

cercanamente superponible con el de 80°C, por lo que se puede concluir que, bajo las condiciones experimentales empleadas, el desplegamiento térmico del dominio TK-ABL es irreversible.

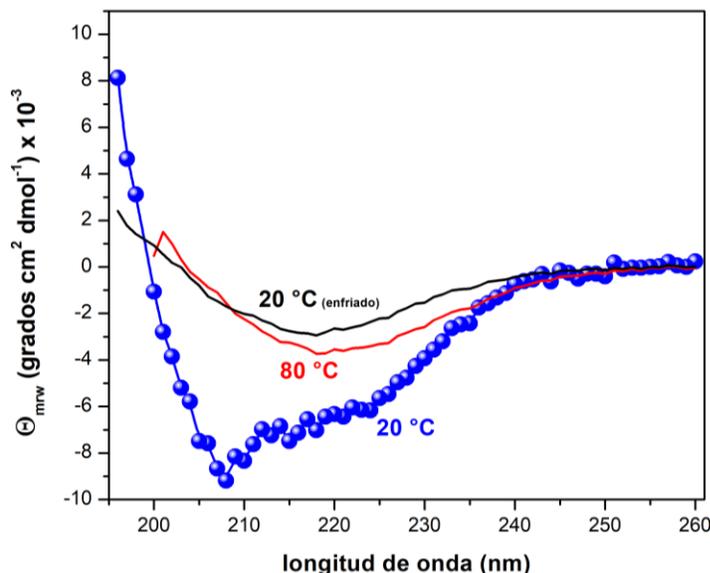


Figura 20. Espectros de DC de TK-ABL en el UV lejano. En símbolos circulares se muestra el espectro a 20°C de la proteína nativa, el cual exhibe dos mínimos negativos alrededor de 208 nm y 222 nm. En línea continua color rojo se muestra el espectro a 80°C y en línea negra el espectro de la proteína una vez enfriada a 20°C. Es posible observar pérdida de estructura secundaria y, además, que se trata de una proteína con desplegamiento térmico irreversible.

En la Fig. 21 se muestran los trazos de la perturbación térmica de TK-ABL seguidos con DC a 208 nm. El calentamiento se realizó a una velocidad de 1°C/min de 20°C a 85°C. En la curva es posible observar dos transiciones, presumiblemente cada una correspondiente al desplegamiento de cada uno de los lóbulos del dominio TK-ABL. La primera transición tiene lugar en el intervalo de 40 a 50°C, mientras que la segunda ocurre entre 70 y 80 °C. Este resultado indica que TK-ABL muestra un mecanismo de desplegamiento complejo, en el cual se involucra la presencia de al menos un intermediario:



donde N es el estado nativo, I una especie intermediaria, y D el estado desplegado. Este resultado es consistente con lo reportado por el estudio del desplegamiento térmico de TK-ABL en función del pH reportado por García-Curiel (2014). Para determinar la correspondencia entre las transiciones obtenidas y los lóbulos que componen al dominio TK-ABL, García-Curiel (2014) realizó mediciones de perturbación térmica en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). Como fue mencionado en la introducción, el lóbulo C tiene la capacidad de unir ácido mirístico como forma de estabilizar a la

forma auto-inhibida de la proteína. La solubilidad del ácido mirístico es muy baja (<0.1 mM). Por tanto, se optó por usar SDS, un tensoactivo con arquitectura química similar a la del mirístico (Fig. 22), pero con una solubilidad incrementada (8 mM), lo cual facilitó el manejo experimental de las muestras. Como se muestra en el recuadro de la Fig. 21, el SDS estabiliza la segunda transición, indicando que ésta corresponde al desplegamiento del lóbulo C, mientras que el lóbulo N es el que presenta menor termoestabilidad. Además, se observa que el lóbulo N se desestabiliza en presencia del ligando, disminuyendo la pendiente de la transición y la Tm. Lo anterior indica que, en presencia del inhibidor alostérico, existe una perturbación desestabilizante de la interacción entre ambos lóbulos (García-Curiel, 2014).

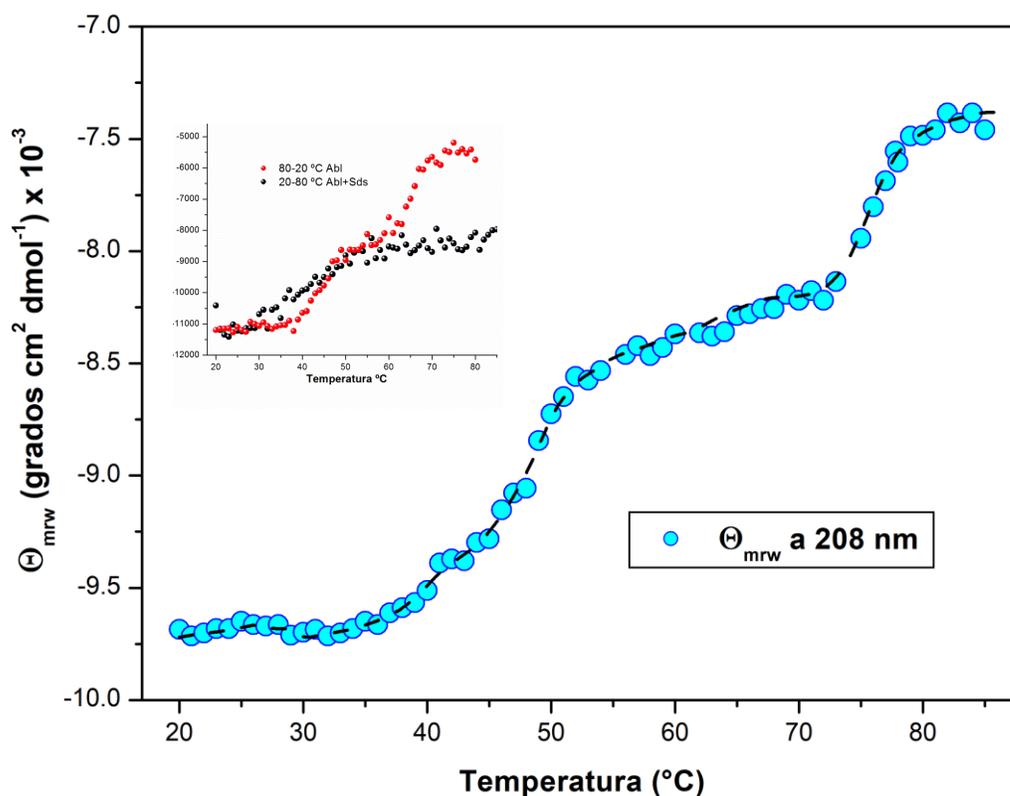


Figura 21. Perturbación térmica de TK-ABL. Se realizó un barrido térmico con velocidad de calentamiento de 1 °C/min, registrándose la señal a una longitud de onda constante de 208 nm. **Recuadro:** Desplegamiento de TK-ABL a pH 6.5 en ausencia (símbolos rojos) y presencia (símbolos negros) de 200 μM de SDS (adaptado de García-Curiel (2014)).

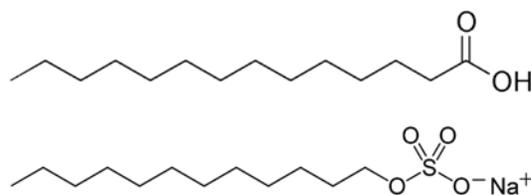


Figura 22. Estructuras químicas del ácido mirístico y del SDS.

5.3 Calorimetría de titulación isotérmica del dominio TK-ABL

Las interacciones moleculares desempeñan un rol fundamental en los procesos biológicos. Elucidar los factores moleculares que gobiernan la formación de interacciones no covalentes en las proteínas requiere del conocimiento cuantitativo de las fuerzas que dirigen el proceso. Con el fin de esclarecer los determinantes energéticos de la interacción de TK-ABL, en este trabajo realizamos una caracterización de la interacción con nucleótidos de adenina mediante calorimetría de titulación isotérmica.

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés, *Isothermal titration calorimetry*) es la única técnica que puede medir de manera directa la energética de unión de procesos biológicos, incluidos la unión proteína-ligando, proteína-proteína, ADN-proteína, proteína-carbohidrato, proteína-lípidos y antígeno-anticuerpo. Bajo condiciones experimentales apropiadas, un solo experimento de ITC permite determinar K_a , ΔH , ΔG y ΔS . Realizando experimentos en función de la temperatura, es posible determinar ΔC_p asociado al proceso de unión con una precisión superior a la alcanzada con cualquier otra técnica (Velázquez Campoy, A., *et al.*, 2005).

En este estudio, determinamos los parámetros de unión a nucleótidos de adenina en el intervalo de 20 a 35 °C. Se escogió este intervalo de temperatura, dado que, de acuerdo con los resultados de perturbación térmica seguidos por DC, arriba de los 40 °C la proteína comienza a desplegarse. Para las mediciones de ITC, la proteína fue preparada en el intervalo de concentración de 25 - 40 μM en una solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% glicerol, 0.25 mM DTT. Los nucleótidos de adenina fueron preparados a partir de una solución concentrada 10 mM ATP o ADP en presencia de 5 mM de Ca/MgCl₂. Por otro lado, con el fin de evaluar la contribución energética del ion metálico, se realizaron mediciones titulando la proteína solo con el nucleótido, añadiendo a la solución amortiguadora 1 mM de EDTA para quelar cualquier traza de metal.

Como se muestra en la Fig. 23, la titulación de TK-ABL con ADP o ATP reveló que la proteína es incapaz de unir cualquiera de los dos nucleótidos en ausencia del catión metálico. Con el fin de descartar que se tratara de una temperatura donde ocurre una interacción isoentálpica, se realizaron mediciones con ADP a dos temperaturas diferentes, obteniéndose un resultado similar.

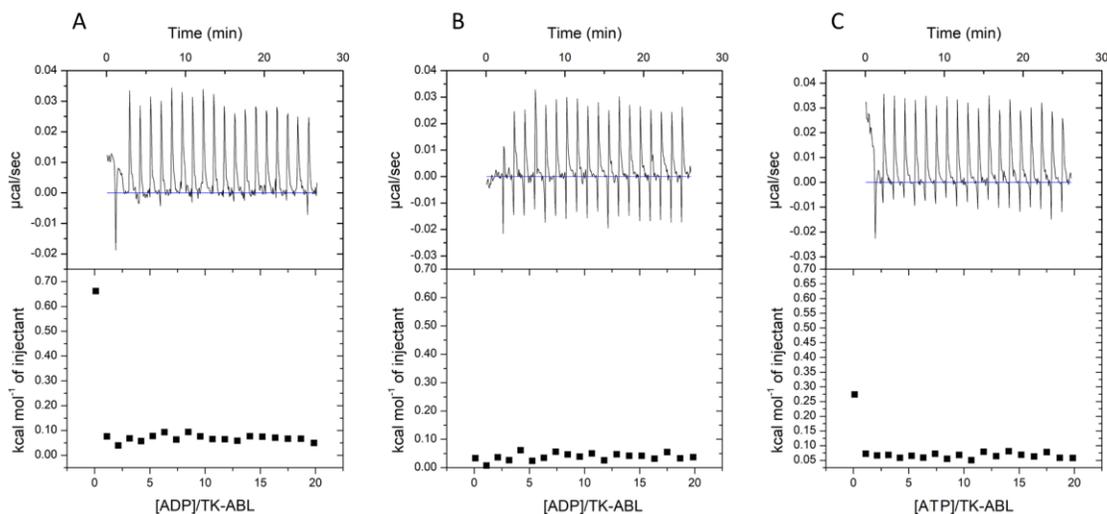
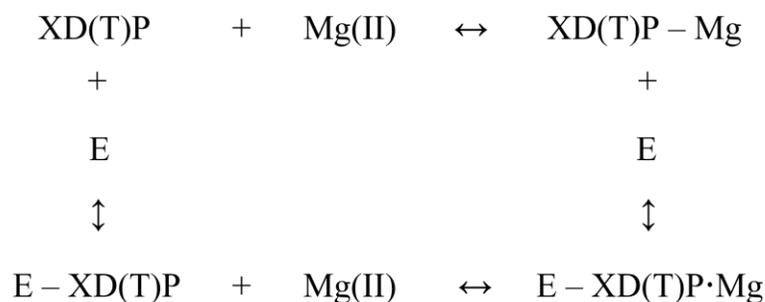


Figura 23. Titulación calorimétrica de TK-ABL. A. ADP, 20 °C. B. ADP, 25 °C. C. ATP, 20 °C.

En cambio, la presencia de calcio o de magnesio generó una clara interacción de ambos nucleótidos con TK-ABL (Fig. 24). Previamente, en nuestro grupo de investigación mostramos que las subunidades α y β de la ATP sintasa (Pulido, N.O., *et. al.*, 2010; Salcedo, G, *et. al.*, 2014.) y la GTPasa humana EFL1 (Luviano, A., *et. al.*, 2019) son capaces de unir nucleótidos en ausencia de magnesio. Como la interacción entre nucleótidos y el magnesio es de afinidad baja, se sigue entonces que estas proteínas muestran un equilibrio complejo en solución, de acuerdo con lo ilustrado en el Esquema 1:



Esquema 1. Equilibrio químico entre una proteína (E) unidora de nucleótidos, el ion magnesio y nucleótidos, donde X representa la base nitrogenada (Pulido, N.O., *et. al.*, 2010).

Como TK-ABL no une nucleótidos en ausencia de magnesio, el mecanismo puede ser descrito a través de un modelo simple de unión (equilibrio horizontal inferior en el Esquema 1), siempre y cuando se mantenga una alta concentración del catión para desplazar el equilibrio hacia

el complejo nucleótido-metal. La constante de afinidad del ADP o ATP con magnesio es de 62,000 y 616,000 M⁻¹, respectivamente (Salcedo, G., et al., 2014). Por tanto, la presencia de 5 mM de MgCl₂ en la celda de reacción llevó a que, a lo largo de la titulación, se tuviera al menos 99% de nucleótido acompañado con el metal. En efecto, observamos que las curvas calorimétricas fueron adecuadamente ajustadas mediante un modelo de un sitio único (estequiometría 1:1), permitiendo determinar las firmas termodinámicas de los complejos de TK-ABL. Un resumen de los resultados de las mediciones calorimétricas realizadas a diferentes temperaturas es presentado en la *Tabla 2*.

La formación de los complejos TK-ABL con nucleótidos de adenina se caracterizaron por ser procesos exotérmicos en todas las temperaturas a las que se llevó a cabo el estudio. El complejo de TK-ABL con MgADP fue entrópicamente dirigido a bajas temperaturas, y entálpicamente dirigido a altas temperaturas (Fig. 24A-D, Tabla 2). Al incrementarse la temperatura, K_a mostró una marcada disminución, el ΔH se volvió más favorable (valores más negativos), mientras que el $T\Delta S$ menos favorable (menos positivo). Las tendencias térmicas observadas de los tres parámetros termodinámicos (K_a , ΔH y ΔS) son consistentes con lo esperado para un proceso exotérmico acompañado por un ΔC_p negativo, observación que puede ser tomada como un indicador interno de lo adecuado de las mediciones experimentales. Debido a la compensación entálpica-entrópica, el ΔG mostró una variación relativamente pequeña en el intervalo de temperatura muestreado.

En el caso de ATP, no fue posible medir la interacción en presencia de magnesio, dado que la enzima hidroliza al trinucleótido en presencia del ion metálico. Por tanto, se optó por medir la formación del complejo TK-ABL-CaATP (Fig. 24E-H, Tabla 2). La afinidad por CaATP resultó aproximadamente 25 veces mayor que por MgADP. La formación de este complejo también estuvo dirigida tanto entálpica como entrópicamente, aunque los valores de ΔH y ΔS mostraron una ligera tendencia a incrementarse con la temperatura, consistente con un ΔC_p positivo y pequeño (Tabla 2).

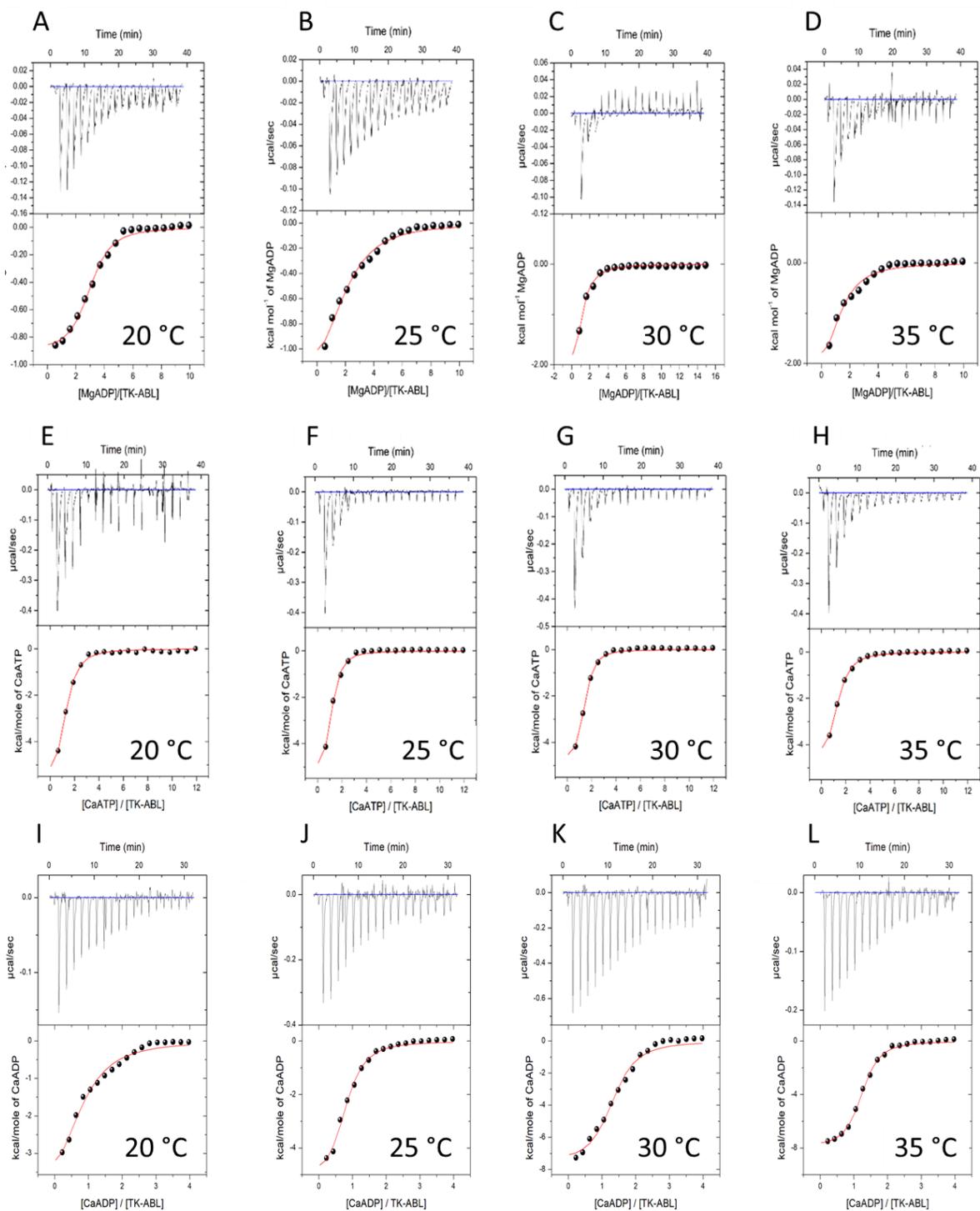


Figura 24. Titulación calorimétrica de TK-ABL en función de la temperatura. A-D. MgADP. E-H. CaATP. I-L. CaADP.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de la unión de TK-ABL a diferentes temperaturas determinados mediante ITC

Ligando	Temperatura (°C)	Ka (x10 ³ M ⁻¹)	Kd (μM)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	-TΔS (kcal mol ⁻¹)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔCp (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
MgADP	20	15.4	65	-0.8	-5.2	-6.0	-318
	25	15.5	64	-2.6	-3.5	-6.1	
	30	8.4	119	-4.4	-1.4	-5.8	
	35	5.5	217	-5.5	0.0	-5.5	
CaATP	20	279	3.6	-5.9	-1.9	-7.8	48
	25	225	4.4	-5.7	-2.1	-7.8	
	30	228	4.4	-5.4	-2.5	-7.9	
	35	136	7.7	-5.2	-2.5	-7.7	
CaADP	20	105	9.5	-3.8	-3.4	-7.2	-314
	25	77	13.1	-5.5	-2.6	-7.1	
	30	52	19.3	-7.7	-0.7	-7.0	
	35	48	21.0	-8.3	1.3	-7.0	

Dado que el calcio no es el ion natural de la enzima para ejercer su actividad enzimática, la interacción con CaATP puede variar con respecto a la interacción con MgATP. Para tener un indicio de esta perturbación, realizamos mediciones con CaADP para comparar el perfil energético de este ligando contra el perfil del ligando natural MgADP (Fig. 24I-L, Tabla 2). Inesperadamente, los datos calorimétricos revelaron que CaADP une a TK-ABL con una afinidad un orden de magnitud mayor que MgADP, debido a una mejor entalpía de formación. Interesantemente, ambos complejos exhibieron un ΔC_p negativo de magnitud similar, indicando que la proteína sufre un rearrreglo conformacional semejante con ambos ligandos. Resultados similares han sido observados para la interacción del dominio TK unido a los dominios de regulación SH3 y SH2 (datos no publicados de nuestro laboratorio).

Las firmas termodinámicas a 35°C para los tres complejos de TK-ABL determinados en este estudio se muestran en las Figs. 25 y 26.

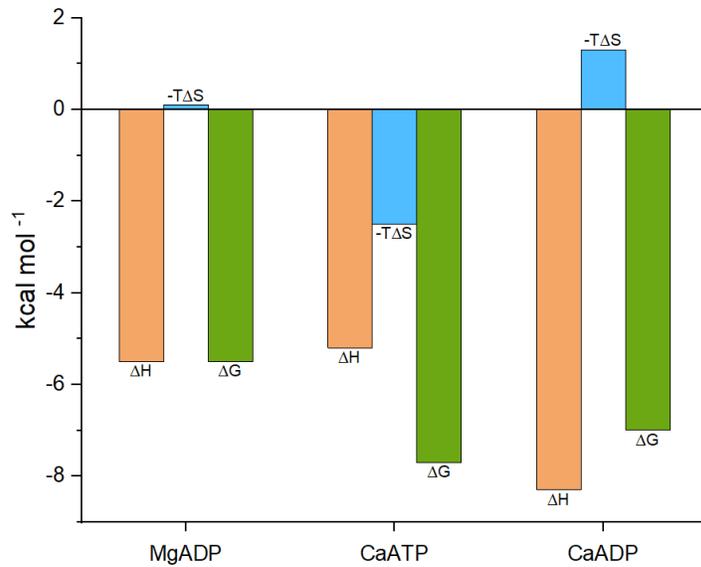


Figura 25. Firmas termodinámicas de los complejos TK-ABL con nucleótidos determinadas a 35°C. En color naranja se muestran los valores de ΔH , en azul de $-T\Delta S$ y en verde de ΔG . La firma termodinámica para el complejo TK-ABL – MgADP. es entálpicamente dirigida con el componente entrópico desfavorable. La unión de TK-ABL y CaATP es dirigida por ambos componentes. Finalmente, para el complejo TK-ABL – CaADP es entálpicamente dirigida con el componente entrópico desfavorable.

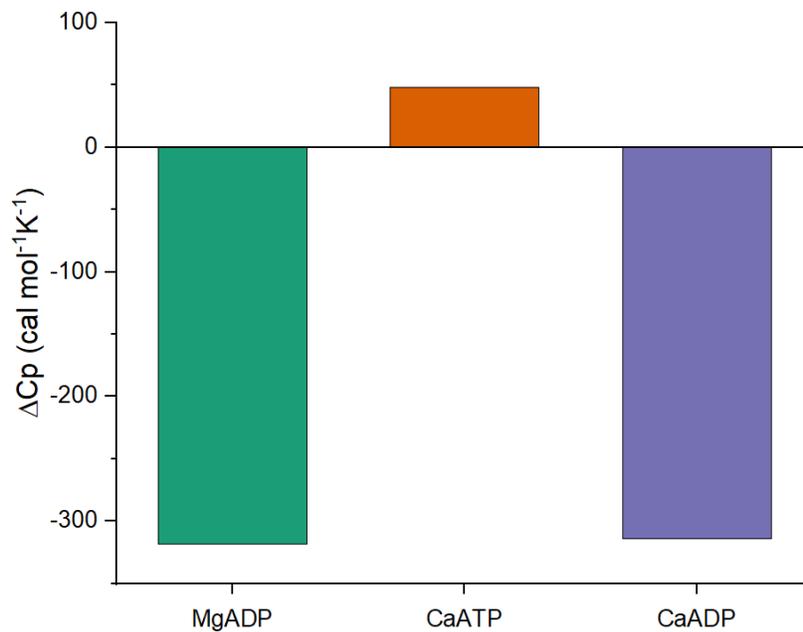


Figura 26. ΔC_p de formación de los complejos TK-ABL con nucleótidos. ΔC_p es considerado un poderoso indicador del rearrreglo conformacional de proteínas. Para los complejos TK-ABL – MgADP y CaADP, los valores de ΔC_p son negativos con una magnitud similar, indicando que la proteína sufre un rearrreglo conformacional semejante con ambos ligandos, Por otro lado, es posible observar una notable diferencia entre los valores de MgADP y CaATP, indicando que la estructuración de la proteína es diferente con cada nucleótido.

5.4 Análisis estructural del reconocimiento de nucleótidos por TK-ABL basado en propiedades energéticas

El término entálpico (ΔH) refleja la contribución energética de las interacciones individuales (puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, electroestáticas, polares y dipolares) entre dos moléculas, considerando que las interacciones con el solvente como referencia, y por lo tanto, refleja también la entalpía de desolvatación. ΔH es negativo (favorable) si las interacciones entre la macromolécula y el ligando sobrecompensan el costo de romper las interacciones de las moléculas individuales con el solvente; de lo contrario, será positiva (desfavorable). En este estudio, encontramos que los 3 complejos de TK-ABL caracterizados son favorecidos entálpicamente en todo el intervalo de temperatura muestreado (Tabla 2), implicando que la formación de nuevas interacciones proteína-ligando e incluso proteína-proteína son más favorables que la desolvatación que acompaña al proceso. Esto habla de una alta complementaridad estereoquímica entre la proteína y los nucleótidos. Interesantemente, esta complementaridad se alcanza únicamente en la presencia del ion metálico, dado que la sustracción de éste del medio lleva a una pérdida total del reconocimiento molecular. Este resultado contrasta con lo reportado para otras proteínas unidoras de nucleótidos, como las subunidades α y β de la ATP sintasa (Pulido, N.O., *et. al.*, 2010; Salcedo, G, *et. al.*, 2014), o la GTPasa humana EFL1 (Luviano, A., *et. al.*, 2019), las cuales disminuyen significativamente su afinidad en ausencia de Mg, pero siguen siendo capaces de unir al nucleótido libre del ion metálico.

El cambio de entropía (ΔS) está determinado por el cambio de grados de libertad del sistema. Típicamente contiene una contribución favorable debido a la ganancia en grados de libertad de las moléculas de agua que antes de la unión se localizaban en la superficie del ligando y la macromolécula y se liberan al solvente tras la unión. La entropía conformacional, así como la entropía roto-traslacional, suelen ser negativas (desfavorables), porque hay una pérdida de grados de libertad debido a una reducción en el número de conformaciones y configuraciones accesibles para ambas moléculas al unirse; sin embargo, la primera puede ser modulada modificando estructuralmente las moléculas de unión, mientras que la última es esencialmente la misma en cualquier evento de unión y no puede ser manipulada (Velázquez-Campoy, A. & Freire, E., 2005). Los complejos caracterizados en el presente estudio mostraron comportamientos entrópicos variables. A una temperatura de 35 °C, que puede ser considerada como cercana a la fisiológica en el cuerpo

humano, la unión de MgADP es isoentrópica, la de CaATP favorable y la de CaADP desfavorable (Tabla 2). Esto sugiere que la proteína alcanza un mayor grado de estructuración al unir CaADP que MgADP, lo cual concuerda con la entalpía significativamente más favorable en presencia de calcio. La entropía favorable del CaATP pudiera sugerir una menor estructuración de la proteína, aunque también puede deberse a la desolvatación favorable del fosfato γ y/o a un efecto diferente que ejerce el calcio al sustituir al magnesio en presencia del trinucleótido.

Existe consenso en que la contribución principal al ΔC_p proviene del cambio del número de moléculas de solvente que se encuentran en contacto directo con los solutos, por lo que existe una proporcionalidad con el cambio en el área expuesta al solvente (Cooper, A., 2000). Por tanto, ΔC_p es considerado un poderoso indicador del rearrreglo conformacional de proteínas. De acuerdo a al estudio de Murphy y Freire usando datos de disolución de dipéptidos cíclicos (Murphy, K.P. & Freire, E., 1992), se puede calcular el ΔC_p a partir de un modelo simple de cambio de área superficial (ΔASA) con la siguiente parametrización:

$$\Delta C_{p_{calc}} = 0.45 \Delta ASA_{np} - 0.27 \Delta ASA_p \quad (10)$$

donde ΔASA_p es el cambio en el área superficial polar y ΔASA_{np} es el cambio en el área superficial no polar. En este estudio, encontramos una clara diferencia en el ΔC_p de MgADP y CaATP, indicando que la estructuración de la proteína es diferente con cada nucleótido. Pero no se puede descartar que esta diferencia se pueda deber principalmente al uso de dos cationes diferentes. Como no es posible medir la unión del ligando natural MgATP debido a que TK-ABL lo hidroliza, optamos por medir la interacción con CaATP, lográndose obtener isoterms de titulación que no fue posible observar con MgATP. Para tener una idea del efecto del catión “no fisiológico”, se realizaron mediciones de unión con CaADP. Nuestros datos mostraron que aunque el calcio modifica las firmas termodinámicas, haciendo más afin la unión, el valor de ΔC_p de ADP con magnesio y calcio fue el mismo. Por tanto, suponemos que la estructuración con CaATP es similar a con MgATP.

A partir de la estructura cristalográfica de TK-ABL uniendo al sustrato no hidrolizable MgATP γ S (Levinson, N.M., *et. al.*, 2006), calculamos el ΔC_p mediante la ecuación 10. Asumiendo que la unión proteína – ligando es de tipo cuerpo rígido, calculamos los cambios de área polar (ΔASA_p) y no polar (ΔASA_{np}) usando el programa NACCESS. La Tabla 3 muestra las áreas accesibles para el nucleótido libre, la proteína libre y el complejo, a partir de las cuales se obtuvieron los cambios de

área de unión. Se modeló el complejo con MgADP, simplemente borrando las coordenadas para el fosfato γ .

Tabla 3. Cambios de área superficial y ΔC_p

Construcción	ASA _p	ASA _{np}	ΔASA_p	ΔASA_{np}	$\Delta C_{p_{calc}}$
TK-ABL - MgATP	7679	6113	-433	-480	-99
TK-ABL	7900	6173			
MgATP	212	420			
TK-ABL - MgADP	7704	6054	-410	-474	-103
TK-ABL	7900	6173			
MgADP	214	355			

La Tabla 3 indica que los dos nucleótidos deberían mostrar valores de ΔC_p muy cercanos (~ -100 cal/molK), lo cual claramente no está de acuerdo con los valores experimentales observados. Por tanto, se puede concluir que la conformación de la proteína en presencia de MgADP debe ser diferente a la que se observa en el cristal con el análogo de ATP. Por otro lado, el ΔC_p experimental para CaATP fue pequeño y positivo, mientras que el esperado de una unión tipo cuerpo rígido es negativo. Esto indica que la unión no puede ser descrita como tipo cuerpo rígido, lo cual concuerda con la flexibilidad estructural que presenta el asa de activación en ausencia de algún ligando ortostérico.

6. Conclusiones.

En este trabajo, caracterizamos las firmas termodinámicas de unión de nucleótidos del dominio catalítico de la proteína oncogénica BCR-ABL. Esta información no solo es útil para entender las bases moleculares del funcionamiento de esta tirosina-cinasa, si no que además da información que puede ser útil para el diseño de inhibidores farmacológicos de la enzima.

La producción recombinante de TK-ABL rindió una proteína soluble y pura, la cual mostró un perfil de desplegamiento térmico tipo sigmoide, lo cual es típico de proteínas bien plegadas. El perfil mostró dos transiciones, las cuales corresponden al desplegamiento de cada uno de los lóbulos que componen a TK-ABL. Estas transiciones se ven perturbadas en presencia de SDS, un análogo del inhibidor alostérico ácido mirístico. El SDS mantiene termoestable al lóbulo C, mientras que desestabiliza al lóbulo N, revelando que una de las funciones del inhibidor alostérico es debilitar la comunicación entre los dos lóbulos, lo cual es de relevancia funcional, dado que el sitio activo se encuentra en la zona interlobular.

Mediante ITC, se logró caracterizar las firmas termodinámicas de unión de TK-ABL con nucleótidos de adenina. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que reporta esta información energética para cualquier tirosina cinasa. Se observó que la presencia del magnesio (o de un catión divalente semejante como el calcio) es indispensable para la unión de los nucleótidos, dependencia absoluta que no se observa en otras enzimas que reconocen nucleótidos. La unión resultó más fuerte por el trinucleótido debido a un aporte favorable tanto de entropía como de entalpía. El ADP, en cambio, a pesar de mostrar una entalpía más favorable que el ATP, se acompañó de una entropía desfavorable que debilita su unión. Estas diferencias sugieren que los nucleótidos estructuran de manera diferente la proteína. La diferencia más notable entre ambos nucleótidos se observó en la magnitud de ΔC_p . Mientras que el ADP mostró un valor grande negativo, indicando un ocultamiento neto de áreas no polares, el ATP mostró un valor positivo y pequeño, lo cual es consistente con el ocultamiento de áreas de tipo polar. Esta información implica que, en principio, se podrían generar inhibidores farmacológicos que unan de manera distinta a la conformación tipo “unida a ATP” que a la conformación “unida a ADP”, factor que no ha sido tomando en cuenta hasta el momento en el diseño de inhibidores de esta enzima.

La gran mayoría de inhibidores farmacológicos en uso actual para el tratamiento de LMC unen el sitio activo de BCR-ABL. Esto significa que dentro de la célula, los inhibidores deben competir con los sustratos naturales de la enzima, incluyendo a los péptidos sustrado y a los nucleótidos. De

acuerdo con nuestros datos, ambos nucleótidos son unidos con una afinidad en el orden micromolar. Esto significa que los inhibidores farmacológicos tienen un “handicap” en ΔG de entre 6 y 7 kcal/mol, que deben invertir de su energía de unión favorable para desplazar a los nucleótidos. Quizá esto ayude a explicar la necesidad de administrar dosis relativamente altas (~500 mg/día) de imatinib a pacientes con LMC. Este es uno de los inconvenientes comunes a los inhibidores tipo ortostérico. Actualmente, existe una amplia investigación en búsqueda de fármacos alostéricos de BCR-ABL. Para contribuir en ello, se requiere realizar caracterizaciones de la unión de esta tirosinasa con el ácido mirístico, su inhibidor alostérico natural, o con un análogo de éste. Además, sería conveniente realizar una caracterización termodinámica con una construcción de proteína que contenga a los dominios de regulación SH3 y SH2, los cuales son elementos fundamentales para la comunicación alostérica.

7. Referencias.

- Advani, A. S., & Pendergast, A. M. (2002). Bcr–Abl variants: biological and clinical aspects. *Leukemia research*, 26(8), 713-720.
- Avilés-Vázquez, S., Chávez-González, A., & Mayani, H. (2013). Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). *Gaceta Médica de México*, 149(6), 646-654
- Barilá, D. & Superti-Furga, G. (1999). Regulation of human c-Abl tyrosine kinase activity in *Xenopus* oocytes and acceleration of progesterone-induced G2/M transition by oncogenic forms. *Biological chemistry*, 380(2), 223-230.
- Chávez-González, M. A., Ayala-Sánchez, M., & Mayani, H. (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Rev Invest Clin*, 61(3), 221-32.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?. *Nature reviews Drug discovery*, 1(4), 309-315.
- Cooper, A. (2000). Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophys Chem.* 31;85(1):25-39.
- Cowan-Jacob, S. W., Möbitz, H., & Fabbro, D. (2009). Structural biology contributions to tyrosine kinase drug discovery. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 280-287
- Diamond, J.M, Melo, J.V. (2011). Mechanisms of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma.* 52 Suppl 1:12-22.
- Foda Z. H., Seeliger, M. A. (2014). Kinase inhibitors: an allosteric add-on. *Nat Chem Biol.* 10(10):796-7
- García-Curiel, M. B., (2014). 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 de maestría).
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc.* 1(6):2876-90.
- Greuber, E. K., Smith-Pearson, P., Wang, J., & Pendergast, A. M. (2013). Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, 13(8), 559-571.
- Hantschel, O., & Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(1), 33-44

- Hantschel, O., & Superti-Furga, G. (2006). Mechanisms of activation of Abl family kinases. In *Abl family kinases in development and disease* (pp. 1-10). Springer New York.
- Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., & Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, 112(6), 845-857.
- Hochhaus, A, La Rosée, P. (2004). Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 18(8):1321-31.
- Kantarjian, H. M., et al. (1991). Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood*, 78(9), 2411-2418.
- Levinson, N.M., Kuchment O, Shen K, Young MA, Koldobskiy M, Karplus M, Cole PA, Kuriyan J. A. (2006). Src-like inactive conformation in the abl tyrosine kinase domain. *PLoS Biol.* 4(5): e144.
- Li ,M, Rehman, A.U., Liu, Y, Chen, K, Lu, S. (2021). Dual roles of ATP-binding site in protein kinases: Orthosteric inhibition and allosteric regulation. *Adv Protein Chem Struct Biol.*124:87-119.
- Luviano, A, Cruz-Castañeda, R, Sánchez-Puig, N, García-Hernández, E. (2019). Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase. *Biophys Chem.* 247:13-24.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934
- Murphy, K.P. & Freire E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem.* 43:313-61.
- Nagar, B., Hantschel, O., Seeliger, M., Davies, J. M., Weis, W. I., Superti-Furga, G., & Kuriyan, J. (2006). Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Molecular cell*, 21(6), 787-798
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., ... &Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, 112(6), 859-871.
- Noble, M. E., Endicott, J. A., & Johnson, L. N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, 303(5665), 1800-1805.
- Panjarian, S., Iacob, R. E., Chen, S., Engen, J. R., & Smithgall, T. E. (2013). Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5443-5450.

- Pluk, H., Dorey, K., & Superti-Furga, G. (2002). Autoinhibition of c-Abl. *Cell*, 108(2), 247-259.
- Pulido N. O, Salcedo G, Pérez-Hernández G, José-Núñez C, Velázquez-Campoy A, García-Hernández E. (2010). Energetic effects of magnesium in the recognition of adenosine nucleotides by the F(1)-ATPase beta subunit. *Biochemistry* 49(25):5258-68.
- Reddy, E. P., & Aggarwal, A. K. (2012). The ins and outs of bcr-abl inhibition. *Genes & cancer*, 3(5-6), 447-454. Shan, Y., et al. 2009.
- Rosenblum, J. S., Nomanbhoy, T. K., & Kozarich, J. W. (2013). Functional interrogation of kinases and other nucleotide-binding proteins. *FEBS letters*, 587(13), 1870-1877.
- Roskoski, R. (2003). STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(4), 709-717.
- Salcedo, G, Cano-Sánchez, P, de Gómez-Puyou MT, Velázquez-Campoy A, García-Hernández E. (2014). Isolated noncatalytic and catalytic subunits of F1-ATPase exhibit similar, albeit not identical, energetic strategies for recognizing adenosine nucleotides. *Biochim Biophys Acta*. 1837(1):44-50.
- Sawyers, C. L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 340 (17), 1330-1340.
- Shan, Y., Seeliger, M.A. , Eastwood, M.P., Frank, F, Xu, H, Jensen, MØ, Dror, R.O., Kuriyan, J, Shaw, D.E. (2009). A conserved protonation-dependent switch controls drug binding in the Abl kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(1):139-44.
- Sharon M. & Nicholas C. Price.(2005). How to study proteins by circular dichroism. *BBA*. 1751:119-139.
- Velázquez-Campoy, A, Freire E. (2005). ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophys Chem*.115(2-3):115-24.
- Vulpetti, A, Bosotti, R. (2004). Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Farmacologia* 59(10):759-65.
- Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 7(5):345-56.