



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**Caracterización energética del reconocimiento de ATP**

**por el dominio catalítico de la enzima oncogénica**

**tirosina-cinasa c-Src humana**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**JULIO CÉSAR MACÍAS BUCIO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ**

**ASESOR INTERNO:  
DR. CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDÓN**

Ciudad de México, Noviembre 2019



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 y asesoramiento del Dr. Christian Axel Luviano Jardón. 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 IN205018, del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyecto 235831, así como de la beca interna para alumnos de licenciatura del Instituto de Química. Se agradece el apoyo de las técnico-académicas, la Dra. Patricia Cano Sánchez, Q. Rocío Patiño Maya y M. C. Lucero Ríos Ruiz del Instituto de Química, UNAM.



## **Agradecimientos**

Al Dr. Enrique García Hernández y al Dr. Christian Axel Luviano Jardón por su apoyo y amistad, que sin su ayuda la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A mi familia, amigos y profesores, gracias por acompañarme durante este trayecto.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Abreviaturas y símbolos</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	3
<b>1. Marco teórico</b> .....	4
1.1. Generalidades estructurales de c-Src.....	4
1.2. Asociación de c-Src en el cáncer.....	8
1.3. Fármacos inhibidores de c-Src.....	10
1.4. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes.....	13
1.5. Termodinámica de la interacción proteína-ligando.....	16
1.6. Calorimetría de titulación isotérmica.....	21
1.7. Dicroísmo circular.....	24
1.8. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	30
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	32
<b>3. Hipótesis</b> .....	32
<b>4. Objetivos</b> .....	32
4.1. Objetivo general.....	32
4.2. Objetivos particulares.....	32
<b>5. Material y método</b> .....	33
5.1. Soluciones y reactivos.....	33
5.2. Replicación y purificación de vectores de expresión.....	34
5.3. Transformación de bacterias.....	35
5.4. Sobreexpresión del dominio cinasa recombinante de c-Src.....	35
5.5. Purificación del dominio cinasa de c-Src.....	36
5.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	37
5.7. Cuantificación de muestras.....	37
5.8. Calorimetría de titulación isotérmica.....	38
5.9. Mediciones de dicroísmo circular.....	39
5.10. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	40
<b>6. Resultados</b> .....	41
6.1. Purificación del dominio cinasa recombinante de c-Src.....	41
6.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	42
6.3. Dicroísmo circular.....	43
6.4. Calorimetría de titulación isotérmica.....	46
6.4.1. Dominio catalítico de c-Src y el ATP.....	46
6.4.2. Calcio y el ATP.....	49
<b>7. Discusión de resultados</b> .....	52
7.1. Obtención del dominio catalítico recombinante de c-Src.....	52
7.2. Estabilidad y plegamiento del dominio catalítico de c-Src.....	53
7.3. Energética de la interacción entre el ATP y el calcio.....	54
7.4. Energética de la interacción entre el dominio catalítico de c-Src y el ATP.....	56
<b>8. Conclusiones</b> .....	59

9. <b>Perspectivas</b> .....	60
10. <b>Referencias</b> .....	61

## Abreviaturas y símbolos

**A<sub>280</sub>**: Absorbancia a 280 nanómetros  
**AbI**: Tirosina cinasa (Abelson Leukemia virus homologe protein kinase)  
**ADN**: Ácido desoxirribonucleico  
**ADP**: Adenosin bifosfato  
**ALL**: Leucemia linfobástica aguda  
**ATP**: Adenosin trifosfato  
**c**: Concentración  
**Ca-ATP**: Complejo de calcio-adenosin trifosfato  
**CaCl<sub>2</sub>**: Cloruro de calcio  
**CML**: Leucemia crónica mieloide  
**c-Src**: Cinasa Src  
**d**: Paso óptico  
**DC**: Dicroísmo circular  
**DTT**: Ditiotreititol  
**ε<sub>280</sub>**: Coeficiente de extinción molar a 280 nanómetros  
**FDA**: Del inglés *Food and Drug Administration*  
**G**: Energía libre de Gibbs  
**H<sup>+</sup>**: Protón  
**HCl**: Ácido clorhídrico  
**HPLC**: Cromatografía de líquidos de alta resolución  
**IC<sub>50</sub>**: Concentración inhibitoria 50  
**IPTG**: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido  
**ITC**: Del inglés *Isothermal Titration Calorimetry*  
**K<sub>a</sub>**: Constante de asociación  
**K<sub>d</sub>**: Constante de disociación  
**KS**: Kanamicina y estreptomina  
**l**: Longitud de onda  
**LB**: Medio Luria Bertani  
**Lys295**: Lisina 295  
**M θ**: Elipticidad molar  
**MALDI-TOF**: Del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*  
**MH<sup>+</sup>**: Ion molecular  
**MW**: Masa molecular  
**NaCl**: Cloruro de sodio  
**OD<sub>600</sub>**: Densidad óptica a 600 nanómetros  
**PAGE**: Gel de electroforesis  
**pH**: Potencial de hidrógeno  
**Ph<sup>+</sup>**: Cromosoma Filadelfia positivos  
**PMF**: Del inglés *Peptide Mass Fingerprinting*  
**PMSF**: Fenilmetilsulfonilo fluoruro  
**R**: Constante de los gases  
**RNA**: Ácido rribonucleico  
**SDS-PAGE**: Gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes  
**SH1**: Dominio de homología a Src 1

**SH2:** Dominio de homología a Src 2  
**SH3:** Dominio de homología a Src 3  
**SH4:** Dominio de homología a Src 4  
**T:** Temperatura  
**TRIS:** Tris(hidroximetil)aminometano  
**Tyr419:** Tirosina 419  
**Tyr530:** Tirosina 530  
**UV:** Ultravioleta  
**YEEI:** Secuencia tirosina-ácido glutámico-ácido glutámico-isoleucina  
 **$\Delta A$ :** Diferencia de absorbancias  
 **$\Delta C_p$ :** Cambio en la capacidad calorífica  
 **$\Delta G_a$ :** Cambio en la energía libre de Gibbs  
 **$\Delta H_a$ :** Cambio en la entalpía  
 **$\Delta H_{int}$ :** Cambio en la entalpía intrínseca  
 **$\Delta H_{solv}$ :** Cambio en la entalpía de solvatación  
 **$\Delta S_a$ :** Cambio en la entropía  
 **$\Delta S_{conf}$ :** Cambio en la entropía conformacional  
 **$\Delta S_{roto-tras}$ :** Cambio en la entropía roto-traslacional  
 **$\theta$ :** Elipticidad  
 **$\theta_{Obs}$ :** Elipticidad observada

## Resumen

La desregulación de la actividad tirosina cinasa de c-Src conduce a distintos trastornos como el cáncer de colon, pulmón, páncreas, próstata, mama y ovario, por lo que se ha vuelto un importante blanco farmacológico en los últimos años. Debido a esto se han diseñado fármacos inhibidores de c-Src, con la característica común de actuar sobre el sitio de unión a ATP.

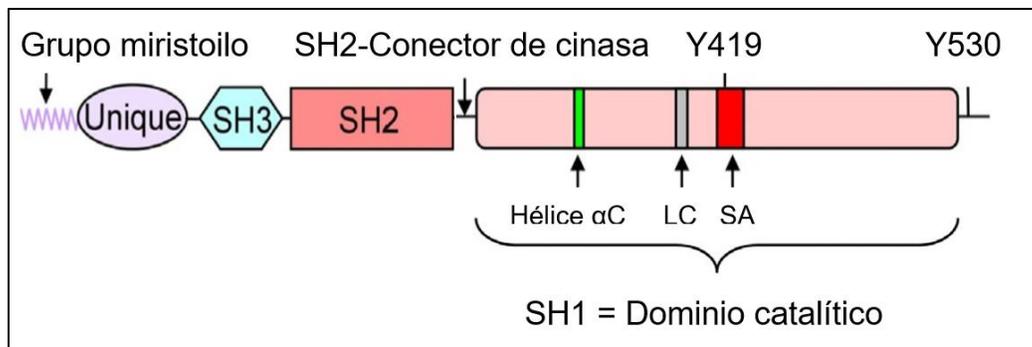
En este trabajo se realizó la sobreexpresión y purificación del dominio catalítico recombinante de c-Src humana en sistema de bacteria, con un rendimiento del orden de miligramos. Se realizó la caracterización del dominio catalítico mediante dicroísmo circular y reveló un espectro típico de  $\alpha/\beta$  proteínas. Al realizar el perfil de desplegamiento térmico se encontró una transición monofásica e irreversible. El peso molecular experimental del dominio fue obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, con un resultado de 32.3 kDa que sólo difiere en 0.3 kDa con el teórico de 32.6 kDa. La caracterización energética fue realizada mediante calorimetría de titulación isotérmica, la cual nos brindó los parámetros termodinámicos de la interacción entre el dominio catalítico de c-Src y el complejo Ca-ATP a diferentes temperaturas. La interacción de c-Src y el Ca-ATP resultó entálpicamente dirigida. Se comprobó además que, la unión del ATP a la proteína requiere de un metal divalente que se acompleje con el ligando. La caracterización termodinámica entre calcio y el ATP, resultó en una unión endotérmica espontánea y entrópicamente dirigida.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Generalidades estructurales de c-Src

Las enzimas tirosina-quinasas no receptoras Src constituyen una familia de proteínas esenciales presentes en todas las células animales.<sup>1</sup> La activación de estas proteínas es compleja y es regulada por diversos factores de crecimiento, citocinas, receptores antigénicos y de adhesión. La familia está compuesta por once miembros que incluyen a las cinasas c-Src, Fyn, Yes, Fgr, Blk, Hck, Lck, Lyn, Frk, Srm y Brk.<sup>2</sup> Estos miembros además de compartir una estructura modular muy conservada, también comparten el dominio SH4, que es una región en el extremo N-terminal orientada hacia la membrana celular.<sup>3,4,5</sup> Los once miembros de la familia Src son proteínas multidominio con un alto grado de conservación, incluyen un segmento N-terminal miristoilado, seguido de los dominios SH3, SH2 y un dominio catalítico. Una característica distintiva de esta familia es un corto fragmento C-terminal.<sup>3,6,7</sup>

La tirosina cinasa c-Src es una proteína de 536 aminoácidos y sus elementos estructurales tienen el siguiente orden: un grupo miristoilo, un dominio único (comúnmente llamado SH4) de alrededor de 80 aminoácidos, el dominio de homología SH3, el dominio de homología SH2, un “*linker*” o conector SH2-dominio cinasa, y un dominio tirosina-quinasa o dominio catalítico (también llamado SH1) (**Figura 1**).<sup>1,2,8</sup>



**Figura 1. Organización de la tirosina-cinasa c-Src humana.<sup>2</sup>**

El grupo miristoilo es necesario para que c-Src lleve su actividad catalítica de manera normal, además de que facilita su fijación a la membrana, lugar donde suele encontrarse. El grupo miristoilo puede verse sustituido en ocasiones por un grupo palmitoilo, que cumple con la misma función que el primer grupo.<sup>9</sup>

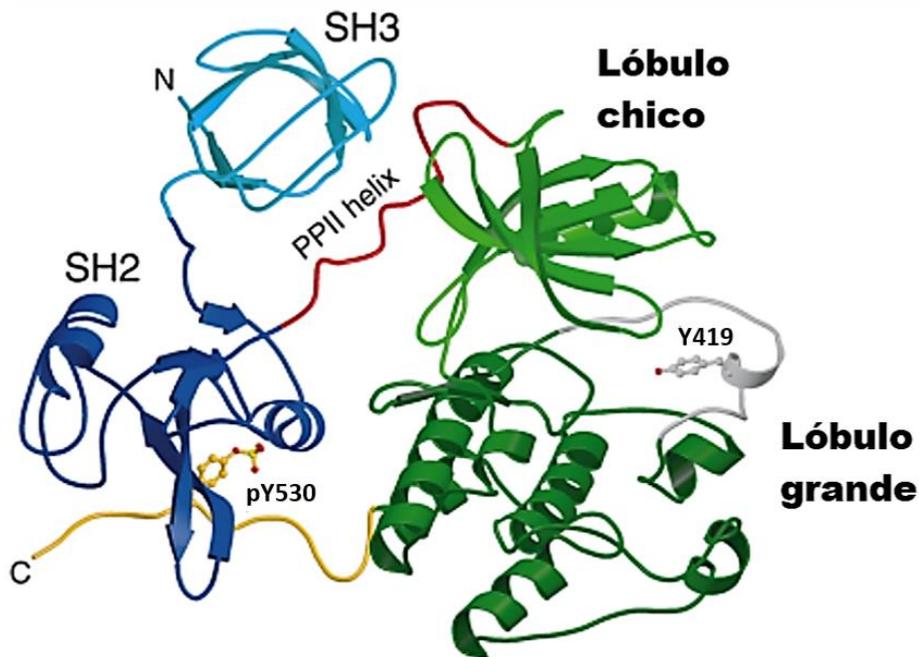
El dominio de homología a c-Src 2 (SH2) está conformado por alrededor de 100 aminoácidos, y consiste en una hoja- $\beta$  central plegada en tres partes con una  $\alpha$ -hélice empaquetada hacia cada lado. El dominio SH2 forma dos sitios de reconocimiento, ambos a manera de cavidades, uno que coordina la unión a fosfotirosina, y otra en la cara opuesta de la hoja beta, que une a uno o más residuos hidrofóbicos desde su fragmento C-terminal a una fosfotirosina.<sup>3,8</sup> El dominio SH2 puede, sin embargo, unir una variedad de secuencias que sean distintas a la secuencia óptima que reconoce (YEEI); además al unirse de manera intramolecular a la tirosina 530 (Tyr530) produce la inhibición de la actividad cinasa debido a que promueve la interacción del dominio SH3 con los residuos de prolina localizados en el *linker* cinasa que une SH2 y el dominio catalítico. La Tyr530 puede ser fácilmente desplazada por la unión de fosfotirosinas más óptimas que pueden llevar a la activación de la enzima.<sup>2,9,10</sup>

Uno de los sitios más importantes de fosforilación es la Tyr530, ubicada a seis residuos del segmento C-terminal. Bajo condiciones *in vivo*, el 90-95% de fosforilaciones en c-Src ocurren en este sitio, que se une intramolecularmente al dominio SH2.<sup>2</sup> La principal responsable de la activación de c-Src al fosforilar la Tyr530 es la tirosina-cinasa Csk, enzima perteneciente a la familia Src.<sup>9</sup>

El dominio de homología a c-Src 3 (SH3), conformado por alrededor de 60 aminoácidos, tiene una arquitectura de barril beta conformada por cinco hebras beta antiparalelas y dos "loops" o lazos prominentes, denominados RT y n-Src loops. Este dominio se encuentra conformado por residuos aromáticos e hidrofóbicos, lo que le permite funcionar como un sitio de reconocimiento a secuencias ricas en prolina. Tales secuencias adoptan una conformación helicoidal de poliprolina tipo II al interactuar con las cadenas aromáticas en la superficie de SH3 formando complejo con este dominio y siendo así, capaz de unir ligandos con motivos que cuenten con la secuencia de prolinas.<sup>2,8,11</sup>

La familia de cinasas Src comparten la característica estructural de todas las tirosina-cinasas de un dominio cinasa bilobulado. En c-Src el lóbulo N-terminal es el más pequeño de ambos lóbulos y está conformado por cinco hebras beta y un alfa hélice denominada hélice C, que es un componente importante del mecanismo regulador en las cinasas Src (**Figura 2**). El lóbulo C-terminal resulta el mayor de ambos y es predominantemente alfa helicoidal; además, contiene el loop regulador de activación, que es el sitio de activación por fosforilación en c-Src y otras cinasas. La unión a nucleótidos y la fosfotransferencia tiene lugar en la hendidura entre los dos lóbulos.<sup>3,12</sup> El dominio cinasa de c-Src contiene la lisina

295 (Lys295) que es esencial para la unión a ATP; también cuenta con el sitio de autofosforilación, la tirosina 419 (Tyr419) que induce la máxima actividad enzimática. La autofosforilación de la Tyr419 produce el desplegamiento del dominio catalítico, reorientando el lóbulo N-terminal, lo cual permite que el lóbulo C-terminal adopte la conformación activa.<sup>9</sup>



**Figura 2. Esquema de la estructura secundaria de c-Src humana.** En azul claro el dominio SH3 y en azul oscuro el dominio SH2. El dominio catalítico es mostrado en verde claro para el lóbulo N-terminal o chico, y en verde oscuro para el lóbulo C-terminal o grande.<sup>13</sup>

Los dominios de homología SH2 y SH3 tienen cuatro funciones importantes. La primera, es que restringen la actividad catalítica de c-Src a través de interacciones intramoleculares. La segunda, es que c-Src puede ser atraída hacia sitios celulares específicos, como los endosomas, membranas perinucleares y vesículas secretoras, debido a la interacción de proteínas que cuentan con los dominios SH2 y/o SH3. Como resultado del desplazamiento intramolecular de los dominios SH2 y SH3, por la interacción con otras proteínas, se genera la

activación de la cinasa, fungiendo como tercera función. Por último, como cuarta función, c-Src puede utilizar preferencialmente a proteínas con los dominios SH2 o SH3 como sustratos de su actividad cinasa.<sup>2,14</sup>

Las cinasas, incluyendo a c-Src, llevan a cabo la siguiente reacción de catálisis:



En la reacción catalizada por la cinasa, el grupo gamma fosforilo del ATP (Adenosina trifosfato) es transferido a la proteína sustrato. Para llevar a cabo la reacción se requiere de cationes divalentes tales como el magnesio; además, basado en la naturaleza del grupo OH fosforilado, se pueden clasificar como serina, tirosina o treonina cinasas.<sup>2,15</sup>

## **1.2. Asociación de c-Src en el cáncer**

c-Src es una tirosina-cinasa citoplasmática no receptora que participa en numerosas vías de señalización al interactuar con diversos receptores con actividad de tirosina-cinasas ubicados en la membrana plasmática.<sup>14</sup> La cinasa participa en la migración celular y la motilidad a través de la interacción con integrinas, E-cadherina, y cinasas de adhesión focal. Además, c-Src participa en vías de regulación de supervivencia celular, proliferación, rearreglo del citoesqueleto, diferenciación, respuesta inmune, sistema nervioso, transcripción, y regulación de la expresión génica, así como también juega un papel importante en la formación y remodelación ósea.<sup>16,17</sup>

c-Src se expresa ubicuamente en células de animales vertebrados, sin embargo, las células del cerebro, osteoclastos y plaquetas expresan de 10 a 400

veces más de c-Src que otras células del organismo. En los fibroblastos, c-Src se encuentra unida a los endosomas, membranas perinucleares, vesículas secretoras y la cara citoplásmica de la membrana donde puede interactuar con una amplia variedad de factores de crecimiento e integrinas.<sup>2,18</sup>

La desregulación de las cinasas Src por la sobreexpresión o la hiperactivación de su actividad cinasa está estrechamente asociado con la carcinogénesis y la metástasis en distintos órganos, incluyendo el hígado, páncreas, pulmones, glándulas mamarias, ovarios, próstata y el colon, así como a glioblastoma y trastornos hematológicos.<sup>9,19,20</sup> Dado que tanto la sobreexpresión como la sobreactivación de c-Src conducen al desarrollo de cáncer, pues se ha encontrado un aumento de su actividad en distintos cánceres humanos (colon, pulmón, páncreas, próstata, mama y ovario), en los últimos años se ha incrementado la investigación clínica dirigida a c-Src como blanco terapéutico en el diseño de fármacos.<sup>16,21,22</sup>

La regulación de la actividad cinasa de c-Src se lleva a cabo por distintos mecanismos, como la activación por medio de receptores con actividad de tirosina-cinasas, y fosfatasas citoplásmicas que pueden desfosforilar la Tyr530 del extremo C-terminal para permitir la autofosforilación de c-Src. Los niveles de c-Src en la célula también son regulados por medio de la vía ubiquitina-proteosoma y a través de su localización en la célula.<sup>13,15</sup> La unión del dominio SH3 al *linker* que une al dominio SH2 y al dominio catalítico de c-Src, además de la unión de SH2 con la Tyr530 en el fragmento C-terminal, inhiben la interacción de los dominios

SH2 y SH3 con otras proteínas que pueden causar la activación de c-Src, provocando la inactivación casi total de la enzima.<sup>23,23</sup>

### 1.3. Fármacos inhibidores de c-Src

c-Src se ha vuelto un importante blanco farmacológico a pesar de no ser un conductor primario de la carcinogénesis, sino que más bien regula procesos importantes durante la migración, supervivencia e invasión de las células cancerígenas.<sup>2</sup> Por este motivo, a lo largo de los años se han seguido distintos enfoques sobre el diseño de fármacos inhibidores de cinasas específicos para c-Src, tales como péptidos, fármacos miméticos de ATP, análogos de sustratos, productos naturales, y moléculas pequeñas únicas resultado de una búsqueda en distintas bibliotecas de compuestos, así como compuestos de estructura similar a los fármacos blanco-dirigidos y por cribado virtual. Los inhibidores de c-Src de primera y segunda generación son diseñados usualmente para ser ligandos competitivos a ATP, como el Bosutinib (SKI-606, Bosulif, Wyeth) y el Dasatinib (BMS-354825, Sprycel™, Bristol-Meyers Squibb).<sup>19</sup>

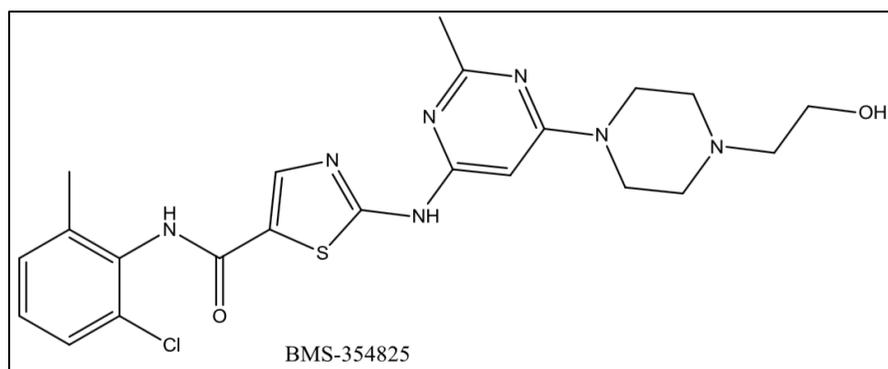
El enfoque más eficaz en el diseño de inhibidores de c-Src ha sido la producción de moléculas que se unan al sitio de reconocimiento a ATP, por lo que funcionan como moléculas competitivas al ATP.<sup>20</sup> Existen cuatro inhibidores orales efectivos para c-Src y algunas otras cinasas que se encuentran aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, US) para el tratamiento de varios tipos de cáncer. En la **Tabla 1** se muestran los fármacos utilizados para algunas de las cinasas implicadas en el proceso del cáncer, así como el tipo específico para el cual son indicados.

Fármaco	Blanco conocido	Indicaciones clínicas
Bosutinib	BCR-Abl, Src, Lyn, Hck, Kit, PDGFR	Leucemia mieloide crónica Ph+, Leucemia linfoblástica aguda Ph+, cáncer de mama, glioblastoma.
Dasatinib	BCR-Abl, Src, Fyn, Yes, Lck, Arg, Kit, EphA2, EGFR, PDGFR $\beta$	Leucemia mieloide crónica Ph+, Leucemia linfoblástica aguda Ph+, cáncer de mama, colorrectal, endometrial, de ovarios, de garganta y de pulmón, glioblastoma, melanoma.
Ponatinib	BCR-Abl, Familia de cinasas Src, VEGFR, PDGFR, FGFR, Eph, Kit, RET, Tie2, Flt3	Leucemia mieloide crónica Ph+, Leucemia linfoblástica aguda Ph+, cáncer de pulmón y tiroides.
Vandetanib	RET, Familia de cinasas Src, EGFR, VEGFRs, Brk, Tie2, EphRs	Cáncer medular de tiroides, mama, garganta, hígado.
Saracatinib (AZD0530)	Src, BCR-Abl	Cáncer colorrectal, gástrico, de ovario, de pulmón y osteosarcoma en pulmón.
AZD0424	Src, BCR-Abl	En ensayos clínicos para distintos tumores sólidos.

**Tabla 1. Fármacos orales inhibidores de c-Src.<sup>2</sup>**

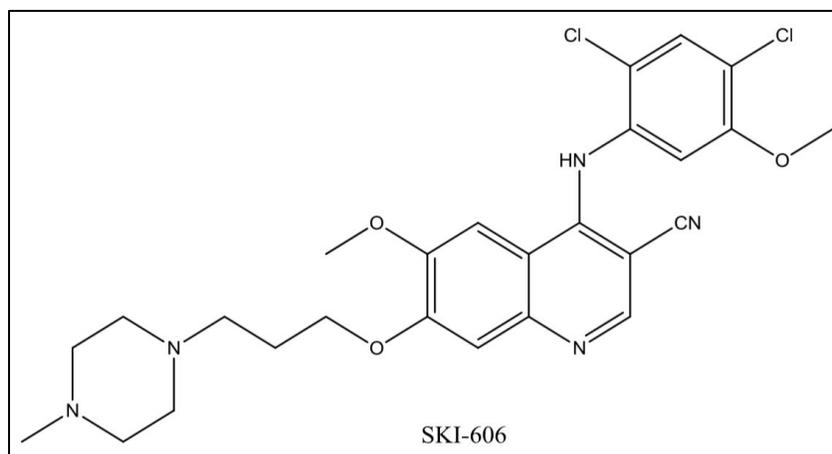
El dasatinib (**Figura 3**) es una benzamida que funciona como inhibidor de c-Src con un rango de actividad nanomolar ( $IC_{50}=0.5nM$ ) y que además ha mostrado actividad hacia otras cinasas como Bcr-Abl.<sup>25</sup> También ha sido probada su actividad *in vivo* e *in vitro* contra células con cáncer dependiente de c-Src y se encuentra aprobado su uso por la FDA como fármaco de elección en el tratamiento de la leucemia crónica mieloide (CML), mientras que se encuentra en etapas clínicas para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL) y algunos tumores sólidos. El dasatinib se une con una alta afinidad al sitio de unión a ATP en el dominio catalítico de c-Src, específicamente el grupo benzamida se une a la cavidad hidrofóbica. El dasatinib ha mostrado una actividad altamente eficaz en la

disminución de la actividad cinasa de c-Src en cáncer prostático, así como disminución de funciones celulares en células malignas (adhesión, migración e invasión).<sup>19</sup>



**Figura 3. Estructura del Dasatinib (BMS-354825, Sprycel™).**<sup>26</sup>

El bosutinib (**Figura 4**) perteneciente al grupo de las bezamidas, tiene alta efectividad como inhibidor de la actividad cinasa de c-Src ( $IC_{50}=1.1nM$ ) y, además, es efectivo contra Abl.<sup>26</sup> Este fármaco presenta selectividad para inhibir a c-Src sobre las cinasas que no pertenecen a la familia Src. El bosutinib es un fármaco activo por vía oral en modelos de xenoinjertos para cáncer de colon, y reduce la autofosforilación de c-Src (en Tyr419) en algunos modelos de cáncer de colon, por lo cual ha sido aprobado por la FDA como el fármaco de elección para tratamiento de cáncer colorrectal, para pacientes con cromosoma Filadelfia positivos (Ph<sup>+</sup>) en CML y para ALL. Se ha encontrado que el bosutinib es capaz de suprimir la migración e invasión en células de cáncer de mama y en glioblastoma, por lo que se encuentra en etapas clínicas para su aprobación como tratamiento.<sup>2,19</sup>



**Figura 3. Estructura del Bosutinib (SKI-606).<sup>26</sup>**

#### **1.4. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes**

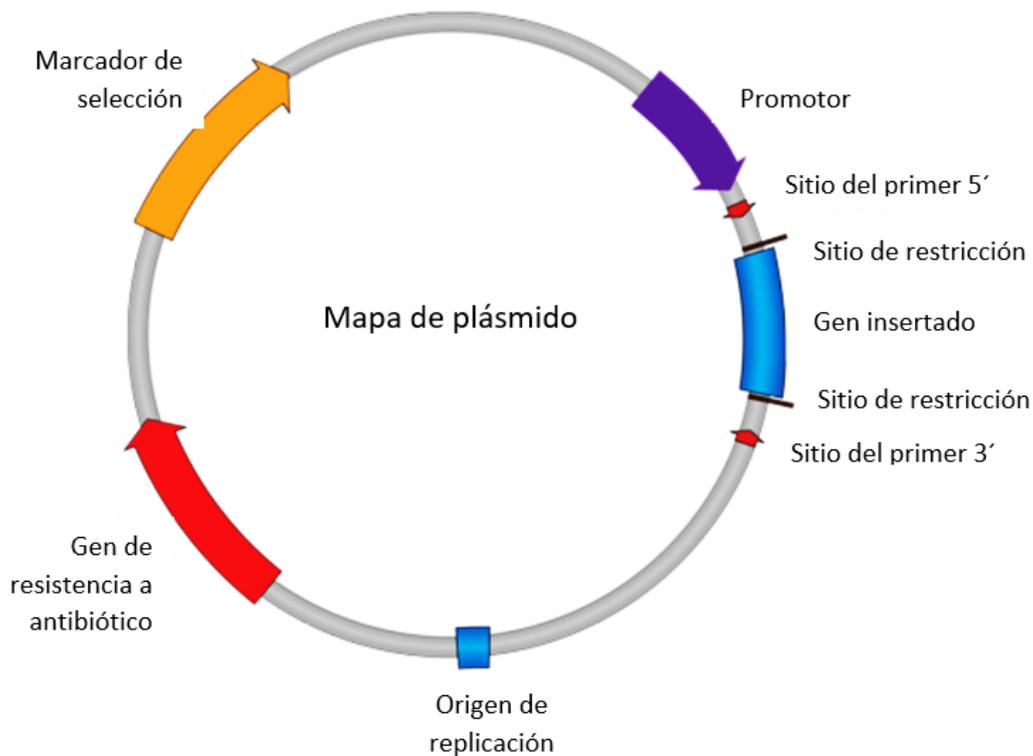
El descubrimiento y la optimización de muchos fármacos inhibidores de cinasas requiere tanto de técnicas clásicas en la búsqueda de moléculas, así como de las aportaciones que las técnicas de estudio actuales nos brindan. El diseño de pruebas bioquímicas, el análisis del mecanismo de acción de los fármacos inhibidores, y la correcta determinación de los blancos farmacológicos proveen la información necesaria para la optimización de moléculas y requieren de algo en común, proteínas recombinantes. Es claro que la necesidad de las proteínas recombinantes en el proceso de descubrimiento de fármacos es alta, gracias a estas proteínas se pueden realizar ensayos bioquímicos que permiten obtener información sobre la estructura, comportamiento y función de una proteína, lo que a su vez permite visualizar en muchas ocasiones el mecanismo de acción del fármaco y el sitio específico de unión en la proteína, todo ello necesario para el diseño de fármacos blanco-dirigidos con mayor afinidad y selectividad.<sup>27,28,29</sup>

Las proteínas son moléculas complejas en términos de estructura y función, y actualmente no pueden ser sintetizadas químicamente. Por lo tanto, las proteínas son manufacturadas mediante procesos biológicos, usualmente utilizando células huésped. Las proteínas sintetizadas dentro de células huésped de una especie distinta a donde proviene su forma nativa son consideradas como proteínas recombinantes, dado que el ADN (Ácido desoxirribonucleico) codificado ha sido recombinado o manipulado mediante ingeniería genética. El uso de proteínas recombinantes resulta crucial para la producción de fármacos, ya que son necesarias para la determinación estructural de blancos farmacológicos.<sup>30</sup>

Las bacterias son comúnmente utilizadas para la producción de proteínas recombinantes, siendo responsables de aproximadamente el 30% de la producción de biofármacos en el mercado. Siempre que no se requieran modificaciones post-traduccionales, las bacterias resultan un excelente sistema de expresión por su relativa simplicidad como por su fisiología. Además, los sistemas bacterianos suelen ser más económicos que los sistemas eucariontes dado el menor costo del medio de cultivo y el menor tiempo del proceso. La bacteria más utilizada para la producción de proteínas recombinantes es *Escherichia coli*, una enterobacteria que cuenta con un amplio linaje de seguridad en laboratorios e industria. *E. coli* es un hospedero particularmente adecuado debido a que está metabólica y fisiológicamente bien caracterizada, además de que es uno de los primeros microorganismos en tener su genoma completo secuenciado; además existen muchas herramientas disponibles para la modificación de su secuencia de

ADN. *E. coli* es un buen vehículo costo-beneficio para la producción de proteínas recombinantes y es reconocida por autoridades farmacéuticas reguladoras.<sup>29,30,31</sup>

El procedimiento para producir una proteína recombinante consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés en un vector de sobreexpresión (plásmidos, virus, cósmidos). El vector tiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula hospedera, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés, un sitio de clonación múltiple, que es una región que contiene diversos sitios de restricción que le permiten la inserción de ADN entre ellos y en algunos casos, genes de resistencia a antibióticos y genes reporteros, que facilitan la selección de las colonias bacterianas que tendrán el vector con la información genética insertada.<sup>32</sup>



**Figura 5. Estructura común de un plásmido.<sup>33</sup>**

Para iniciar el procedimiento de expresión, se lleva a cabo una ligación que permite insertar dentro del sitio de clonación múltiple del vector, un segmento de ADN que corresponde al marco de lectura funcional, que contiene la información para la proteína de interés. Al producto de este vector, más el fragmento de ADN codificante (inserto), se denomina construcción. Se procede con la transformación, realizada al insertar la construcción dentro de la célula hospedera.<sup>32</sup> Por último, la sobreexpresión se refiere a la producción masiva de la proteína llevada a cabo por las bacterias; generalmente la región promotora se regula por el modelo del operón *lac* en bacteria y *gal* en levadura, con lo cual se regula el momento de la sobreexpresión, y al añadir un inductor como el isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, análogo de la lactosa no hidrolizable) o galactosa, el promotor deja de estar reprimido e inicia la síntesis de la proteína recombinante.<sup>34,35</sup>

Los pasos más importantes para la producción de una proteína recombinante son entonces, el diseño del vector, la correcta selección de la cepa productora, un buen cultivo bacteriano y una óptima purificación de la proteína.<sup>36</sup>

### **1.5. Termodinámica de la interacción proteína-ligando**

El reconocimiento molecular se refiere al proceso en el cual las biomacromoléculas interactúan entre sí o con distintas moléculas pequeñas por medio de interacciones no covalentes para formar un complejo específico. Este proceso cuenta con dos características que lo definen; la especificidad, la cual distingue entre el ligando más y menos específico a la molécula, y la afinidad, la cual determina que un ligando de interacción débil a una alta concentración no es

capaz de desplazar un ligando de gran interacción y baja concentración. Las proteínas son una clase importante de biomacromoléculas que realizan sus funciones al unirse a otras moléculas, ésta nueva molécula se conoce como ligando. El conocimiento de los mecanismos responsables del reconocimiento, unión e interacción proteína-ligando facilita el descubrimiento, diseño y desarrollo de fármacos.<sup>37</sup>

La gran cantidad de cambios energéticos que ocurren durante la interacción de una proteína y su ligando dependen de múltiples propiedades específicas al sistema, como los estados de protonación, la unión a cationes metálicos, cambios conformacionales y entrópicos de un ligando a otro, entre otros. Asimismo, existen varias interacciones involucradas en el proceso de unión, como las interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.<sup>38</sup>

Al interactuar una proteína (P) y un ligando (L) con mutua afinidad en solución y formar un complejo proteína-ligando (PL), la reacción se representa como **(ec. 1)**:



Esta reacción estará descrita por una constante de asociación ( $K_a$ ), y una constante de disociación ( $K_d$ ), que funcionan como las constantes de la cinética de reacción describiendo el proceso de unión y disociación del complejo P-L. La ecuación que describe la  $K_a$ , y que le interesa a nuestro grupo de trabajo, es la siguiente:

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

Las fuerzas que dirigen la asociación entre una proteína y un ligando son el resultado conjunto de la variedad de interacciones e intercambios energéticos entre la proteína, el ligando, el agua y los iones del amortiguador. La energía libre de Gibbs ( $G$ ) es una medida de la capacidad del sistema de realizar el máximo trabajo a una temperatura y presión constantes; dado que la estabilidad de un complejo proteico está dada por el cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_a$ ) del complejo formado y de las moléculas libres, la distribución de especies en equilibrio y presión constantes se asocia como sigue:

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

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

Tal como en cualquier proceso espontáneo, la formación del complejo toma lugar únicamente cuando el cambio en la energía libre de Gibbs del sistema es negativo a presión y temperatura constantes. El grado de formación de complejo está determinado por qué tan alto o bajo sea el valor negativo del cambio de energía libre, que además determina la estabilidad del complejo y a la vez la afinidad del ligando por la proteína. Entre más negativo el valor de  $\Delta G_a$ , más favorable la reacción.<sup>38</sup>

El cambio de energía libre está relacionado con el cambio en la entalpía ( $\Delta H_a$ ), que representa el calor liberado con la formación de enlaces o, el calor liberado con la ruptura de estos; la energía libre también está relacionada con el

cambio en la entropía ( $\Delta S_a$ ), que representa los cambios en los grados de libertad en el sistema a la unión del ligando. La relación de los parámetros termodinámicos está dada por:

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

El valor en el cambio de la entalpía es negativo en un proceso exotérmico, mientras que será positivo en un proceso endotérmico. Para un proceso de unión, el cambio en la entalpía se refiere como entalpía de enlace y dicta el cambio energético cuando un ligando se une a una proteína por interacciones no covalentes como las fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, y la fuerza iónica, entre otras interacciones en la interfase de unión. Estas interacciones entre la proteína y el ligando generan una contribución entálpica favorable y forman parte del cambio intrínseco de entalpía ( $\Delta H_{int}$ ). La solvatación de grupos polares y no polares generan una contribución entálpica desfavorable y forman parte del cambio entálpico de solvatación ( $\Delta H_{solv}$ ). La contribución total a la entalpía de unión está dada por:<sup>39</sup>

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

La entropía es una medida del desorden o la aleatoriedad de los átomos y moléculas en un sistema. El cambio en la entropía ( $\Delta S_a$ ) es una propiedad termodinámica que muestra cambios positivos o negativos en un sistema a través de la ganancia o pérdida de grados de libertad, respectivamente. El cambio total de la entropía de unión consta de tres términos entrópicos; la entropía de solvatación ( $\Delta S_{solv}$ ), que representa el incremento en el cambio de entropía debido

a la liberación de solvente tras la unión de un ligando, usualmente una contribución favorable a la entropía de unión gracias a su gran valor positivo; la entropía conformacional ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ), que representa el grado de libertad conformacional de la proteína y el ligando tras la unión, puede ser una contribución favorable o desfavorable a la entropía de unión, dependiendo de si el grado de libertad del complejo incrementa o disminuye en comparación al de la proteína y ligando libres; por último la entropía roto-traslacional ( $\Delta S_{\text{roto-tras}}$ ), representa la disminución del grado de libertad rotacional y traslacional de la proteína y el ligando al formar un complejo, por lo tanto contribuye desfavorablemente a la entropía de unión.<sup>38</sup>

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

Otro parámetro termodinámico importante es el cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ), que mide el cambio de energía con la temperatura a una presión constante. Puede calcularse cuando se cuenta con valores del cambio de entalpía de unión a distintas temperaturas. El cambio en la capacidad calorífica provee una conexión entre los demás parámetros termodinámicos y la información estructural de proteínas debido a la fuerte relación con el área superficial menos disponible, o de cavidades estrechas, en la formación de un complejo proteína-ligando. Así, al disminuir el área de contacto de la proteína con el solvente tras la formación de un complejo, la capacidad calorífica tendrá valor negativo, siendo una contribución favorable. Puede calcularse la capacidad calorífica determinando el valor del cambio de entalpía a distintas temperaturas.<sup>40</sup>

## 1.6. Calorimetría de Titulación Isotérmica

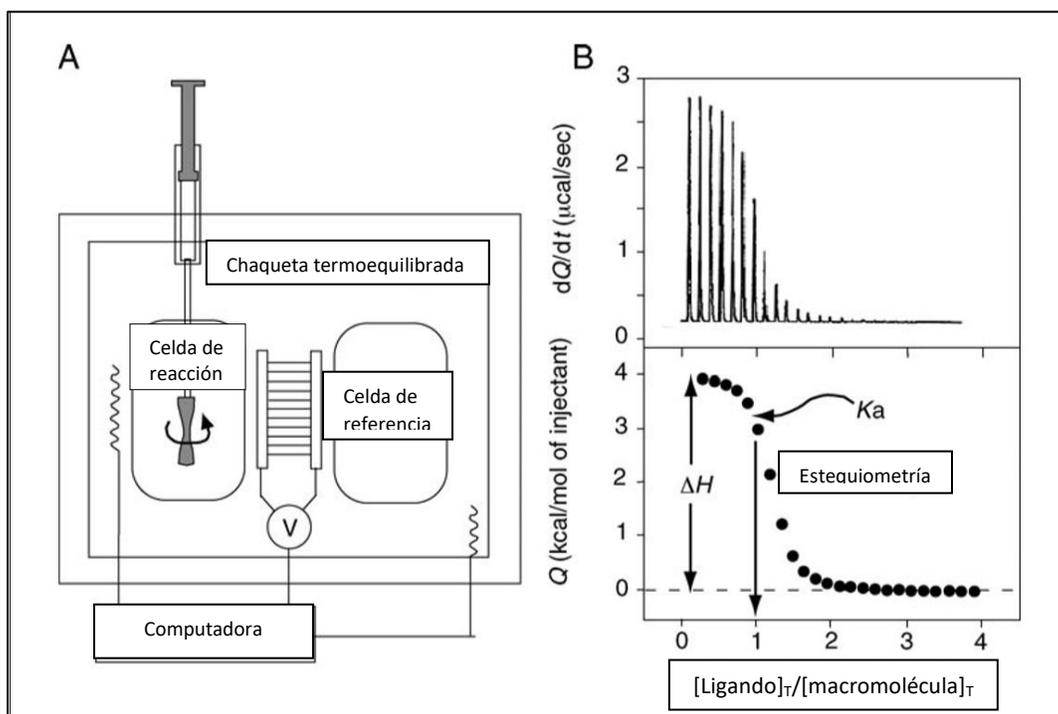
Una meta importante en el desarrollo de fármacos es diseñar inhibidores y ligandos que tengan grandes afinidades por sus moléculas objetivo. En cuanto a la optimización de las interacciones, la determinación precisa de la afinidad de unión se vuelve progresivamente más compleja una vez que llega y sobrepasa la escala nanomolar. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) puede usarse para determinar los parámetros termodinámicos de unión de un ligando a concentraciones menores al rango picomolar.<sup>41</sup> El análisis del calor de la reacción como una función de la concentración provee una caracterización termodinámica completa de la energía unión, por ello, la calorimetría de titulación isotérmica tiene la capacidad de determinar de manera precisa la afinidad de unión, la energía libre de Gibbs, la estequiometría de la reacción, la entalpía, la entropía y los cambios en el calor asociado a la unión.<sup>42</sup>

El instrumento de ITC es un calorímetro que opera de acuerdo con el principio de poder de compensación dinámica, mide la cantidad de energía ( $\mu\text{cal/seg}$ ) requerida para mantener una diferencia de temperatura constante (cercana a cero) entre la muestra en la celda de reacción y la celda de referencia. Inicialmente, el sistema de retroalimentación aplica continuamente una pequeña cantidad de energía a la celda de reacción, lo cual determina la línea base. Cada inyección de la solución en la jeringa (usualmente llamada ligando) desencadena la reacción de unión y, dependiendo de la afinidad y la concentración de los reactantes (macromolécula y ligando) en la celda de reacción, se formará una cierta cantidad de complejo. La formación de este complejo viene acompañada por

la liberación (reacción exotérmica) o la absorción (reacción endotérmica) de calor que causa una diferencia de temperatura entre la celda de reacción y la celda de referencia que contiene agua o solución amortiguadora. Luego entonces, el sistema de retroalimentación disminuye o incrementa la energía que debe aplicar a la celda de reacción para compensar el desbalance térmico. Después de cada inyección, el sistema busca el equilibrio y el balance de temperatura es reestablecido. Por lo tanto, la señal de energía guardada muestra un patrón típico de deflexiones en forma de picos. Integrando el área bajo el pico, y asumiendo la línea base como referencia, se obtiene el calor asociado a cada inyección. Conforme el reactante en la celda de reacción comienza a saturarse, la señal calorífica disminuye hasta que sólo el calor de fondo, junto con algún fenómeno inespecífico (dilución del ligando, fricción líquida, etc.) se observan.

En la **Figura 6A** podemos observar un esquema básico de un calorímetro de ITC, se muestran las dos celdas (reacción y referencia) rodeadas por una chaqueta termoequilibrada, la jeringa de inyección que también funciona como un dispositivo de agitación, y los sistemas termoestático y de retroalimentación controlados por computadora. En la **Figura 6B** de la misma figura se aprecia un experimento clásico de ITC, donde el panel superior muestra la secuencia de picos, cada uno correspondiente a cada inyección de la jeringa. Para este caso particular, el ejemplo corresponde a una reacción endotérmica y la señal monitoreada es el calor necesario que debe ser aplicado a la celda de reacción para mantener la temperatura constante y cercana a la celda de referencia con una diferencia casi de cero. El panel de la parte inferior muestra el gráfico de calor

integrado; el área debajo de cada pico, calculadas y normalizadas por mol de ligando inyectado en cada una de las inyecciones, son graficadas contra el radio molar (el cociente de la concentración total de ligando y macromolécula en la celda de reacción).<sup>43</sup>



**Figura 6. (A)** Esquema básico de instrumento de ITC. **(B)** Experimento típico de ITC.<sup>43</sup>

ITC es la única técnica experimental capaz de medir la energía de unión en sus componentes entálpicos y entrópicos, lo que permite la identificación de la naturaleza y la magnitud de las fuerzas envueltas en la unión de dos moléculas; además de que la selectividad de un compuesto, en cuanto a proteínas o la respuesta a mutaciones asociadas a fármaco-resistencia, depende en un grado significativo de su firma termodinámica, y gracias a ello se ha vuelto una tecnología clave en la optimización de compuestos, incluso por encima de otras técnicas de análisis que sólo pueden determinar la constante de afinidad de unión

e indirectamente calcular otros parámetros termodinámicos realizando experimentos a distintas temperaturas.<sup>42</sup> La calorimetría de titulación isotérmica ha incrementado su popularidad en el estudio de proteínas, ya que cuenta con algunas ventajas como que la técnica es relativamente fácil de emplear, pudiendo obtener una gran cantidad de resultados con una pequeña cantidad de proteína; en algunos casos, los valores de la constante de unión de una serie de proteínas resultan similares o casi indistinguibles, por lo que la determinación de la entropía y entalpía de la reacción nos permite un mayor grado de discriminación; aunque no es posible obtener una correlación termodinámica-estructural total de los experimentos de ITC, sí es posible obtener conclusiones sensatas de los datos al comparar cambios conformacionales sutiles de las proteínas; por último, la correlación entre la capacidad calorífica y el cambio en el área de las cavidades superficiales en la formación de una interfase proteica ha resultado una herramienta muy útil para el entendimiento de las interacciones proteicas en cuanto a estructura y termodinámica.<sup>44,45</sup>

### **1.7. Dicroísmo circular**

La interacción de una molécula quiral con la luz polarizada es muy específica y ha demostrado ser un método para la caracterización estructural tanto de moléculas pequeñas como de macromoléculas.<sup>46</sup> La determinación de estructura secundaria y terciaria de biomacromoléculas, especialmente de proteínas y ácidos nucleicos, es necesaria para conocer cómo estas moléculas adquieren su conformación nativa y funcional; debido a ello se han desarrollado múltiples técnicas que nos permiten entender cómo se forman estructuras

secundarias y terciarias, así como las interacciones no covalentes que están involucradas en la estabilidad de una biomolécula.<sup>47</sup>

El dicroísmo circular (DC) es una técnica empleada rutinariamente para entender la estructura secundaria y terciaria de proteínas, ácidos nucleicos, y estructuras mayores formadas por la asociación de estas moléculas con sus ligandos. El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que explora la diferencia en la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha sobre moléculas ópticamente activas para determinar sus configuraciones absolutas. Cuando es aplicado a proteínas en el rango de longitud de onda del UV lejano del espectro electromagnético (260-170 nm) puede ser usado para caracterizar y cuantificar el contenido de estructura secundaria en términos de  $\alpha$ -hélice, hojas- $\beta$  y estructuras sin orden definido. Esta técnica también nos permite monitorear cambios moleculares producidos por efectos ambientales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, o cambios mayores producidos por la interacción con un ligando. La señal de dicroísmo circular de residuos aromáticos de triptófano, tirosinas, y fenilalaninas son detectables en el rango cercano del UV entre 260 a 300 nm y pueden ser usados para monitorear cambios en el ambiente de estas moléculas, lo cual está relacionado con la estructura terciaria de proteínas.<sup>48,49</sup>

La diferencia resultante entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y circularmente a la derecha se expresa como absorbancia. Los instrumentos de DC se conocen como espectropolarímetros y miden la diferencia de absorción de moléculas ópticamente activas, es decir, que cuentan con al

menos un centro quiral. La absorbancia resultante se grafica como la elipticidad en el eje Y, y la longitud de onda en el eje X. Un equipo de DC sigue el esquema:

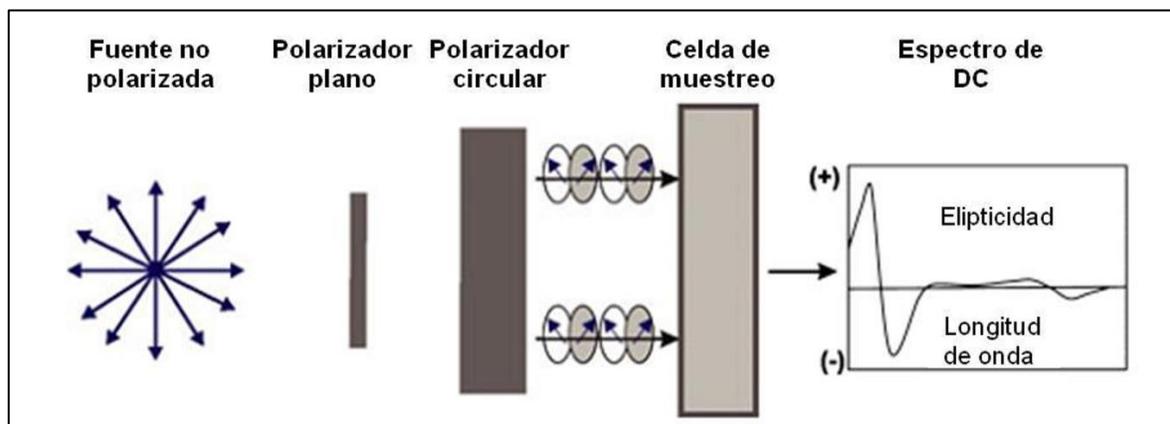


Figura 7. Esquema de DC en el que se mide la diferencia en absorbación.<sup>48</sup>

Cuando la luz pasa a través de una solución que contiene un cromóforo como una proteína quiral, la luz puede interactuar de dos maneras distintas, puede ser refractada en su paso a través de la solución o puede ser absorbida. La refracción es cuantificada por el índice de refracción ( $n$ ) de la solución, mientras que la absorción es medida con el coeficiente de extinción molar ( $E$ ). Las moléculas ópticamente activas cuentan con coeficientes de extinción molar distintos a la izquierda ( $E_L$ ) y a la derecha ( $E_R$ ) para la luz circularmente polarizada. La diferencia de los coeficientes se conoce como ( $\Delta E$ ). Con base en la ley de Lambert-Beer, la diferencia en la absorbancia de la luz polarizada circularmente a la izquierda ( $A_L$ ) y a la derecha ( $A_R$ ), puede expresarse como ( $\Delta A$ ):

$$\Delta A = A_L - A_R \Delta E c l \quad (\text{ec. 7})$$

Donde la concentración ( $c$ ) y la longitud de onda ( $l$ ) se incluyen en la ecuación 7. La diferencia de absorbancias,  $\Delta A$ , es una medida del

espectropolarímetro y se reporta generalmente en términos de elipticidad ( $\theta$ ) en grados; existe una relación numérica simple entre  $\Delta A$  y  $\theta$ :

$$\theta = 33 (A_L - A_R) \quad (\text{ec. 8})$$

Para la comparación de resultados es necesaria la molaridad, por lo que se considera la masa molecular del compuesto ( $MW$ ), la concentración ( $c$ ) en gramos/cm<sup>3</sup>, y la longitud de onda ( $l$ ) en cm, para obtener la elipticidad molar ( $M\theta$ ):<sup>49,50</sup>

$$M\theta = m \theta / 100 c l \quad (\text{ec. 9})$$

Los espectros de DC para proteínas están generalmente divididos en tres rangos de longitud de onda, basados en la energía de las transiciones electrónicas que dominan ese determinado rango. El primero, el UV lejano (debajo de 250 nm), donde predominan las contribuciones peptídicas; el segundo, el UV cercano (250-300 nm), donde predominan las cadenas laterales aromáticas; el tercero, la región UV-visible cercano (300-700 nm), donde contribuyen los cromóforos extrínsecos.

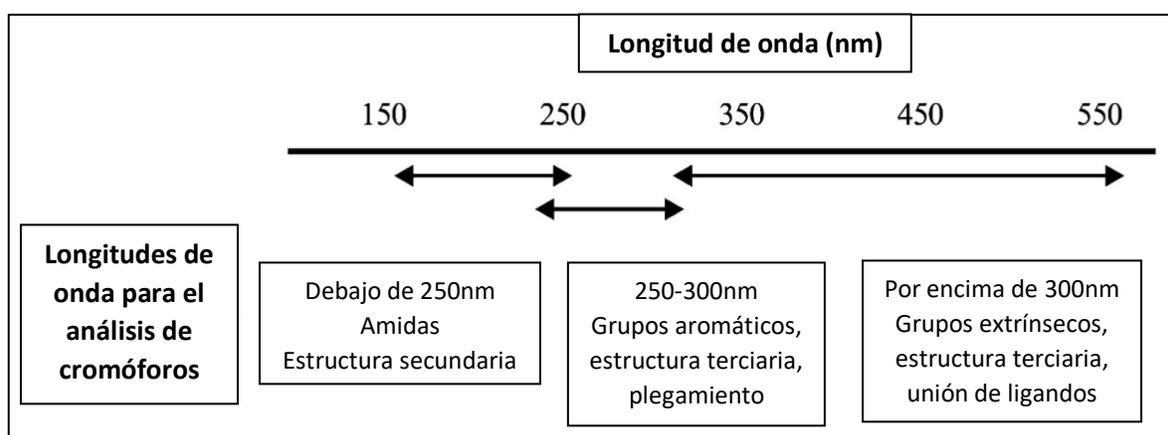


Figura 8. Regiones del espectro de DC para proteínas.<sup>51</sup>

La contribución de cromóforos intrínseca al espectro de proteínas se refiere a aquellos que son parte de la proteína, como péptidos, grupos de cadena lateral y

grupos disulfuro. Mientras que los cromóforos extrínsecos son aquellos que no son parte de la proteína, como flavinas o algún ligando que se encuentre en la solución analizada.<sup>51</sup>

La estructura secundaria de proteínas puede ser determinada a través de mediciones de DC en el UV lejano (260-170 nm), así como puede inferirse la estructura terciaria por mediciones en el UV cercano (260-350 nm). A longitudes de onda menores a 260 nm domina la absorción el enlace peptídico, específicamente por las amidas con carbonos alfa asimétricos en ambos lados del enlace peptídico, lo que induce una señal de DC y permite la interpretación de estructura secundaria. A longitudes de onda en el UV cercano comienzan a dominar la señal los aminoácidos aromáticos, como la fenilalanina entre 250 y 270 nm, la tirosina entre 270 y 290 nm, el triptófano entre 280 y 300 nm, y por último los puentes disulfuro a longitudes mayores a 300 nm que también muestran señal.<sup>49,52,53</sup>

Las amidas presentan dos transiciones débiles al ser medidas en el UV lejano, una primera  $n \rightarrow \pi^*$  que se caracteriza por ser la más débil e involucrar electrones no enlazantes del carbonilo, se presenta entre 210-230 nm y es responsable de la banda negativa a 222 nm para las hélices alfa y a 216-218 nm para hebras beta; una segunda transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  de mayor energía alrededor de los 190 nm, responsable de la banda positiva entre 193-195 nm para las hebras  $\beta$ , y las bandas positiva a 198 nm y negativa a 208 nm para las hélices  $\alpha$ .<sup>54,55</sup>

El espectro de dicroísmo circular esperado para una muestra de proteína con hélices  $\alpha$ , hebras  $\beta$  o una secuencia proteica no repetitiva o sin plegamiento

se muestra en la **Figura 9**, la medición se realiza en el UV lejano (190-260 nm) monitoreando el cambio de elipticidad molar. Cuando la proteína analizada cuenta con hélices  $\alpha$  debe presentar un máximo positivo entre 193 y 195 nm, mientras que dos mínimos negativos, uno a 208 nm y otro a 222 nm. Si la proteína cuenta con hebras  $\beta$ , debe presentar un máximo positivo a 198 nm, así como un mínimo negativo a 220 nm. Si la secuencia proteica se encuentra desplegada o no es repetitiva, exhibirá valores negativos alrededor de 195 nm y tendrá una baja elipticidad, rondando valores no lejanos a cero, alrededor de los 210 nm.<sup>50,53</sup> El espectro ejemplo en la **Figura 8** muestra los datos de proteínas conformadas por un solo tipo de estructura secundaria, pues las proteínas que contengan tanto hélices alfa como hebras beta mostraran espectros únicos de acuerdo con la concentración de cada tipo de estructura secundaria, pudiendo ser opacados algunos puntos del espectro.<sup>48</sup>

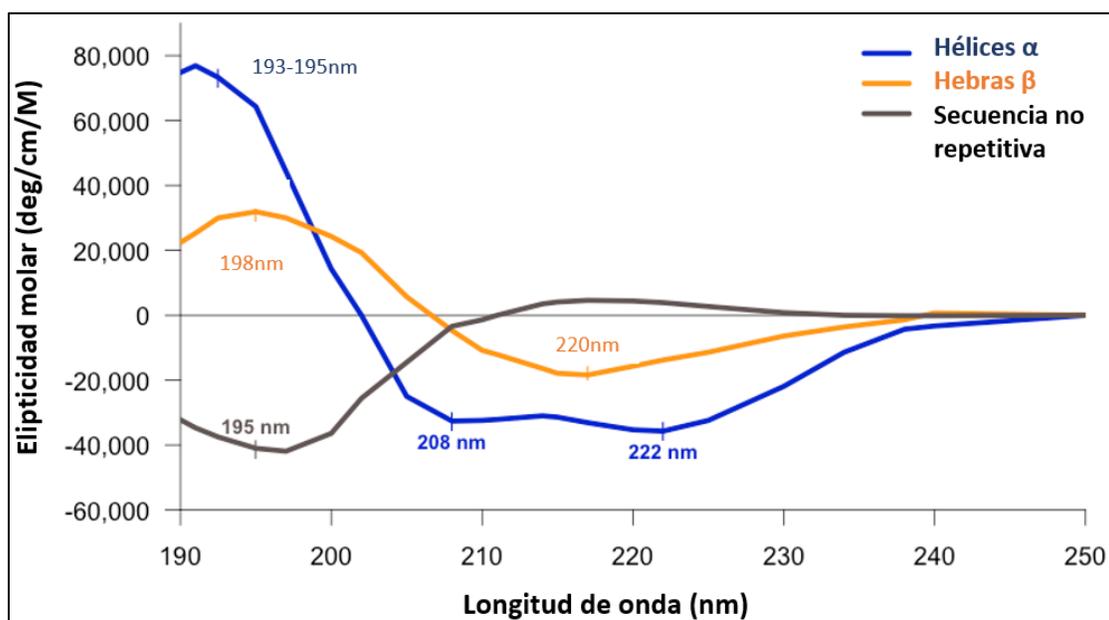
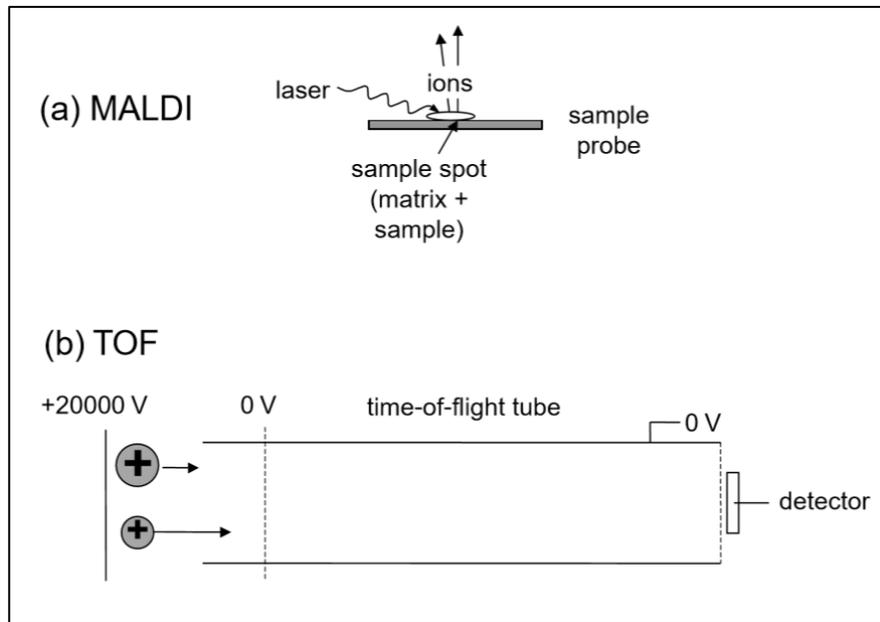


Figura 9. Espectros de DC asociados a distintos tipos de estructuras secundarias para proteínas en el UV lejano.<sup>56</sup>

## 1.8. Espectrometría de masas MALDI-TOF

La ionización MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) acoplada a un analizador TOF (*Time of Flight*) es una técnica analítica altamente competitiva para la detección y caracterización de biocompuestos, tales como péptidos, proteínas, azúcares, polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas. Esta técnica es empleada en espectrometría de masas y se basa en la ionización suave de muestras que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales. Además, la técnica no requiere de muchos pasos para la preparación de muestras, es capaz de analizar mezclas y requiere de cantidades del orden picomolar de proteínas.<sup>57,58</sup>

En esta técnica la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal, de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser (frecuentemente un láser pulsado de nitrógeno a 337 nm) en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H<sup>+</sup> (protones) a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, favoreciendo especies monocargadas que son analizadas mediante TOF. Los iones son enviados a través de un tubo de vuelo debido a pulsos de alto voltaje, donde se separan de acuerdo con su energía cinética. El analizador TOF permite la determinación de la masa en una región de alto vacío mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector (**Figura 10**).<sup>59,60</sup>



**Figura 10. (a)** Esquema ilustrativo de MALDI y **(b)** el analizador TOF.<sup>60</sup>

MALDI-TOF suele ser utilizado para la identificación tanto de proteínas aisladas como de mezclas de ellas, basándose en la identificación de la masa característica de los péptidos identificados o PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*).<sup>61</sup> Previo al análisis de una muestra, esta debe ser digerida utilizando enzimas proteolíticas, tales como tripsina, quimotripsina o endoproteinasas para formar una mezcla de péptidos; si se planea identificar una sola proteína y ha sido purificada previamente por cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o mediante geles de electroforesis (PAGE) en una o dos dimensiones, se puede utilizar sin necesidad de digerir la muestra. Luego de ser analizados se comparan los valores con bases de datos que contienen la masa de proteínas digeridas específicamente con la enzima utilizada. Si los datos son confiables, se puede confirmar la identidad de una proteína si la diferencia entre la masa teórica de los residuos y la obtenida experimentalmente no son muy diferentes.<sup>62,63,64,65</sup>

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tirosina-cinasa c-Src se encuentra implicada en distintos tipos de cáncer, por lo que se ha vuelto un importante blanco farmacológico en el tratamiento de estos padecimientos. Los fármacos inhibidores de c-Src aprobados por la FDA han sido diseñados para unirse al sitio de unión a ATP en el dominio catalítico de c-Src, lo que los vuelve ATP competitivos. Por lo tanto, es relevante conocer las bases energéticas que guían la interacción del nucleótido con la enzima, con el fin de poder describir de manera cuantitativa la competencia que deben superar los inhibidores farmacológicos. Además, esta información termodinámica proveerá elementos para profundizar en la comprensión del funcionamiento de c-Src. Con este doble propósito, en este estudio realizamos una caracterización termodinámica mediante calorimetría de titulación isotérmica de la interacción del ATP con el dominio catalítico de c-Src.

## 3. HIPÓTESIS

El análisis de la firma termodinámica de interacción entre el dominio catalítico de c-Src con el ATP permitirá dilucidar aspectos moleculares subyacentes a la actividad tirosina-cinasa de la enzima.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar los determinantes energéticos de la interacción ( $\Delta G_a$ ,  $\Delta S_a$ ,  $\Delta H_a$ ), así como la  $K_a$  entre el ATP y el dominio catalítico de c-Src mediante calorimetría de titulación isotérmica.

### 4.2 Objetivos particulares

- Sobreexpresar el dominio catalítico de c-Src recombinante en un sistema bacteriano.
- Purificar el dominio catalítico de c-Src mediante cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de intercambio aniónico.
- Caracterizar al dominio catalítico de c-Src mediante dicroísmo circular para conocer su estabilidad térmica y estado conformacional.

- Determinar los parámetros energéticos de la interacción entre el dominio catalítico de c-Src y el ATP mediante calorimetría de titulación isotérmica.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1 Soluciones y reactivos

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich, Inc., en grado analítico. Los diferentes medios y amortiguadores ocupados en la producción recombinante, purificación y caracterización espectroscópica y calorimetría de la enzima son indicados en la **Tabla 2**.

<b>Medio LB (Luria-Bertani)</b>	Aforar a un litro de agua destilada los siguientes reactivos: 10 g de Triptona 10 g de NaCl 5 g de Extracto de levadura Esterilizar en autoclave.
<b>Amortiguador de lisis</b>	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 5 % Glicerol Filtrar por membrana 0.45 µm
<b>Amortiguador A columna Ni</b>	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 5 % Glicerol 30 mM Imidazol Filtrar por membrana 0.45 µm
<b>Amortiguador B columna Ni</b>	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 5 % Glicerol 500 mM Imidazol Filtrar por membrana 0.45 µm
<b>Amortiguador A columna Q</b>	50 mM TRIS-HCl 50 mM NaCl 5 % Glicerol Filtrar por membrana 0.45 µm
<b>Amortiguador B columna Q</b>	50 mM TRIS-HCl 1 M NaCl 5 % Glicerol Filtrar por membrana 0.45 µm

<b>Amortiguador para calorimetría</b>	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 5 % Glicerol 5 mM CaCl <sub>2</sub> 0.5 mM DTT Filtrar por membrana 0.45 µm
<b>Amortiguador para dicroísmo circular</b>	2 mM TRIS-HCl 100 mM NaCl 5 % Glicerol 0.5 mM DTT Filtrar por membrana 0.45 µm
<b>Amortiguador de tanque 10X</b>	250 mM TRIS base 200 mM Glicina 1 % SDS
<b>Amortiguador de carga 4X</b>	200 mM TRIS-HCl pH 8.0 400 mM DTT 40 % Glicerol 8 % SDS 0.4 % Azul de bromofenol
<b>IPTG</b>	1 M IPTG
<b>PMSF</b>	1 M PMSF
<b>DTT</b>	1 M DTT
<b>Estreptomicina</b>	2.5 % Estreptomicina
<b>Kanamicina</b>	2.5 % Kanamicina

**Tabla 2. Soluciones y reactivos.**

## **5.2 Replicación y purificación de vectores de expresión**

Los vectores de expresión pET28a-TKD-Src y pCDFDuet-1-YopH, que codifican para el dominio catalítico de c-Src y para la fosfatasa YopH, y que además brindan la resistencia a kanamicina y estreptomicina respectivamente, fueron replicados utilizando la cepa de *Escherichia coli* DH5α. Luego se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®, US) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La cepa DH5α es la cepa de *E. coli* utilizada rutinariamente en los procesos de clonación de

plásmidos con alta eficiencia; esta cepa cuenta además con las mutaciones *recA1* y *endA1* que incrementan la estabilidad de la inserción y mejoran la calidad del plásmido utilizando los kit comerciales Miniprep.<sup>66</sup>

### **5.3 Transformación de bacterias**

La cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) es utilizada para la producción de proteínas recombinantes en alta cantidad, cuenta con el lisógeno DE3, es deficiente de las proteasas Lon y OmpT, y es inducible por IPTG gracias a la polimerasa de RNA T7.<sup>67</sup> Las cepas de células químicamente competentes BL21(DE3) y DH5 $\alpha$  fueron creadas por la Dra. Patricia Cano Sánchez del Instituto de Química, UNAM.

Se realizó la cotransformación de la cepa BL21(DE3) mediante el método de choque térmico.<sup>68</sup> Alícuotas de 50  $\mu$ L de células competentes de la cepa BL21(DE3) almacenadas a -70 °C fueron descongeladas en hielo durante 5 minutos, se adicionó 1  $\mu$ L de ADN plasmídico ( $\approx$ 50 ng) y se incubaron en un baño de hielo por 30 minutos. Pasado el tiempo, fueron incubadas a 42 °C durante 45 segundos en un equipo *thermoblock* (Accublock digital dry bath, Labnet, US) y después enterradas en hielo durante 2 minutos, llevándose a cabo el choque térmico. Luego se adicionaron 200  $\mu$ L de medio LB y se dejaron recuperar durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se plaquearon las células en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C hasta el desarrollo visible de colonias transformantes ( $\approx$ 18 h).

### **5.4 Sobreexpresión del dominio catalítico recombinante de c-Src**

Se preparó un preinóculo a partir de una colonia de células cotransformantes BL21(DE3) resuspendida en 30 mL de medio LB suplementado con antibióticos (LB+KS) e incubada a 37 °C durante 6 horas a 200 rpm. Después se repartió el preinóculo en tres matraces de 2 L de capacidad conteniendo 1.5 L de medio LB+KS y se incubaron a 37 °C a 250 rpm alrededor de 6-8 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 1.0 ( $OD_{600} \approx 1$ ). Al cabo de ese tiempo fueron incubados a 18 °C durante 1 hora bajo las mismas condiciones de agitación. Se procedió a inducir los cultivos con 1 mM de IPTG y

se incubaron a 18 °C durante 18 horas, llevando a cabo así la sobreexpresión. Pasado el tiempo de incubación, se colectaron las células por centrifugación en tres tubos Falcon® de 50 mL con la misma cantidad de paquete celular, posteriormente fueron almacenadas en el congelador de un refrigerador común.<sup>7,36</sup>

### **5.5 Purificación del dominio catalítico recombinante de c-Src**

La purificación del dominio catalítico de c-Src se llevó acabo de acuerdo con el método reportado por Seeliger y col. con algunas modificaciones.<sup>7</sup> Los paquetes celulares obtenidos en el paso anterior fueron resuspendidos en 25 mL de amortiguador de lisis y posteriormente lisados mediante sonicación en un equipo Sonicator 3000 (Misonix, Inc, US) con una potencia de 5.5 watts y ciclos de 5 segundos en encendido y 30 segundos en apagado hasta completar un total de 5 minutos en encendido. El lisado fue aclarado por centrifugación a 14000 rpm durante 40 minutos para separar el detrito celular del extracto crudo (sobrenadante). El extracto crudo fue filtrado por una membrana de 0.45 µm y aplicado a una columna de afinidad a níquel HisTrap™ FF (GE Healthcare) de 5mL usando el siguiente protocolo (cada unidad de volumen corresponde a 5mL):

- i. 3 vol. de agua desionizada
- ii. 4 vol. de amortiguador A-Ni (para equilibrar la columna)
- iii. Extracto crudo-Ni (se colectó fracción No retenido-Ni)
- iv. 4 vol. de amortiguador A-Ni (se colectó fracción Lavado-Ni)
- v. 6 vol. de amortiguador B-Ni (se colectó fracción Elución-Ni)
- vi. 4 vol. de amortiguador B-Ni
- vii. 3 vol. de agua desionizada
- viii. 3 vol. de etanol al 20%

La muestra de la fracción del Extracto crudo-Ni se tomó previo al paso por la columna de afinidad a níquel. Después, la fracción Elución-Ni fue aplicada a una columna de intercambio aniónico HiTrap™ Q FF (GE Healthcare) de 5 mL usando el siguiente protocolo (cada unidad de volumen corresponde a 5mL):

- i. 3 vol. de agua desionizada
- ii. 4 vol. de amortiguador A-Q (para equilibrar la columna)
- iii. Extracto crudo-Q (se colectó fracción No retenido-Q)
- iv. 4 vol. de amortiguador A-Q (se colectó fracción Lavado-Q)
- v. 6 vol. de amortiguador B-Q (se colectó fracción Elución-Q)
- vi. 4 vol. de amortiguador B-Q
- vii. 3 vol. de agua desionizada
- viii. 3 vol. de etanol al 20%

### **5.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

Todas las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida, al 10 % para la fracción separadora y 4% para la fracción concentradora, en condiciones desnaturizantes con SDS. Se utilizó el marcador de peso molecular para proteínas BLUEstain™ 2 Protein Ladder (GoldBio, US). Las fracciones de la purificación fueron previamente preparadas mezclando 20 µL de cada fracción colectada con 20 µL de amortiguador de carga y calentadas en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Aplicadas las muestras en el gel, la migración electroforética procedió a 90 Volts durante 90 minutos hasta que el indicador de bromofenol llegara aproximadamente a 1 cm antes de salir del final del gel.

El gel fue fijado con una solución de ácido acético glacial 10%, metanol 50% y agua destilada 40% durante 15 minutos, y posteriormente teñido con una solución de azul de Comassie al 0.1%. Una vez teñido, se lavó con agua hasta eliminar el exceso de colorante.<sup>69,70</sup>

### **5.7 Cuantificación y preparación de muestras**

La fracción Elución-Q resultante de la purificación, y que contiene a nuestra proteína, se introdujo en una membrana de corte de 12-14 kDa/25 mm (Spectra/Por® 2 Dry Standard RC Dialysis Tubing, Spectra Labs, US) contra amortiguador de calorimetría a 4°C durante 18 horas para realizar la diálisis. La

proteína dializada se filtró por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , el filtrado resultante fue diafiltrado y concentrado en tubos centricones con membrana de 10 kDa de corte de peso molecular (Amicon<sup>®</sup> Ultra 15 mL Centrifugal Filters Merck Millipore, US) mediante centrifugación a 4500 rpm en periodos de 10 y 5 minutos durante tres y una ocasión respectivamente, intercambiando con amortiguador de calorimetría.

La cuantificación de la proteína se procedió por lectura de su absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, US) empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. El cálculo de la concentración se obtuvo utilizando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon_{280} = 51140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  calculado mediante el servidor Expasy-ProtParam tool,<sup>71</sup> asumiendo que todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos. La muestra para cuantificar fue preparada diluyendo la proteína 1:5 con amortiguador de calorimetría y tomando la lectura directamente del equipo, que descuenta de manera automática el blanco (amortiguador de calorimetría). Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de proteína [P] a partir de la  $A_{280}$ , del  $\epsilon_{280}$  y tomando en cuenta el factor de dilución (1:5):<sup>69</sup>

$$[P] = A_{280} / \epsilon_{280} \quad (\text{ec. 10})$$

### 5.8 Calorimetría de titulación isotérmica

Las mediciones calorimétricas fueron obtenidas en un microcalorímetro MicroCal ITC200 (GE Healthcare, US). Se utilizó una concentración de proteína de 20  $\mu\text{M}$  en la celda de reacción, mientras que la concentración de ATP utilizada en la jeringa fue de 1.5 mM para el primer conjunto de titulaciones c-Src vs ATP a las temperaturas 20 y 35°C. El segundo conjunto de titulaciones consistió en la proteína contra el Ca-ATP a las temperaturas 20, 25, 30 y 35°C, utilizando la misma concentración de proteína y ATP que para el primer conjunto, siendo el ligando preparado en amortiguador de calorimetría con calcio. En el tercer grupo de titulaciones, el sistema calcio vs ATP, se conservaron las condiciones de temperatura del segundo conjunto, usando una concentración de 70 mM para el calcio y 0.75 mM para el ATP; este último preparado en amortiguador de calorimetría sin  $\text{CaCl}_2$ .

El esquema de titulación para los tres conjuntos fue de 19 inyecciones consecutivas de 2  $\mu\text{L}$  de ligando, con intervalo de 3 minutos entre cada inyección y agitación constante de 600 rpm. Todas las muestras fueron degasificadas mediante alto vacío y sin agitación durante 20 minutos previo a cada experimento. Los datos crudos fueron analizados y ajustados a un modelo de un sitio de unión empleando el software Origin 7.0.<sup>43</sup>

### 5.9 Mediciones de dicroísmo circular

Los espectros de DC se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco-J700 (Jasco Inc, Easton, MD, US) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier a 20 °C y empleando una celda de cuarzo de 1 mm de paso de luz. Las mediciones fueron realizadas a una velocidad de barrido de 20 nm/min con una resolución de 1 nm en el intervalo de 260 a 190 nm (región del UV lejano), con un tiempo de espera de 5 segundos. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales.

Para la obtención del perfil de desplegamiento térmico de c-Src se realizó un barrido de temperatura en un intervalo de 20-80 °C a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min monitoreando el cambio de elipticidad a 208 nm (longitud de onda constante) con una resolución de 1 °C. La muestra proteica utilizada para las mediciones fue preparada diluyendo la proteína purificada con agua desionizada ajustando a una concentración final de 0.33 mg/mL apropiada a las necesidades de este tipo de experimentos.

Para procesar los datos se transformó el valor de elipticidad observada a elipticidad molar ( $\text{grado cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ) utilizando la fórmula (**ec. 9**):

$$\theta_{Molar} = \frac{\theta_{Obs} * MW}{[P] * d * 100}$$

Donde  $\theta_{Molar}$  es la elipticidad molar,  $\theta_{Obs}$  es la elipticidad observada en miligrados (mdeg),  $MW$  es el peso molecular promedio de los aminoácidos,  $[P]$  es la concentración de proteína en mg/mL y  $d$  es el paso óptico en cm.<sup>50,53</sup>

## 5.10 Espectrometría de masas MALDI-TOF

El espectro de masas fue obtenido en el sistema MALDI-TOF (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) en un instrumento MALDI-TOF (Microflex Bruker Daltonics) a cargo de la M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz del Instituto de Química, UNAM. La muestra se preparó diluyendo la proteína pura hasta 3.75  $\mu\text{M}$  e intercambiando dos veces con agua desionizada para eliminar el exceso de sales. La muestra se suspendió en una matriz de ácido sinapínico en una relación (1:5) matriz/proteína.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Purificación del dominio cinasa recombinante de c-Src

El dominio cinasa recombinante de c-Src fue sobreexpresado en sistema de bacteria, primero utilizando la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para la replicación de los plásmidos pET28a-TKD-Src, que contiene la información del dominio cinasa, y pCDFDuet-1-YopH, que contiene la fosfatasa YopH necesaria debido a la alta toxicidad que representa la sobreexpresión de una cinasa para la bacteria; y la cepa *E. coli* BL21(DE)3 fue utilizada para la sobreexpresión siendo cotransformada con los plásmidos anteriores.<sup>7</sup>

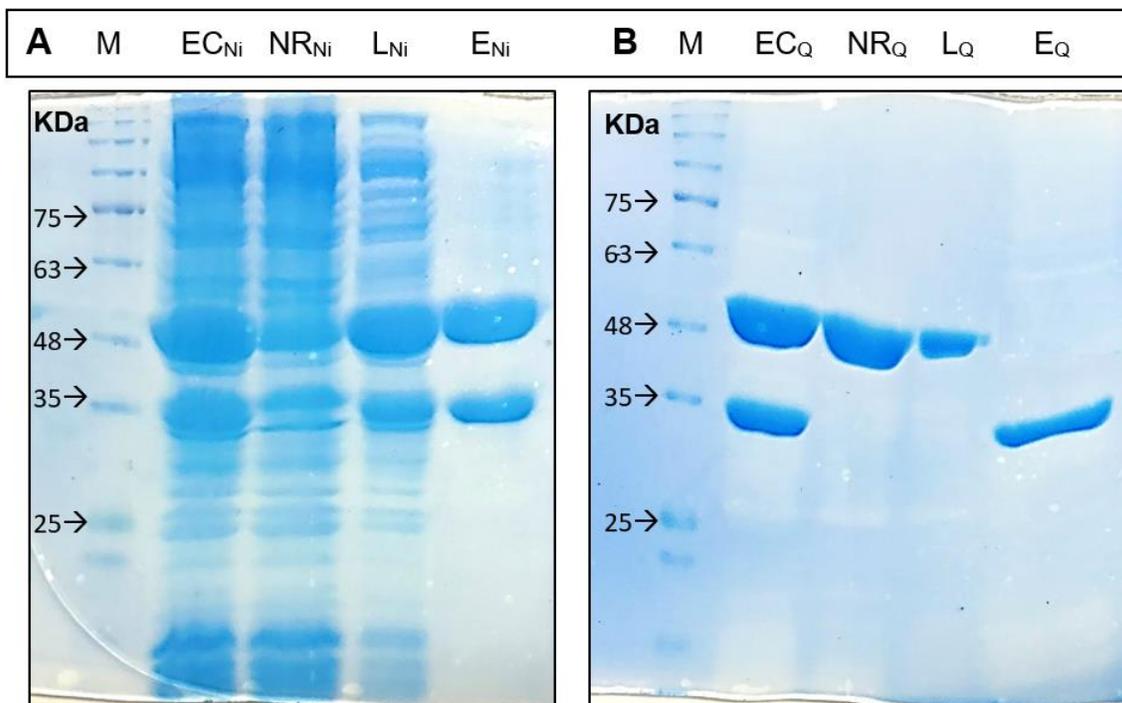
Con el objetivo de facilitar la purificación del dominio de c-Src, se incluyó una etiqueta de histidinas en el segmento N-terminal, lo que permitió el uso de cromatografía de afinidad a níquel. Al terminar la primera cromatografía se obtuvo el dominio catalítico de c-Src y a la fosfatasa YopH, de acuerdo con los resultados del corrimiento de las fracciones de la purificación en gel de poliacrilamida, por lo que resultó necesario emplear una segunda cromatografía, en esta ocasión de intercambio aniónico. A continuación, se muestran los parámetros fisicoquímicos de ambas proteínas.<sup>7,71</sup>

Proteína	PM (Da)	pI	$\epsilon_{280}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	No. de residuos
<b>Dominio catalítico c-Src</b>	32633	6.05	51140	253
<b>YopH</b>	50939.4	8.92	18910	468

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de YopH y el dominio catalítico de c-Src.

Al llevarse a cabo la segunda cromatografía, se introdujo la muestra de elución proveniente de la primera cromatografía, que contenía ambas proteínas. Debido a que hay una diferencia notable en el punto isoeléctrico de ambas proteínas (**Tabla 3**) y que el pH del amortiguador utilizado fue 8.0, c-Src se encontraba con carga negativa mientras que YopH con carga positiva, provocando que esta última no fuera retenida en la resina de la columna cargada

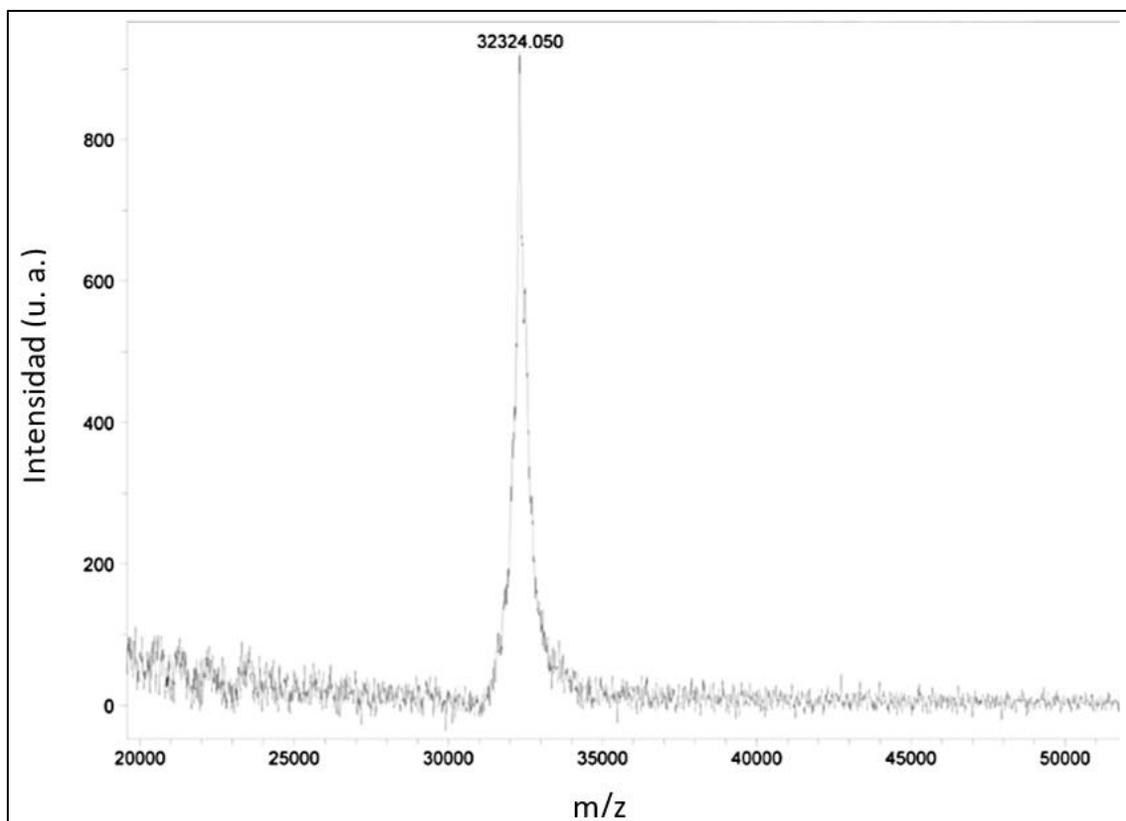
positivamente. De esta manera se obtuvo el dominio catalítico de c-Src puro, como se muestra en la **Figura 11**.



**Figura 11. Geles SDS-PAGE de la purificación del dominio catalítico de c-Src.** A) Fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad a níquel del extracto crudo proteico. EC<sub>Ni</sub>, extracto crudo; NR<sub>Ni</sub>, no retenido; L<sub>Ni</sub>, lavado; E<sub>Ni</sub>, elución. B) Fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico. EC<sub>Q</sub>, extracto crudo; NR<sub>Q</sub>, no retenido; L<sub>Q</sub>, lavado; E<sub>Q</sub>, elución.

## 6.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

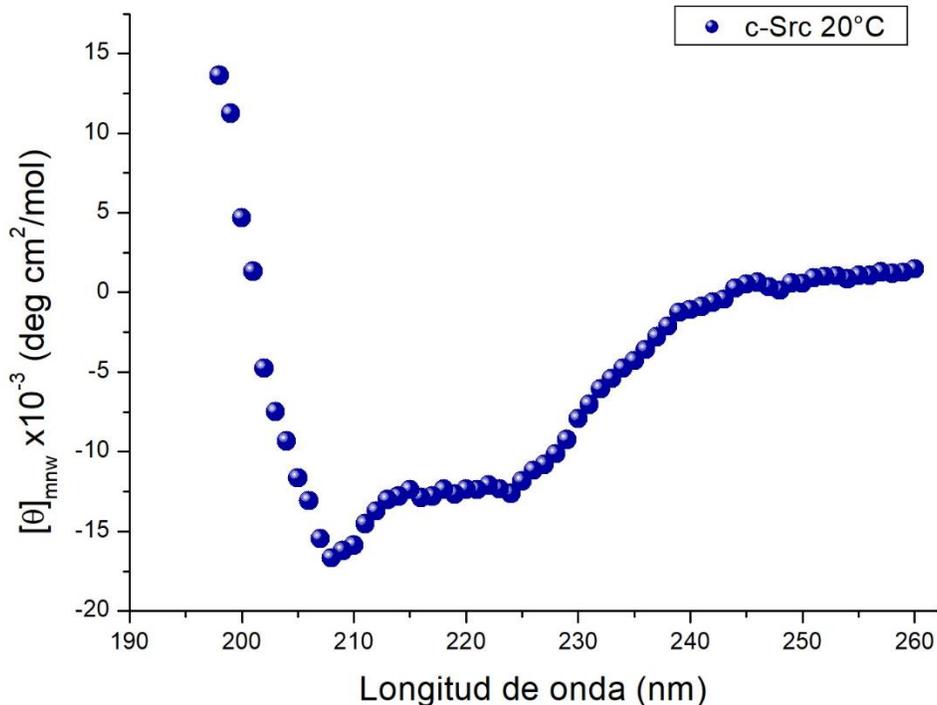
Para confirmar la identidad del dominio catalítico de c-Src, se realizó un análisis por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF a la proteína pura. Se concentró la muestra hasta 3.75  $\mu$ M y se intercambió con agua desionizada dos veces en un sistema Amicon con membrana de corte de 30 kDa para eliminar el exceso de sales. El espectro obtenido de MALDI-TOF (**Figura 12**) mostró un ion molecular m/z de 32324 Da, muy cercano al peso molecular teórico del dominio catalítico de c-Src de 32633 Da, con solo una diferencia de 309 Da, por lo que se confirma la identidad de la proteína.



**Figura 12. Espectro de masas para el dominio catalítico de c-Src.** La masa molecular teórica para el dominio catalítico de c-Src es de 32633 Da y la relación fue de 32324 Da para el ion molecular (MH<sup>+</sup>).

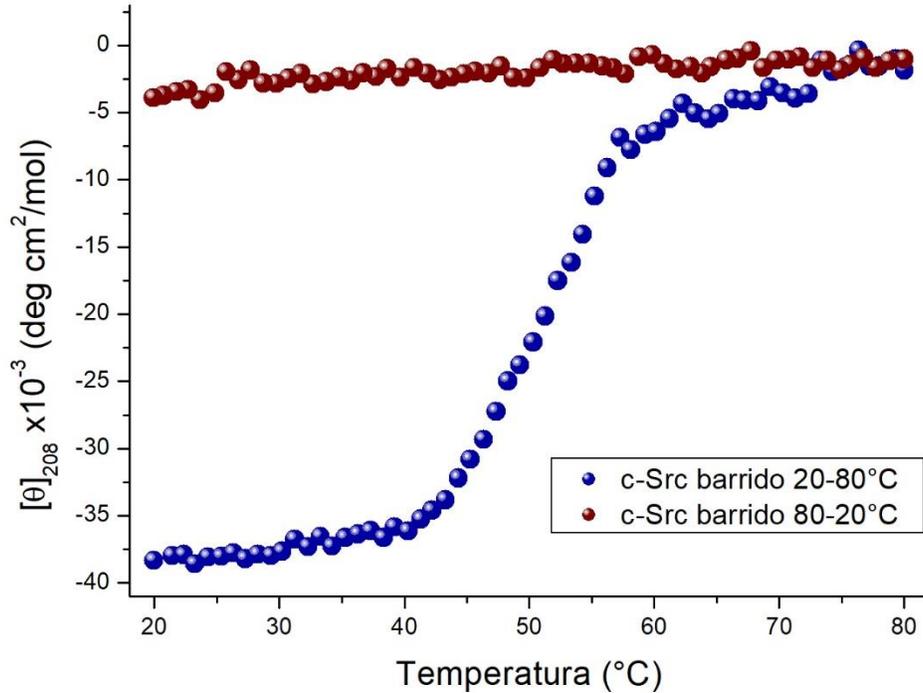
### 6.3 Dicroísmo circular

Con el objetivo de determinar el plegamiento del dominio catalítico de c-Src, se realizaron mediciones de dicroísmo circular en la región del UV-lejano (280-190 nm) a 20 °C (**Figura 13**). Se puede observar en el espectro de DC obtenido un máximo positivo a 198, así como un mínimo negativo a 208 y a 224 nm. El espectro para proteínas que cuentan solo con hélices  $\alpha$  debe presentar un máximo positivo alrededor de 195 nm, así como un mínimo negativo a 208 y 222 nm, mientras que para hebras  $\beta$  un máximo positivo a 198 nm y un mínimo negativo de menor intensidad a 214 nm (**Figura 9**). Por lo tanto, el espectro obtenido para c-Src muestra la presencia de hélices  $\alpha$ , tanto como de hebras  $\beta$ , siendo el mínimo de éstas últimas enmascarado a la señal más dominante de las hélices  $\alpha$ .<sup>50</sup>



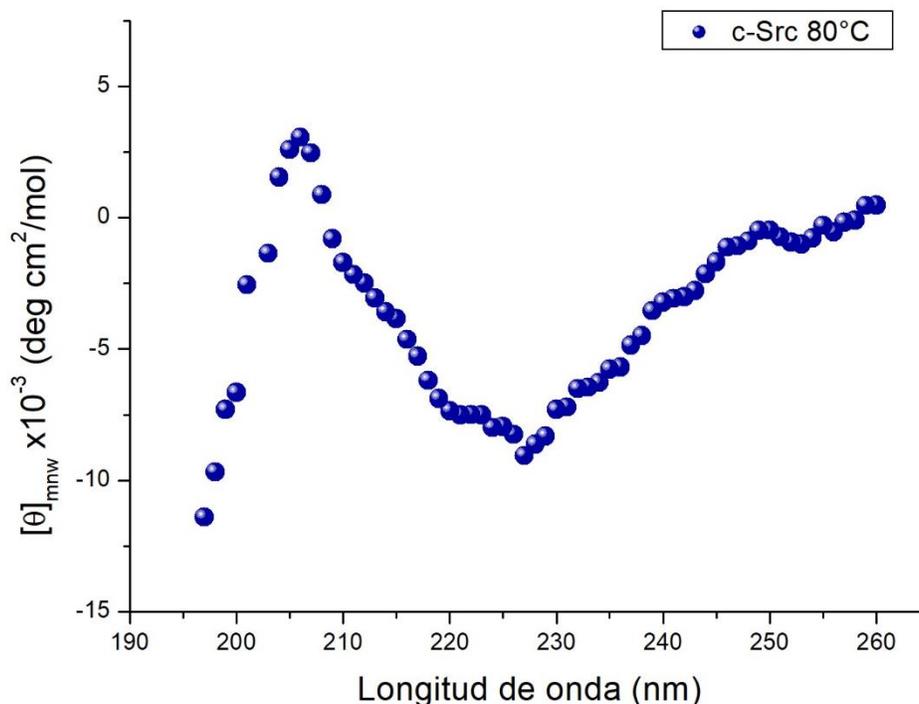
**Figura 13. Espectro de DC del dominio catalítico de c-Src a 20°C.** Realizado a una velocidad de barrido de 20 nm/min, resolución de 1 nm, en un rango de 190 a 260 nm, a una elipticidad molar con mínimo en 208 nm, a una temperatura de 20 °C, en un amortiguador de 2 mM de TRIS-HCl pH 8.0, 100 mM de NaCl, 5 % de glicerol y 0.5 mM de DTT.

Para obtener información acerca de la estabilidad térmica del dominio catalítico de c-Src se realizó un barrido de temperatura de 20 a 80 °C monitoreando el cambio de elipticidad molar a 208 nm (**Figura 14**, puntos azules). El barrido térmico muestra una transición monofásica que da inicio alrededor de 43°C, lo que nos indica que el dominio catalítico de c-Src se encuentra en un estado de plegamiento nativo a temperaturas menores de alrededor 35 °C.



**Figura 14. Superposición del perfil de desplegamiento (puntos azules) y plegamiento (puntos rojos) térmico del dominio catalítico de c-Src.** Monitoreando elipticidad a 208 nm, con velocidad de calentamiento de 1 °C/min y de enfriamiento de 5 °C/min, resolución de 1 °C

Se realizó la medición del espectro DC a los 80 °C (**Figura 15**), con el objetivo de determinar el plegamiento con el que contaba el dominio catalítico de c-Src concluido el perfil de desplegamiento. El espectro obtenido nos muestra que se pierden puntos característicos de una proteína  $\alpha/\beta$ , y aunque se conserva cierto grado de plegamiento, hay una pérdida de estructura secundaria considerable.



**Figura 15. Espectro de DC del dominio catalítico de c-Src a 80°C.** Realizado a una velocidad de barrido de 20 nm/min, resolución de 1 nm, en un rango de 190 a 260 nm, a una elipticidad molar con mínimo en 208 nm, a una temperatura de 80°C, en un amortiguador de 0.05 mM de TRIS-HCl pH 8.0, 100 mM de NaCl, 10% de glicerol y 0.1 mM de DTT.

Para determinar si el desplegamiento térmico es reversible para el dominio catalítico de c-Src, se realizó un barrido de 80 a 20 °C (**Figura 14**, puntos rojos), mostrando el perfil de plegamiento obtenido, que no se recupera la señal original. Esto indica que el desplegamiento térmico no es reversible por parte del dominio catalítico de c-Src.

## 6.4 Calorimetría de titulación isotérmica

### 6.4.1 Dominio catalítico de c-Src y el ATP

Con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos de la interacción entre el dominio catalítico de c-Src y el ATP, se realizó la caracterización termodinámica de su asociación en un intervalo de temperaturas de 20 a 35 °C, con incrementos de 5 °C. El estudio se realizó con el ion calcio

como cofactor metálico, dado que en presencia del ion magnesio la enzima ejerce una actividad catalítica residual que impide medir directamente el proceso de unión. La **Tabla 4** resume los valores de los parámetros termodinámicos para la titulación del dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP, siendo todas las reacciones exotérmicas. La **Figura 16** muestra los termogramas (paneles superiores) y las isotermas de unión (paneles inferiores). Las curvas calorimétricas fueron ajustadas mediante un modelo de un solo tipo de sitio de unión. Los resultados fueron consistentes con una estequiometría de interacción 1:1.

<b>T</b> (°C)	<b>K<sub>a</sub></b> (x10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )	<b>K<sub>d</sub></b> (nM)	<b>ΔH<sub>a</sub></b> (Kcal mol <sup>-1</sup> )	<b>-TΔS<sub>a</sub></b> (Kcal mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔG<sub>a</sub></b> (Kcal mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔCp</b> (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
<b>20</b>	1.0 +/- 0.1	1026.7	-3.7 +/- 0.1	-4.3	-8.0	-14
<b>25</b>	2.9 +/- 1.0	348.4	-3.8 +/- 0.2	-5	-8.8	
<b>30</b>	5.1 +/- 0.6	194.9	-3.9 +/- 0.0	-5.2	-9.3	
<b>35</b>	1.9 +/- 0.2	531.9	-3.9 +/- 0.1	-4.9	-8.8	

**Tabla 4. Parámetros termodinámicos para la unión del dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP.**

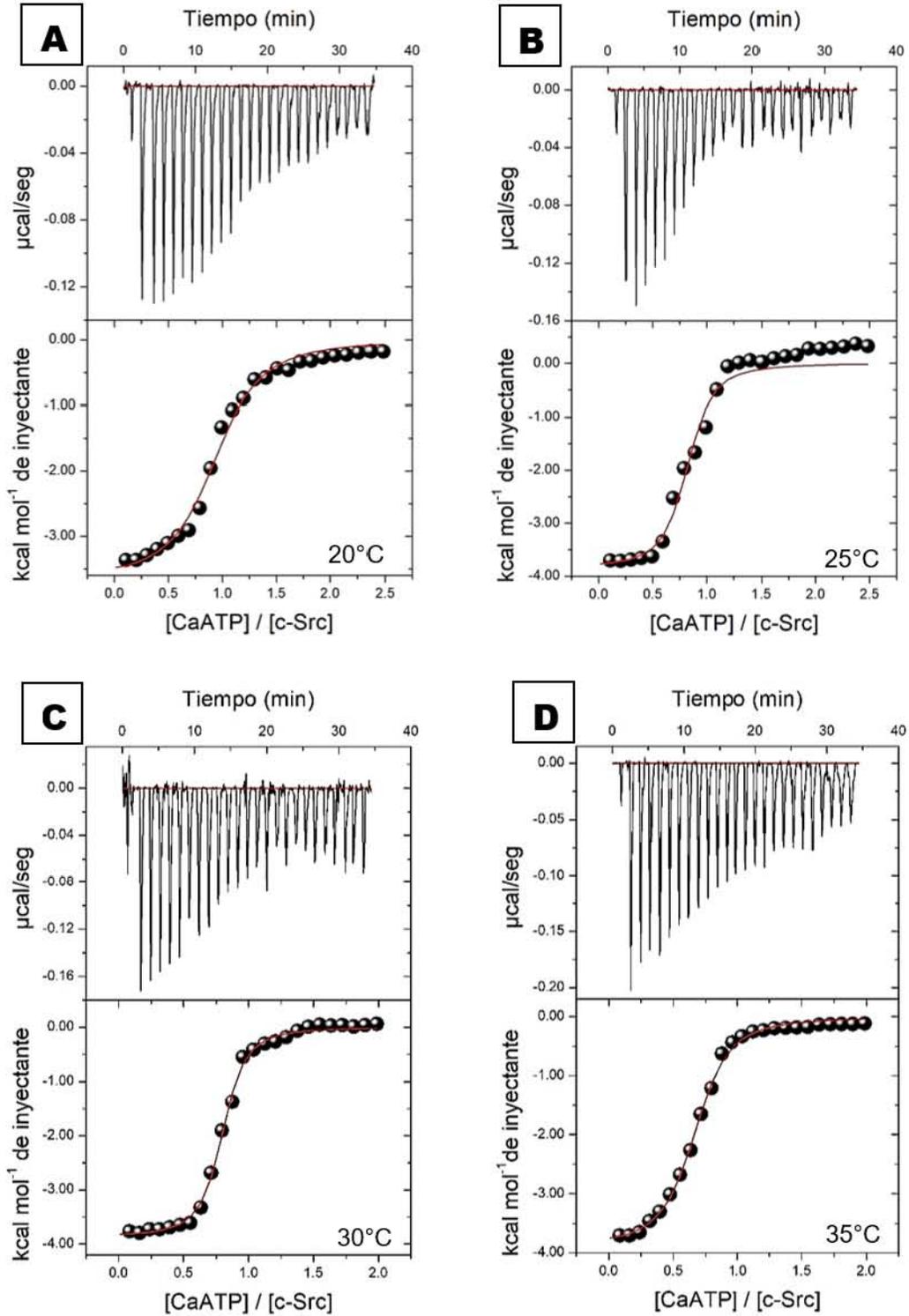
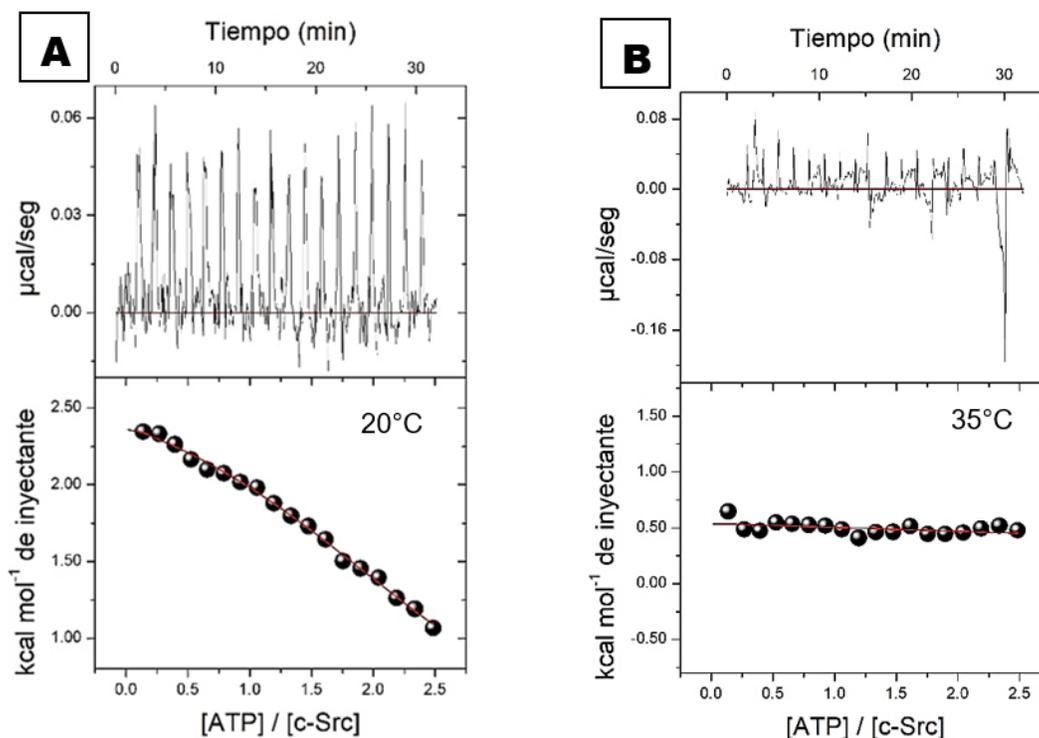


Figura 16. Termogramas (parte superior) e isotermas de unión (parte inferior) para la asociación entre el dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP. Realizados a A)20, B)25, C)30 y D)35°C, obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Para conocer la interacción que presenta el sistema del dominio catalítico de c-Src con el ATP en ausencia de un metal divalente, se realizaron las titulaciones bajo las mismas condiciones de las determinaciones que incluyeron calcio. La **Figura 17** muestra los termogramas (paneles superiores) y las isotermas de unión (paneles inferiores) determinados a 20 y 35 °C. Como se puede observar, no se observó señal de interacción del ATP libre de ion metálico con la proteína en ninguna de las temperaturas evaluadas.



**Figura 17. Termogramas (parte superior) e isotermas de unión (parte inferior) para la asociación entre el dominio catalítico de c-Src y el ATP. Realizados a A) 20 y B) 35 °C, obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica.**

#### 6.4.2 Calcio y el ATP

Para conocer la interacción entre el calcio y el ATP y poder así evaluar el efecto de este equilibrio sobre la interacción del dominio catalítico de c-Src, se realizaron las titulaciones de asociación el ion metálico y el nucleótido en un intervalo de temperatura de 20 a 35 °C cada 5°C. La **Figura 18** muestra los termogramas (paneles superiores) y las isotermas de unión (paneles inferiores) para el sistema calcio y ATP, siendo todas las reacciones endotérmicas. Se utilizó un modelo de un sitio de unión ajustado a las curvas calorimétricas,

estableciéndose una estequiometría 1:1. La **Tabla 5** resume los valores de los parámetros termodinámicos para la titulación del calcio y el ATP.

<b>T</b> (°C)	<b><math>K_a</math></b> ( $\times 10^3 M^{-1}$ )	<b><math>K_d</math></b> ( $\mu M$ )	<b><math>\Delta H_a</math></b> (Kcal mol <sup>-1</sup> )	<b><math>-T\Delta S_a</math></b> (Kcal mol <sup>-1</sup> )	<b><math>\Delta G_a</math></b> (Kcal mol <sup>-1</sup> )	<b><math>\Delta C_p</math></b> (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
<b>20</b>	2.0 +/- 0.2	492.6	1.0 +/- 0.0	-5.5	-4.4	87.4
<b>25</b>	2.1 +/- 0.2	487.8	1.1 +/- 0.0	-5.6	-4.5	
<b>30</b>	2.5 +/- 0.2	401.6	1.6 +/- 0.1	-6.3	-4.7	
<b>35</b>	3.0 +/- 0.2	343.6	2.3 +/- 0.1	-7.2	-4.9	

**Tabla 5. Parámetros termodinámicos para la unión de Ca y el ATP.**

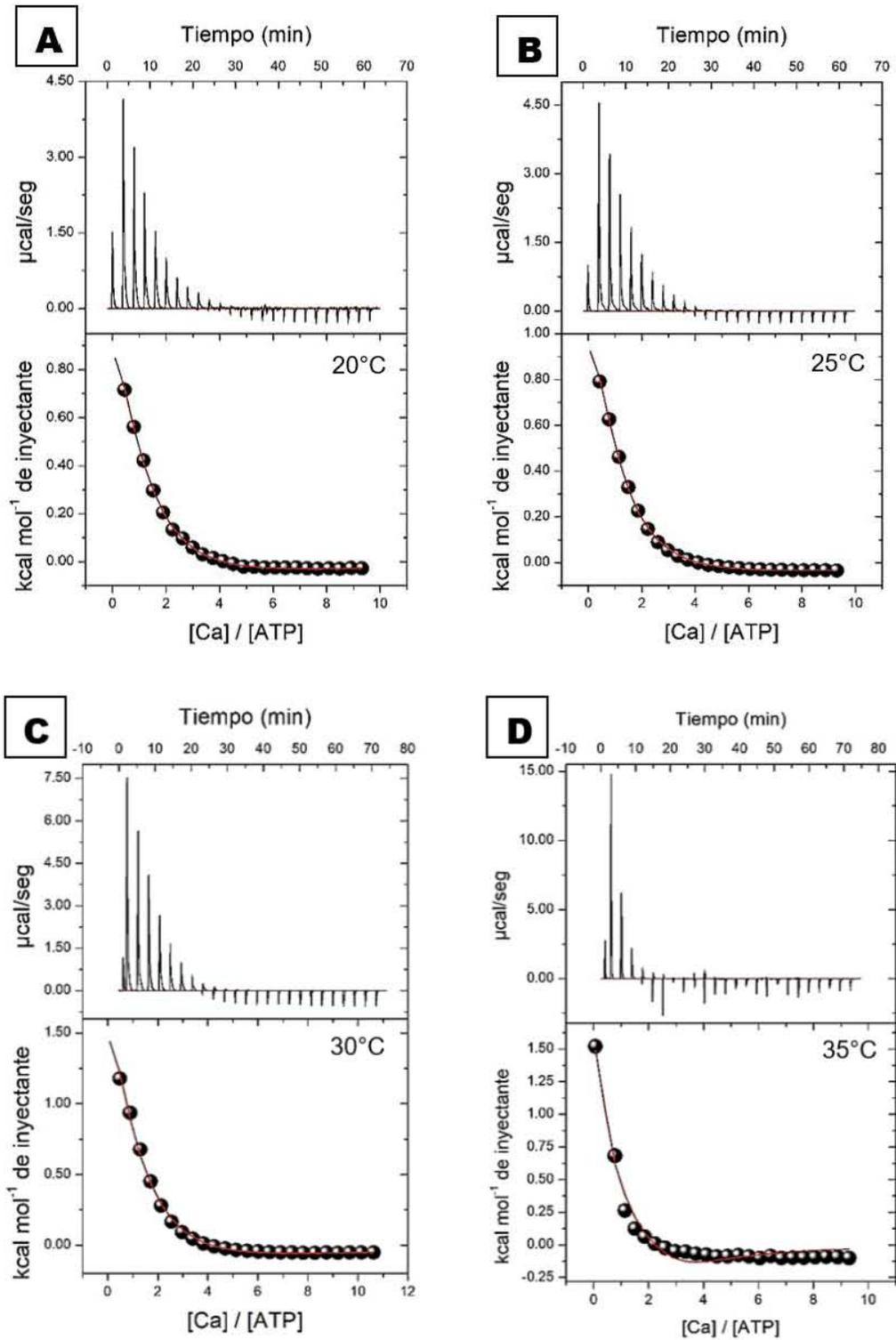


Figura 18. Termogramas (parte superior) e isothermas de unión (parte inferior) para la asociación entre calcio y el ATP. Realizados a A) 20, B) 25, C) 30 y D) 35 °C, obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Obtención del dominio catalítico recombinante de c-Src

En la actualidad, el desarrollo y optimización de fármacos blanco-dirigidos requiere de la caracterización del blanco terapéutico por medio de estudios bioquímicos, estructurales y biofísicos. En particular, los dos últimos tipos de estudio demandan cantidades grandes de proteína pura y activa, del orden de miligramos.<sup>27,28,29</sup> Por lo anterior, en este trabajo se decidió sobreexpresar de manera recombinante el dominio catalítico de c-Src utilizando el método descrito por Seeliger y col. con ligeras modificaciones debido a facilidades experimentales, obteniendo el dominio de c-Src con un rendimiento de 10 mg/L de cultivo LB. Para su obtención fue cotransformada la cepa *E. coli* BL21(DE3) utilizando los plásmidos pET28a-TKD-Src que codifica para el dominio catalítico de c-Src y pCDFDuet-1-YopH que codifica para la fosfatasa YopH. La necesidad de la coexpresión de la fosfatasa se debe a que la sobreexpresión de la tirosina-cinasa c-Src produce una alta toxicidad por hiperfosforilación en la bacteria, de acuerdo con lo reportado por Seeliger y col. Además, en ausencia de la fosfatasa se reporta la sobreexpresión de una gran cantidad de proteína insoluble que al ser purificada reduce de manera importante la cantidad de proteína activa o correctamente plegada.<sup>7</sup> La importancia de YopH radica en su alta especificidad por residuos de fosfotirosina y su baja discriminación entre proteínas sustrato, lo cual contribuye a la homeostasis del grado de fosforilación.

La fosfatasa YopH muestra, a pesar de no tener una etiqueta de histidinas, cierta interacción con la resina de níquel y se adhiere a ella, por lo que fue necesario el uso de la cromatografía de intercambio aniónico que nos permitió obtener el dominio de c-Src puro debido a la notable diferencia en los puntos isoeléctricos entre éste y la fosfatasa (**Tabla 3**). El análisis de los geles de poliacrilamida (**Figura 11**) muestra una banda en el carril de elución de la cromatografía de intercambio aniónico muy cercana a la altura de la banda de 35

kDa del marcador de peso molecular para proteínas, que coincide con el peso molecular teórico para el dominio cinasa de c-Src de 32.6 kDa.<sup>2,71</sup> Además, después de comparar el peso molecular obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de 32324.05 Da (**Figura 12**), que sólo difiere en 0.3 kDa del peso teórico, se concluye que se obtuvo el dominio catalítico recombinante de c-Src. Tanto el gel de poliacrilamida como el espectro de masas indican que la proteína fue obtenida básicamente en forma pura.

## **7.2 Estabilidad del dominio catalítico de c-Src**

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica usada para caracterizar y cuantificar el contenido de estructura secundaria en proteínas, así como cambios en la estructura terciaria, lo que permite estudiar su plegamiento. También permite monitorear cambios moleculares producidos por efectos ambientales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, o cambios mayores producidos por la interacción con un ligando.<sup>47,48,49</sup> Con el objetivo de comprobar el adecuado plegamiento del dominio catalítico de c-Src, para conocer su estabilidad térmica y poder definir el intervalo de temperatura para realizar los experimentos de calorimetría con la proteína en un estado plegado, se realizaron mediciones de dicroísmo circular a 20 y 80 °C, así como un barrido de temperatura iniciando en 20 y hasta 80 °C, además de uno iniciando en 80 y terminando en 20°C.

El espectro de DC obtenido para el dominio catalítico de c-Src a 20 °C (**Figura 13**) muestra un patrón que indica la presencia de más de un tipo de estructura secundaria, siendo tanto de hélices  $\alpha$  como de hebras  $\beta$ , debido a la forma característica que siguen los puntos, tanto en máximos como en mínimos.<sup>49,50,54,55</sup>

El espectro obtenido es característico de la presencia de estructura secundaria de cada tipo, tanto hélice  $\alpha$  y hebra  $\beta$ . Mediante el software K2D3, se calculó un enriquecimiento de 36% de hélices  $\alpha$  y 14.53% de hebras  $\beta$ , lo que concuerda con lo descrito en la literatura para la estructura cristalográfica del dominio catalítico de c-Src.<sup>2,9,10,13</sup>

El perfil de desplegamiento (**Figura 14**, puntos azules) mostró una transición monofásica del dominio catalítico de c-Src, lo que da evidencia para asumir que la proteína se encuentra con un plegamiento nativo a temperaturas menores a 35°C. Al disminuirse la temperatura, no se recuperó la señal del estado nativo de plegamiento, por lo que el desplegamiento provocado por la temperatura resultó irreversible (**Figura 14**, puntos rojos). La temperatura de trabajo óptima para el dominio catalítico de c-Src resulta por debajo de los 35°C, donde no parece haber cambios en la estructura secundaria.

### **7.3 Energética de la interacción entre el ATP y el calcio.**

La forma quelada por ion metálico del ATP es el sustrato para todas las reacciones enzimáticas que utilizan el ATP, siendo la forma acomplejada con el ion  $Mg^{2+}$  la más relevante fisiológicamente. El ATP requiere de un metal divalente para acomplejarse, tal como lo es el  $Mg^{2+}$ , el  $Ca^{2+}$  y el  $Sr^{2+}$ , aunque existen pruebas de que puede unirse a cationes monovalentes como el  $Li^+$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  con una menor afinidad que los divalentes.<sup>72,73</sup> Para conocer y describir la interacción que tiene el calcio con el ATP, se realizaron titulaciones calorimétricas de este sistema.

En las mediciones realizadas entre el calcio y el ATP, se observa una afinidad en el orden milimolar. La constante de afinidad ( $K_a$ ) aumentó conforme se incrementó la temperatura, mostrando que la formación del complejo calcio-ATP es más favorable conforme se llegó a los 35 °C. Esta tendencia es termodinámicamente esperada para un proceso endotérmico, lo cual coincide con el signo de la entalpía de unión determinada. Además, los datos mostraron una estequiometría 1:1, que concuerda con lo reportado en la literatura.<sup>72</sup>

El cambio de entalpía de unión ( $\Delta H_a$ ) resulta del balance entre el cambio de entalpía intrínseca ( $\Delta H_{int}$ ), contribución favorable determinada por la formación de enlaces no covalentes entre las moléculas interactuantes, y el cambio de entalpía de solvatación ( $\Delta H_{solv}$ ), contribución desfavorable debido al proceso de desolvatación de las superficies interactuantes. Por tanto, los datos calorimétricos indican un mayor peso del  $\Delta H_{solv}$  para la unión calcio-ATP.<sup>37,40</sup> El  $\Delta H_a$  mostró una

dependencia de la temperatura, aumentando de 1.0 a 2.3 kcal/mol en el intervalo de temperatura estudiado.

El cambio en la entropía de unión ( $\Delta S_a$ ) resulta en una disminución mínima conforme el aumento de temperatura, con valores positivos desde 272 a 206 cal/mol. El  $\Delta S_a$  en la formación de complejos biomoleculares está determinado por tres componentes principales. El cambio en la entropía de solvatación ( $\Delta S_{solv}$ ) está determinado por el desplazamiento de las moléculas del solvente unidas al ATP y al calcio, lo que resulta en una aportación favorable (valor positivo) a la unión, por la liberación de las moléculas de agua del solvatante. El segundo componente, el cambio en la entropía conformacional ( $\Delta S_{conf}$ ), resulta en una contribución desfavorable debido a que el ATP pierde grados de libertad conformacional cuando está unido al calcio, mientras que este último no tiene gran peso en esta contribución, teniendo un pequeño valor negativo. El último componente, el cambio en la entropía roto-traslacional ( $\Delta S_{roto-tras}$ ) resulta en una aportación desfavorable, ya que con la formación del complejo Ca-ATP se reduce la cantidad de partículas libres en la solución. Los datos calorimétricos indican, por lo tanto, que la aportación positiva del  $\Delta S_{solv}$  a la  $\Delta S_a$  es la contribución favorable dominante a la formación del complejo Ca-ATP.<sup>37,38,40</sup>

El cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_a$ ) disminuye y se hace más negativa conforme el aumento de temperatura, lo cual indica mayor estabilidad en el complejo formado conforme se llega a los 35°C. Gracias al valor negativo del  $\Delta G_a$ , y al valor positivo de  $\Delta S_a$  y  $\Delta H_a$ , se concluye que la unión del calcio y el ATP es un proceso endotérmico espontáneo, entrópicamente dirigido.

El cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) resultó de un valor positivo de 87.4 cal/molK, lo cual es consistente con la deshidratación de superficies polares.<sup>74</sup>

## 7.4 Energética de la interacción entre el dominio catalítico de c-Src y el ATP

El objetivo final del reconocimiento molecular es la formación de un complejo entre las moléculas participantes, tales como una proteína y un ligando.<sup>37,75</sup> La optimización de fármacos blanco-dirigidos requiere de un buen reconocimiento molecular, por ello se han realizado muchos esfuerzos en caracterizar bioquímica, biofísica y estructuralmente los blancos farmacológicos, como lo es la tirosina cinasa c-Src.<sup>6,9,76</sup> Con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos de la unión entre el ATP y el dominio catalítico de c-Src para poder analizar su interacción, se realizaron titulaciones calorimétricas de estas biomoléculas a diferentes temperaturas.

En las mediciones realizadas del dominio catalítico de c-Src titulado con el ATP en ausencia de un metal divalente (**Figura 17**), se observa que no hay interacción entre ambas biomoléculas. Este resultado implica que el ion metálico es fundamental para el reconocimiento del ATP por parte de la enzima.<sup>72</sup> Presumiblemente, la repulsión de cargas entre el ATP, que debido a los grupos fosfato cuenta con carga negativa, y los grupos cargados de la proteína en el sitio catalítico o de unión a ATP, no permite la unión de ambas biomoléculas. Los datos calorimétricos muestran una débil señal endotérmica para la titulación a 20°C, la cual puede ser atribuida al calor de dilución al titular la muestra.<sup>41,43</sup>

Para las mediciones del dominio catalítico de c-Src contra el complejo Ca-ATP, se observó una  $K_a$  en el orden milimolar. Asimismo, existe una dependencia del cambio de entalpía de unión ( $\Delta H_a$ ) con la temperatura, disminuyendo de -3.7 a -3.9 kcal/mol.

Las mediciones del dominio catalítico de c-Src vs Ca-ATP a 35°C no siguen la tendencia de cambio que tienen los parámetros termodinámicos que se presentan a menores temperaturas, algo que podría atribuirse a que como muestra la **Figura 15**, existen ligeras alteraciones a la estructura secundaria conforme la temperatura se acerca a los 35°C. Por lo anterior, se ha decidido no tomar en cuenta la titulación del dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP a 35°C

para el análisis de la tendencia de los parámetros termodinámicos y el cálculo del cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ).

La  $\Delta H_a$  de la unión resulta favorable al ser negativa, característica de una unión exotérmica, además, se hizo más favorable conforme el aumento de temperatura. Este cambio favorable nos indica que el componente de la entalpía de enlace, el cambio de entalpía intrínseca ( $\Delta H_{int}$ ), que está dada por la formación de interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, tiene una gran aportación favorable a la  $\Delta H_a$  debido a la formación de enlaces no covalentes entre el Ca-ATP y el dominio catalítico de c-Src, pues la cinasa cuenta con un sitio de unión específico para este ligando; el segundo componente, el cambio de entalpía de solvatación ( $\Delta H_{solv}$ ), presenta una contribución desfavorable debido a la desolvatación de grupos polares y no polares en la proteína, así como en el ligando y las partículas del solvente. Al final, la formación de enlaces no covalentes es más favorable que la pérdida de moléculas de solvente en la proteína y el ligando.<sup>37,40</sup>

El cambio en la entropía de unión ( $\Delta S_a$ ) se muestra favorable al presentar valores positivos del orden de 215-260 cal/mol, además aumenta su valor conforme incrementa la temperatura. La  $\Delta S_a$  se compone de tres aportaciones, el cambio de entalpía de solvatación ( $\Delta S_{solv}$ ), que está dada por la liberación del solvente en la proteína y el ligando tras la unión, el cual es un componente favorable a la asociación; el cambio de entropía conformacional ( $\Delta S_{conf}$ ) está dado la pérdida de grados de libertad, por lo que el componente resulta desfavorable para la unión; por último, el cambio de entropía roto-traslacional ( $\Delta S_{roto-tras}$ ) está dado por la pérdida de grados de libertad rotacionales y traslacionales de las moléculas interactuantes, al pasar de un sistema bimolecular antes de la unión (proteína + ligando) a un sistema unimolecular después de la unión (complejo proteína-ligando), y resulta en menos partículas libres en solución, por lo que este componente resulta desfavorable. Aún con dos contribuciones desfavorables, por parte de la  $\Delta S_{conf}$  y la  $\Delta S_{roto-tras}$ , la gran contribución favorable de la  $\Delta S_{solv}$ , permite

que la  $\Delta S_a$  resulte favorable a la unión del dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP.<sup>37,77,78</sup>

El cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) provee una conexión entre los demás parámetros termodinámicos y la información estructural de proteínas debido a la fuerte relación con el área superficial menos disponible en la formación de un complejo proteína-ligando. Así, el  $\Delta C_p$  determinado a partir del  $\Delta H_a$  para las titulaciones a 20, 25 y 30°C resulta de -14 cal/mol, al ser un valor negativo nos indica que hay una disminución del área superficial disponible en la proteína tras la unión del Ca-ATP, es decir que disminuye el área de contacto entre la proteína y el solvente.<sup>44,79</sup> No obstante, es de hacer notar que este valor tan pequeño de  $\Delta C_p$  es cercano al reportado para la interacción de otras proteínas con nucleótidos que siguen una asociación tipo cuerpo rígido.<sup>80</sup> Por tanto, se puede concluir que no existen cambios sustanciales en la conformación de c-Src al interactuar con el nucleótido.

Los valores del  $\Delta G_a$  resultaron favorables al ser negativos y se hacen más favorables conforme el aumento de la temperatura, lo que nos indica que hay un ocultamiento de superficie de la proteína expuesta al solvente tras la unión del complejo Ca-ATP; debido al valor del  $\Delta G_a$ , el proceso es espontáneo y existe buena estabilidad en la formación del complejo proteico, confirmado también por la elevada  $K_a$  que resulta a la vez en una baja constante de disociación ( $K_d$ ).<sup>74</sup>

En base a lo anterior, la unión entre el dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP es un proceso endotérmico espontáneo entálpicamente dirigido, lo que indica que la cantidad de interacciones no covalentes, supera a la rigidificación o pérdida de grados de libertad que se genera tras la unión. La optimización de fármacos en la actualidad esta basada en la mejora de los componentes entálpicos y/o entrópicos de la unión entre el ligando y el receptor, por lo que conocer bajo que componentes está gobernada la unión de un ligando como el ATP, puede ayudar a la optimización de fármacos que mimetizan la unión de este ligando en el sitio catalítico de nuestra proteína.<sup>81</sup>

## 8. CONCLUSIONES

-El dominio catalítico de c-Src recombinante fue sobreexpresado y purificado en bacteria exitosamente.

-El análisis de DC del dominio catalítico de c-Src reveló un plegamiento característico de una  $\alpha/\beta$  proteína, una estabilidad térmica sin presentar cambios por debajo de alrededor de 35°C, y una transición monofásica por el desplegamiento térmico que es irreversible.

-El dominio catalítico de c-Src sólo puede unirse al ATP cuando éste se encuentra acomplejado con un metal divalente.

-Los determinantes energéticos de la interacción entre el dominio catalítico de c-Src y el Ca-ATP fueron favorables y entálpicamente dirigidos, con constantes de asociación del orden  $\mu\text{M}$ .

-Los determinantes energéticos de la interacción entre el ATP y el calcio fueron entrópicamente dirigidos y entálpicamente desfavorables, con constantes de asociación del orden mM.

-La interacción de c-Src con Ca-ATP puede ser descrita como una asociación tipo cuerpo rígido.

Este trabajo forma parte de la investigación actual que existe hacia las cinasas, enzimas de gran prioridad clínica debido a su papel en distintos trastornos. Particularmente, se brindan aportaciones acerca de la energética de la interacción entre c-Src y el nucleótido sustrato, así como de los cambios conformacionales asociados. Esta información eventualmente podrá ser utilizada en la optimización de fármacos blanco-dirigidos hacia el sitio de unión a ATP y con ello conseguir una mejora en las terapias actuales.

## **9. PERSPECTIVAS**

Con el fin de determinar cuantitativamente la competencia entre el ATP y las moléculas farmacológicas indicados para padecimientos relacionados con la proteína, se realizará la caracterización termodinámica de la interacción entre c-Src y fármacos inhibidores como bosutinib, dasatinib, ponatinib y Vandetanib.

## 10. REFERENCIAS

1. Okada M. Regulation of the src family kinases by csk. *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(10):1385-1397.
2. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research.* 2015;94(1):9-25.
3. Boggon TJ, Michael JE. Structure and regulation of Src family kinases. *Nature.* 2004; 23(1):7918-7927.
4. Xiao X, Ni Y, Yu C, Li L, Mao B, Yang Y, Zheng D, Silvestrini B, Cheng C. Src family kinases (SKFs) and cell polarity in the testis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2017;81:46-53.
5. Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell.* 1999;3:629-638.
6. Lipsick J. A history of cancer research: tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2019;11:1-19.
7. Seeliger MA, Young M, Henderson MN, Pellicena P, King DS, Falick AM, Kuriyan J. High yield bacterial expression of active c-Abl and c-Src tyrosine kinases. *Protein Science.* 2005;14(1):3135-3139.
8. Ingley E. Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1784:56-65.
9. Espada J, Martín-Pérez J. An update on src family of nonreceptor tyrosine kinases biology. En: Galluzzi L, ed. *International Review of cell and molecular biology.* USA: Elsevier; 2018. p. 83-122.
10. Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004;324:1155-1164.
11. Rösner HI, Poulsen FM, Residue-specific description of non-native transient structures in the ensemble of acid-denatured structures of the all-beta-protein c-Src SH3. *Biochemistry.* 2010;49(15):3246-3253.
12. Sicheri F, Kuriyan J. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997;7(6):777-785.
13. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:373-398.
14. Hubbard S. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. *Curr Opin. Struct. Biol.* 2002;12(6):735-741.
15. Roskoski R Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005;331:1-14.
16. Frame MC, Roskoski Jr R. Src family tyrosine kinases. *Reference module in life sciences.* 2017;4:1-11.
17. Heppner DE, Dustin CM, Liao C, Hristova M, Veith C, Little AC, Ahlers BA, White SL, Deng B, Lam Y, Li J, van der Vliet A. Direct cysteine sulfenylation drives activation of the src kinase. *Nat. Commun.* 2018;9:4522-4533.

18. Katyal P, Puthenveetil R, Vinogradova O. Structural insights into the recognition of beta-3 integrin cytoplasmic tail by the SH3 domain of src kinase. *Protein Sci.* 2013;22(10):1358-1365.
19. El-Rashedy AA, Mag El-Din AA. Drug design of src kinase inhibitor: An overview. *JIPBS.* 2018;5:51-59.
20. Shukla D, Meng Y, Roux B, Pande V. Activation pathway of src kinase reveals intermediate states as targets for drug design. *Nat. Commun.* 2014;5:3397-3408.
21. Yeatman TJ. A renaissance for Src. *Nature.* 2004;4(1):470-480.
22. Yu JS. From discovery of tyrosine phosphorylation to targeted cancer therapies: The 2018 Tang Prize in biopharmaceutical science. *Biomedical Journal.* 2019;42:80-83.
23. Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Manley PW, Jahnke W, Fabbro D, Liebetanz J, Meyer T. The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure.* 2005;13(6):861-871.
24. Taskinen B, Ferrada E, Fowler DM. Early emergence of negative regulation of the tyrosine kinase src by the C-terminal src kinase. *J. Biol. Chem.* 2017;292(45):18518-18529.
25. Nam S, Kim D, Cheng JQ, Zhang S, Lee JH, Buettner R, Mirosevich J, Lee FY, Jove R. Action of the src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(20):9185-9189.
26. O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, Rivera VM, Tang H, Metcalf III CA, Bohacek RS, Wang Y, Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Dalgarno D, Clackson T, Sawyer TK, Deininger MW, Druker BJ. Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML. *Blood.* 2004;104(8):2532-2539.
27. Schwartz PA, Murray BW. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry.* 2011;39:192-210.
28. Hubbard RE. Structure-based drug discovery and protein targets in the CNS. *Neuropharmacology.* 2011;60:7-23.
29. Albanese SK, Parton DL, Isik M, Rodríguez-Laureano L, Hanson SM, Behr JM, Gradia S, Jeans C, Levinson NM, Seeliger MA, Chodera JD. An open library of human kinase domain constructs for automated bacterial expression. *Biochemistry.* 2018;57(31):4675-4689.
30. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today.* 2014;19(5):590-601.
31. Schlegel S, Genevaux P, de Gier JW. Isolating *Escherichia coli* strains for recombinant protein production. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017;74(5):891-908.
32. Guevara-Hernández E, López-Zavala AA, Jiménez-Gutiérrez LR, Sotelo-Mundo RR. Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su

- importancia en la investigación científica e industrial. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 2013;15(3):8-17.
33. Addgene. (27 de 05 de 2019). *Addgene the nonprofit plasmid repository*. Obtenido de <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/#origins>
  34. Gileadi O. Recombinant protein expression in *E. coli* : a historical perspective. *Methods Mol Biol*. 2017;1586:3-10.
  35. Cruz-Castañeda R. Determinantes energéticos de la interacción entre la GTPasa ribosomal EFL1 y su factor intercambiador de nucleótidos SBDS. México: UNAM; 2018. p. 75.
  36. Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2011;10(2):209-223.
  37. Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL, Liu SQ. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci*. 2016;14(144):1-34.
  38. Saini RD. Thermodynamics of protein-ligand interactions and their analysis. *Journal of Proteins and Proteomics*. 2017; 8(4):205-217.
  39. Homans SW. Dynamics and thermodynamics of ligand-protein interactions. *Top Curr Chem*. 2006; 272:51-82.
  40. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. 2004; 24:1-52
  41. Velázquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat. Protoc*. 2006; 1(1):186-191.
  42. Freire E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004; 3(1):295-299.
  43. Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E. Isothermal titration calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology*. 2004; 23:17.8.1-17.8.24.
  44. Liang Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochim. Biophys. Sin*. 2008; 40(7):565-576.
  45. Renaud JP, Chung CW, Danielson UH, Egner U, Hennig M, Hubbard RE, Nar H. Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities. *Nature Reviews*. 2016;15:679-698.
  46. Fasman GD. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. USA: Plenum Publishing Corp; 1996.
  47. Banerjee B, Misra G, Ashraf MT. Circular dichroism. En: Misra G, ed. *Data processing handbook for complex biological data sources*. USA: Elsevier; 2019. p. 21-30.
  48. Miles AJ, Wallace BA. Circular dichroism spectroscopy for protein characterization: biopharmaceutical applications. En: Houde DJ, Berkowitz SA, ed. *Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals*. USA: Elsevier; 2005. p. 129-137.
  49. Dodero VI, Quirolo ZB, Sequeira MA. Biomolecular studies by circular dichroism. *Frontiers in Bioscience*. 2011;16:61-73.

50. Mata-Martínez E. Métodos físico-químicos en biotecnología. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
51. Sreerama N, Woody RW. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. En: Hochstrasser M, ed. *Methods in Enzymology*. USA: Elsevier; 2004. p. 318-351.
52. Clarke DT. Circular dichroism in protein folding studies. En Coligan JE, ed. *Current protocols in protein science*. USA: Board; 2012:28.3.
53. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* 2006;1(6):2876-2890.
54. Correa DH, Ramos CH. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr. J. Biochem. Res.* 2009;3(5):164-173.
55. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1751:119-139.
56. Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* 1969;8(10):4108-4116.
57. Chaurand P, Luetzenkirchen F, Spengler B. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 1999;10:91-103.
58. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.* 2015;61:100-11.
59. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 2015;6(791):1-16.
60. Counterman AE, Thompson MS, Clemmer DE. Identifying a protein by MALDI-TOF mass spectrometry: An experiment for the undergraduate laboratory. *J. Chem. Educ.* 2008;80(2):177-180.
61. Webster J, Oxley D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 2012;800:227-240.
62. Egelhofer V, Gobom J, Seitz H, Giavalisco P, Lehrach H, Nordhoff E. Protein identification by MALDI-TOF-MS peptide mapping: A new strategy. *Anal. Chem.* 2002;74(8):1760-1771.

63. Millares P, LaCourse EJ, Perally S, Ward DA, Prescott MC, Hohgkinson JE, Brophy PM, Rees HH. Proteomic profiling and protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry in unsequenced parasitic nematodes. *PLoS One*. 2012;7(3):e33590.
64. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: Current trends. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2017;23:17-20.
65. Szerszunowicz I, Nalecz D, Dziuba M. Selected bioinformatic tools and MS (MALDI-TOF, PMF) techniques used in the strategy for the identification of oat proteins after 2-DE. *Methods Mol. Biol.* 2017;1536:253-270.
66. MCLAB. (12 de 07 de 2019). *Dh5-Alpha Competent E. coli*. Obtenido de <https://www.mclab.com/Dh5-Alpha-Competent-E.-Coli.html>
67. New England BioLabs. (12 de 07 de 2019). *BL21 (DE3) Competent E. coli*. Obtenido de <https://international.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage>
68. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007;6:253.
69. Noble JE. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Comassie dyes. *Methods Enzymol.* 2014;536:17-26.
70. Sambrook J, Russell DW. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *CSH Protoc.* 2006;4:40-45.
71. ExPASy Bioinformatics Resource Portal. (25 de 07 de 2019). *ProtParam SRC\_HUMAN (P12931)*. Obtenido de <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P12931@270-523@>
72. Wilson JE, Chin A. Chelation of divalent cations by ATP, studied by titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 1991;193:16-19.
73. Knape MJ, Ballez M, Burghardt NC, Zimmermann B, Bertinetti D, Kornev AP, Herberg FW. Divalent metal ions control activity and inhibition of protein kinases. *Metallomics.* 2017;9(11):1576-1584.
74. Prabhu NV, Sharp KA. Heat capacity in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2005;56:521-548.
75. Whitesides GM, Krishnamurthy VM. Designing ligands to bind proteins. *Q. Rev. Biophys.* 2006;38(4):385-395.

76. Huber DL, Green MA, Hansen R, Höchst H, Reininger R, Rowe R, Trzeciak W, Tonner BP. SRC: Current activities and plans for the future. *Nucl. Instr. And Meth. In Phys. Res. A*. 1994;347:49-51.
77. Amzel LM. Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins*. 1997;28(2):144-149.
78. Amzel LM. Calculation of entropy changes in biological processes: folding, binding, and oligomerization. *Methods. Ezymol.* 2000;323:167-177.
79. Bronowska AK. Thermodynamics of ligand-protein interactions: implications for molecular design. En: Moreno-Piraján JC. Thermodynamics-interactions studies-solids, liquids and gases. Croatia: Intech; 2011:1-48.
80. Hahn-Herrera O, Salcedo G, Barril X, García-Hernández E. Inherent conformational flexibility of F11ATPase  $\alpha$ -subunit. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(9):1392-1402.
81. Reynolds CH, Holloway MK. Thermodynamics of ligand binding and efficiency. *ACS Med. Chem. Lett.* 2011;2(6):433-437.