



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Estabilidad termodinámica y bases energéticas de la unión del dominio tirosina quinasa Bcr-Abl a nucleótidos de adenosina y su inhibidor imatinib (STI-571)”.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Manuel Bernardo García Curiel

TUTOR PRINCIPAL

Enrique García Hernández, Instituto de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Nuria Victoria Sánchez Puig, Instituto de Química  
Rogelio Rodríguez Sotres, Facultad de Química

MÉXICO, D. F. Junio, 2014



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 IN205712, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 129239 y 158473.**



## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas y entidades académicas que bajo su interés y apoyo formaron parte de mi preparación profesional: Entre las cuales considero:

**A mi tutor:** Enrique García que bajo su alta capacidad crítica, incondicional apoyo y sobre todo paciencia, llevó por un excelente camino mi desarrollo. Ha sido un pilar inamovible en mi intento de ser un investigador y un ejemplo a seguir.

**A mi comité tutorial:** La Dr. Nuria Victoria Sánchez Puig y el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, dos personas que siempre tuvieron propuestas críticas y positivas ante los proyectos y sobre todo en fomentar mi capacidad crítica en cada tutorial.

**A mis compañeros del laboratorio:** por compartir el mismo interés en la investigación y establecer un ambiente de trabajo y diversidad de ideas.

**A todos los maestros de mis clases:** Que sería imposible nombrarlos a todos aquí pero que sin duda bajo su empeño y vocación por el trabajo, llevaron a buen puerto mi aprendizaje en estos dos años.

**Y sin duda alguna:** A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa y espacio en el que he podido desarrollarme de forma libre durante ya 10 años.

**También:** A todas las personas que con su sudor y esfuerzo pagan sus impuestos y gracias a ello recibí el apoyo económico por el CONACYT, a través del programa de apoyo a estudios de posgrado con registro No.443179.

*Victoria, José, Ivonne,  
Jeannine, Alby,  
Derek, David.*

*“Sólo dos legados duraderos podemos dejar a  
nuestros hijos: uno, raíces; otro, alas”. H. C.*

## **ABREVIATURAS**

<b>LMC</b>	Leucemia mieloide crónica
<b>Abi</b>	Abelson protein
<b>Bcr</b>	Breakpoint cluster region
<b>Src</b>	Sarcoma Protein
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato
<b>TK</b>	Tirosina quinasa
<b>SH2</b>	Sarcoma homology 2
<b>SH3</b>	Sarcoma homology 3
<b>PPII</b>	Poliprolina II
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>TEV</b>	Tobacco etch virus protease
<b>DC</b>	Dicroísmo Circular
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>RMN</b>	Resonancia magnetica nuclear
<b>ADN</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida de alta velocidad
<b>RMSD</b>	Root Mean Square Deviation

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
1.1 El cromosoma Filadelfia y la Leucemia Mieloide Crónica .....	1
1.2 Tirosina Quinasas .....	2
1.3 La Proteína Bcr-Abl.....	3
1.4 El dominio catalítico tirosina quinasa .....	4
1.5 Dominios SH3, SH2 y la región Cap son reguladores de la activación del dominio TK .....	7
1.6 Imatinib .....	10
1.7 Planteamiento del problema .....	13
<b>II. HIPOTESIS</b> .....	14
<b>III. OBJETIVO PRINCIPAL</b> .....	15
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	15
<b>IV. MATERIAL Y METODOS</b> .....	16
4.1 Sobre-expresión del dominio TK-Abl.....	16
4.1.1 Purificación del dominio TK-Abl.....	17
4.1.2 Corte con la proteasa TEV .....	17
4.1.3 Purificación por columna de intercambio catiónico.....	17
4.2 Fluorescencia de unión a ADP e Imatinib.....	18
4.2.1 Protocolo experimental .....	19
4.3 Dicroísmo circular, predicción de estructura secundaria y determinación de la estabilidad .....	19
4.3.1. Protocolo Experimental.....	23
4.4. Calorimetría de Titulación Isotérmica. Unión de ATP e Imatinib.....	24
4.4.1 Calorimetría de Titulación Isotérmica .....	24
4.4.2. Protocolo experimental .....	30
<b>V. RESULTADOS</b> .....	31
5.1 Sobre-expresión y purificación de los dominios TK-Abl y TK-Src .....	31
5.2. Mediciones espectroscópicas .....	34
5.2.1. Dicroísmo circular.....	34

5.2.2. Fluorescencia intrínseca .....	46
5.3. Calorimetría de Titulación Isotérmica .....	48
VI. <b>DISCUSION</b> .....	51
VII. <b>CONCLUSIONES</b> .....	58
VIII. <b>PERSPECTIVAS</b> .....	59
IX. <b>BIBLIOGRAFIA.</b> .....	60

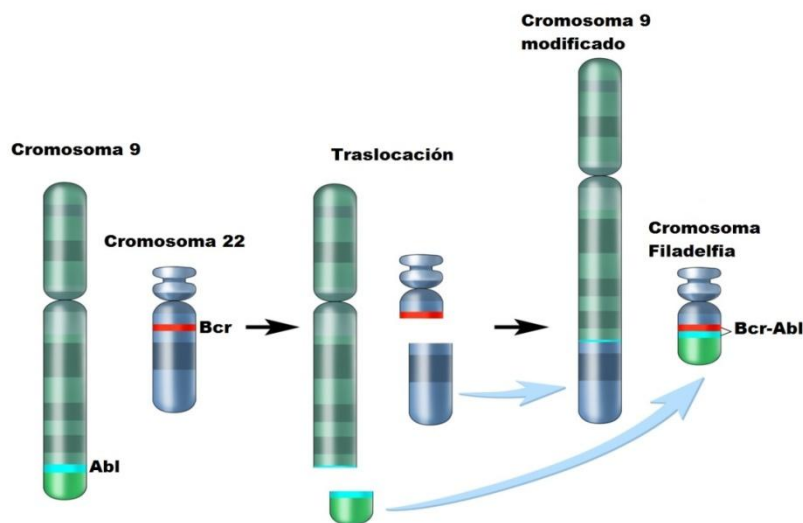


## I. INTRODUCCION

### 1.1 El cromosoma Filadelfia y la Leucemia Mieloide Crónica

En 1959, David Hungerford, del Fox Chase Cancer Center, y Peter Nowell, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania, descubrieron que las células sanguíneas tomadas de dos personas con leucemia mieloide crónica (LMC) tenían una anomalía bastante llamativa: al cromosoma 22 de estas células le faltaba un segmento. Esta fue la primera vez que se vinculó un mal genético con la leucemia y la primera anomalía genética asociada con cualquier forma de cáncer (Nowell y Hungerford, 1960). Trece años después, en 1973, en la Universidad de Chicago, Janet D. Rowley observó que en el 95% de los pacientes con LMC se presentaba la translocación entre un segmento del cromosoma 9 y el 22  $t(9;22)$ , conocida como translocación filadelfia (Rowley, 1973).

Fueron necesarios nueve años más para saber cuáles eran las implicaciones de dicha translocación. En 1983, Heisterkamp y colaboradores mostraron que la parte faltante del cromosoma 9 era el gen codificante para la proteína Abl, conocida por su actividad de tirosina quinasa. Dos años más tarde, Shtivelman y colaboradores mostraron que el gen de la Abl estaba anclado en el gen denominado Bcr, formando un oncogén híbrido, el gen Bcr-Abl causante de la LMC (Figura 1; Heisterkamp *et al.*, 1983).



**Figura 1.** Traslocación recíproca entre el cromosoma 9 y el cromosoma 22 dando resultado el cromosoma filadelfia (Nagar *et al.*, 2003).

## 1.2 Tirosina Quinasas

Hasta antes de 1979, sólo dos aminoácidos eran conocidos por aceptar grupos fosfato, la serina y treonina, como parte de un mecanismo de regulación de la actividad de las proteínas. Pero en ese año, Hunter y colaboradores, trabajando con la proteína Src (una de las tantas proteínas que intervienen en cascadas de señalización en la división celular), descubrieron un tercer aminoácido que podía ser fosforilado, la tirosina.

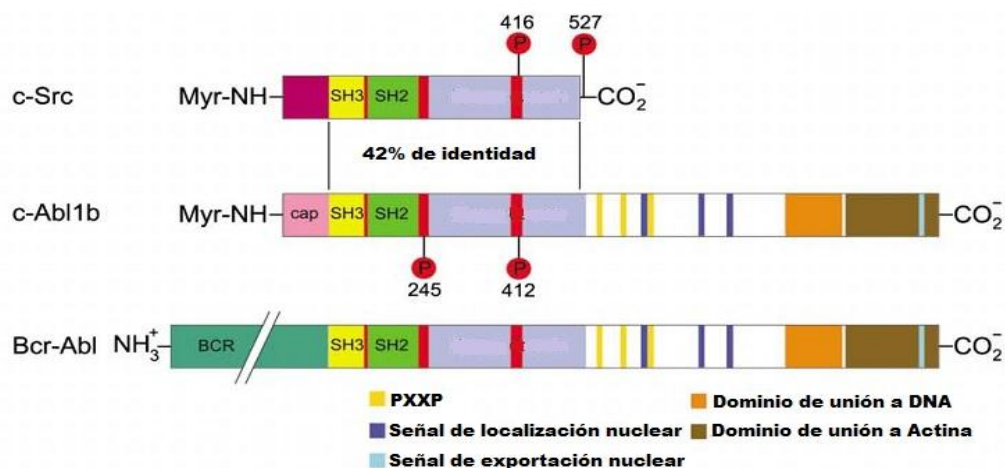
Las tirosina quinasas son enzimas que transfieren el fosfato- $\gamma$  del ATP a un residuo tirosina de una proteína blanco. La fosforilación de los residuos de tirosina a nivel celular tiene varias implicaciones y están involucradas directamente en la proliferación celular. De hecho, muchos de los receptores de factores de crecimiento que se conocen hoy en día son tirosina quinasas (Bertics y Gill, 1985. Schlessinger, 1987). Bajo condiciones normales, la fosforilación de proteínas blanco es un eficiente sistema para amplificar señales extracelulares y para iniciar una cascada de procesos metabólicos internos (Zippel R. *et al.*, 1986).

La revelación del genoma completo del ser humano ha servido para mostrar que alrededor de 518 genes codifican para proteínas con actividad de quinasa, lo cual representa cerca del 2% del total de genes del humano (Manning *et al.*, 2002). Muchos son los casos en los que se ha observado que las tirosina quinasas son causantes de enfermedades mortales. Entre ellas se encuentra la leucemia, que es causante de la muerte anual de más de 350, 000 personas en el mundo. Una de las leucemias más estudiadas es la leucemia mieloide crónica. Esta leucemia es causada por la actividad desregulada de la quinasa Bcr-Abl, la cual favorece la proliferación y división celular de células cancerígenas.

### 1.3 La Proteína Bcr-Abl

Estructuralmente, la quinasa Abl consiste en un dominio tirosina quinasa (TK) ubicado en el extremo carboxilo terminal y los dominios SH2 y SH3 (Src-homology-2 y Src-homology-3) en el extremo amino terminal (Figura 2). Estos dos últimos dominios se encuentran presentes en otros tipos de quinasas, como Src. El amino terminal tiene unido un ácido mirístico. Las estructuras tridimensionales de estos tres dominios están altamente conservadas entre diferentes quinasas. Cabe mencionar que las diferencias principales entre las quinasas de las familias Abl y Src son las diversas regiones que están antes del dominio SH3 y después del dominio tirosina quinasa. Una característica de los miembros de la familia de quinasas Abl es una región de tapa o “Cap”, la cual es una variante de autorregulación en esta proteína (Hantschel y Superti-Furga, 2004).

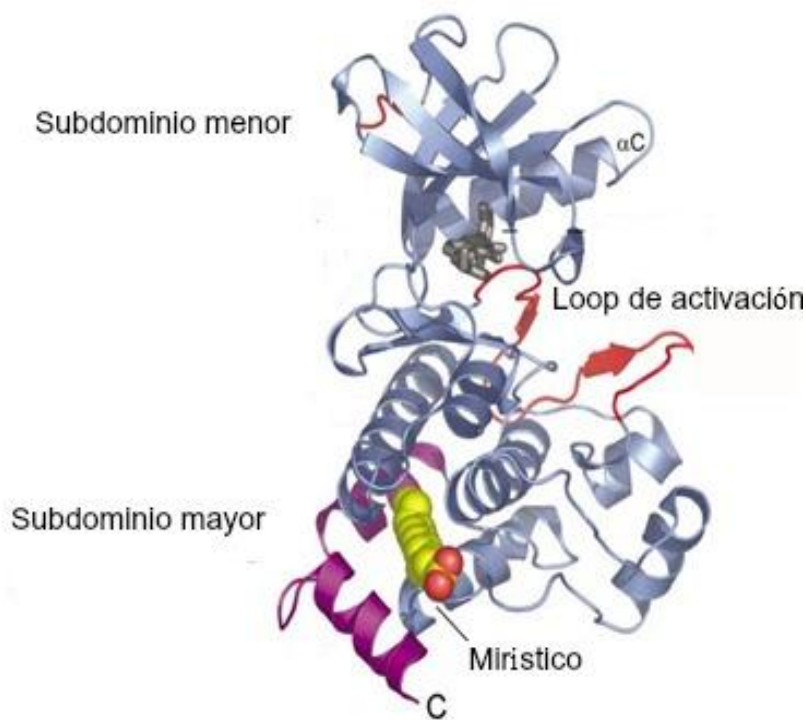
El producto transcripcional del oncogén Bcr-Abl es la proteína de fusión Bcr-Abl (Figura 2), con actividad tirosina quinasa incrementada, y cuya transcripción permanece activa continuamente sin necesidad de ser activada por otras proteínas mensajeras. La expresión de la proteína Bcr-Abl resulta en un aumento de la proliferación, supervivencia y transformación morfológica celular. A su vez, activa un gran número de proteínas y enzimas controladoras del ciclo celular, e inhibe la reparación del DNA, causando inestabilidad en el genoma. Todos estos fenómenos terminan desembocando en la LMC (Hantschel y Superti-Furga, 2004).



**Figura 2.** Organización estructural de dominios de la superfamilia de tirosina-quinasa que contienen dominios SH2-SH3. También se muestra la organización de la proteína oncogénica Bcr-Abl, la cual sufre la pérdida de la tapa o “Cap” (Nagar *et al.*, 2003).

## 1.4 El dominio catalítico tirosina quinasa

Como se ha mencionado, el dominio TK es una estructura altamente conservada en la mayoría de las tirosina quinasa, con una identidad de aproximadamente 35% entre familias. Consta de aproximadamente 300 aminoácidos. Este dominio cataliza la transferencia del fosfato- $\gamma$  del ATP sobre el grupo hidroxilo de la tirosina contenida en los péptidos del sustrato (Hantschel y Superti-Furga, 2004). La estructura del dominio TK ha sido dividida en dos subdominios o lóbulos; el subdominio menor (lóbulo N o lóbulo pequeño) y el subdominio mayor (lóbulo C o lóbulo grande; Figura 3). El subdominio menor está formado por 5 hebras  $\beta$  antiparalelas y una prominente hélice  $\alpha$  denominada hélice  $\alpha C$ , mientras que el subdominio mayor está compuesto sólo de hélices  $\alpha$  (Huse y Kuriyan., 2002).



**Figura 3.** Estructura tridimensional del dominio TK-Abl, señalando algunos de sus componentes (Modificado de Nagar *et al.*, 2003).

La unión del ATP ocurre en la interfase de los dos subdominios, en donde se encuentran los residuos catalíticos. Cinco son los factores esenciales para la generación de la conformación catalíticamente activa de los dominios TK.

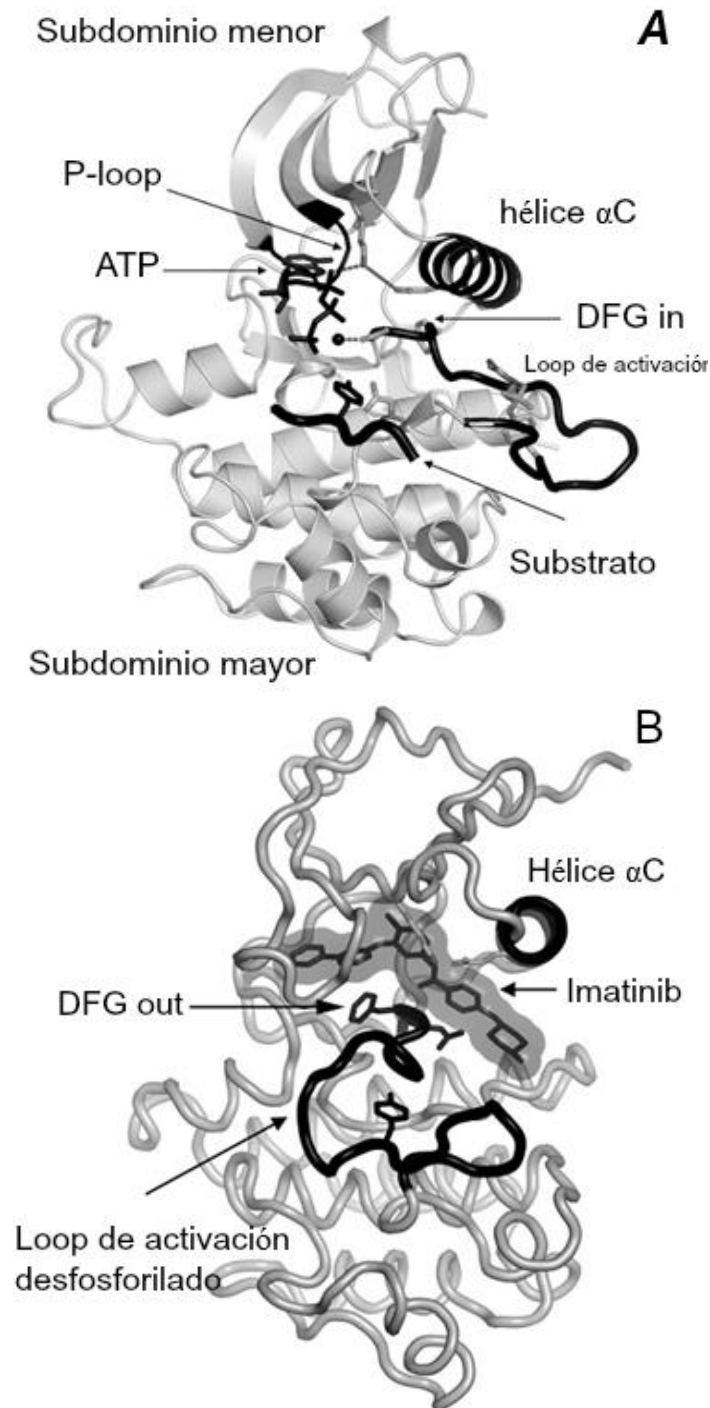
(1) El primer factor es un segmento denominado asa o “loop” de activación, en el cual el estado de fosforilación determina si la quinasa está activa. En la mayoría de las quinasas, el sitio de activación es un residuo tirosina (residuo 393 en Abl) el cual está localizado a la mitad del asa, que al estar fosforilado puede interactuar de forma electrostática con un residuo de arginina. Esta interacción genera que el asa permanezca abierta y en una forma extendida, de manera que el sustrato se pueda unir al sitio activo. En cambio, cuando la tirosina no está fosforilada, el asa adopta una conformación que impide la unión al sustrato (Figura 4A).

(2) En el lado N-terminal del asa de activación, se localiza un motivo de tres residuos muy conservado en todas las tirosina quinasas, denominado DFG (Asp-Phe-Gly, residuos del 381 al 383 en Abl). Se ha demostrado que el estado conformacional de este motivo es un factor importante para la activación de las TK's. En el estado activo, la cadena lateral del ácido aspártico está orientado hacia la cavidad de unión del ATP, y es capaz de unir un átomo de magnesio necesario para la transferencia del grupo fosfato, mientras que la fenilalanina se orienta hacia afuera de la cavidad ( estado “DFG in”; Figura 4A). Cuando las posiciones de estos dos residuos se intercambian, y la cadena lateral del ácido aspártico rota hacia afuera del sitio de unión a ATP y la cadena lateral de la fenilalanina se orienta hacia el interior, entonces la proteína se encuentra en un estado inactivo (estado “DFG out”) (Figura 4B; Hubbard., 1997; Hubbard *et al.*, 1994).

(3) Otro de los componentes regulatorios de este dominio está basado en la orientación de la hélice  $\alpha C$ . En las quinasas activas, esta hélice presenta un residuo de ácido glutámico que forma un puente salino con un residuo de lisina del subdominio menor, con lo cual se coordinan los grupos fosfato del ATP (Figura 4A; Sicheri *et al.*, 1997). En las quinasas inactivas, la hélice rota hacia el solvente y el puente salino que coordina los grupos fosfato se rompe.

(4) Un asa flexible rica en glicina (*P-loop*) conecta las hebras  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , formando la base del sitio activo.

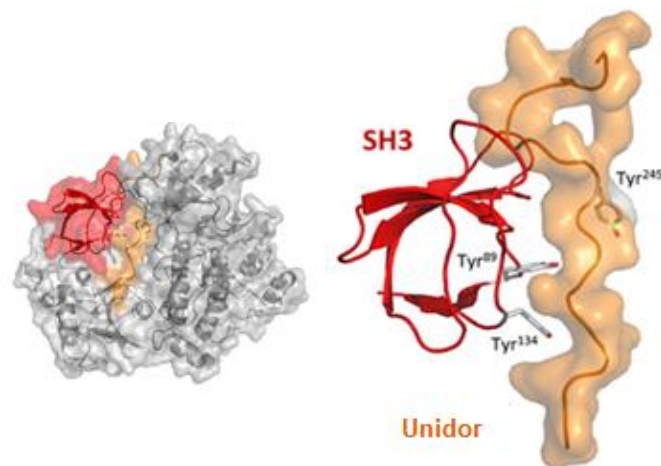
(5) La disposición relativa de los dos subdominios también son determinantes en la actividad de estas quinasas.



**Figura 4.** Estructura tridimensional del dominio TK-Abl en estado activo, DFG in (**A**), y en estado inactivo, DFG out (**B**) (Nagar, 2007).

## 1.5 Dominios SH3, SH2 y la región Cap son reguladores de la activación del dominio TK

Además de los elementos de regulación intradominio, la actividad de Abl es modulada por la interacción con los dominios de homología y por la región Cap. El dominio SH3 está compuesto por tres pequeñas hebras  $\beta$  antiparalelas, empacadas unas con otras para establecer una estructura en forma de barril. Como en muchos otros dominios SH3 de otras tirosina quinasas, el de Abl se une a péptidos ricos en residuos de prolina, los cuales forman una estructura helicoidal llamada poliprolina II, PPII (Pisabarro, 1998). En la forma inactiva, el dominio SH3 se une al conector con el dominio SH2 formando una hélice PPII. Esta estructura es muy importante, ya que cuando existen deleciones o mutaciones puntuales en la zona de residuos de prolina, se pierde la regulación del dominio TK-Abl, lo cual apoya la idea de que el dominio SH3 tiene una función de regulación negativa sobre el dominio TK (Figura 5).

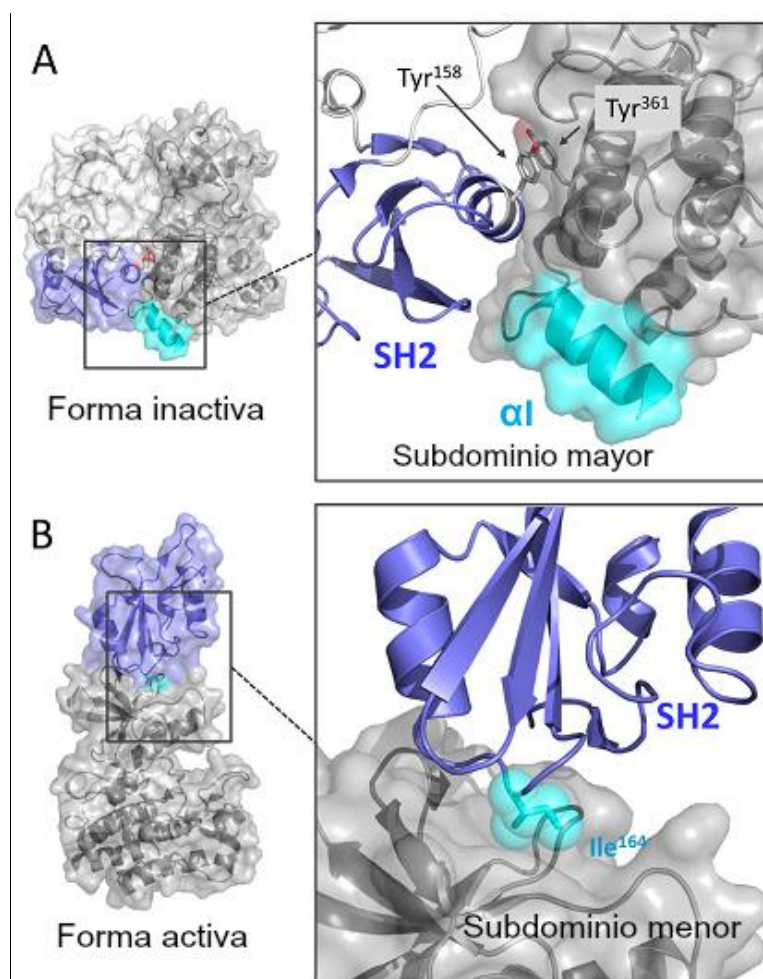


**Figura 5.** El dominio SH3 (rojo) interactuando con el linker SH2 (anaranjado) en la forma inactiva regulada del dominio TK-Abl. PDB: 2FO0. (Panjarian, 2013).

Estructuralmente, el dominio SH2 está formado por hojas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por hélices  $\alpha$  en cada lado (Figura 6). Al unir la cadena lateral de su Tyr<sup>158</sup> con la Tyr<sup>361</sup> del subdominio mayor, entre muchos otros enlaces de hidrógeno, SH2 en conjunto con la Cap causan la reorientación de la hélice  $\alpha$ ,

lo cual regula la actividad de forma negativa del dominio TK (Figura 6A; Nagar *et al.*, 2003; Hantschel *et al.*, 2003).

Estudios recientes han mostrado que el dominio SH2 sufre una reorientación significativa durante la activación de la quinasa (Figura 6B). Existen evidencias por cristalografía de rayos X de que en el estado activado el dominio SH2 se mueve de su posición regulatoria negativa a una nueva posición en el tope del dominio quinasa, interactuando con el subdominio menor y estabilizando la forma activa del dominio tirosina quinasa (Jacob *et al.*, 2011; Dixit y Verkhivner, 2009).

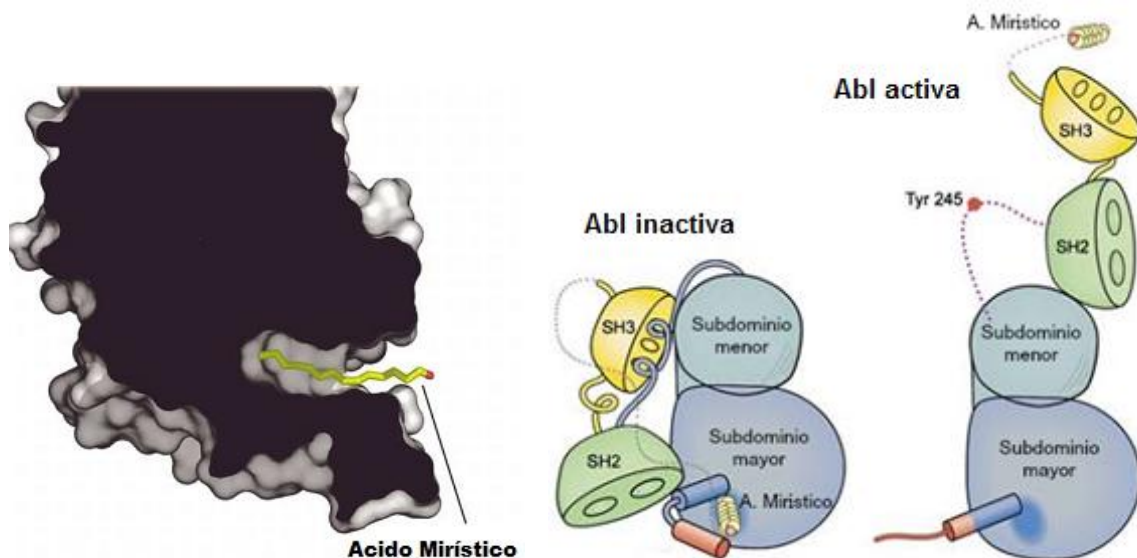


**Figura 6.** Regulación negativa de SH2 sobre TK. **(A)** En la forma inactiva, el dominio SH2 (azul) interactúa con el subdominio mayor (gris) por medio de un enlace de tipo pi entre las tirosinas 158 y 361, determinando la posición de la hélice  $\alpha$  (cian) (PDB:2FO0) **(B)** En la forma activa, la interacción entre las tirosinas más diversos enlaces de hidrógeno son perdidos (PDB: 1OPL) (Panjarian, 2013).



La región Cap de la Abl está formada por unos 80 aminoácidos, y se encuentra miristoilada. La primer estructura cristalográfica de la Abl reveló que el ácido mirístico se une al bolsillo hidrofóbico ubicado en el lóbulo C del dominio quinasa (Figura 7A). Dicha interacción es crítica para mantener autoinhibida a la proteína. Una mutación o la ausencia del ácido mirístico tiene como resultado una actividad descontrolada de la quinasa (Nagar *et al.*, 2003. Hantschel *et al.*, 2003).

Así, en su conjunto, los dos dominios homólogos SH2 y SH3, la Cap terminal y el ácido mirístico sufren cambios conformacionales que intervienen directamente con interacciones esenciales para regular la actividad del dominio TK de la Abl (Figura 7B).



**Figura 7. (A)** Superficie Molecular de Abl, autoinhibida por la molécula de ácido mirístico ubicada en su N-Cap. **(B)** Esquema del estado general de activación y desactivación de la Proteína c-Abl (Modificado de Nagar *et al.*, 2003)

Cabe resaltar que si bien el dominio TK de la proteína Bcr-Abl es idéntico al dominio TK nativo en Abl, la actividad y propiedades atípicas de la proteína de fusión resulta ser promovida por elementos de estructura contenidos en la fracción Bcr. La oncoproteína de fusión no contiene la región Cap regulatoria, mientras que las interacciones entre los dominios SH2 y SH3 son modificadas por Bcr (Arlinghaus., 2002). Estas alteraciones derivan en la actividad aumentada del dominio tirosina quinasa del dominio TK-Abl.

Por otro lado, se cree que el dominio Bcr promueve la oligomerización de la oncoproteína. Se ha observado que la formación del dímero es suficiente para la activación desregulada de TK- Abl (McWhirter *et al.*, 1993. Zhang *et al.*, 2001. He *et al.*, 2002). Debido a que el oncogén Bcr-Abl se expresa en todas las etapas clínicas de la enfermedad, la proteína Bcr-Abl resultante representa un blanco farmacológico ideal para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la LMC (Cohen, 2002. Noble *et al.*, 2004).

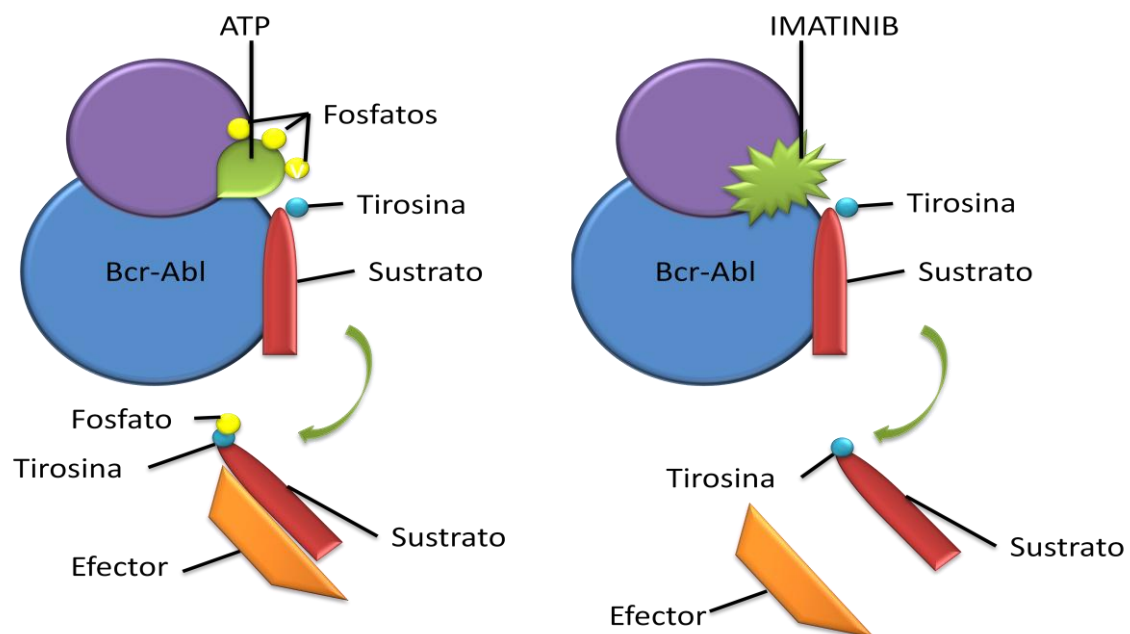
Datos publicados por dos grupos de investigación diferentes en 1991 (McWhirter y Wang: Muller *et al.*, 1991), demuestran que dos regiones de Bcr son esenciales para alterar la función de la proteína Bcr-Abl. La región 1, conformada por los aminoácidos 1-63, y la región 2, conformada por los aminoácidos 176-242. La región 2 contribuye a la desregulación de la tirosina quinasa uniéndose al dominio SH2 de Abl y propiciando su activación. La región 1 está, al parecer, involucrada en un aumento en la unión de actina que propicia la transformación celular.

Se sabe que la actividad aumentada de tirosina quinasa de la proteína Bcr-Abl es crucial para la generación de células transformadas presentes en la enfermedad, por lo que la inhibición de la actividad catalítica se ha convertido en un importante objetivo farmacológico al momento de desarrollar fármacos contra la LMC.

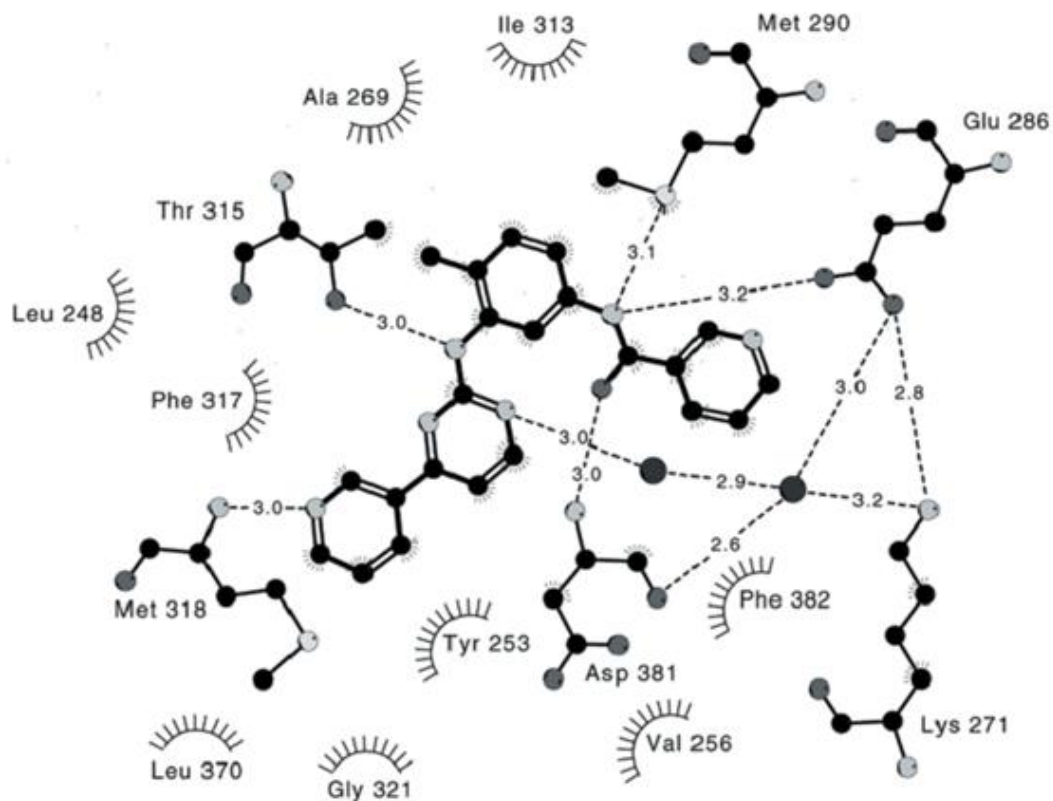
## **1.6 Imatinib**

El imatinib (STI-571) es un derivado fenilaminopirimidínico que tiene alta afinidad y especificidad por la quinasa Abl y ha resultado un éxito de la clínica en el tratamiento de leucemias Bcr-Abl positivas. Su eficacia es del 95% en el tratamiento de la LMC. También ha mostrado su utilidad en algunos casos de leucemia linfocítica aguda. El imatinib actúa inhibiendo competitivamente el sitio de unión a ATP, impidiendo la fosforilación del sustrato, y por tanto regula de manera negativa la cascada de señalización celular que da lugar al síndrome proliferativo mieloide (Figura 8; Goldman *et al.*, 2001).

Kuriyan y colaboradores, en el año 2000, elucidaron la estructura tridimensional del dominio TK-Abl unido a su inhibidor imatinib. Ellos demostraron que el inhibidor es específico para Abl, ya que se une a la conformación inactiva “DFG out” de dicho dominio, la cual es diferente a la de otras tirosina quinazas de la familia Src que guardan homología con Abl (40% de similitud). En dicha conformación, se favorecen una serie de redes de puentes de hidrógeno, algunos de los cuales le confieren especificidad. Entre ellos se observa el puente formado por la Met<sup>318</sup>. Este último residuo está involucrado directamente con el reconocimiento del nitrógeno N1 del ATP. Así mismo, la interacción entre los residuos Lys<sup>271</sup> y Glu<sup>286</sup> se presenta en la mayoría de las quinazas activas y se rompe al inactivarse; sin embargo, en el estado inactivo de Abl, esta interacción se conserva, y forma parte de una red de puentes de hidrógeno que incluye dos moléculas de agua y al Asp<sup>381</sup>, el cual está involucrado en la interacción con el ion Mg<sup>2+</sup> en el sitio activo. Por otro lado, se observan numerosas interacciones de van der Waals entre los residuos Tyr<sup>253</sup>, Leu<sup>370</sup>, Phe<sup>382</sup>, Met<sup>290</sup> y Ile<sup>313</sup> y los anillos aromáticos del inhibidor, que dan como resultado una notoria complementariedad (Figura 9; Kuriyan *et al.* 2000).



**Figura 8.** Modelo general del modo de acción del Imatinib (STI571), actuando directamente en el sitio de unión de ATP (Goldman y Melo, 2001).



**Figura 9.** Dibujo esquemático de las interacciones entre TK-Abl y su inhibidor imatinib. Los residuos que forman interacciones de van der Waals son señalados por los semicírculos con pestañas, los elementos participantes en puentes de hidrógeno están representados en diagramas de esferas y barras. Los puentes de hidrógeno están dibujados con líneas discontinuas, la distancia entre donador y aceptor está dada en Å.

Si bien el imatinib ha resultado un agente eficaz en el tratamiento de LMC, una fracción importante de pacientes termina por desarrollar resistencia al fármaco y, por consiguiente, acusan una recaída clínica. A nivel molecular, se han identificado varios de los mecanismos de resistencia a imatinib. De todos estos, el más frecuente es la generación de mutaciones puntuales en el dominio quinasa de Bcr-Abl, que impide la unión del imatinib al sitio TK de Abl (Capdeville *et al.*, 2002). Los pacientes que debido al desarrollo de resistencia al fármaco (18%), no alcanzan la remisión de la enfermedad al ser tratados con imatinib, presentan mutaciones puntuales en al menos uno de 13 aminoácidos que están distribuidos a través del dominio quinasa de la Abl (posiciones 250, 252, 253, 255, 289, 315, 317, 351, 396 y 486), además de otros cambios que se distribuyen por fuera del dominio quinasa (Shah *et al.*, 2002).

Si bien estas mutaciones son encontradas en células Bcr-Abl resistentes a imatinib, no confieren ventaja proliferativa en ausencia del fármaco. Esta última observación aunada al corto tiempo requerido para la emergencia a la resistencia sugiere que las mutaciones ya estaban presentes antes del inicio del tratamiento y fueron seleccionadas debido a la especificidad ejercida por el fármaco.

### **1.7 Planteamiento del problema**

El presente proyecto forma parte de un estudio global que hemos iniciado recientemente en nuestro grupo de trabajo, tendiente a entender con mayor profundidad el funcionamiento de la quinasa Abl, como paso previo para la búsqueda de nuevas estrategias para lograr una inhibición más efectiva de Bcr-Abl. A pesar de la vasta información estructural existente a la fecha, la energética del proceso de unión de TK-Abl con imatinib y otros inhibidores no ha sido descrita. Así mismo, en una exhaustiva revisión de la literatura, no encontramos estudios que describan con detalle la termodinámica del reconocimiento de nucleótidos de adenosina. Establecer la correlación entre las propiedades estructurales y energéticas involucradas en el proceso de reconocimiento molecular por parte de TK-Abl, nos permitirá conocer con más detalle las bases del funcionamiento de esta enzima. En este trabajo, realizamos una caracterización de la interacción de Abl con imatinib y con nucleótidos de adenosina mediante calorimetría de titulación isotérmica de alta resolución. Esta información nos ha permitido desvelar algunos aspectos de las fuerzas involucradas en el reconocimiento de estas moléculas que compiten por el mismo sitio de unión en la proteína.

Por otro lado, muy poco se conoce aún sobre la estabilidad estructural de TK-Abl, y sobre la variación de ésta con respecto a cambios en las condiciones ambientales. Por tanto, decidimos realizar experimentos de perturbación térmica en función del pH.

## **II. HIPOTESIS**

El oncogén Bcr-Abl es causante de la leucemia mielógena crónica, debido a que expresa una proteína de fusión con actividad tirosina quinasa desregulada. Dicha actividad surge de la pérdida de interacciones fundamentales entre el dominio TK y los otros dominios que conforman a Abl no mutante. Por tanto, conocer en detalle la estabilidad estructural y las propiedades energéticas de unión del dominio TK aislado, incrementará nuestra comprensión sobre las bases que gobiernan la actividad desregulada de Bcr-Abl.

### **III. OBJETIVO PRINCIPAL**

Caracterizar la estabilidad estructural, así como la afinidad de interacción de TK-Abl con nucleótidos de adenosina y con el inhibidor competitivo imatinib.

#### **3.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Expresar y purificar el dominio TK-Abl en estado inactivo.
2. Caracterizar la estabilidad termodinámica y el mecanismo de desplegamiento térmico del dominio TK-Abl mediante dicroísmo circular en función del pH.
3. Evaluar los cambios en la estructura secundaria y terciaria del dominio TK-Abl al unir nucleótidos de adenosina mediante dicroísmo circular y fluorescencia.
4. Determinar mediante calorimetría de titulación isotérmica el mecanismo y parámetros de interacción (entalpía, entropía, energía libre de Gibbs, constante de afinidad), del dominio con nucleótidos de adenosina e imatinib.

## IV. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 Sobre-expresión del dominio TK-Abl

Los vectores para la expresión del dominio TK nos fueron proporcionados por el Dr. John Kuriyan, de la Universidad de Berkeley. La secuencia codificante de la quinasa está clonada en el vector pET28a (Novagen) entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*, obteniendo un transcrito como el esquematizado en la Figura 10. Esta construcción fue cotransformada en células *E. coli* BL21DE3 (Novagen) con el gen de la fosfatasa YopH clonada en el vector pCDFDuet entre los sitios de restricción *NcoI* y *AvrII*.



**Figura 10.** Esquema general del transcrito del dominio TK-Abl en pET28a. En rojo se muestra la región de la etiqueta hexahistidina, en anaranjado el sitio de corte para TEV y en azul el inserto de la secuencia codificante para el dominio catalítico de Abl.

Una colonia de cepa BL21DE3 cotransformada con plásmidos pET28-a (dominio TK-Abl) y pCDFDuet (YopH) creció a 37 °C toda la noche en medio Luria Bertani (LB) suplementado con estreptomicina y kanamicina (100 µg/mL). Este cultivo se diluyó 1:100 en medio LB fresco con estreptomicina y kanamicina, y se dejó en agitación continua a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm de 1.2. Posteriormente, se hizo la inducción de la expresión de la proteína con IPTG 0.5 mM y se disminuyó la temperatura del cultivo a 18 °C. El paquete celular se obtuvo por centrifugación (10 min a 5,500 rpm, 4 °C) y se lisó en presencia de PMSF 0.01 µM por sonicación (Misonix 3000) con amortiguador de lisis 50 mM Tris-HCl pH: 8.2, 500 mM NaCl, 5% glicerol. La fracción soluble se separó de la insoluble por centrifugación (45 min a 14,500 rpm, 4 °C). La presencia de la proteína recombinante se siguió mediante geles de SDS-PAGE tanto en la fracción insoluble como en la soluble.



#### **4.1.1 Purificación del dominio TK-Abl**

El sobrenadante fue filtrado en una membrana 0.22  $\mu\text{m}$  y aplicado a una columna de afinidad a níquel (HisTrap FF, GE Lifescience) a un flujo de 1 mL/min previamente equilibrada con amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 100mM NaCl, 5% glicerol, 50 mM de imidazol. La columna fue lavada con 5 volúmenes del amortiguador de equilibrado, y luego fue eluida con 3 volúmenes de columna de amortiguador de elución 50 mM Tris pH 8.2, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 0.5 M Imidazol. Las fracciones fueron analizadas en un gel de SDS-PAGE.

#### **4.1.2 Corte con la proteasa TEV**

La fracción de elución que contiene a la quinasa fue almacenada y cortada con 1 mg de proteasa TEV por cada 25 mg de quinasa a 4 °C por 16 horas para remover el segmento de hexahistidina. Al término de la incubación, la muestra se filtró en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se volvió a realizar otra purificación por columna de afinidad a níquel para que en este paso se retenga la TEV (que también contiene la hexahistidina) así como el producto resultante del corte, que contiene a la etiqueta, por lo que el dominio TK-Abl se recuperó en la fracción no retenida. El rendimiento fue de aproximadamente 75% en la efectividad del corte. El dominio TK-Abl fue dializado en 20 volúmenes de amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8.2, 100 mM NaCl, 5% de glicerol, empleando una membrana de 13 kDa.

#### **4.1.3 Purificación por columna de intercambio catiónico**

Una vez realizado el corte con TEV, la proteína fue purificada por cromatografía de intercambio aniónico para remover la fosfatasa y la TEV remanente en la muestra. La proteína dializada y cortada fue cargada en una columna de intercambio catiónico (HiTrap Q FF, GE Lifescience), equilibrada con 20 mM Tris-HCl, pH 8.2, 20 mM NaCl, 5% glicerol (Amortiguador QA).

La proteína fue eluida en un gradiente lineal de 0 a 100% de amortiguador QB (Amortiguador QA más 1M NaCl), obteniendo la elución del dominio TK-Abl al 55% del gradiente segmentado de cloruro de sodio (NaCl).

La proteína obtenida fue concentrada a 1 mg/mL y conservada a -70 °C. La concentración de la misma fue determinada espectrofotométricamente a 280 nm, usando un coeficiente de extinción de  $60\ 550\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Mediante este protocolo, logramos obtener entre 7 y 10 mg de proteína pura por litro de cultivo de bacteria.

#### **4.2 Fluorescencia de unión a ADP e Imatinib**

La fluorescencia es una categoría de luminiscencia que ocurre en un importante número de moléculas aromáticas y experimentalmente se suele registrar mediante los espectros de emisión obtenidos en una zona del espectro de menor longitud de onda con respecto a la onda de excitación. Este espectro de emisión es una gráfica de la intensidad de luz fluorescente en función de la longitud de onda de la luz emitida. La energía puede dispersarse mediante colisiones inter e intramoleculares, fenómeno que causa un apagamiento de la emisión fluorescente (disminución del rendimiento cuántico). Las moléculas que causan este fenómeno son denominadas apagadores, ya que ocasionan el regreso del fluoróforo al estado energético basal de manera no radiativa. A partir de este fenómeno de apagamiento se puede obtener información sobre ciertos procesos moleculares en la solución, así como sobre el ambiente químico promedio adyacente al fluoróforo.

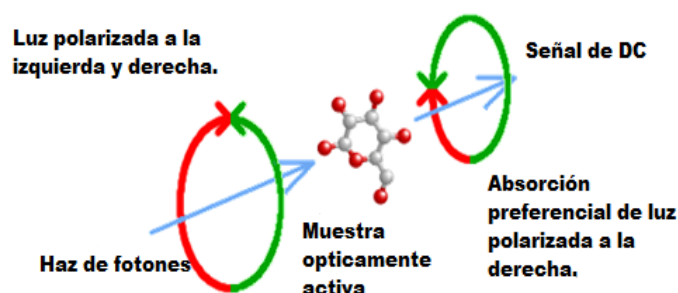
Los fluoróforos se pueden dividir en 2 clases generales: intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos son aquellos que se presentan naturalmente, como el grupo indol del triptófano, fenol de la tirosina y benceno de la fenilalanina. En el caso de los extrínsecos, son los que se agregan a la muestra que no muestra propiedades de fluoróforo, como son los colorantes de DNA (acridina y bromuro de etidio); o ANS (8-anilino-1-naftalensulfonato), TNS (2-p-toluidinil-6-naftaleno de ácido sulfónico) en estudios de proteínas.

### 4.2.1 Protocolo experimental

Con la finalidad de observar si ocurría unión entre la proteína y los ligandos, en el presente proyecto realizamos ensayos de titulación fluorimétrica. La concentración de proteína TK-Abl fue de 5.75  $\mu\text{M}$ , usando soluciones stock ya sea de ADP (10 mM) + 5 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , o de imatinib (6 mM). La proteína fue titulada secuencialmente añadiendo alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de MgADP o 2  $\mu\text{L}$  de imatinib en experimentos separados, hasta que la señal no cambiara significativamente. La fluorescencia de emisión fue monitoreada en el intervalo de 300 a 460 nm, mientras que la excitación se realizó a 280 nm. Las mediciones se realizaron en un equipo OLIS DM45, usando celdas de cuarzo con 1 cm de trayectoria óptica.

### 4.3 Dicroísmo circular, predicción de estructura secundaria y determinación de la estabilidad

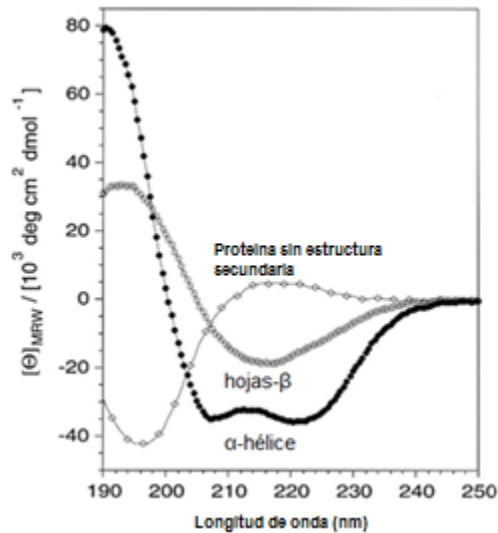
La teoría de dicroísmo circular (DC) fue desarrollada por Biot y Fresnel (Neumann y Snatzke, 1990). Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfaseamiento y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz y estos fenómenos provocan que la luz emitida se desplace en trayectoria elíptica (Correa D., 2009; Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de los componentes de un haz de luz plano-polarizado. Se representan los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. Esos mismos vectores después de interactuar con la muestra ópticamente activa.

El dicroísmo circular es una de las técnicas que permite determinar la estructura secundaria de proteínas y monitorear cambios en dicha estructura. Es el puente de unión entre la secuencia (estructura primaria) y las técnicas cristalográficas o RMN (estructura terciaria). El cromóforo en el UV lejano (180 a 250 nm) es el enlace peptídico. El DC en el UV lejano permite obtener medidas empíricas de la estructura de la proteína y su conformación. Se puede diferenciar el contenido relativo de hélices  $\alpha$ , hebras  $\beta$  y giros en la estructura. Las amidas como cromóforo tienen dos transiciones de baja energía que han sido caracterizadas como  $n \rightarrow \pi^*$  y  $n_0 \rightarrow \pi^*$ , que muestran dicroísmo circular a 215-230 nm y 185- 200 nm, respectivamente. La transición  $n \rightarrow \pi^*$  es causante de las bandas negativas observada una a 222 nm, características de las hélices  $\alpha$  y otra entre 216-218 nm, característica de hebras- $\beta$ . La transición  $n_0 \rightarrow \pi^*$  es responsable de la banda positiva a 190 nm y de la banda negativa a 208 nm, característica de hélices  $\alpha$ ; así mismo, incluye la banda positiva a 198 nm, característica de hebras  $\beta$ .

La Figura 12 muestra los espectros en el UV lejano característicos para proteínas con estructura dominada por hélices  $\alpha$ , de hebras  $\beta$  o carentes de estructura secundaria. En un ensayo de DC, una señal negativa significa que se absorbe preferentemente luz polarizada a la izquierda y una señal positiva que se absorbe preferentemente luz polarizada a la derecha. El espectro para una proteína con estructura predominante de hélices  $\alpha$  tiene dos bandas negativas de magnitud similar a 222 y 208 nm, y una banda positiva a 190 nm (Figura 12). El espectro para una proteína en donde las hebras  $\beta$  son predominantes presenta una banda negativa entre 210-220 nm y una banda positiva entre 195-200 nm (Figura 12). El espectro para una proteína sin estructura secundaria repetitiva presenta una banda negativa predominante a 200 nm (Kelly S., 2000; Figura 12).



**Figura 12.** Espectro de UV-lejano en DC característico de proteínas con estructura predominante de  $\alpha$ -hélice, de hoja- $\beta$  o una proteína sin estructura secundaria.

El dicroísmo es una potente técnica para esclarecer los mecanismos de desplegamiento y estabilidad de las proteínas. Bajo un modelo simple de dos estados, la estabilidad de cada parte de la estructura es dependiente de las otras partes, por lo que las estructuras parcialmente son inestables con respecto a las estructuras nativas y completamente desplegadas; así que la reacción en la presencia de agente desnaturizante o elevadas temperaturas, puede describirse por la ecuación:



Para una transición de dos estados la constante de equilibrio está expresada como:

$$K_D = [D] / [N] \quad (\text{ec 4.2})$$

La fracción de especies desnaturizadas se puede medir con técnicas biofísicas o espectroscópicas, y se define al parámetro "y" observable que es utilizado para seguir la desnaturización. El valor de ese parámetro debe modificarse con los cambios en la conformación molecular, y de esa manera es posible medir indirectamente la transición; las muestras en estado nativo así como en estado desplegado deben poseer sus propios valores del parámetro observable "y", siendo  $y_N$  y  $y_D$ , respectivamente. Estos valores dependen de la concentración de agente desnaturizante (temperatura en este caso), lo que hace necesaria su extrapolación lineal a cualquier punto de la transición.

Así mismo, se definen  $f_N$  y  $f_D$ , como las fracciones de proteína nativa y desnaturizada respectivamente, de acuerdo a un simple balance de masa se tiene:

$$f_N + f_D = 1 \quad (\text{ec 4.3})$$

y de igual forma:

$$y = y_N f_N + y_D f_D \quad (\text{ec 4.4})$$

de las ecuaciones anteriores, puede obtenerse el valor  $f_D$ :

$$f_D = (y - y_N) / (y_D - y_N) \quad (\text{ec 4.5})$$

Esto implica que en cualquier punto de la transición es posible conocer la fracción de proteína desnaturizada a partir del valor del parámetro "y", y de la extrapolación lineal de los valores de  $y_N$  y  $y_D$ . Así mismo, pueden calcularse la constante de equilibrio  $K_D$  y el cambio de energía libre del proceso ( $\Delta G$ ).

$$K_D = [D] / [N] = f_D / f_N = f_D / (1 - f_D) \quad (\text{ec 4.6})$$

$$K_D = \exp(\Delta G / RT) \quad (\text{ec 4.7})$$

Sustituyendo 4.3, 4.4 y 4.5 en la ecuación 4.6, se obtiene:

$$K_D = (y_N - y) / (y - y_D) \quad (\text{ec 4.8})$$

Los estudios del desplegamiento térmico son importantes porque a través de ellos es posible obtener los parámetros termodinámicos de la transición. Utilizando la ecuación de van't Hoff ( $\ln K_D$  contra  $1/T$ ) se puede conocer el cambio de entalpía del proceso de desplegamiento, sabiendo que la pendiente de dicha curva es:

$$d \ln K_D / d(1/T) = -\Delta H / R \quad (\text{ec 4.9})$$

Si este último valor es evaluado a la temperatura que corresponde a la mitad de la transición ( $T_m$ ), en la que el valor de  $K_D = f_D / f_N = 1$  y por lo tanto el valor del cambio de energía libre es cero, es posible estimar el cambio de la entropía durante la reacción de desplegamiento:

$$\Delta S_m = \Delta H_m / T_m \quad (\text{ec 4.10})$$

El cambio de la capacidad calorífica del proceso  $\Delta C_p$  está dado por la derivada parcial de  $\Delta H$  con respecto de la temperatura:

$$d\Delta H / dT = \Delta C_p \quad (\text{ec 4.11})$$

### 4.3.1. Protocolo Experimental

Los ensayos de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-750 acoplado a un sistema Peltier, con celdas de cuarzo con una trayectoria óptica de 0.1 cm. Las mediciones se realizaron en función del pH, tal como se detalla en la Tabla 1.

Buffer	pH
25 mM Tris-HCl	8.2
25 mM Tris-HCl	7.2
10 mM Cacodilatos	6.5
10 mM Acetatos	4.5
10 mM Citratos	3.5

**Tabla 1.** Buffers empleados en los experimentos de Dicroísmo Circular para cada una de las pruebas en función del pH indicado.

Las transiciones de la desnaturalización/renaturalización térmica se siguieron midiendo el cambio en la señal en la elipticidad a 208 nm en un intervalo de temperatura entre los 20 y 80 °C. La velocidad de calentamiento/enfriamiento fue de 1 °C por minuto. Las concentraciones de proteína estuvieron en el intervalo de concentración de 0.12 -0.20 mg/mL para los experimentos en función del pH, y de 0.39 mg/mL con 0.6 mM de ATP y 5 mM Mg<sup>2+</sup> para el experimento es presencia del nucleótido. El espectro fue medido en el UV-lejano en un intervalo de longitud de onda de 250 a 190 nm.

## **4.4. Calorimetría de Titulación Isotérmica. Unión de ATP e Imatinib**

### **4.4.1 Calorimetría de Titulación Isotérmica**

El proceso de reconocimiento y unión que se lleva a cabo entre la proteína y su ligando, su relación con la función biológica y su posible aplicación en la ingeniería de proteínas han generado el interés de varios grupos de investigación. El entendimiento total de la interacción proteína-ligando requiere de la resolución de las propiedades biofísicas de ambos, así como el conocimiento conformacional y estructural a nivel atómico de la proteína, el ligando y el complejo. Con la finalidad de resolver este proceso, diversas técnicas se han utilizado de forma complementaria. Algunas se han basado en la determinación directa de las especies presentes en el sistema como la ultracentrifugación y diálisis, obteniéndose valores de estequiometría y constantes de unión. Otras permiten medir la señal proporcional al avance de la reacción. Dentro de este segundo grupo está la calorimetría, con la que se obtienen valores sobre cambios de entalpía y capacidad calorífica, con la finalidad de conocer la energía del proceso de interacción (Velázquez-Campoy y Freire, 2005).

A partir de las estructuras cristalográficas ha sido posible inferir la estructura de las proteínas aisladas en complejos con sus ligandos o con un análogo, tratando de conocer el mecanismo que llevan a cabo durante su funcionamiento y dilucidando los posibles residuos involucrados en el reconocimiento. Sin embargo, con la simple estructura no se pueden conocer las variables que influyen en el reconocimiento del ligando y son necesarias otras herramientas para poder entender el proceso a nivel microscópico. Como complemento, el estudio de cinética de reacciones y el efecto de las mutaciones sobre la velocidad de reacción han sido útiles para descifrar el posible mecanismo de unión de las proteínas.



Durante el reconocimiento molecular, las fuerzas de interacción que se pueden dar entre átomos o moléculas son de origen electrostático, incluso las que se llevan a cabo entre moléculas no polares. El cálculo de estas interacciones electrostáticas en las proteínas ha sido difícil por la heterogeneidad local en su estructura. Dentro de las fuerzas intermoleculares que contribuyen a la estabilización de los complejos están:

*Puentes de hidrógeno.* Ocurren cuando 2 átomos electronegativos compiten por el mismo átomo de hidrógeno que se encuentra unido covalentemente a uno de los átomos (donador). Su configuración óptima es lineal, teniendo pequeños cambios de energía por la inclinación. En general, la fuerza de los puentes de hidrógeno se encuentra dentro del rango de 2-10 kcal/mol (12-38 kJ/mol) a temperatura ambiente.

*Puentes salinos o enlace iónico.* Al formarse un ion, existe el reacomodo de los orbitales en el átomo. Así, los que quedan con el orbital de valencia lleno quedarán con electrones en exceso (carga negativa) y los que queden con un orbital vacío tendrán una deficiencia electrónica (carga positiva). Dos átomos con esta característica pueden unirse por la acción electrostática de sus cargas formales, creando un enlace iónico.

*Interacciones de van der Waals.* Son débiles y de corto alcance, existiendo una distancia interatómica donde se alcanza la interacción más favorable. Pueden ser de 2 tipos: entre un dipolo inducido y un dipolo permanente, y entre dipolos inducidos. Este tipo de interacciones a menudo son representadas por la energía potencial ( $E_p$ ) en función de la distancia e incluyen las fuerzas atractivas ( $1/r^6$ ) y repulsivas ( $1/r^{12}$ ) en un campo cerrado (potencial de Lennard-Jones), donde  $r$  es la distancia entre los centros de los átomos.

*Unión hidrofóbica o efecto hidrofóbico.* Es una forma de describir la tendencia de transferencia de componentes no polares de una solución acuosa a una fase orgánica. Por lo general no se produce un gran cambio en la entalpía del sistema, pero sí un aumento de la entropía debido a la liberación de moléculas de agua solvatantes. La energía de este tipo de interacciones es proporcional

al área que se oculta al solvente, y es una contribución importante en la estabilidad de las proteínas (Fersht, 1999).

Es importante reconocer que la dependencia del proceso de las interacciones moleculares dentro de la proteína, entre proteína-solvente y proteína-ligando, hacen necesaria una caracterización energética lo más detallada posible, para poder entender las fuerzas moleculares que actúan en el reconocimiento.

El análisis para descifrar las interacciones proteína-ligando desde un enfoque energético del proceso coloca a la calorimetría como método para entender las fuerzas moleculares que actúan en el reconocimiento de manera global, dividiendo la energía de asociación ( $\Delta G$ ) en sus componentes entálpico y entrópico. La energía del equilibrio proteína-ligando puede ser típicamente caracterizada por 4 parámetros termodinámicos: energía libre estándar  $\Delta G^\circ$ , entalpía molar estándar  $\Delta H^\circ$ , entropía molar estándar  $\Delta S^\circ$  y la capacidad calorífica molar estándar  $\Delta C_p^\circ$ .

Calorimétricamente, la constante de equilibrio,  $K_a$ , y la entalpía de unión,  $\Delta H_a$ , se pueden obtener directamente del experimento. Una vez determinados, es posible calcular tanto la energía libre de asociación ( $\Delta G_a$ ) como el cambio de entropía,  $\Delta S_a$ , de acuerdo con:

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad (\text{ec. 4.12})$$

Donde R es la constante de los gases (1.9872cal/K mol) y T es la temperatura absoluta (Kelvin).

En la formación de complejos proteicos, la determinación de estos parámetros no está solo dirigido a incrementar el conocimiento de los factores subyacentes que contribuyen a la relación estructura-estabilidad-función, a la vez, el propósito es generar valoraciones cuantitativas de las interacciones con la suficiente precisión como para generar un marco apropiado para el diseño de fármacos e ingeniería de proteínas (Ladbury JE., 2010).

Para poder comprender mejor la caracterización termodinámica hay que tener en claro el significado de cada uno de los parámetros termodinámicos presentes en la ecuación 4.12.

**Entalpía ( $\Delta H$ ).** El parámetro termodinámico  $\Delta H$  representa el flujo de calor en cambios químicos que se efectúan a presión (P) constante. A P constante el  $\Delta H$  es igual al calor ( $q$ ) que involucra el sistema por lo que se cumple  $\Delta H = q_p$ , lo que indica que el  $\Delta H$  es igual al calor ganado o perdido a presión constante. Por lo tanto, si  $\Delta H$  es positivo ( $q_p > 0$ ) el sistema habrá absorbido calor, por lo que el proceso es endotérmico y se considera entálpicamente desfavorable. Por el contrario, si  $\Delta H$  es negativo ( $q_p < 0$ ) el sistema habrá liberado calor, por lo que el proceso es exotérmico y se considera entálpicamente favorable. En las reacciones de reconocimiento molecular que se llevan a cabo en un medio acuoso el  $\Delta H$  es aproximadamente igual al cambio en la energía interna de los solutos y del solvente. El  $\Delta H$  favorable resulta de cambios en formación de interacciones electrostáticas ( $\Delta H_{elec}$ ) y contactos de van der Waals ( $\Delta H_{vdW}$ ) entre las moléculas interactuantes, que conforman el  $\Delta H$  intrínseco de la proteína. El  $\Delta H$  desfavorable se relaciona con la desolvatación de grupos polares y no polares ( $\Delta H_{solvatación}$ ). El cambio en la entalpía en el proceso de asociación ( $\Delta H_a$ ) se puede expresar como:

$$\Delta H_a = \Delta H_{intrínseco} + \Delta H_{desolvatación} \quad (\text{ec. 4.13})$$

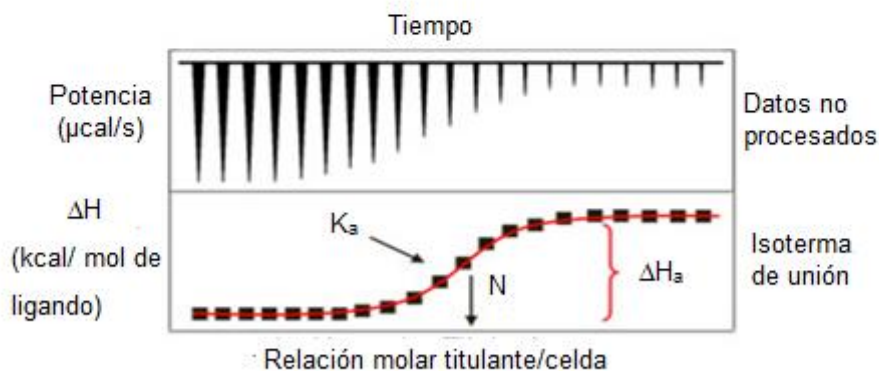
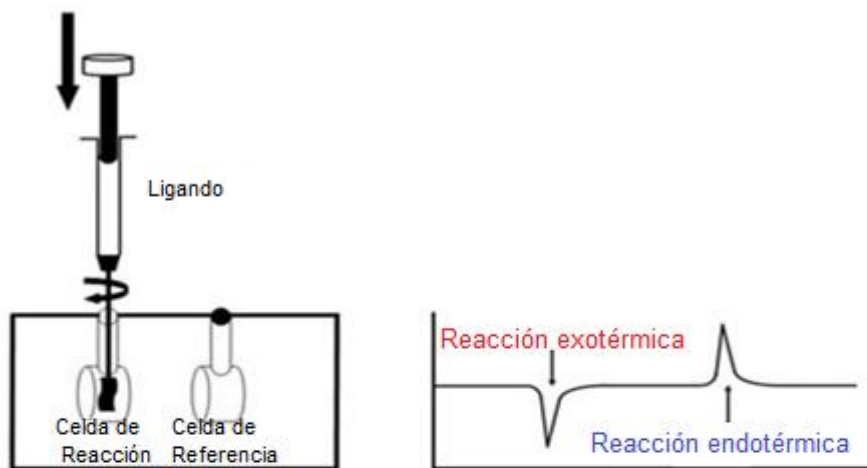
**Entropía ( $\Delta S$ ).** Las principales contribuciones a la entropía son el cambio tanto en la entropía de solvatación ( $\Delta S_{solv}$ ), conformacional ( $\Delta S_{conf}$ ) y roto-traslacional ( $\Delta S_{rot-tras}$ ). El primero de ellos es favorable para la unión y se origina de la liberación de las moléculas de agua que se encuentran solvatando de forma parcial o completa del sitio de unión y el ligando. Este efecto es la fuerza predominante en la asociación de grupos hidrofóbicos. El ( $\Delta S_{conf}$ ) es casi siempre desfavorable ya que el proceso de unión involucra la pérdida de grados de libertad conformacional de la proteína y el ligando. El ( $\Delta S_{rot-tras}$ ) está asociado a la reducción del número de partículas en el medio que se lleva a cabo después de la unión, es desfavorable por que existe una pérdida en los

grados de libertad de rotación y traslación en las moléculas. El cambio en la entropía del proceso de asociación ( $\Delta S_a$ ) se puede expresar como:

$$\Delta S_a = \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{rot-tras}} \quad (\text{ec. 4.14})$$

*Energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ).* La energía libre de Gibbs o energía libre es el término termodinámico que se caracteriza por dar la condición de equilibrio y de espontaneidad de una reacción a P y T constantes. Dependiendo del valor y del signo de  $\Delta G$  a T y P constantes, se puede establecer si un proceso es espontáneo ( $\Delta G < 0$ , favorable) o no ( $\Delta G > 0$ , desfavorable), o bien si se encuentra en equilibrio ( $\Delta G = 0$ ). De acuerdo a la ecuación 4.12.

El calorímetro de titulación isotérmica (CTI) es un dispositivo compuesto de dos celdas idénticas, rodeadas por una cubierta adiabática y en el que sensores detectan la diferencia de temperatura entre las dos celdas y entre éstas y la chaqueta. Para realizar un experimento, la muestra es colocada en la celda de muestra, y la celda de referencia es llenada con el amortiguador o agua. Antes de comenzar la titulación una potencia constante es aplicada a la celda de referencia. Esta señal activa el circuito de alimentación localizado en la celda de muestra y representa la línea base (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema básico del funcionamiento de un calorímetro de titulación isotérmica en donde se ejemplifican los tipos de isótermas esperadas y la cantidad de datos que obtenemos a través del uso del mismo gráfico.

Experimentalmente, se observa directamente la diferencia de potencia aplicada para mantener la temperatura de las dos celdas idéntica con respecto al tiempo. En el experimento de titulación, después de cada adición de una pequeña alícuota de ligando, el calor liberado o absorbido en la celda de muestra es medido con respecto a la celda de referencia. Durante la secuencia de inyecciones, el intercambio de calor de la celda de muestra dependerá del tipo de reacción, es decir, si es exotérmica o endotérmica (Velázquez-Campoy, 2004). Para una reacción exotérmica, la temperatura de la celda de muestra se incrementa y el poder de alimentación es desactivado para mantener la temperatura entre las dos celdas igual. En una reacción endotérmica la temperatura de la celda disminuye, incrementándose el poder de alimentación.

Para cada inyección, es posible obtener el calor asociado a la reacción integrando el área bajo cada pico de la señal medida, que es proporcional a la fracción de ligando unido, y se puede representar con la ecuación 4.15 para el caso de un modelo de un solo tipo de sitios independientes. El análisis de este calor de reacción en función de la concentración, provee de una caracterización termodinámica completa, determinándose la constante de asociación  $K_a$ , la entalpía de unión  $\Delta H_a$  y la estequiometría  $n$  en un solo experimento (Velázquez-Campoy y Freire, 2005).

$$Q = V_0 \cdot \Delta H_a \cdot [L] + \left[ \frac{1 + [M]_t \cdot K_a \cdot n - \sqrt{(1 + [M]_t \cdot K_a \cdot n - [L])^2 - 4K_a L}}{2K_a} \right] \text{ (ec. 4.15)}$$

donde  $V_0$  es el volumen de la celda,  $[M]_t$  es la concentración total de la molécula (incluyendo las fracciones libres y en el complejo), y  $[L]$  es la concentración de ligando libre (Murphy y Freire, 1992).

#### **4.4.2. Protocolo experimental**

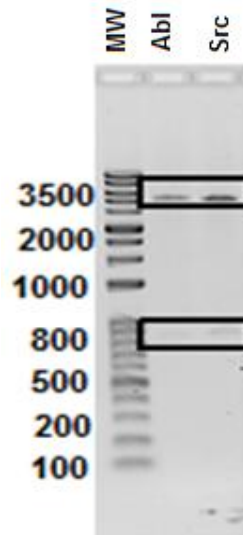
Las fracciones ricas en el dominio catalítico TK-Abl fueron dializadas en amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 300 mM NaCl, 5% glicerol, y posteriormente concentradas en Amicon (Millipore) con membrana de 14,000 daltones de corte. Para las determinaciones calorimétricas la concentración final de proteína estuvo en el intervalo de 14 a 34  $\mu$ M. Las soluciones de MgATP fueron preparadas utilizando el amortiguador de diálisis, adicionado con 5 mM de  $MgCl_2$  para garantizar que el equilibrio químico esté desplazado hacia la presencia del complejo MgATP. La concentración fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar para ATP de 15,600  $M^{-1} cm^{-1}$  a 259 nm. La concentración de ATP estuvo entre 1.2 a 2.0 mM. La concentración de imatinib fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar de 43,400  $M^{-1} cm^{-1}$  a una longitud de onda de 417 nm.

## V. RESULTADOS

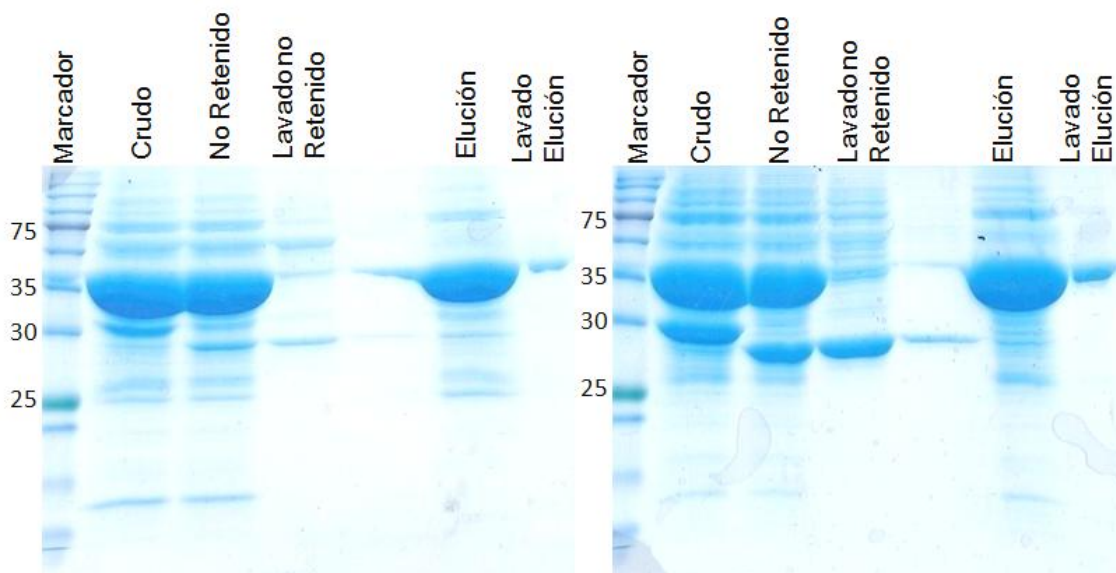
En el presente trabajo, se muestran datos obtenidos del dominio tirosina quinasa de Abl (TK-Abl) en su forma desfosforilada e inactiva. En la primera parte de esta sección se muestran los resultados obtenidos de la sobre-expresión y purificación de TK-Abl. Los datos sobre perturbación térmica en función del pH son presentados en la segunda parte. Para esclarecer si el comportamiento de estabilidad térmica observado en TK-Abl es compartido por otros miembros de la familia tirosina-quinasa, se caracterizó también el patrón de desplegamiento del dominio catalítico recombinante de la proteína Src en función del pH. En la tercera parte, se muestran los resultados obtenidos de las titulaciones seguidas por fluorescencia intrínseca. En la parte final, mostramos los resultados calorimétricos de la unión de TK-Abl a MgATP y al inhibidor imantinib.

### 5.1 Sobre-expresión y purificación de los dominios TK-Abl y TK-Src

Los plásmidos donados por el Dr. John Kuriyan que contienen los dominios catalíticos de Abl y Src, fueron primero digeridos para obtener los patrones de restricción correspondientes (Figura 14) y luego mandados a secuenciar. Ambas pruebas confirmaron la integridad de las construcciones. La expresión de ambos dominios se hizo en la cepa BL21 (DE3), genotipo:  $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3)$ , que contiene el lisógeno DE3 y es utilizada para expresar proteínas en una alta cantidad. Esta cepa posee una mutación no caracterizada que le confiere resistencia a la muerte celular asociada con la producción de ciertas proteínas recombinantes tóxicas (LaVallie *et. al.*, 1993). Usando la cepa BL21 (DE3), obtuvimos una buena producción de proteína soluble para ambas muestras (7 mg por litro de cultivo para Abl y 12 mg por litro para Src), La Figura 15 muestra el seguimiento por SDS-PAGE de la purificación progresiva de los dominios.



**Figura 14.** Mapa de restricción de los dominios tirosina-quinasa de Abl y Src en el vector de expresión pET28a (3552 pb). Cada uno de los insertos está formado por 846 pares de bases.



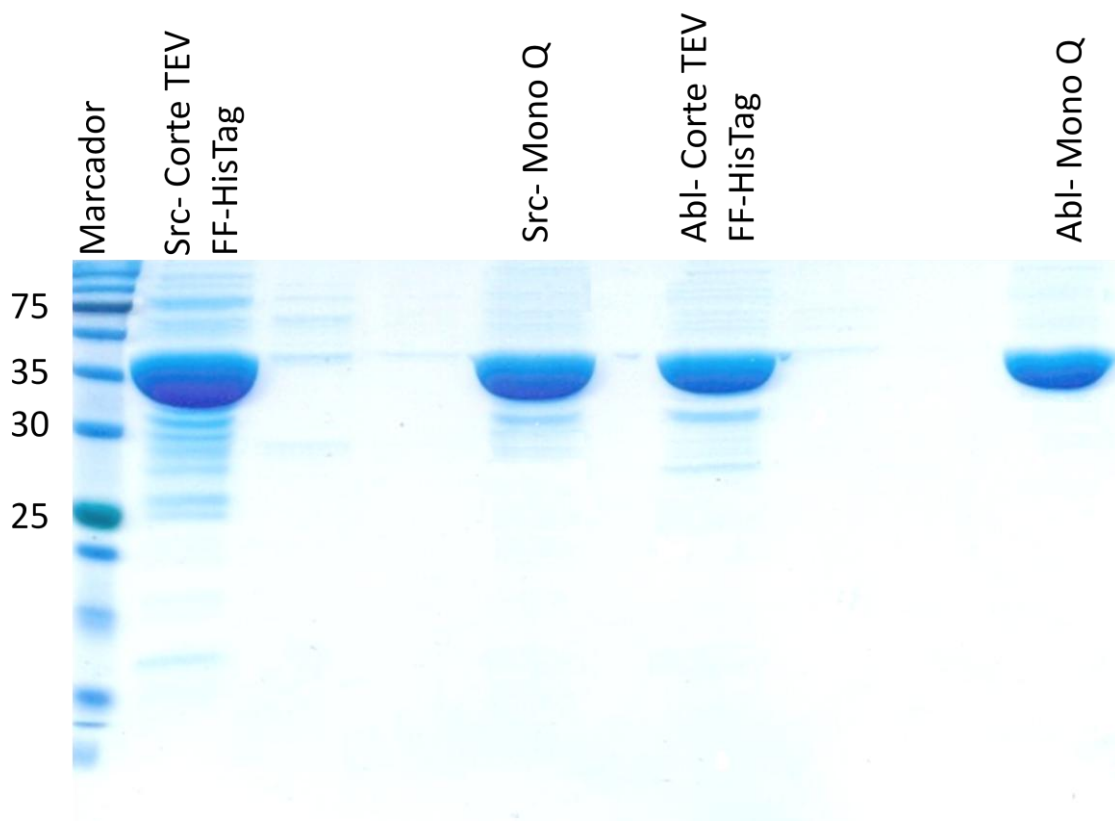
**Figura 15.** Monitoreo por SDS-PAGE de la purificación parcial del dominio TK-Abl (izquierda) y del dominio TK-Src (derecha) por medio de una columna de afinidad a níquel. Ambos dominios muestran un corrimiento electroforético consistente con la masa esperada de 32.8 kD.

El dominio TK-Abl fue sometido a una reacción de corte con la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV, por sus siglas en inglés), la cual reconoce un sitio específico de corte de 7 residuos Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly. En promedio, se obtuvo una eficiencia en la digestión proteolítica de aproximadamente 75%. La razón de esta eficiencia se debe en parte a que la actividad de esta proteasa es óptima a 30 °C; sin embargo, en el presente



estudio se realizó la reacción a 10 °C, ya que a temperaturas mayores de 25 °C, como se muestra más adelante, el dominio es inestable y tiende a agregarse.

Para remover los últimos residuos de TEV y otras proteínas que pudieran quedar en la muestra, se realizó un paso adicional de purificación en una columna de intercambio catiónico por cromatografía líquida de alta resolución, observando una fracción eluida en 550 mM de NaCl, correspondiente a nuestra proteína de estudio prácticamente pura (Figura 16).

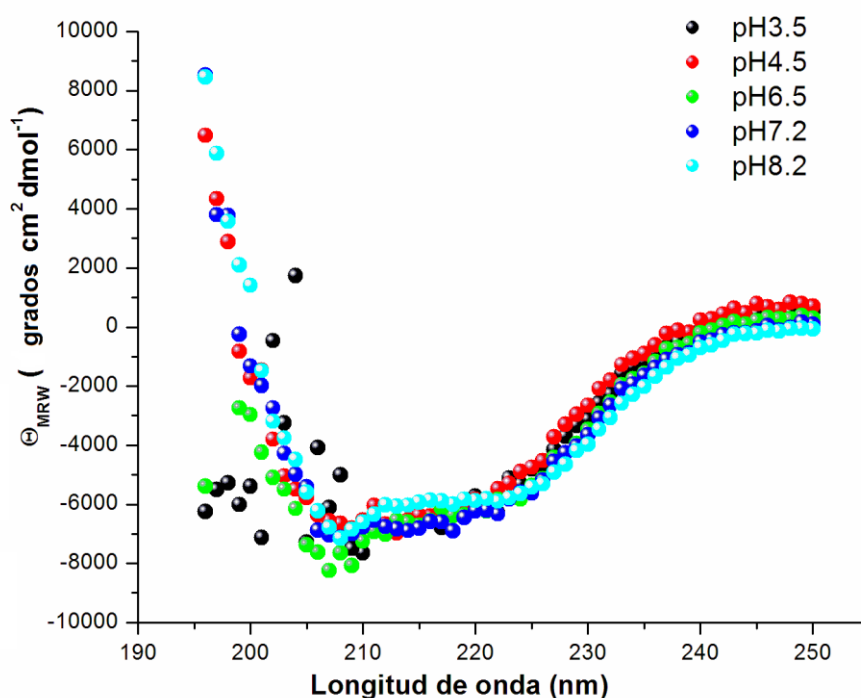


**Figura 16.** Purificación de los dominios TK-Abl y TK-Src después del corte con TEV, por medio de una columna de afinidad a níquel y subsecuente paso por una columna de intercambio catiónico.

## 5.2. Mediciones espectroscópicas

### 5.2.1. Dicroísmo circular

Establecer la estabilidad estructural del dominio TK en función del pH y la temperatura fue importante para determinar las condiciones en las cuales podríamos realizar los estudios de reconocimiento molecular, así como esclarecer el mecanismo de desplegamiento de esta proteína. La Figura 17 muestra espectros de DC en el UV-lejano del dominio TK-Abl a 20 °C en función del pH. Los espectros exhiben la forma típica de una proteína enriquecida con hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$ . La semejanza entre los espectros indica que la estructura secundaria del dominio se mantiene prácticamente invariante en el intervalo de pH analizado.

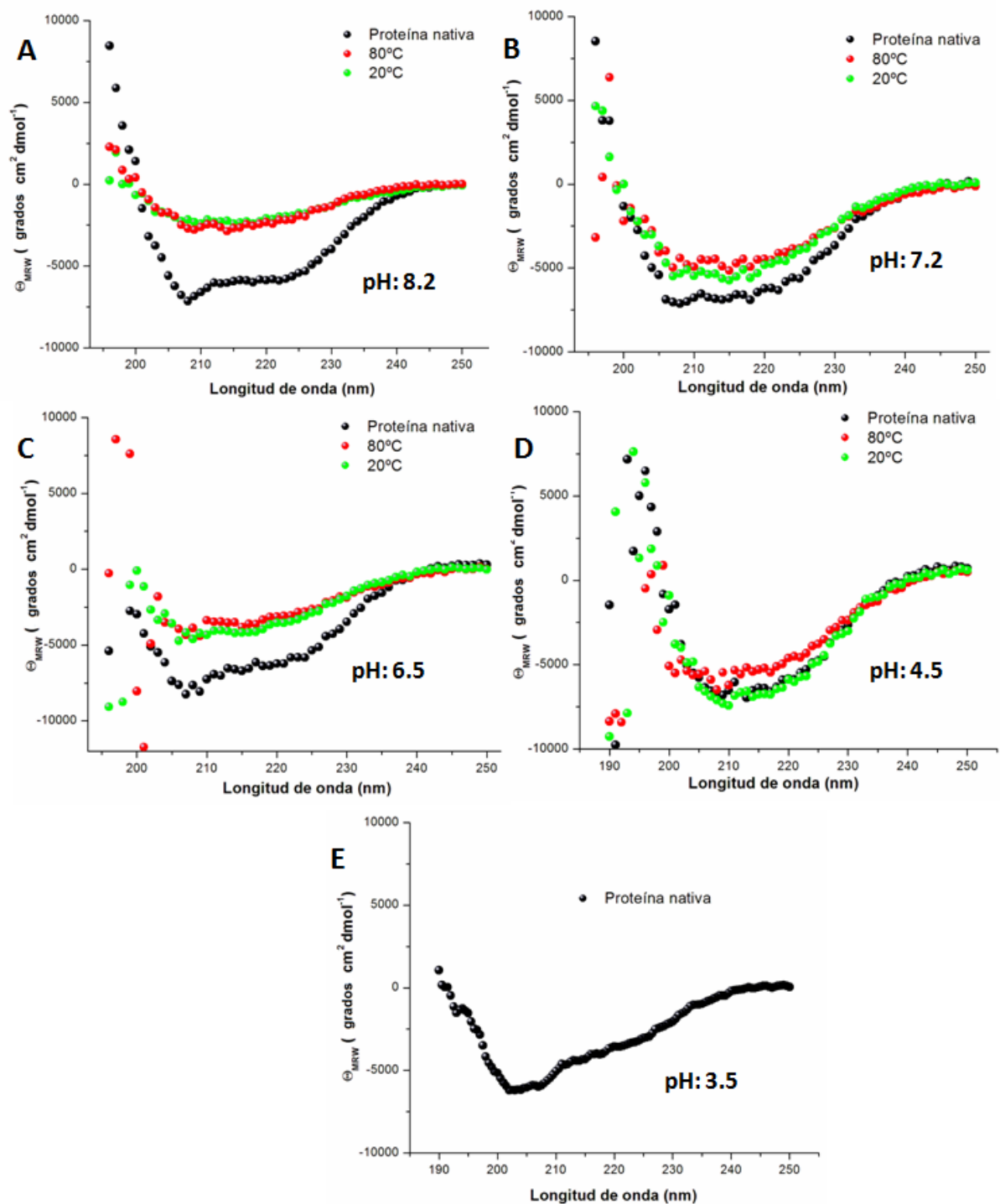


**Figura 17.** Espectros de DC en el ultravioleta lejano del dominio TK-Abl tomado a 20 °C en función del pH.

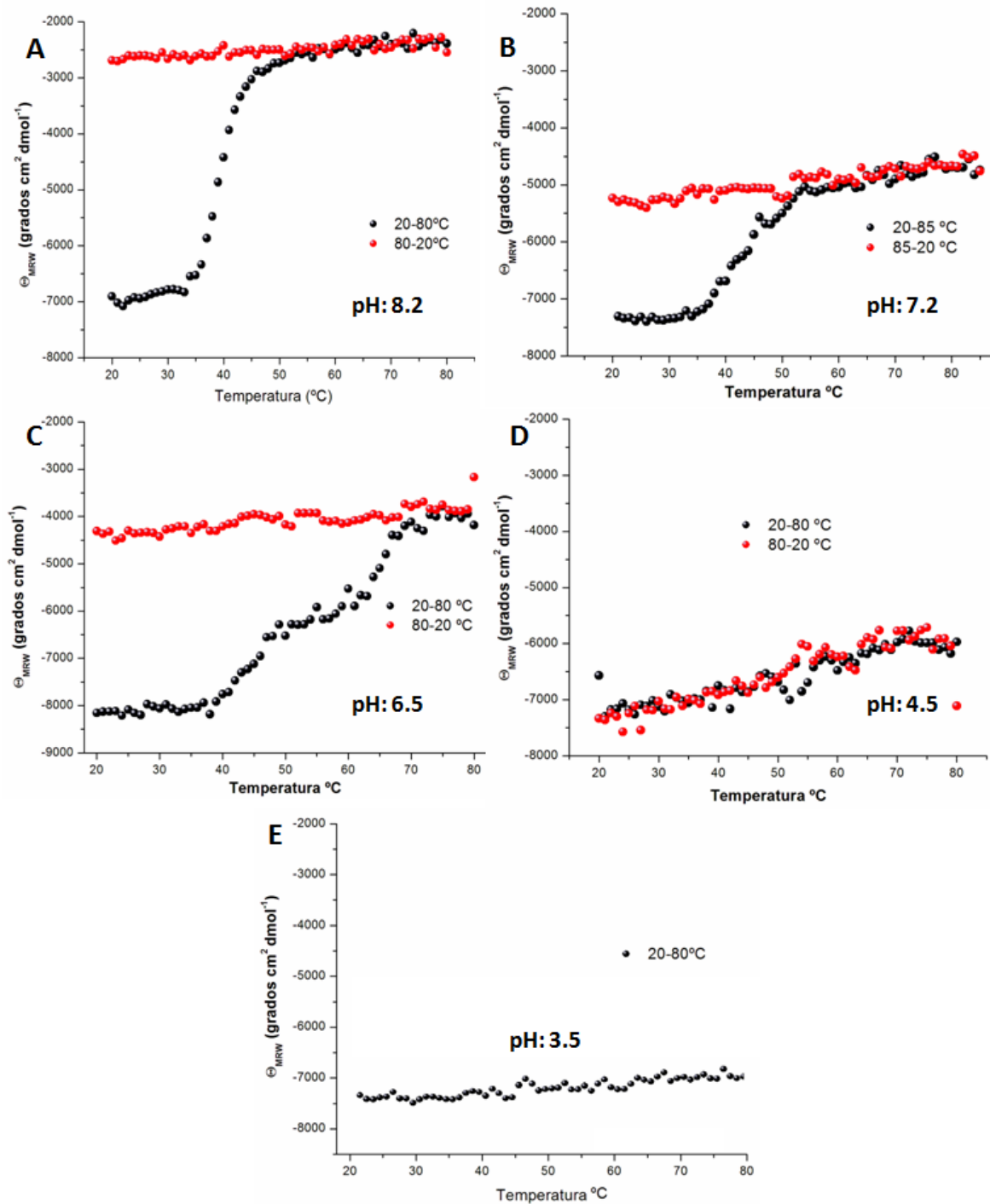
La Figura 18 muestra los espectros a los diferentes valores de pH, tomados a baja y alta temperatura, al haber sometido a la proteína a un ciclo de calentamiento/enfriamiento entre 20 y 80 °C. El espectro a 80 °C, pH 8.2 (símbolos rojos), muestra que la proteína sufrió un cambio conformacional por perturbación térmica considerable, aunque la señal positiva exhibida debajo de

200 nm de longitud de onda sugiere la conservación de una cantidad residual de estructura secundaria. Al ser enfriada la solución y tomarse nuevamente el espectro a 20 °C (símbolos verdes), se observó un espectro completamente superponible al de 80 °C. Por tanto, se concluye que bajo las condiciones de estudio, el proceso de desplegamiento térmico del dominio TK-Abl es irreversible. Conforme el pH se fue acidificando, la señal remanente de DC a 80 °C se fue incrementando. Por debajo del punto isoeléctrico del dominio ( $pI=5.7$ ), se observaron variaciones marginales de señal con respecto a la forma nativa, los cuales fueron completamente reversibles al regresar a temperatura ambiente.

La Figura 19 muestra los barridos de temperatura obtenidos a los diferentes valores de pH, seguidos a una longitud de onda fija de 208 nm y una velocidad de calentamiento de 1 °C/min (símbolos negros). Posteriormente, se realizó el barrido de enfriamiento hasta regresar a la temperatura original de 20 °C (símbolos rojos). A pH 8.2, el barrido mostró una transición aparentemente monofásica (Figura 19A). La pérdida de estructura secundaria a este pH comenzó alrededor de los 35 °C y finalizó alrededor de los 60 °C, indicando una baja estabilidad térmica del dominio. En el barrido de enfriamiento, se observa que el dominio no tiene la capacidad de replegarse en las condiciones de estudio. A pH 7.2, la estabilidad del dominio se incrementa con respecto a pH 8.2, con una variación en la temperatura media aparente de la transición ( $T_{m_{ap}}$ ) de ~6 °C (Tabla 2). Se observa también que en el perfil térmico comienza a insinuarse la ocurrencia de dos transiciones. El barrido térmico a pH 6.5 (Figura 19C) muestra ya claramente dos transiciones, presumiblemente cada una correspondiente al desplegamiento de uno de los dos lóbulos del dominio tirosina-quinasa; la primera transición comienza en 40°C y finaliza en 52°C, mientras que la segunda transición empieza en 58°C y termina en 76°C. La  $T_{m_{ap}}$  para cada transición se muestra en la Tabla 2. A valores de pH por debajo del  $pI$  (Figura 19D-E), no se observó una pérdida abrupta de estructura secundaria, manteniéndose el espectro a alta temperatura muy semejante al de baja temperatura, sugiriendo que en estas condiciones el estado nativo de la proteína es muy estable.



**Figura 18.** Espectros de DC en el ultravioleta lejano del dominio TK-Abl, **A)** 25 mM TRIS-HCl, pH 8.2, **B)** 25 mM TRIS-HCl, pH 7.2, **C)** 10 mM Cacodilato, pH 6.5, **D)** 10 mM Acetatos, pH 4.5, **E)** 10 mM Citratos, pH 3.5. En símbolos negros la proteína nativa, en rojo la proteína a 80 °C y en verde a 20 °C al ser vuelta a enfriar.

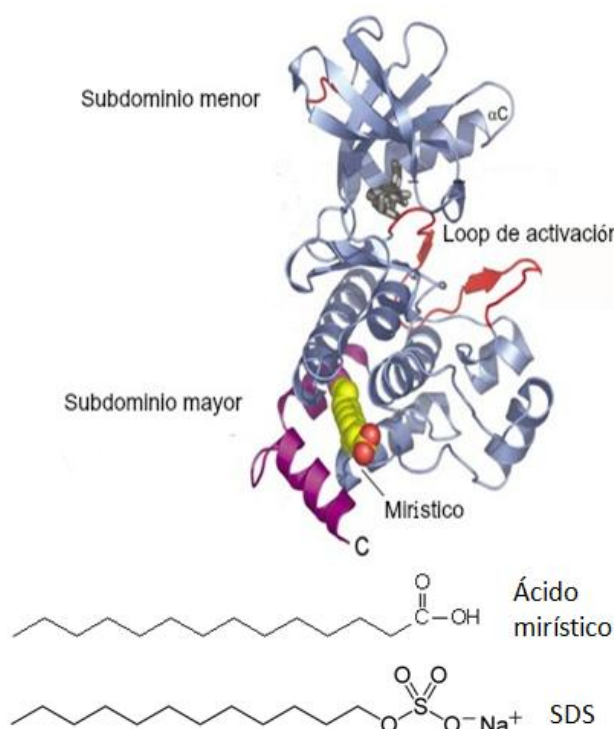


**Figura 19.** Barrido térmico del dominio TK-Abl en función del pH seguido por dicroísmo circular en el UV lejano a una longitud de onda fija de 208 nm. **A)** 25 mM TRIS-HCl, pH 8.2, **B)** 25 mM TRIS-HCl, pH 7.2, **C)** 10 mM cacodilato, pH 6.5, **D)** 10 mM acetatos, pH 4.5, **E)** 10mM citratos, pH 3.5. En símbolos negros el calentamiento de 20 a 80 °C, en símbolos rojos el enfriamiento de 80 a 20 °C.

pH	T <sub>m</sub> <sub>ap</sub> (°C)
8.2	39.5
7.2	45.2
6.5 (primer transición)	44.0
6.5 (segunda transición)	69.8

**Tabla 2.** Temperatura media aparente para cada transición del dominio TK-Abl en función del pH.

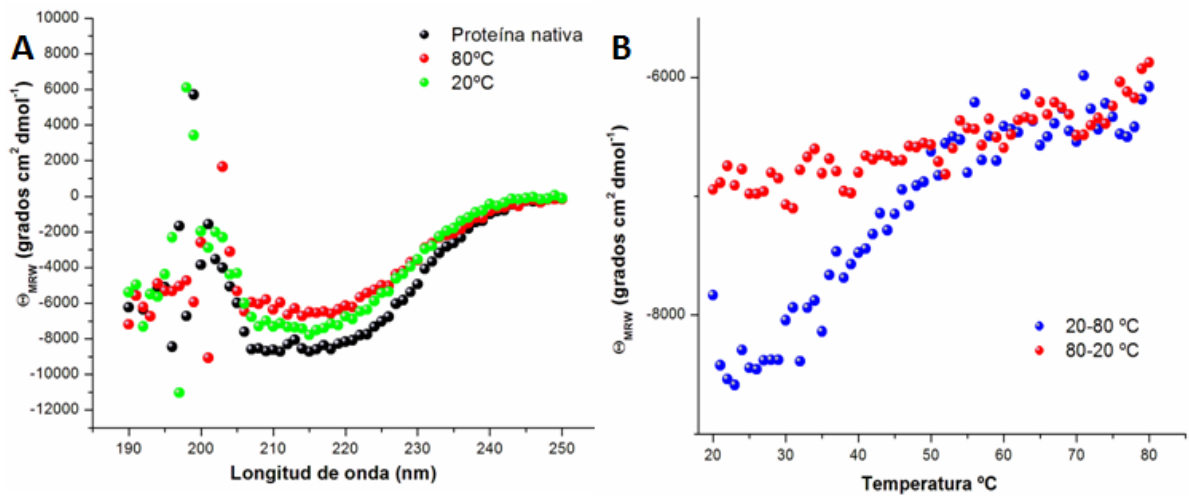
El siguiente paso fue tratar de establecer si existía una correspondencia entre las dos transiciones observadas a pH 6.5 y los dos lóbulos que conforman el dominio TK-Abl. Como se mencionó en la introducción, el lóbulo C tiene la capacidad de unir una molécula de ácido mirístico como medio de auto-inhibición de la proteína (Figura 20). A pH 6.5, la solubilidad de este ácido graso saturado de 14 átomos de carbono es muy baja (< 0.1 mM), por lo que decidimos ocupar en su lugar dodecil sulfato de sodio (SDS), cuya solubilidad es mucho mayor (~8 mM), facilitando de esta manera el manejo experimental de las muestras. Como se ha demostrado para otras proteínas, el SDS es un excelente análogo de ácidos grasos como el mirístico y el laúrico (Gutiérrez-Magdaleno *et al.*, 2013).



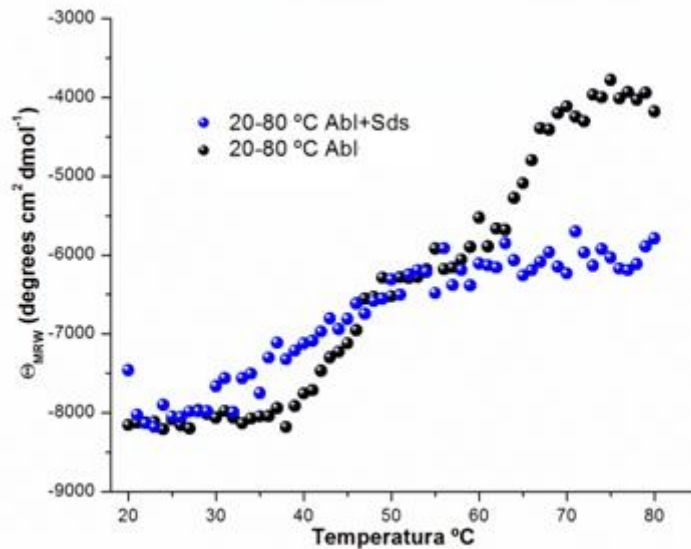
**Figura 20.** Estructura tridimensional del dominio TK-Abl, señalando algunos de sus componentes. Se muestra la estructura química del ácido mirístico y del SDS (Modificado de Hantschel *et al.*, 2003).

La Figura 21A muestra el espectro de DC en el UV-lejano del dominio TK-Abl a 20 °C, pH 6.5, en presencia de 200  $\mu$ M de SDS. Al igual que en los experimentos anteriores, el espectro en presencia de SDS exhibe la forma típica de una proteína enriquecida con hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$  (símbolos negros). Se muestra también el espectro de dicroísmo a 80 °C (símbolos rojos), donde se observa que la proteína conserva a esta temperatura mayor elipticidad que en ausencia de SDS. La Figura 21B muestra el barrido térmico. Al calentar la muestra a 80 °C (símbolos azules), se observa una sola transición para este desplegamiento y una alta conservación de la señal, indicativo de que se conserva aún una gran cantidad de estructura secundaria, al realizar el enfriamiento de la muestra a 20 °C (símbolos rojos) se observa la no recuperación de la estructura secundaria, indicando que el desplegamiento de la proteína sigue siendo irreversible en presencia del ligando.

La Figura 22 muestra la comparación del barrido térmico del dominio TK-Abl a pH. 6.5 en ausencia (símbolos negros) y presencia de SDS (símbolos azules). Se aprecia claramente que el SDS estabiliza la segunda transición observada en ausencia de ligando. En cambio, modifica tan sólo marginalmente la  $T_{m_{ap}}$  de la primera transición (44.0 y 42.2 en ausencia y presencia de SDS, respectivamente). Por tanto, es posible concluir que en la forma apo de la proteína a un pH de 6.5, el lóbulo N o subdominio menor presenta una termorresistencia menor a la del lóbulo C. A su vez, estos resultados establecen que el dominio TK-Abl sigue un mecanismo de desplegamiento por etapas, siguiendo un orden de perturbación de los lóbulos como el que se muestra en la Figura 23. Por otro lado, es interesante observar que en presencia de SDS, el desplegamiento del lóbulo N comienza a menor temperatura que en ausencia del ligando. Este resultado sería consistente con un escenario en el que el SDS estabiliza al lóbulo C a costa de romper interacciones de éste con el lóbulo N. De comprobarse dicho escenario, se estaría evidenciando la existencia de cierto grado de acoplamiento en la estabilidad de los dos lóbulos. A su vez, sugeriría que el mecanismo subyacente de inhibición del N-cap consiste en parte en provocar el desacoplamiento entre los dominios, con la presumible desorganización del sitio activo.

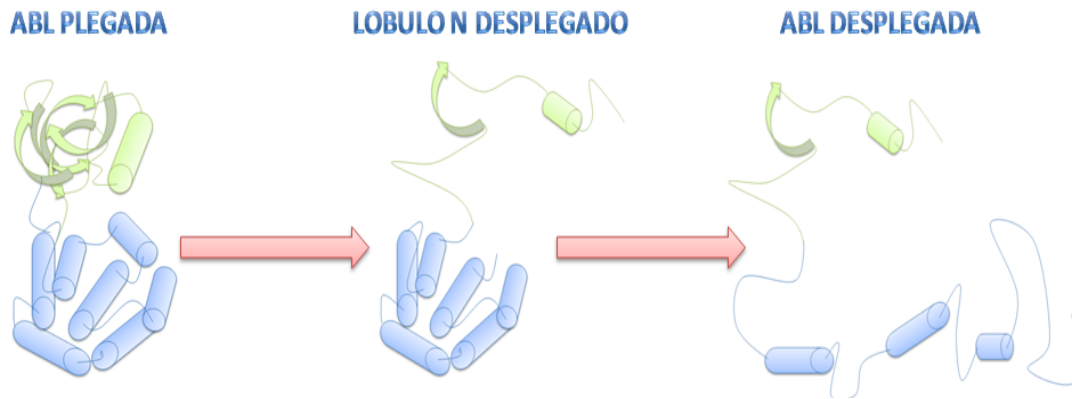


**Figura 21. A)** Espectros de DC en el ultravioleta lejano del dominio TK-Abl. La temperatura utilizada fue de 20 °C. En símbolos negros la proteína nativa, en rojo la proteína a 80 °C y en verde a 20 °C al ser vuelta a enfriar. **B)** Barrido térmico seguido a una longitud de onda fija de 208 nm. En símbolos azules el calentamiento de 20 a 80 °C, en símbolos rojos el enfriamiento de 80 a 20 °C



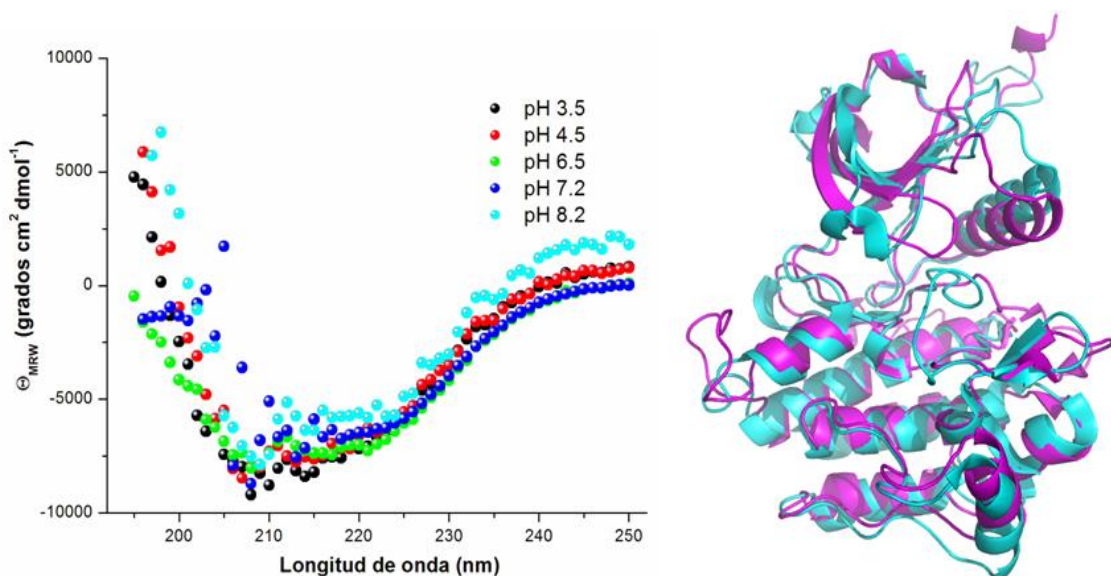
**Figura 22.** Barrido térmico seguido a una longitud de onda fija de 208nm. En símbolos negros se observa el desplegamiento del dominio TK-Abl en ausencia del ligando, en símbolos azules se observa el desplegamiento en presencia de ligando. Ambos experimentos en buffer 10 mM cacodilato, pH 6.5





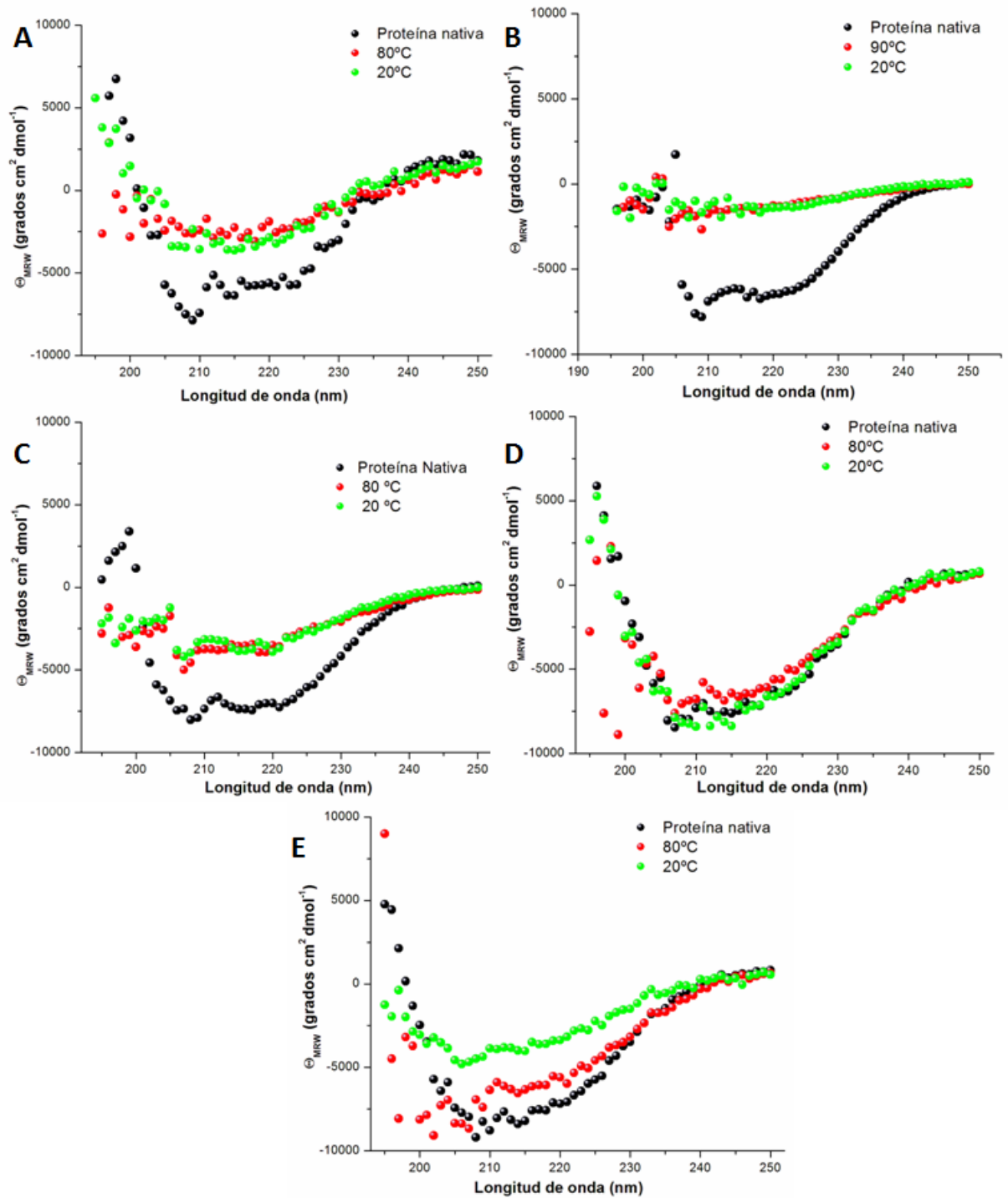
**Figura 23.** Modelo de desplegamiento térmico para el dominio TK-Abl a pH 6.5.

Con el fin de explorar si el comportamiento de TK-Abl es compartido por otros miembros de la familia de tirosina-quinasas, realizamos una caracterización del desplegamiento térmico del dominio TK-Src. La identidad entre los dos dominios es de 42%, mientras que el RMSD entre sus estructuras tridimensionales es de 3.0-3.2 Å (Dixit y Verkhivker, 2009, Figura 24). La Figura 24 muestra los espectros de DC en el UV-lejano del dominio homólogo a 20 °C en función del pH. Al igual que con TK-Abl, los espectros de TK-Src exhiben la forma típica de una proteína enriquecida con hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$  a lo largo de todo el intervalo de pH muestreado.

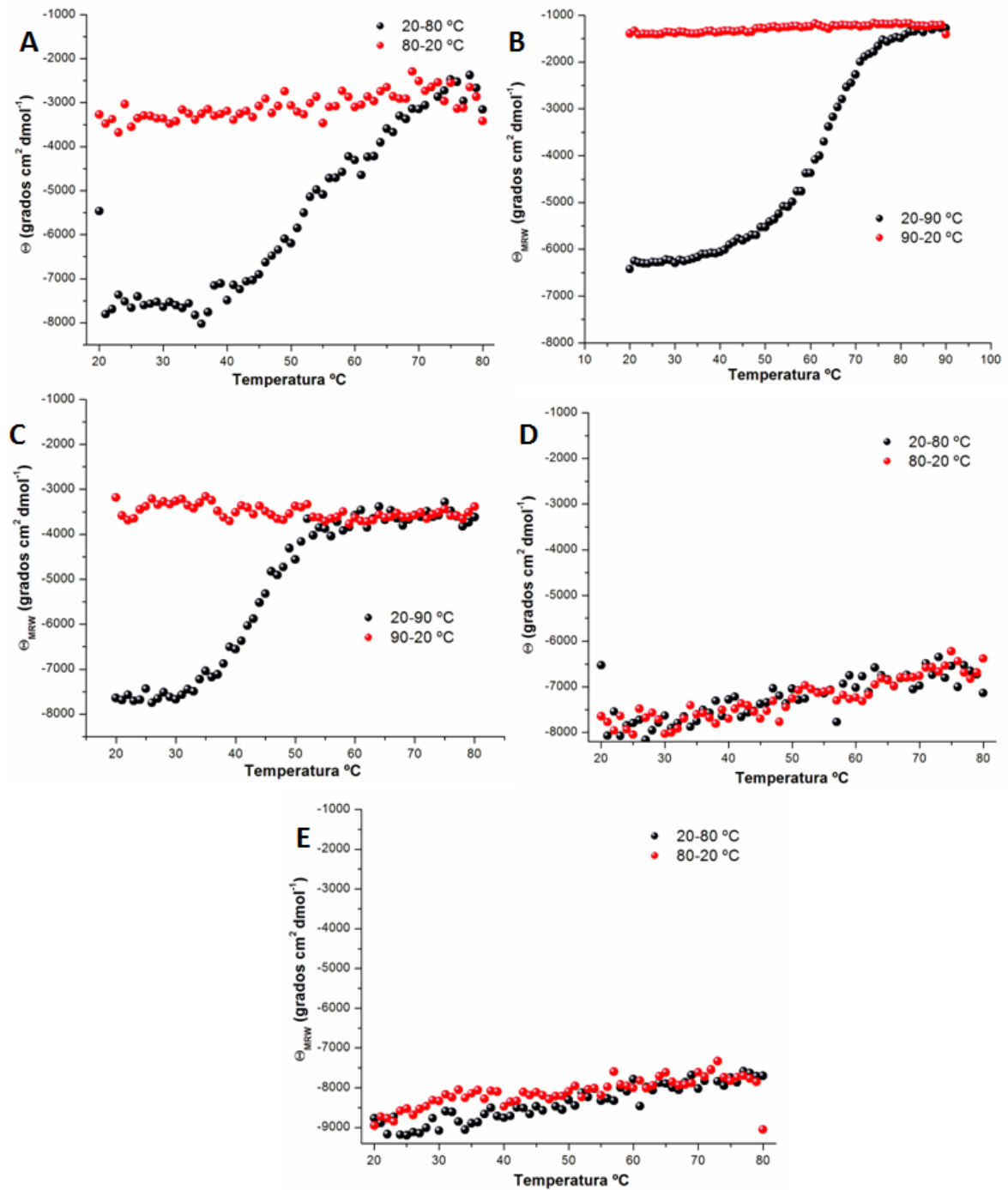


**Figura 24. Izquierda.** Espectros de DC en el ultravioleta lejano del dominio TK-Src, en amortiguador 25 mM TRIS-HCl, pH 8.2, 25 mM TRIS-HCl, pH 7.2, 10 mM Cacodilato, pH 6.5, 10 mM Acetatos, pH 4.5, 10 mM Citratos, pH 3.5. La temperatura utilizada fue de 20 °C. La concentración de proteína varió de 3.87  $\mu\text{M}$  a 6.61  $\mu\text{M}$  (0.12 a 0.20 mg/mL). **Derecha.** Alineamiento de las estructuras de los dominios quinasa TK-Abl (cian) y TK-Src (magenta).

En la Figura 25 se muestra los espectros de TK-Src tomados a diferentes temperaturas. Al igual que TK-Abl, esta quinasa muestra un desplegamiento térmico irreversible, y una progresiva estabilización estructural conforme el pH se vuelve más ácido, mostrando una notoria termorresistencia por debajo de su  $pI = 5.6$ . En el caso de TK-Src, el desplegamiento a pH 8.2 muestra dos transiciones claramente desacopladas (Figura 26A), mientras que a valores de pH 7.2 y 6.5 se observa el traslape de las mismas (Figura 26B-C). Por tanto, el estudio de TK-Src confirma que los así llamados dominios tirosina-quinasa en realidad están compuestos por al menos dos dominios o unidades cooperativas de plegamiento.

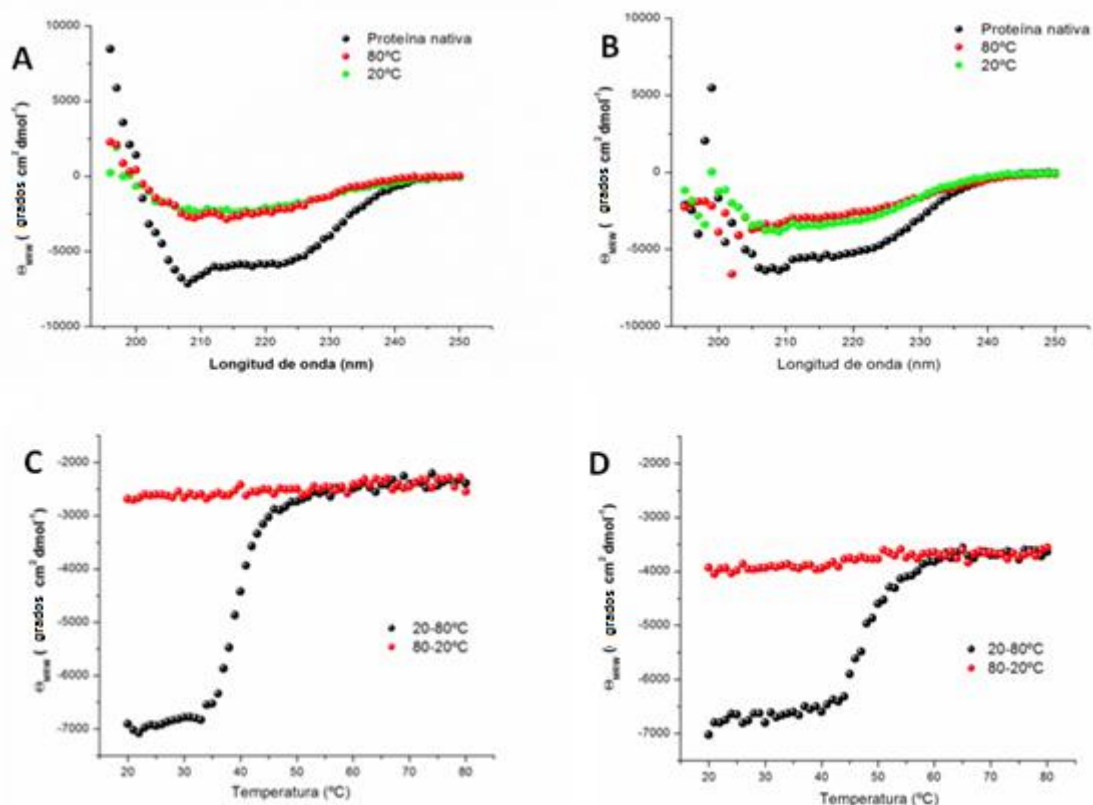


**Figura 25.** Espectros de DC en el ultravioleta lejano del dominio TK-Src, **A)** 25 mM TRIS-HCl, pH 8.2, **B)** 25 mM TRIS-HCl, pH 7.2, **C)** 10 mM Cacodilato, pH 6.5, **D)** 10 mM Acetatos, pH 4.5, **E)** 10 mM Citratos, pH 3.5. En símbolos negros la proteína nativa, en rojo la proteína a 80 °C y en verde a 20 °C al ser vuelta a enfriar.



**Figura 26.** Despliegamiento térmico del dominio TK-Src en función del pH seguido por dicroísmo circular en el UV lejano, **A)** 25 mM TRIS-HCl, pH 8.2, **B)** 25 mM TRIS-HCl, pH 7.2, **C)** 10 mM Cacodilato, pH 6.5, **D)** 10 mM Acetatos, pH 4.5, **E)** 10 mM Citratos, pH 3.5. Barrido térmico seguido a una longitud de onda fija de 208 nm. En símbolos negros el calentamiento de 20 a 80 °C, en símbolos rojos el enfriamiento de 80 a 20 °C.

El siguiente paso fue indagar el efecto de MgATP sobre la estabilidad térmica de TK-Abl. Comparando el espectro de dichroísmo entre el dominio apo (Figura 27A) y en presencia de ATP\*Mg (Figura 27B), se observa que el nucleótido no causa modificaciones en la estructura secundaria de la proteína. La Figura 27C muestra el barrido de temperatura del dominio aislado y la Figura 27D el barrido correspondiente al dominio en presencia de ATP\*Mg. Se observa que el nucleótido provoca que la pérdida de la estructura secundaria inicie cerca de los 45 °C, con una  $T_{m_{ap}}$  alrededor de 9 °C mayor que la del dominio aislado (Tabla 3). Este resultado es una prueba inequívoca de que el MgATP sí tiene interacción con la proteína en estado inactivo, propiedad que hasta la fecha no ha sido reportada en la literatura. Se realizó el ensayo de replegamiento, enfriando la muestra de 80 a 20 °C (símbolos rojos), observándose nuevamente la no recuperación de la señal de la proteína nativa.



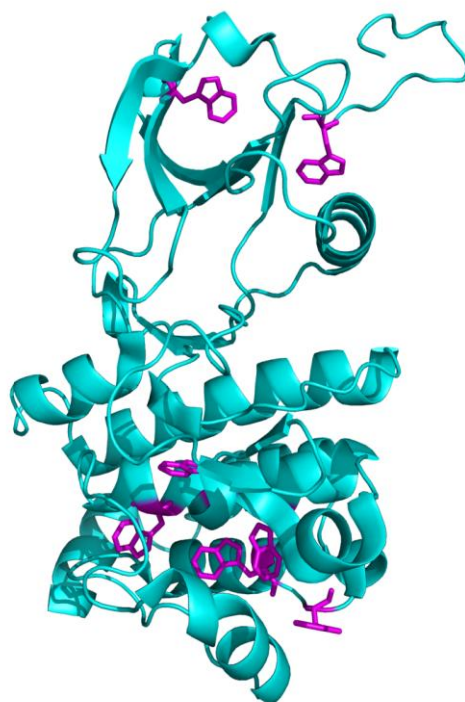
**Figura 27.** Espectros de DC en el ultravioleta lejano del dominio TK-Abl, 25 mM TRIS-HCl, pH 8.2, en ausencia **A)** y presencia de 2 mM ATP, 5 mM  $MgCl_2$  **B)**. En símbolos negros la proteína nativa, en rojo la proteína a 80 °C y en verde a 20 °C al ser vuelta a enfriar. Barrido térmico térmico del dominio TK-Abl apo **C)** y en complejo con ATPMg **D)**. Los símbolos negros y rojos corresponden al calentamiento y enfriamiento de la proteína, respectivamente.

	TK-Abl	TK-Abl * MgATP
T <sub>m</sub> (°C)	39.5	48.5

**Tabla 3.** Temperatura media aparente para cada transición del dominio TK-Abl en función del pH para el dominio apoTK-Abl y en presencia de ATP.

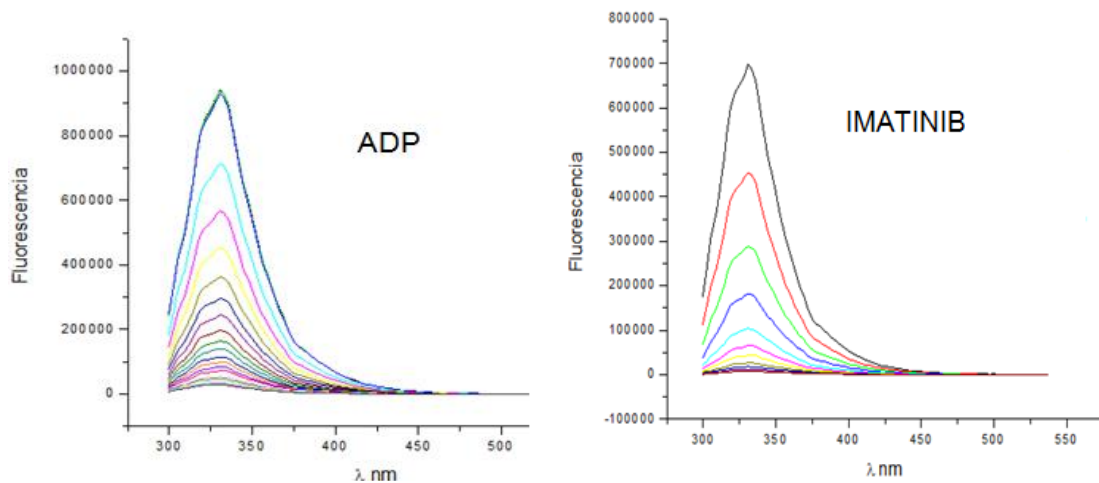
### 5.2.2. Fluorescencia intrínseca

Tratando de confirmar si la forma inactiva de TK-Abl es capaz de unir nucleótidos, realizamos experimentos de titulación fluorimétrica. El dominio TK-Abl, como se muestra en la Figura 28, contiene 7 triptofános repartidos entre los dos lóbulos de la molécula, por lo que se esperaba fueran un excelente sensor para la unión del ligando.

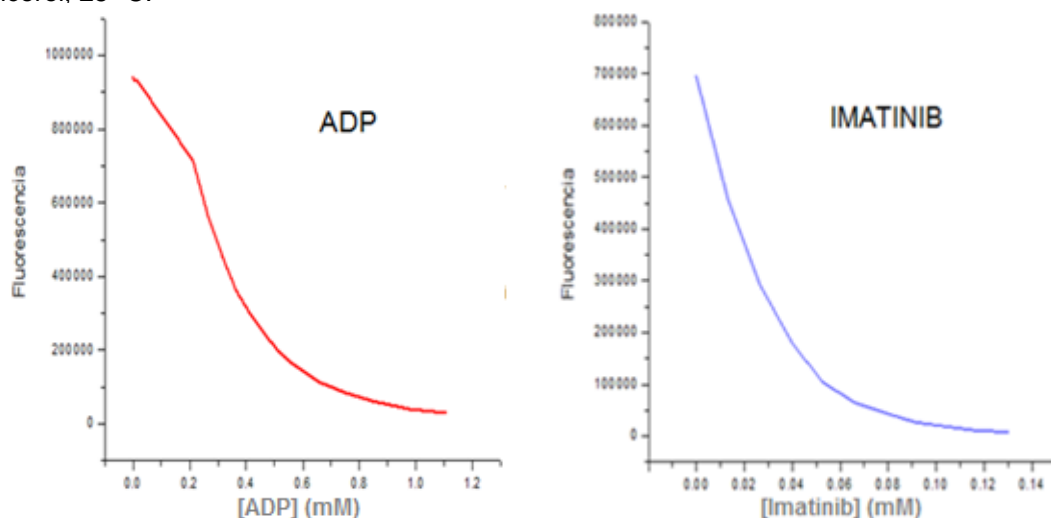


**Figura 28.** Representación esquemática del dominio TK-Abl, donde se resalta la posición de los 7 residuos triptófano presentes en la molécula.

La Figura 29 muestra los espectros de emisión a lo largo de la titulación del dominio con MgADP (10 mM) y con imatinib (6 mM). En concordancia con lo reportado por Levinson y Boxer (2012), la longitud de máxima emisión ( $\lambda_{\max}$ ) de la forma apo del dominio fue de 340 nm. La adición de cualquiera de los dos ligandos provocó una fuerte disminución en la intensidad de fluorescencia, sin que hubiera un desplazamiento importante en  $\lambda_{\max}$ . Para construir la isoterma de unión, el cambio en la intensidad de fluorescencia a 340 nm fue graficado con respecto a la concentración total de ligando (Figura 30). Los resultados confirman que el dominio es capaz de unir nucleótidos, aunque se requiere una concentración un orden de magnitud mayor que la de imatinib para lograr su saturación.



**Figura 29.** Espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda$  de excitación 280nm) obtenidos a lo largo de la titulación secuencial de TK-Abl (5  $\mu$ M) con MgADP (10 mM) y con imatinib (6 mM). Ambos experimentos se realizaron en amortiguador TRIS-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 25  $^{\circ}$ C.



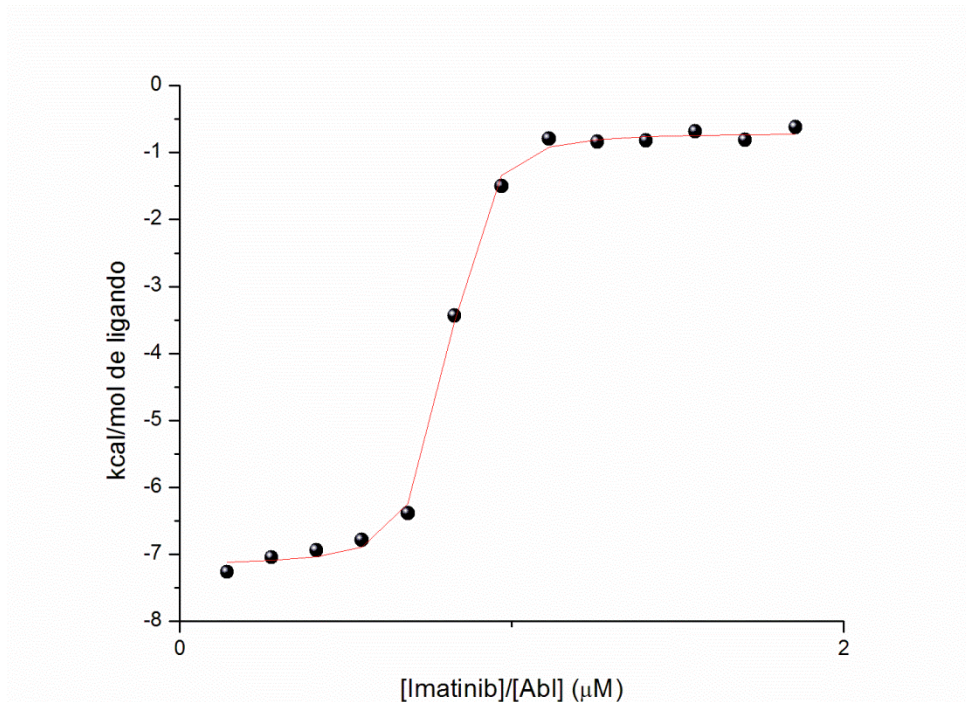
**Figura 30.** Cambio en la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija ( $\lambda_{\max} = 340$ nm) en función de la concentración de ligando.

### 5.3. Calorimetría de Titulación Isotérmica

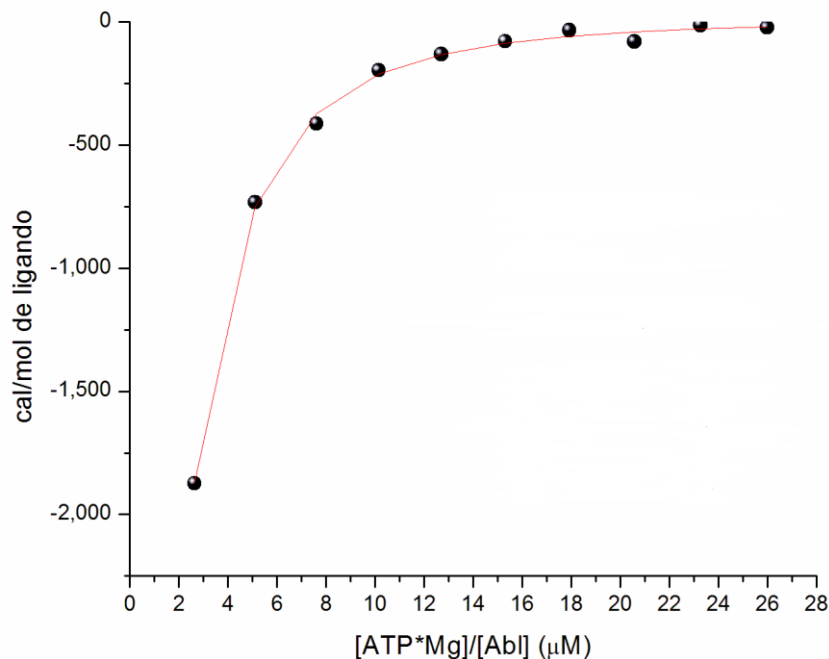
Uno de los aspectos aún no resueltos con respecto a Abl es la caracterización a detalle de los parámetros termodinámicos que rigen la interacción con sus ligandos naturales, así como con sus inhibidores. Esclarecer estas interrogantes es el objetivo en la presente sección. Los parámetros de unión a imatinib fueron obtenidos por calorimetría de titulación isotérmica (CTI) en un calorímetro ITC-200 (GE) a 25 °C. La proteína fue preparada en un intervalo de concentración 14-34  $\mu\text{M}$  en una solución amortiguador 20 mM TRIS-HCl, pH 8.2, 300 mM NaCl y 5% de glicerol. El imatinib (purificado de cápsulas vendidas en el mercado, Novartis) fue diluido en el amortiguador ocupado para la proteína a una concentración final de 725  $\mu\text{M}$ . La Figura 31 muestra la isoterma de unión obtenida con imatinib. La curva fue analizada mediante un modelo de unión de un solo tipo de sitios, usando el software Origin (Microcal). Los parámetros obtenidos muestran una constante de unión elevada para el imatinib (Tabla 4); además, el ajuste indica una estequiometría cercana a 1 y que la unión es dirigida tanto entálpica como entrópicamente.

Las Figuras 32 y 33 muestran las isotermas de unión obtenidas para la titulación de TK-Abl con MgATP y ATP, respectivamente, a 25 °C. Ambas curvas fueron analizadas con un modelo de unión a un solo tipo de sitios. Como se muestra en la Tabla 4, el valor de  $K_a$  para el nucleótido en complejo con magnesio resultó ser 3 órdenes de magnitud más pequeño que el obtenido para imatinib. Dada esta baja afinidad, fue necesario fijar la estequiometría a 1 para obtener convergencia en el ajuste no lineal. A diferencia del imatinib, la unión del MgATP está entálpicamente dirigida y entrópicamente desfavorecida. En cambio, la firma termodinámica de la unión del ATP en ausencia de magnesio muestra los componentes entrópico y entálpico favorables, como en el caso del imatinib (Tabla 4).

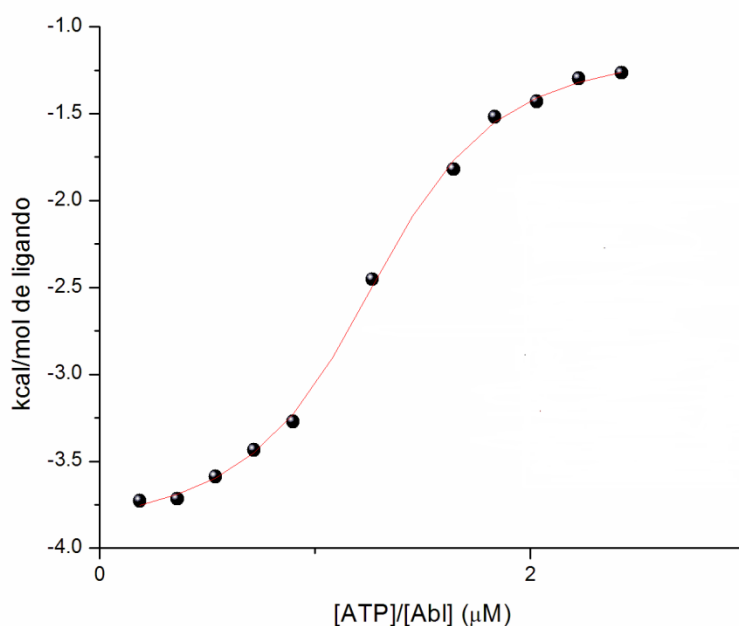




**Figura 31.** Isotherma de unión TK-Abl (12  $\mu\text{M}$ ) con imatinib (725  $\mu\text{M}$ ). La línea continua representa el mejor ajuste de un modelo de unión simple a los datos calorimétricos. Se aplicó un programa de 13 inyecciones secuenciales de 2.5  $\mu\text{L}$  cada una, con un espacio entre cada una de 200 segundos. La medición se realizó en amortiguador TRIS-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 25  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 32.** Isotherma de unión TK-Abl (6  $\mu\text{M}$ ) con MgATP (2 mM). La línea continua representa el mejor ajuste de un modelo de unión simple a los datos experimentales. Se aplicó un programa de 10 inyecciones secuenciales de 2.5  $\mu\text{L}$  cada una, con un espacio entre cada una de 200 segundos. La medición se realizó en amortiguador TRIS-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 25  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 33.** Isotherma de unión TK-Abl (24  $\mu\text{M}$ ) con ATP (1.8 mM). La línea continua representa el mejor ajuste de un modelo de unión simple. Se aplicó un programa de 12 inyecciones secuenciales de 2.5  $\mu\text{L}$  cada una, con un espacio entre cada una de 160 segundos. La medición se realizó en amortiguador TRIS-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Diversos estudios han demostrado que el imatinib une con alta afinidad el estado inactivo de la proteína, dato que se corrobora con nuestros resultados obtenidos calorimétricamente. Sin embargo, hasta la fecha nada se sabe de manera cuantitativa sobre la capacidad de unión de la proteína con nucleótidos. Nuestros datos claramente demuestran que la forma inactiva es capaz de reconocer MgATP con considerable afinidad, aunque con una firma termodinámica muy diferente a la exhibida con el imatinib.

	TK-Abl-Imatinib	TK-Abl-ATP	TK-Abl-MgATP
<b>Ka(M<sup>-1</sup>)</b>	<b>2.2x10<sup>7</sup> ± 1.2x10<sup>5</sup></b>	<b>1.9x10<sup>5</sup> ± 3.1x10<sup>4</sup></b>	<b>7.1x10<sup>4</sup> ± 1.8x10<sup>3</sup></b>
<b>n</b>	<b>0.85 ± 0.08</b>	<b>1.25 ± 0.05</b>	<b>1.0</b>
<b>ΔG(kcal/mol)</b>	<b>-10.0 ± 0.7</b>	<b>-7.1 ± 0.1</b>	<b>-6.9 ± 0.9</b>
<b>ΔH(kcal/mol)</b>	<b>-6.4 ± 0.3</b>	<b>-2.8 ± 0.3</b>	<b>-11.1 ± 0.6</b>
<b>TΔS(kcal/mol)</b>	<b>3.5 ± 0.5</b>	<b>4.3 ± 0.4</b>	<b>-4.1 ± 0.4</b>

**Tabla 4.** Datos termodinámicos de unión del dominio TK-Abl con MgATP, ATP e imatinib.

## VI. DISCUSION

### 6.1 Diferencia de la energética estructural del dominio catalítico TK-Abl en función de la temperatura y el pH.

El estudio del dominio TK-Abl ha estado revestido de un gran interés, dado que se trata de un blanco farmacológico bien establecido para el tratamiento y control de la LMC. No obstante, una fracción importante de pacientes sigue mostrando resistencia contra fármacos dirigidos al sitio activo de la quinasa, por lo que se precisa del desarrollo de nuevas estrategias para lograr la inhibición de la actividad enzimática desregulada. Un acercamiento que cada vez gana más popularidad en el diseño de fármacos es “atacar” sitios distintos al sitio activo. En este contexto, conocer los fundamentos energéticos del blanco farmacológico ha resultado muy valioso para la identificación de sitios alternativos de inhibición. Sin embargo, hasta el momento poco se sabe sobre el mecanismo de ensamblaje y estabilidad estructural de TK-Abl. En el presente estudio, hemos realizado experimentos de perturbación térmica en función del pH, con el fin de desvelar nuevos aspectos sobre la organización estructural de TK-Abl.

Nuestras determinaciones de DC muestran que la estructura secundaria del dominio TK-Abl a temperatura ambiente se mantiene prácticamente invariable en el intervalo de pH de 3.5 a 8.2. A valores de pH mayores al punto isoeléctrico ( $pI = 5.7$ ), la proteína mostró una clara transición térmica de desplegamiento, aunque con una pérdida no total de estructura secundaria a altas temperaturas. Dado que se observó la formación de abundantes agregados solubles después de haber sometido a la proteína a un ciclo de calentamiento/enfriamiento, una explicación plausible de la estructura secundaria remanente es que se deba a la formación de agregados parcialmente estructurados. A valores por debajo de su punto isoeléctrico, la proteína mostró una notable termorresistencia, a pesar de que a pH de 3.5, por ejemplo, la carga positiva neta de la molécula ( $q = +34.4$ ) es mayor que la carga negativa neta a pH de 8.2 ( $q = -13.7$ ).

El perfil de desplegamiento observado a pH de 6.5 muestra la existencia de más de una transición térmica. Para esclarecer cuál de los dos lóbulos se desplegaba primero, la estrategia a seguir fue la adición de una molécula que se pudiera unir al sitio de unión del ácido mirístico, como lo es el SDS. El SDS no causó cambios en la estructura secundaria de la proteína. No obstante, al hacer el desplegamiento térmico observamos una sola transición, sugiriendo una gran conservación de estructura secundaria, lo cual era un indicativo de que gran parte de la proteína estaba plegada. Al realizar la sobreposición de los perfiles térmicos a pH 6.5 en presencia y ausencia de SDS, se observó que la segunda transición desaparece, lo cual es una prueba de que el lóbulo C es capaz de unir SDS y que dicha unión estabiliza a este dominio, causando que no se despliegue en el intervalo de temperatura de estudio.

Nuestros resultados muestran que a pesar de que el lóbulo N esté desplegado, el lóbulo C conserva su estructura y capacidad de reconocer moléculas con cadenas hidrofóbicas, lo cual demuestra que estos lóbulos constituyen cada uno de ellos una unidad cooperativa de plegamiento. Por tanto, es posible afirmar que el así llamado dominio tirosina quinasa es, en el sentido formal del término (Lauren y George, 2012), una estructura bidominio. No obstante, en presencia de SDS aparentemente el dominio N se vuelve más inestable, observándose un decremento en la pendiente de la transición y de la  $T_{m_{ap}}$ . Una posible explicación de esta observación es que para contribuir a mantener la forma autoinhibida de Abl, la unión del ácido mirístico causa la ruptura de interacciones entre los dos lóbulos, provocando una distorsión conformacional en el sitio catalítico a costa de la desestabilización del dominio N. Esta observación abre nuevas perspectivas en la búsqueda de mecanismos de inhibición farmacológica de Abl. Dado que la mayoría de mutaciones de TK-Abl resistentes a los fármacos actualmente disponibles muestran variaciones en residuos que conforman el sitio catalítico, el desarrollo de moléculas que se unan al sitio de reconocimiento del mirístico podría permitir la inhibición a larga distancia de estas mutantes.

Hasta donde es de nuestro saber, sólo existe un antecedente previo sobre la estabilidad de TK-Abl, y es el estudio realizado en 2004 por Oliver Hantschel

sobre el lóbulo C producido de manera recombinante. En su tesis de doctorado, Hantschel reportó una  $T_m$  de 71 °C determinada por perturbación térmica seguida por dicroísmo circular a un pH de 7.0 en buffer 20 mM fosfatos, 50 mM NaCl 1 mM DTT. Este dato resulta interesante, ya que corresponde de forma cercana a nuestro valor de  $T_{m_{ap}} = 69.8$  encontrado para la segunda transición a pH 6.5. La correspondencia entre estos datos es una prueba más de que el dominio C es el más estable de los dos dominios a un pH neutro o ligeramente ácido

## **6.2 Diferencia de la energética estructural del dominio catalítico TK-Src en función de la temperatura y el pH.**

Al no encontrar un marco de comparación en la bibliografía con respecto a la estabilidad del dominio tirosina quinasa de Abl, en el presente proyecto decidimos estudiar a TK-Src, el cual guarda una homología del 42% con TK-Abl. Al igual que con el dominio TK-Abl, observamos que la estructura secundaria de TK-Src se mantiene invariante en el intervalo de pH ensayado. Estos datos en conjunto nos muestran que ambos dominios son bastante estables a pesar de los cambios en el pH del medio. A valores de pH menores al pI, TK-Src mostró una estabilidad térmica tan grande como la de TK-Abl. Por encima del pI, TK-Src mostró también progresivamente mayor susceptibilidad al desplegamiento térmico. La variación de pH también permitió evidenciar condiciones en las cuales TK-Src muestra claramente dos transiciones de desplegamiento. No obstante, mientras que estas transiciones son más evidentes para TK-Abl en condiciones cercanas al pI, para TK-Src lo son en condiciones de mayor basicidad. Esta es otra prueba de que estos dominios tirosina quinasa en realidad son dos unidades de plegamiento independientes, y que en valores de pH por encima de su pI poseen una estabilidad marginal. Hasta la fecha, el campo de estudio sobre la estabilidad de los dominios quinasa ha sido muy poco explorado. El presente proyecto aporta nuevos datos sobre el comportamiento de estas proteínas, estableciendo un marco de exploración de la relación estructura-función para la ubicación de nuevos sitios blanco para fármacos.

### **6.3 Diferencia de la energética estructural del dominio catalítico TK-Abl aislado y en complejo con su ligando natural MgATP**

Hasta la fecha no existe un trabajo con este dominio quinasa en estado inactivo que pruebe su capacidad de unión del complejo MgATP. Para establecer un marco adecuado para llevar a cabo nuestros experimentos de calorimetría fue necesario probar la unión por métodos espectrofotométricos.

Mostramos por medio de dicroísmo circular que el espectro no cambia en presencia o ausencia del nucleótido, prueba que es interesante ya que sugiere que la unión del MgATP se da sin cambiar la estructura secundaria de la proteína. Los diferentes barridos de temperatura en presencia del nucleótido y sin él muestra que al unir MgATP, el dominio TK-Abl adquiere una conformación más estable, ya que la  $T_m$  se incrementa 9 grados centígrados, de 39.5°C a 48.5 °C, de igual forma observamos que la cantidad de proteína con estructura secundaria conservada es mayor cuando el dominio esta en presencia de ATP, la capacidad del dominio inactivo de reconocer ATP, podría *per se* ser una fuente de estabilización estructural. En este estado, el dominio une ATP sin hidrolizarlo. Por tanto, el ATP presente en el medio celular, cuya concentración aproximada es de 6 mM, podría asistir en mantener plegado al dominio inactivo. En este sentido, es interesante mencionar que resultados de cristalografía de rayos X por Kurijan y colaboradores en 2006, muestran que el estado inactivo es más flexible que el estado activo, lo cual sugeriría que el ATP podría estar ayudando a la estructuración del dominio inactivo.

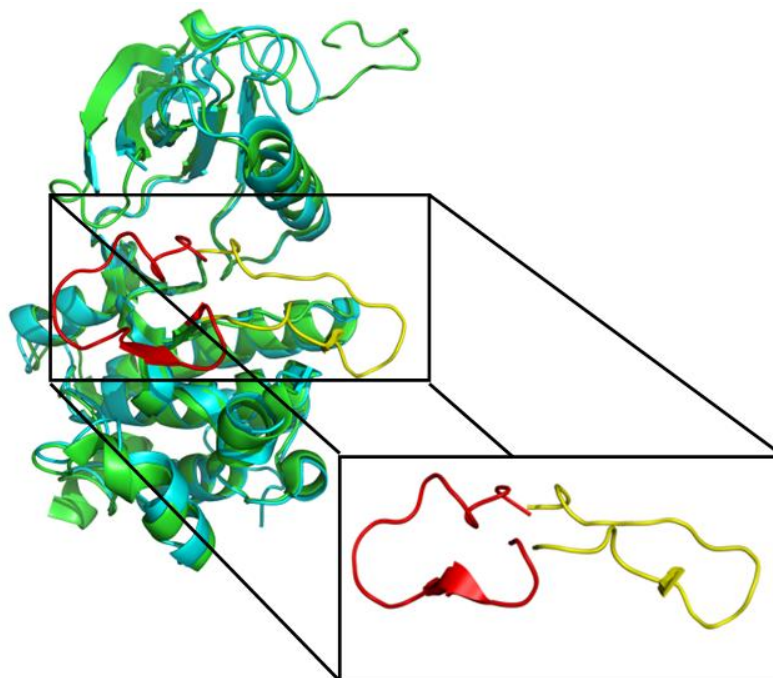
### **6.4 Diferencias energéticas del reconocimiento de imatinib y MgATP**

Elucidar las bases moleculares que gobiernan la formación de interacciones no covalentes en las proteínas requiere del conocimiento cuantitativo de las fuerzas que conducen el proceso. En esta sección, se presenta un análisis energético-estructural comparativo para la formación de los complejos del dominio TK-Abl con imatinib, ATP y MgATP, considerando en su conjunto las funciones termodinámicas obtenidas.

Pocos han sido los estudios que se han hecho en referencia a la caracterización energética de la unión del dominio TK-Abl con sus inhibidores. Para la mayoría de inhibidores, se conoce tan sólo la constante de disociación y/o la de inhibición. Hasta donde es de nuestro saber, sólo un estudio ha presentado datos de calorimetría. Seeliger y colaboradores, en 2005, reportaron un experimento de calorimetría de titulación isotérmica entre el dominio TK-Abl en estado inactivo e imatinib. Los autores encontraron una  $K_D$  de 50 nM, la cual concuerda muy bien con el valor de 44 nM obtenido en nuestro estudio. En el mismo trabajo, Seeliger y colaboradores reportan una  $K_D$  para el complejo de imatinib con TK-Abl en conformación activa de 1.6  $\mu$ M, lo cual mostró que el imatinib se une preferentemente al estado inactivo de la quinasa, razón por la cual ha resultado un fármaco tan valioso para el tratamiento de la LMC.

Las bases estructurales de la interacción preferentes del imatinib con la forma inactiva de Abl han sido claramente establecidas (Schindler y Kuriyan, 2000). La Figura 34 muestra las estructuras sobrepuestas de TK-Abl en conformación activa (color cian y asa de activación en amarillo) e inactiva (color verde y asa de inactivación en rojo). La principal diferencia entre los dos estados es la orientación del asa de activación. En el estado inactivo, el asa se encuentra cerrada, de tal forma que bloquea el sitio de reconocimiento al péptido sustrato de la quinasa. En cambio, en el estado activado, el asa cambia de conformación, exponiendo el sitio activo al solvente. El imatinib estabiliza de manera preferente la conformación cerrada del asa, además de posicionarse de manera directa sobre el sitio de unión a la adenina del ATP. Por tanto, la mayor afinidad del imatinib por el estado cerrado se da por el hecho de que se une al asa plegada, mientras que con el estado activado, donde el asa se encuentra preferentemente abierta, es necesario pagar el costo energético para cambiar la conformación de dicha asa. En este sentido, la unión del imatinib con la forma inactiva se puede describir como una asociación de tipo cuerpo rígido. Por otro lado, el imatinib es una molécula relativamente grande y enriquecida con superficies hidrofóbicas, por lo que es de esperarse que su unión a la proteína sea favorecida entrópicamente. Estos dos aspectos, la unión tipo cuerpo rígido y la hidrofobicidad de la interacción, pueden explicar el

por qué la unión de este fármaco es tanto entálpica como entrópicamente favorecida.



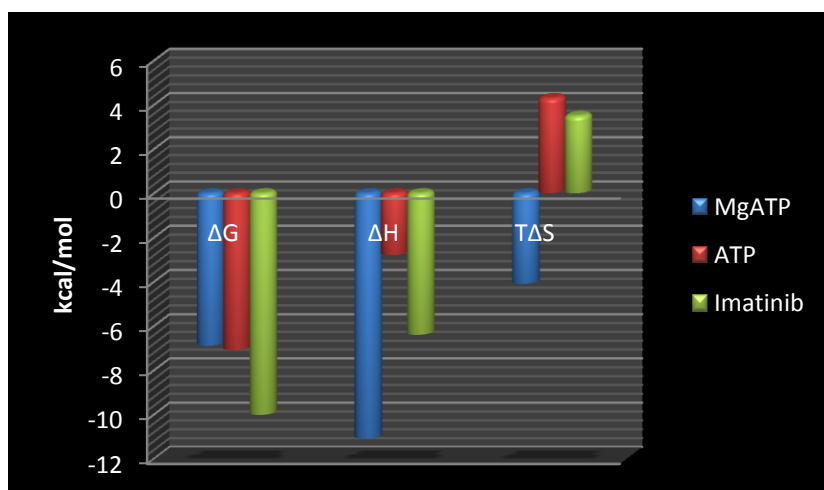
**Figura 34.** Estructura tridimensional del dominio TK-Abl en estado inactivo (estructura en verde con asa de activación en rojo,) y en estado activo (estructura en azul con asa de activación en amarillo,). Se representa en un acercamiento las conformaciones del asa para cada estado.

La estructura tridimensional de TK-Abl unida a ATP y MgATP aún no ha sido resuelta experimentalmente. No obstante, las firmas termodinámicas obtenidas en este estudio sugieren que la unión de ATP genera ajustes conformacionales que dependen de la presencia o ausencia del metal. A diferencia del imatinib, la unión de MgATP mostró una entropía desfavorable (Figura 35). Este cambio drástico en la entropía de unión puede deberse a una mayor estructuración de la proteína debida a la formación de interacciones más energéticas con el nucleótido (lo cual está de acuerdo con el  $\Delta H$  de unión más negativo). Interesantemente, comparaciones de las diversas estructuras obtenidas para TK-Abl muestran que el estado inactivo tiene mayor grado de flexibilidad conformacional que el activo (Panjarian, 2013). Por otro lado, al exponerse el asa más al solvente debido al cambio conformacional al estado activado, debe provocarse una entropía desfavorable adicional, al quedar atrapadas un mayor



número de moléculas de agua solvatantes. Estos dos factores en su conjunto, la rigidificación estructural y el mayor grado de solvatación del asa de activación, podrían explicar la caída tan grande de entropía de unión con respecto a la observada con imatinib. Una de las explicaciones más plausibles de que el asa de activación se oriente hacia la conformación abierta se puede deber al hecho de que para que se dé la unión de MgATP, es necesario que el ácido aspártico del motivo DFG esté orientado hacia el sitio de unión, ya que el aspártico juega un papel crucial en la coordinación del magnesio (Haile *et al.* 2009). Como es sabido, la reorientación del motivo hacia la conformación “DFG in” está acoplada a la apertura del asa de activación (Figura 34).

En ausencia de magnesio sería de esperarse que no se favorezca el cambio conformacional del motivo DFG, dado la alta densidad de carga de los fosfatos del ATP. Bajo este escenario, la unión de ATP no estaría acompañada de la entropía desfavorable debida a la reestructuración del asa de activación. A su vez, la ausencia del catión abatiría la entalpía de interacción, al dejar de establecerse interacciones salinas con el aspártico del motivo DFG, entre otras interacciones. Este comportamiento es justamente el observado en la firma termodinámica de unión de ATP, la cual es más parecida a la del imatinib. El hecho de que el ATP, al igual que el imatinib, tenga una unión tipo cuerpo rígido con TK-Abl, implica que no tiene que pagar el costo del rearreglo conformacional del asa de activación, lo cual permite explicar el por qué muestra una mayor afinidad por el dominio catalítico que en presencia de magnesio.



**Figura 35.** Firmas termodinámicas de unión del dominio TK-Abl con MgATP, ATP e Imatinib.

## VII. CONCLUSIONES

Las bases energéticas de la estabilidad y reconocimiento molecular del dominio TK-Abl han sido poco exploradas. El presente trabajo ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- La estabilidad estructural de los dominios TK-Abl y TK-Src puede pasar de ser marginal ( $pH > pI$ ), desplegándose a temperaturas por debajo de la temperatura fisiológica, a altamente estable ( $pH < pI$ ) adquiriendo una conformación que no se despliega hasta los 80 °C.
- El así llamado “dominio” tirosina quinasa es en realidad un bidominio, compuesto por al menos dos unidades cooperativas del plegamiento.
- El dominio C del bidominio TK-Abl, tiene la capacidad de unir n-alcanos sulfatados como lo es el SDS.
- Mostramos por primera vez que el dominio TK-Abl en estado inactivo es capaz de unir MgATP y ATP.
- El imatinib, ATP y el MgATP muestran diferencias considerables en los parámetros termodinámicos de unión con la proteína en estado inactivo. Los valores encontrados sugieren que la unión con imatinib y ATP es de tipo cuerpo rígido, mientras que la unión con el complejo MgATP podría generar un cambio en la estructura del dominio.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos de unión con el dominio TK-Abl en estado activo similares a los realizados en este trabajo, de manera que podamos hacer una comparación del comportamiento termodinámico de unión de ambos estados.
- Evaluar si el sitio de unión a mirístico es un sitio alostérico analizando el mecanismo de unión del ATP e imatinib con la proteína preincubada con ácido mirístico.
- Elucidar la estructura tridimensional del dominio TK-Abl, tanto en conformación activa como inactiva, en complejo con ATP y MgATP.
- Definir las condiciones experimentales más apropiadas para estudiar el proceso de desplegamiento térmico del dominio TK-Abl, en particular buscando condiciones donde el proceso sea reversible.
- Obtener de manera recombinante la proteína Abl en presencia de los dominios SH2 y SH3, y caracterizar su desplegamiento por calorimetría diferencial de barrido, para evaluar la posible estabilidad que los dominios SH2 y SH3 imparten al dominio TK-Abl.
- Caracterizar calorimétricamente la unión de Abl completa a imatinib y a nucleótidos, de manera que sea posible evaluar los efectos cooperativos interdominio en el reconocimiento molecular.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- ❖ Arlinghaus RB. (2002). **Bcr: a negative regulator of the Bcr-Abl oncoprotein in leukemia.** *Oncogene*. 21; 8560:8567.
- ❖ Bertics P., Gill G. (1985). **Self-phosphorylation enhances the protein-tyrosine kinase activity of the epidermal grow factor receptor.** *J. Biol. Chem.* 25;260(27):14642-7
- ❖ Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J., Matter AG. (2002). **(STI571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug.** *Nat Rev Drug Discov.* 1:493-502.
- ❖ Cohen O. (2002). **Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century?.** *Nat Rev Drug Discov.* 1:309-315.
- ❖ Correa DHA., Ramos CH. (2009). **The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function.** *Journal of Biochemistry Research.* 3(5): 164-173.
- ❖ Dixit A., Verkhivker GM. (2009). **Hierarchical modeling of activation mechanisms in the Abl and EGFR kinase domains: thermodynamic and mechanistic catalysis of kinase activation by cancer mutations.** *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000487.
- ❖ Fersht A. (1999). **Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding.** W. H. Freeman. Illustrated Reprint. 255-263.
- ❖ Franz WM., Berger P., Wang JY. (1989). **Deletion of and N-terminal regulatory domain of the c-Abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential.** *EMBO J.* 8:137-147.
- ❖ Goldman JM., Melo JV. (2001). **Targeting the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukaemia.** *N Engl J Med/* 644:1084-1086.

- ❖ Gutierrez-Magdaleno G., Bello M., Portillo-Télez MC., Rodríguez-Romero A., García-Hernández E. (2013). **Ligand binding and self association cooperativity of  $\beta$ -lactoglobulin**. *J. Moll. Recognit.* 26(2): 67-75.
- ❖ Haile T., Jianxing X., Michael K., Steven K., Julie P., Yuah-Hua D., Jeffrey O., Deb M., Rocco C., Nidhi J., Emilia B., Suzan JH., Joe W. (2009). **Beyond the MEK-pocket: Can current MEK kinase inhibitors be utilized to synthesize novel type III NCKIs? Does the MEK-pocket exist in kinases other than MEK?**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Pages, 226-229.
- ❖ Hantschel O. (2003) **Structural and Function Analysis of the Non-Receptor Tyrosine Kinase c-Abl**. Post. Doc. Tesis. European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg.
- ❖ Hantschel O., Nagar B., Guettler S., Kretzschmar J., Dorey K., Kurijan J., Superti-Furga G. (2003). **A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl**. *Cell* 112: 845-857.
- ❖ Hantschel O., Superti-Furga G. (2004). **Regulation of the c-Abl and BCR-ABL tyrosine kinases**. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:33-44
- ❖ He Y., Wertheim JA., Xu L., Miller JP., Karnell FG., Choi JK., Ren R., Pear WS. (2002). **The coiled-coil domain and Tyr 177 of Bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukaemia-like disease by Bcr-Abl**. *Blood*. 99:2957-2968.
- ❖ Heisterkamp N., Stephenson J.R., Groffen J., Hnasen P.F., Klein A., Bartram C.R., Grosveld G. (1983). **Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia**. *Nature*. 306:239-242.
- ❖ Hubbard SR. (1997). **Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase complex with peptide substrate and ATP analog**. *EMBO*.16: 5575-5582.

- ❖ Hubbard SR., Wei L., Ellis L., Hendrickson WA. (1994). **Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor.** Nature. 372: 746-754.
- ❖ Huse M., Kuriyan J. (2002). **The conformational plasticity of protein kinases.** Cell 3;109(3): 275-282.
- ❖ Jacob RE., Zhang J., Gray NS., Engen JR. (2011). **Allosteric interactions between the myristate - and ATP- site of the Abl kinase.** PLoS ONE 6, e15929.
- ❖ Kelly SM., Price NC. (2000). **The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function.** Current Protein and Peptide Science. 1: 349-384.
- ❖ Kuriyan J., Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller WT., Clarkson B. (2000). **Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase.** Science. 289: 1938-1942.
- ❖ Ladbury JE. (2010) **Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design.** Biochem Soc Trans. 38: 888-893.
- ❖ Lauren LP., George DR. (2012). **A thermodynamic definition of protein domains.** PNAS. 109:9420-9425.
- ❖ LaVallie ER., DiBlasio EA., Kovacic S., Grant KL., Schendel PF., McCoy JM. (1993). **A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm.** Bio/Technology. 11; 187-193.
- ❖ Levinson NM., Boxer SG. (2012) **Structural and spectroscopic analysis of the kinase inhibitor busotinib and an isomer of busotinib binding to Abl tyrosine kinase domain.** PLoS ONE. 7(4): e29828. Doi:10.1371/journal.pone.0029828.

- ❖ Manning G., Whyte DB., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002) **The protein kinase complement of the human genome.** Science 298: 1912-1934.
- ❖ McWhirter JR., Wang JYJ.(1991) **An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukaemias.** The EMBO Journal. 12:1533-1546.
- ❖ McWhirter JR., Galasso DL., Wang JYJ. (1993). **A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins.** Mol Cell Biol. 13:7587-7595.
- ❖ Muller AJ., Young JC., Pendergast AM., Pondel M., Landau NR., Littman DR., Witte ON. (1991). **BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias.** Mol Cell Biol. 11(4): 1785-1792.
- ❖ Murphy KP., Bhakuni V., xie D., Freire E. (1992). **Molecular basis of cooperativity in protein folding. III. Structural identification of cooperative folding units and folding intermediates.** J Mol Biol. 5;227(1): 293-306.
- ❖ Nagar B. (2007). **c-Abl Tyrosine kinase and inhibition by the cancer drug imatinib (Gleevec/STI-571).** The Journal of Nutrition. 22: 1518S-1523S.
- ❖ Nagar B., Hantschel O., Young MA., Scheffzek K., Veach D., Bornmann W., Clarkson B., Superti-Furga G., Kurijan J. (2003). **Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase.** Cell 112: 859-871.
- ❖ Noble MEM., Endicott JA., Johnson LN. (2004). **Protein kinase inhibitors: insights into drug desing from structure.** Science. 303:1800-1805.
- ❖ Nowell P. C., Hungerford P.A. (1960). **A minute chromosome in human granulocytic leukaemia.** Science. 142:1497.

- ❖ Panjarian S., Iacob RE., Chen S., engen JR., Smithgall TE. (2013). **Structure and dynamic regulation of Abl kinases.** J Biol Chem. 22; 288(8): 5443-5450.
- ❖ Pisabarro MT., Serrano I., Wilmanns M. (1998). **Cristal structure of the Abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions.** J. Mol. Biol. 281: 513-521.
- ❖ Rowley J.D. (1973). **A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining.** Nature. 243: 290-293.
- ❖ Schlessinger J., Yarden Y. (1987). **Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intramolecular allosteric activation.** Biochemmistry 26(5): 1434-1442.
- ❖ Seeliger MA., Young M., Henderson MN., Pellicena P., King DS., Falick AM., Kuriyan J. (2005). **High yield bacterial expression of active c-Abl and c-Src tyrosine kinases.** Protein Scienc. 14:3135-3139.
- ❖ Shah NP., Nicoll JM., Nagar B., Gorre ME., Paquette RL., Kuriyan J., Sawyers CL. **Multiple BCR-ABL kinase domains mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor Imatinib (STI571) in chronic myeloid leukaemia.** Cancer Cell 2:117-125.
- ❖ Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Canaani E. (1985). **Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia.** Nature. 315: 350-355
- ❖ Velazquez-Campoy A., Leavitt SA., Freire E. (2004). **Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry.** Methods Mol Biol. 261: 35-54.
- ❖ Velazquez-Campoy A., Freire E. (2005). **ITC in the post-genomic era...? Priceless.** Biophys Chem. 1;115 (2-3): 115-124.



- ❖ Zhang X., Subrahmanyam R., Wong R., Gross AW., Ren R. (2001). **The NH2-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl.** Mol Cell Biol. 21:840-853.
- ❖ Zippel R., Sturani E., Toschi L., Naldini L., Alberghina L., Comoglio P. (1986). **In vivo phosphorylation and dephosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor studied by immunoblot analysis with phosphotyrosine antibodies.** Biochim Biophys Acta. 19;881(1): 54-61.