



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

BASES ENERGÉTICO-ESTRUCTURALES DE LA INHIBICIÓN ALOSTÉRICA
DEL BIDOMINIO TIROSINA CINASA BCR-ABL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ROBERTO CRUZ CASTAÑEDA

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfredo Torres Larios
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Héctor Viadiu Ilarraza
[Instituto de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto PAPIIT IN206221, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) proyecto 235831. Se agradece el apoyo de la Dra. Patricia Cano del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Química de Biomacromoléculas, la Quím. Eréndira García Ríos del Laboratorio de Cromatografía, la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya del Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría, del Instituto de Química, UNAM.



DEDICATORIAS

Al Dr. Enrique García por su alta grado de paciencia, quien se ha convertido no solo en un guía académico extraordinario en este camino, sino también mi amigo con quien siento placer de charlar cada que coincidimos.

*Al grupo de trabajo del Dr. Enrique: **Homero, Lalo, George, Luis...** y quien se me olvide, siempre me brindaron una mano en el laboratorio y en especial al grupo de los ABLologos (**Itzel y Manuel**) con quienes juntos gritábamos de emoción cada que los resultados eran positivos, pero en especial a **Axel Luviano** que sin su compañía y guía esta aventura hubiera sido increíblemente aburrida.*

*A la **Dra. Patricia Cano**, le agradezco la confianza y lo divertido de su compañía, por sus enseñanzas académicas.*

*A **mis profesores** de la carrera y la Maestría que no terminaría en mencionarlos, quienes permitieron encontrara mi vocación y me formaron para la vida profesional.*

Una mención especial a quienes ya no están con nosotros y compartieron un pedacito de este hermoso trayecto, para ustedes Arnulfo Bautista, María del Rocío Patiño y Daniel Said García... ¡vuelen alto!

*Al **Instituto de Química** de nuestra máxima casa de estudios la **Universidad Nacional Autónoma de México**. ¡Por mi raza hablara el espíritu!*

AGRADECIMIENTOS

A mi madre **Eva Castañeda** a quien admiro y respeto por librar una de las batallas más duras en la vida, educar y cuidar a cuatro niños con admirable esfuerzo y dedicación. Cuando leas esta tesis quizás no comprendas mi trabajo, pero algo entenderás, esta tesis también te pertenece pues es el fruto de tus esfuerzos y en cada renglón está escrito un gracias, un te amo, un te admiro, un te quiero y un Dios te bendiga. ¡Te amo mamá!

A mi querida hermana **Elizabeth** quien por años has sido mi cómplice y mi compañera de juegos. Además, ¿cómo olvidar los agarrones de greñas? A ti te dedico mi trabajo porque ambos sabemos cuán difíciles fue crecer solos, porque sabemos que nuestras metas serán más difíciles que las de muchas personas, pero también sabemos que mientras nos tengamos, podremos librar muchas batallas.

A mis hermanos **Nayeli** y **Luis** a quienes amo y deseo que conquistes metas más grandes que las que yo he logrado, sin duda ustedes son un hermoso regalo que la vida me dio.

A la **Sra. Mago** porque cuando nadie estuvo, usted nos vigiló, nos alimentó y nos ayudó. No podría describir lo agradecido que estoy; la admiración y cariño que le tengo, lo que sí puedo escribir es que la llevo en mi corazón en cada paso de mi vida.

A mis hermosos sobrinos **Mariana, Jireh, Magaly, Sofia (las gemelas) y el pequeño Maty** quienes llenan mis días de alegría y en muchas veces mi inspiración, les amo y quiero verlos crecer felices, los quiero con todo mi corazón y mi alegría. Ustedes son la continuidad de nuestro linaje.

A **Roberto Cruz** y **Octavio Cruz** quienes ya no están con nosotros, pero su linaje vive para recordarlos.

A mis Abuelos **Bertín** y **Remedios** por las enseñanzas y cuidados que tuvieron conmigo, espero puedan ver que esos esfuerzos rindieron frutos.

A **Magaly García** que sin duda siempre será tú, gracias por cada minuto que me regalaste, fuiste la mejor coincidencia en mi vida y deseo verte plena y feliz y si existen otras vidas espero y deseo que en esa vida ¡seamos!

A Mamá **Magda** no hay como pagar todo lo que me ayudaste, gracias por ser la guía espiritual y el ánimo en noches oscuras, tu bondad no tiene comparación, solo quiero reiterar que estaré eternamente agradecido y en deuda.

A la ingeniosa **Thali**, quien no me deja subir el escalón, siempre haciéndome ver que la Maestría no quita lo... inocente. Has sido fuente de largas horas de risa y diversión sobre todo cuando lo necesitaba.

A mi tío **Sergio** quien me educo y por quien siento un profundo cariño pues aún en mi mente existen los consejos dados y la guía espiritual que necesitaba.

*A mi tía **Aby** quien se convirtió en mi amiga, mi confidente y un apoyo incondicional, siempre me dio amor, cariño y me sigue consintiendo, así que recuerde... usted siempre estará en mi club.*

*A mis tíos **Irene** y **Ricardo** quienes corrigieron mi camino cuando me equivoque y hoy se alegran por mis triunfos, gracias porque sin su intervención quizás mi camino hubiera sido otro.*

*A **José Margarito Torres**, el hermano mayor que la vida me dio, porque en ti tengo un amigo y un apoyo, te admiro y respeto enormemente. Se que papá está muy orgulloso de ambos.*

*A las Familia **Cruz Lara**, con quienes hemos fortalecido un vínculo que no quiero que se rompa nunca, los amo, les admiro y deseo que podamos tener muchas noches interminables. **Octavio**, **Mayra** y **Jose** les deseo todo lo mejor en este mundo y que nuestros días sigan siendo de risas, cariño y amor.*

*A la **Familia Galicia Rodríguez** por siempre tener consideraciones hacia conmigo.*

A todos aquellos que voluntariamente o involuntariamente me han regalado momentos de risas, amor, comprensión y una que otra cerveza.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 PROTEÍNAS TIROSINA CINASAS	11
1.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y SU IMPACTO EN LA POBLACIÓN MEXICANA	13
1.3 GENERALIDADES ESTRUCTURALES DE ABL	15
1.4 DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL DEL DOMINIO TIROSINA-CINASA	17
1.5 CAMBIOS CONFORMACIONALES GLOBALES ENTRE LA FORMA ACTIVA E INACTIVA DE ABL	20
1.6 ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS CONTRA LA PROTEÍNA DE FUSIÓN BCR-ABL.....	24
1.7 CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL DOMINIO TK TRAS LA UNIÓN DE INHIBIDORES ATP COMPETITIVOS	26
1.8 TERMODINÁMICA DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-LIGANDO	27
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVO GENERAL	33
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 VECTORES DE EXPRESIÓN	34
5.2 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS	34
5.3 SOBREEXPRESIÓN DE SH-ABL	35
5.4 LISIS CELULAR.....	35
5.5 PURIFICACIÓN DE SH-ABL.....	35
5.6 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS- PAGE) 36	
5.7 CUANTIFICACIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	37
5.8 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	37
5.9 ANÁLISIS DE DICROÍSMO CIRCULAR	38
5.10 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA	38
5.11 CÁLCULO DE ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE (ASA)	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1 SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE SH-ABL	40
6.2 PLEGAMIENTO Y ESTABILIDAD TÉRMICA DE SH-ABL	42
6.3 CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE UNIÓN ENTRE SH-ABL A INHIBIDORES ATP COMPETITIVOS	45
6.4 EFECTO DEL ÁCIDO MIRÍSTICO EN LA UNIÓN DE INHIBIDORES ATP COMPETITIVOS	46
6.5 CAMBIOS EN LA CAPACIDAD CALORÍFICA ACOPLADOS A LA UNIÓN DE INHIBIDORES	48
6.6 TERMODINÁMICA DE UNIÓN ENTRE SH-ABL Y DODECILSULFATO DE SODIO (SDS).....	49
6.7 LOS DOMINIOS SH3-SH2 AFECTAN LA ESTABILIDAD TÉRMICA DEL DOMINIO TK.....	52
6.8 LA UNIÓN DE IMATINIB A SH-ABL ES MARGINALMENTE MÁS AFÍN QUE CON DASATINIB, AUNQUE CON FIRMA TERMODINÁMICA DISÍMIL.....	52
6.9 LA PRESENCIA DE MYR AUMENTA LA AFINIDAD POR DASATINIB, SIN ALTERARLA SIGNIFICATIVAMENTE POR IMATINIB	53
6.10 LOS INHIBIDORES IMATINIB Y DASATINIB LLEVAN A SH-ABL A ADOPTAR CONFORMACIONES DIFERENTES QUE DEPENDEN DEL EFECTO DEL INHIBIDOR ALOSTÉRICO	54

6.11	CONTRIBUCIÓN DE LOS DOMINIOS SH3 Y SH2 A LA UNIÓN DE INHIBIDORES A TK-ABL.	56
6.12	EL DODECILSULFATO DE SODIO (SDS), UN POSIBLE BUEN EMULADOR DEL ÁCIDO MIRÍSTICO .	58
7.	CONCLUSIONES.....	59
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	60
	APÉNDICE 1. DICROÍSMO CIRCULAR.....	65
	APÉNDICE 2. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC)	67
	ANEXOS:.....	70
	SOLUCIONES AMORTIGUADORAS, REACTIVOS Y MEDIOS	70

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADP: Adenosín difosfato

ASA: Área superficial accesible al solvente

ATP: Adenosín trifosfato

DC: Dicroísmo circular

DO: Dominio de oligomerización

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600nm

Ec: Ecuación

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ITC: del inglés *Isotermal Titration Calorimetry*

K_a: Constante de asociación

K_d: Constante de disociación

LB: medio *Luria-Bertani*

LMC: Leucemia Mieloide crónica

MALDI-TOF: Del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*

Myr: Ácido mirístico

P-loop: Del inglés *phosphate-binding loop*

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PR: Proteína recombinante

PTKs: del inglés *Protein Tyrosine kinases*

SH2: del inglés *Src homology 2*

SH3: del inglés *Src homology 3*

Try: tirosina

UA: Unidades de absorbancia

Δ ASA: Cambio de área superficial accesible al solvente

Δ Cp: Cambio en la capacidad calorífica

Δ G: Cambio en la energía libre de Gibbs

Δ H: Cambio en la entalpía

Δ S: Cambio en la entropía

Src: del inglés *stored response chain*

RESUMEN

Bajo condiciones normales, la actividad catalítica de la tirosina-cinasa Abl es finamente regulada por varios mecanismos intra e intermoleculares. En la forma desfosforilada de la cinasa, el grupo miristoilo presente en el extremo terminal se une al dominio catalítico, ocasionando acomodados conformacionales en el sitio de unión a MgATP que resulta en la inhibición catalítica de forma alostérica. La translocación cromosómica t(9;22)(q34;q11) genera la enzima oncogénica Bcr-Abl como producto del entrecruzamiento segmentado de los genes que codifican para Abl y para la proteína Bcr. Debido a la pérdida del grupo miristoilo en Bcr-Abl, la actividad transforforilante de la enzima queda desregulada, ocasionando el desarrollo, mantenimiento y progresión de la leucemia mieloide crónica (LMC).

La estrategia farmacológica más explorada para regular la actividad de Bcr-Abl ha consistido en inhibir competitivamente el sitio de unión a MgATP. Hasta el momento, se han desarrollado fármacos eficaces como imatinib, dasatinib, nilotinib, entre otros, que conducen a la remisión de la enfermedad. Sin embargo, se ha reportado con frecuencia creciente la ocurrencia de mutaciones puntales en el sitio de unión a MgATP que provocan que los inhibidores competitivos pierdan su capacidad de unión a Bcr-Abl y, por lo tanto, su eficacia clínica. En vista de ello, la inhibición alostérica de Bcr-Abl es un campo que ha despertado gran interés. Recientemente, se han sintetizado fármacos como GNF-5 y Abl001 (Novartis Pharmaceuticals) que se unen al sitio de unión del miristoilo, generando una inhibición alostérica. La importancia de estos inhibidores radica en que las terapias duales en combinación con fármacos competitivos son eficaces para eliminar células en cultivo que expresan resistencia a fármacos como la mutación T315I (Bcr-Abl^{T315I}), que es la que genera la mayor resistencia a tratamientos monofármaco.

Con el fin de proveer información que permita arrojar nueva luz sobre el mecanismo de regulación alostérica de Abl humana, la cual eventualmente pueda resultar de utilidad para establecer estrategias de desarrollo y optimización de nuevos fármacos para la inhibición de Bcr-Abl, en el presente estudio realizamos una caracterización termodinámica de los efectos energéticos de unión mutuos entre el sitio activo y el sitio alostérico de la enzima. Se realizó la sobreexpresión en sistema bacteriano y la purificación de una construcción recombinante (SH-Abl) consistente en los dominios de homología SH3 y SH2 unidos al dominio catalítico de la enzima (TK-Abl), obteniendo un rendimiento en el orden de decenas de miligramos de proteína

por litro de medio de cultivo. El plegamiento y la integridad estructural de SH-Abl fueron comprobados mediante dicroísmo circular en el UV lejano. Los experimentos de interacción mediante calorimetría de titulación isotérmica mostraron que SH-Abl une imatinib y dasatinib con una afinidad sub-nanomolar, aunque con una entalpía de unión mucho más favorable para el primero de los inhibidores. La ocupación del sitio alostérico con ácido mirístico provocó un incremento de un orden de magnitud en la afinidad de SH-Abl por dasatinib, mientras que la afinidad por imatinib se modificó marginalmente. Este efecto diferencial en la afinidad por los inhibidores estuvo acompañado por cambios grandes y opuestos en la entalpía de interacción. Además, un análisis de los valores del cambio de capacidad calorífica determinados para cada complejo estudiado, señala que la unión de inhibidores a SH-Abl está acompañada por cambios conformacionales de diferente magnitud, llevando a SH-Abl a adoptar diferentes conformaciones en función del inhibidor competitivo y/o alostérico al que se asocie. Un análisis comparativo con datos de unión TK-Abl aislado, permitió evaluar los efectos energéticos de los dominios SH3 y SH2 en el reconocimiento de inhibidores farmacológicos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas Tirosina Cinasas

Aproximadamente el ~2% del genoma humano transcribible codifica para 518 diferentes cinasas, siendo este grupo de enzimas el segundo más numeroso del proteoma. Las cinasas están clasificadas en tres familias: proteínas serina/treonina (385 miembros), proteínas tirosina cinasa (90 miembros) y proteínas pseudo-tirosina cinasas (43 miembros)(1, 2).

Las tirosinas cinasas (PTKs del inglés *protein tyrosine kinases*) conforman una gran y diversa familia, presente principalmente en el filo *Metazoas*, aunque también se han caracterizado enzimas en los grupos de *los Coanoflagelados* y los *Filasteas*. Estos tres grupos provienen de un solo tronco común que se remonta a hace 600 millones de años (2, 3). Las PTK catalizan la transferencia del fosfato gama del nucleótido trifosfato (ATP) a un residuo de tirosina (Tyr) de una cadena proteica, resultando en un cambio conformacional que afecta la función de la proteína cliente (4). Las PTKs tienen un dominio catalítico altamente conservado, muy similar en las proteínas serina/treonina cinasas, pero con motivos que identifican solo a la familia de las tirosina cinasa con un alto grado de conservación (5).

Se sabe que el humano expresa cerca de 90 genes de PTK distribuidos en 19 de los 24 cromosomas humanos (**Figura 1**). De los 90 genes, 58 pertenecen a las RTK (RTK del inglés *receptor tyrosine kinases*) distribuidos en 20 subfamilias y 32 genes para el tipo no receptoras (NRTK del inglés *non-receptor tyrosine kinases*) que pueden ser divididas a su vez en 10 subfamilias (2). Las RTK son proteínas transmembranales involucradas en la traducción de señales del medio extracelular. Las RTK están compuestas por tres dominios: un dominio extracelular (que se une al ligando), un dominio transmembranal y finalmente un dominio catalítico intracelular (que fosforila al sustrato). Las NRTK actúan en diferentes compartimientos celulares como proteínas reguladoras. Éstas carecen de un dominio transmembranal, jugando un papel importante en muchas vías de señalización (2, 4, 6). Contienen un dominio cinasa a menudo acompañado de dominios de señalización o interacción proteína-proteína tales como los dominios de homología SH2 y SH3 (7). En los últimos 20 años, se ha intensificado el estudio de las cinasas. Esto ha permitido entender el papel las PTK en el desarrollo de enfermedades humanas como la diabetes y el cáncer (2). Además, los genes de las PTK también han sido vinculados a una variedad de síndromes congénitos (4, 6, 8).

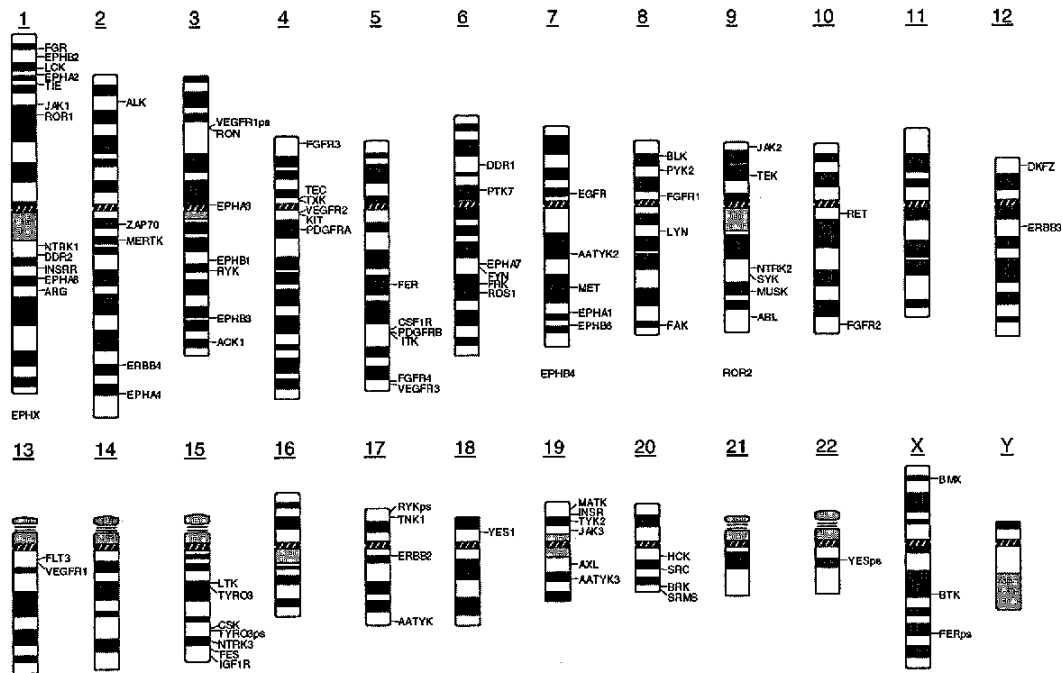


Figura 1 Distribución de genes de proteínas tirosina cinasas (PTK) en el genoma humano (2).

De manera normal, las PTK están involucradas en diversos procesos de regulación como señalización, crecimiento, diferenciación, adhesión, motilidad y muerte celular. Han sido implicadas en vías de señalización que previenen la proliferación desregulada o contribuyen a la sensibilidad de estímulos apoptóticos. Sin embargo, estas vías de señalización están alteradas en células cancerosas, favoreciendo la sobrevivencia y proliferación. Por tanto, no es de sorprender que el fallo en la regulación de las PTK puede resultar en el mal funcionamiento de la red de señalización, y proveen la generación de células malignas (7, 9, 10). En virtud de ello, estas enzimas se han posicionado como blancos farmacológicos. Se han propuesto diversas estrategias para su inhibición, como el desarrollo de moléculas que compitan por el sitio de unión a ATP (11–13), anticuerpos monoclonales (14), fármaco-péptidos (15), inhibidores alostéricos (16) e inhibidores de la angiogénesis (17), entre otras. En los últimos años se han identificado y estudiado algunas tirosina cinasas frecuentemente involucradas en cáncer como Src (18), EGFR (19) y Abl (20), entre otras (21). Abl es una tirosina-cinasa involucrada en el desarrollo de la leucemia mieloide crónica (LMC), el cáncer más estudiado tanto a nivel celular como molecular. La búsqueda de la inhibición de Abl ha llevado a innumerables investigaciones alrededor del mundo para poder entender su funcionamiento y su papel en la enfermedad (11).

1.2 Leucemia mieloide crónica y su impacto en la población mexicana

La LMC es un desorden clonal que se origina en las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, caracterizado por un exceso de granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos). En 1973, Janet Rowley definió a la LMC como la primera enfermedad maligna determinada por la adquisición de un único evento genético que ocurre a nivel cromosómico (22, 23). La causa molecular de la LMC es la translocación recíproca entre los brazos *q* de los cromosomas 9 y 22 (**Figura 2**), generando un cromosoma 9 más largo y un cromosoma 22 más corto llamado cromosoma Philadelphia (Ph+). Esta translocación fusiona la porción 3' del gen de la cinasa Abl (del inglés *ABelson Leukemia virus homologe*) en el cromosoma 9 con la porción 5' del gen que codifica la enzima Bcr (del inglés *Breakpoint Cluster Región*) en el cromosoma 22, resultando en la expresión de una proteína quimérica Bcr-Abl. La tirosina-cinasa Abl está presente en todas las células del organismo humano, teniendo una actividad finamente regulada. Interacciona con otras proteínas que conjuntamente regulan procesos celulares tales como la adhesión celular, la reparación del ADN y la dinámica del citoesqueleto (24). Por otro lado, Bcr es una Thr/Ser cinasa, que también funciona como una proteína activadora de la GTPasa conocida como Rac1, la cual está involucrada en la formación de la red neuronal. A través de esta actividad, la proteína Bcr ayuda a regular el movimiento (migración) y la función de las células (25).

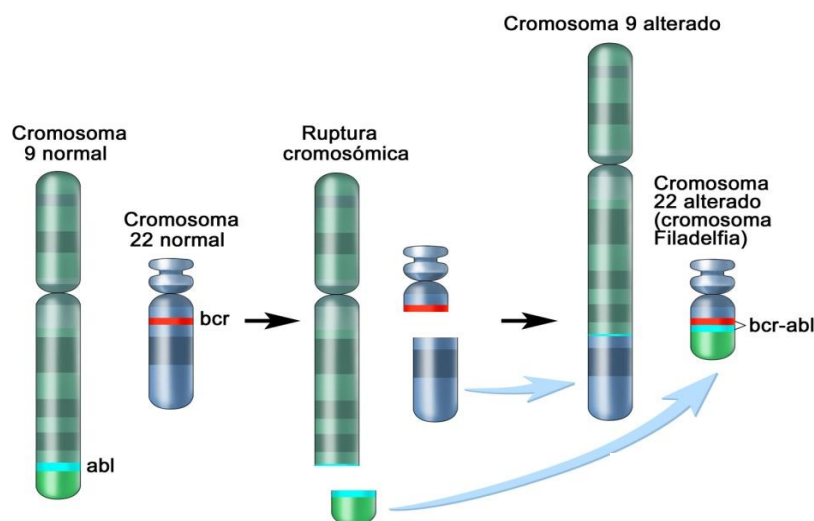


Figura 2. Translocación t(9;22) (q34;q11) que origina el cromosoma filadelfia. Segmentos de los brazos largos (*q*) de los cromosomas 9 y 22 sufren una ruptura en los sitios de los genes *Abl* y *Bcr* respectivamente, los cuales son intercambiados recíprocamente para dar origen a un cromosoma 9 alterado (gen quimérico *Abl-Bcr*) y a un cromosoma 22 alterado (gen quimérico *Bcr-Abl*), este último denominado cromosoma Philadelphia (modificado de <https://www.teresewinslow.com/#/cellular-scientific/>).

El sitio de corte en el cromosoma 22 puede darse en tres lugares distintos (exón 1, 11/12 y 13); dependiendo del sitio será el peso molecular de la proteína quimérica resultante. En el 90% de los casos, el rompimiento en el cromosoma 22 da origen a una proteína de 210 kDa (p210^{BCR-Abl}) asociada a la LMC (23, 26). Bcr-Abl en las células malignas se encuentra constitutivamente activa, por lo que su desregulación está involucrada en procesos como inhibición de la apoptosis, la pérdida de la adhesión celular y aumento de la proliferación, entre otras alteraciones que resultan en el desarrollo de la enfermedad (20, 26). A medida que la enfermedad avanza, nuevas anormalidades citogenéticas pueden irse desarrollando, así como mutaciones en el dominio cinasa de Bcr-Abl. Estas mutaciones están asociadas a la resistencia a tratamientos farmacológicos de LMC (23).

Cabe mencionar que la fusión de Abl con otras proteínas también conduce a la pérdida de los mecanismos autorregulatorios de Abl, asociándose a otros tipos de leucemias. Aquí, las proteínas de fusión aportan motivos que incrementan la actividad cinasa de Abl (20). Además, Abl ha sido detectada en otros tipos de tumores sólidos como mama, colorrectal, pulmón y ovario, presentado una amplificación génica, acumulación de mutaciones y alta actividad catalítica. Sin embargo, los mecanismos de Abl en este tipo de neoplasias aún son poco conocidos (27).

Según la *American Cancer Society*, la LMC representa un poco más del 10% de todos los casos de leucemia en Estados Unidos. Este tipo de leucemia se presenta principalmente en adultos y rara vez en niños. La edad media de diagnóstico es alrededor de los 64 años de edad, y casi la mitad de los casos se diagnostica en mayores de 65 años. En el 2018, aparecieron cerca de 8,430 nuevos casos (4,980 hombres y 3,450 mujeres) con una mortalidad del 22% (28). Particularmente en México, diversos estudios han determinado la edad media de diagnóstico entre los 39 y 43 años, con los límites de edad entre 12 y 86 años. La falta de unificación en estas estadísticas en nuestro país hace difícil la estimación precisa de estos datos, aunque se calcula que existen alrededor de 80,000 casos de leucemia, el 10% de los cuales corresponde a LMC. La incidencia anual aproximada es 1-1.5 casos por cada 100,000 habitantes (29, 30).

La LMC es la primera enfermedad neoplásica que tiene un tratamiento dirigido a un blanco molecular en específico. La primera línea de tratamiento son inhibidores de unión al sitio catalítico de Bcr-Abl. Este tipo de tratamientos ha extendido la supervivencia de los pacientes hasta por 10 años en el 87% de la población enferma. En cambio, otras estrategias previas de quimioterapia o la aplicación de interferón llevan a una supervivencia menor a 5 años (31). El costo anual aproximado de tratamiento con los inhibidores clínicamente aprobados imatinib y

dasatinib es de \$29,000.00 y \$49,500.00 dólares, respectivamente. Es evidente que dichos costos constituyen un gran obstáculo para que las terapias basadas en tales fármacos puedan estar al alcance de la mayoría de los pacientes que los necesitan (29).

1.3 Generalidades estructurales de Abl

Abl presenta una arquitectura multidominio. La primera mitad de la secuencia (residuos 1–531) es homóloga a la familia de tirosina-cinasas Src, constando de los dominios SH3, SH2 y un dominio tirosina-cinasa (TK del inglés *Tyrosine kinase*) (24, 32). La segunda mitad cuenta con dominios que la diferencian de la familia Src como un dominio de unión a DNA, un dominio de unión a filamentos de actina y motivos de reconocimiento cortos (33, 34) (**Figura 3A**).

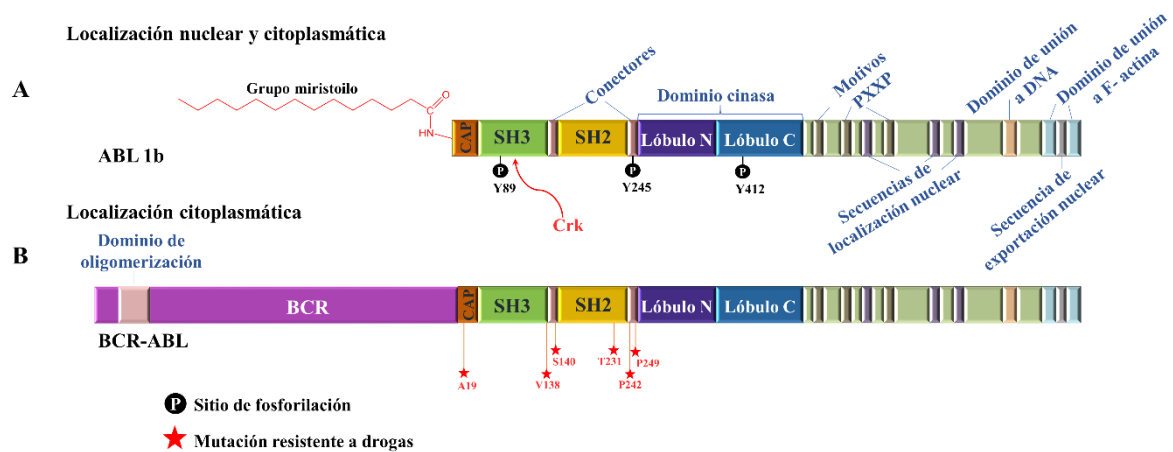


Figura 3. Organización estructural de la proteína Abl y BCR-Abl. A) Organización estructural de la proteína Abl isoforma 1b donde se muestran sus diferentes regiones y dominios. B) Organización estructural de la oncoproteína quimérica Bcr-Abl, en donde se observa el dominio de oligomerización en el segmento Bcr que favorece su actividad transformante y además se muestra la pérdida del grupo miristoilo autorregulatorio. Se muestran mutaciones en diferentes dominios que generan resistencia a fármacos (adaptado de Hantschel O y Saleh T (32, 35)).

El gen *abl* produce dos variantes por empalme alternativo, uno de ellos tiene un grupo miristoilo en el extremo N-terminal (Abl-1b) y otro que es 19 residuos más corto en el extremo N-terminal (Abl-1a), que no presenta esa modificación postraduccional (32, 36). La organización estructural de Abl está conformada, desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal, por los siguientes elementos:

- La región cap (residuos 1-84) que se puede encontrar miristoilada o no. El grupo miristoilo es una cadena alifática de 14 carbonos que tiene un papel clave en su regulación catalítica. Estructuras cristalográficas (34) y estudios de unión (37) han revelado que este grupo miristoilo interactúa con un hueco hidrofóbico ubicado en

el lóbulo C del dominio catalítico (TK). Se ha caracterizado que la unión de pequeñas moléculas hidrofóbicas a este hueco altera la actividad catalítica de la cinasa, apoyando que existe una comunicación alostérica entre el sitio de unión del grupo miristoilo y el sitio activo (38, 39).

- El dominio SH3 (residuo 85-138) compuesto de dos hebras- β cortas antiparalelas, empaquetadas una contra la otra para formar una estructura en forma de barril. El dominio SH3 puede unir péptidos ricos en prolina.
- Un pequeño *linker* o conector^{SH3/2} (139-152) que une al dominio SH3 con un dominio SH2.
- El dominio SH2 (residuos 153-237), cuya estructura consiste en una hebra- β antiparalela central, flanqueada por hélices- α . Este dominio tiene dos funciones importantes para la regulación de Abl, uno es el reconocimiento de fosfotirosinas de las proteínas blanco (40), y el segundo es el reconocimiento del empaquetamiento de SH2 con el lóbulo C-terminal a través de una red de puentes de hidrógenos y una interacción por traslapamiento de anillos entre la Try161 del SH2 y la Try 361 del C-terminal (32–34, 36, 37).
- Un *linker* (residuos 238-250) que enlaza el dominio SH2 con el dominio TK. Este *linker* posee un motivo poliprolina (PXXP) que adopta una conformación helicoidal tipo poliprolina tipo II (PPII), la cual es reconocida por el dominio SH3 (32–34, 36, 37).
- El dominio TK (residuos 251-534), el cual contiene dos lóbulos que se dividen por el sitio catalítico de la enzima.
- La segunda mitad de la secuencia de Abl (residuos 535-1100) contiene motivos ricos en prolina (PXXP), motivos de localización nuclear, un dominio de unión a DNA y finaliza con una secuencia de exportación nuclear (**figura 1A**).

Cuando se da la traslocación cromosómica, el gen de Bcr se fusiona al N-terminal de Abl, eliminando parte de la Cap que tiene al grupo miristoilo autorregulatorio (**Figura 3B**). La proteína Bcr contiene un dominio de oligomerización que es sustancial para el establecimiento de la enfermedad. Este dominio se compone de una hélice N-terminal corto, un bucle flexible y

una larga hélice C-terminal que forman una estructura con forma de N con el bucle, que permite a las dos hélices asumir una orientación paralela (**Figura 4A**). El dominio de oligomerización favorece la formación de oligómeros de Bcr-Abl, permitiendo la transfosforilación de Abl y aumentar su actividad cinasa (**Figura 4B**)(41).

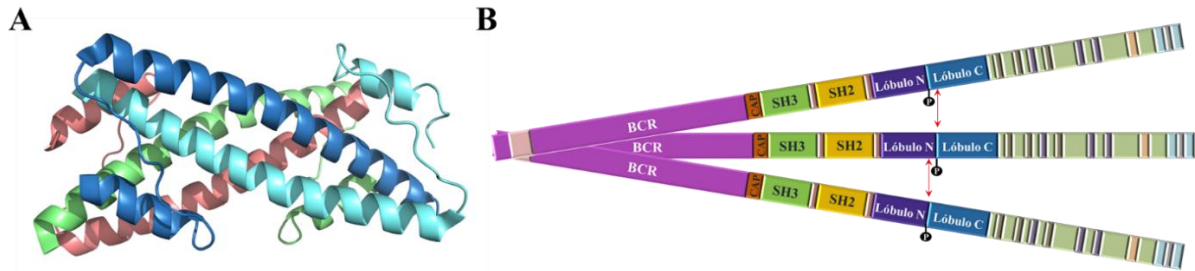


Figura 4. Dominio de Oligomerización (DO) y su papel en BCR-Abl. A) Estructura cristalográfica del dominio de oligomerización (PDB: 1K1F), donde se muestran cuatro cadenas independientes del dominio de oligomerización (DO), interactuando a través de intercambio de hélices- α . **B)** La polimerización del DO genera un oligómero que favorece la transfosforilación de Abl, y así la activación de su función cinasa.

1.4 Descripción estructural del dominio tirosina-cinasa

El dominio tirosina-cinasa (residuos 251-534 en Abl humana) se divide en dos lóbulos. El lóbulo N (251-335) está compuesto de cinco hebras β antiparalelas y la llamada hélice- α C. El lóbulo C (335-534) está mayoritariamente formado por hélices α ; entre ellas se encuentra la hélice α I, la cual se dobla al interactuar con el grupo miristoilo de la Cap (**Figura 5**). En la interfase de estos dos lóbulos se encuentra el sitio activo. Los dos lóbulos están conectados a través de una hebra (la región del conector / bisagra) que actúa como una bisagra sobre la cual pueden rotar uno con respecto al otro al unir ATP y / o al péptido sustrato (32–34, 36, 37).

Los residuos del 266-275, ricos en glicinas, forman un asa llamada P-loop entre las hebras- β B1 B2 del lóbulo N (**figura 5**). Estos residuos participan en el reconocimiento de los fosfatos β y γ del ATP (42). La región bisagra que une a los lóbulos N y C está estructurado por los aminoácidos 335-340, los cuales generan una plataforma donde la adenina del ATP se asienta (43).

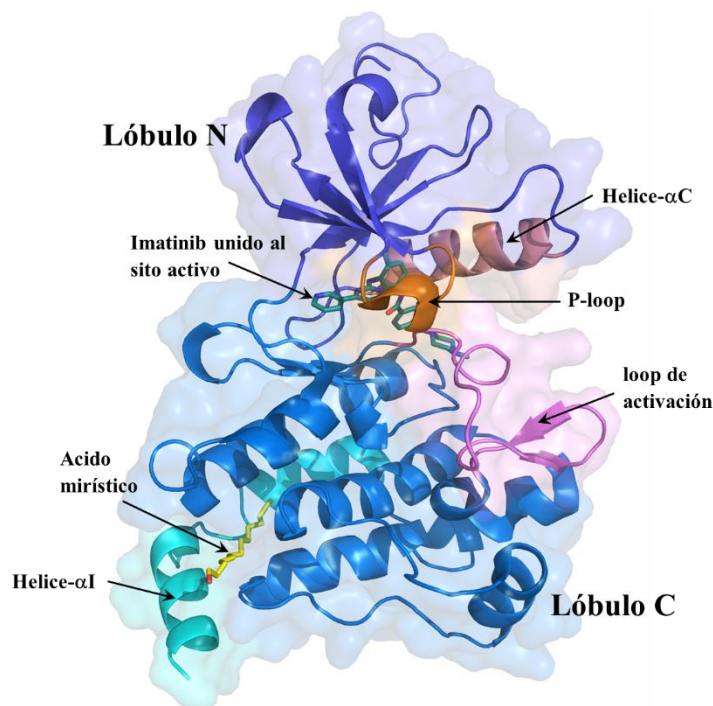


Figura 5. Estructura del dominio tirosina-cinasa (TK-Abl). Estructura resuelta por rayos X unida a imatinib, un fármaco de primera generación; además fue resuelto un ácido mirístico unido al sitio de regulación alostérica en el lóbulo C (PDB 1OPJ).

Otro elemento clave para la regulación de la actividad cinasa de Abl es el llamado *loop* de activación (residuos 400-421). Este loop de alta flexibilidad se encuentra en el lóbulo C (**Figura 5**). Oscila entre dos conformaciones, una DGF-in (activa) y otra inactiva DFG-out (inactiva) (**Figura 6A**). El motivo aspartato-fenilalanina-glicina (DFG) en el estado activo está orientado hacia el sitio activo, donde puede coordinar un ion Mg^{2+} importante para la catálisis. En la conformación inactiva, el aspartato se aleja del sitio activo y la fenilalanina se mueve hacia adentro, en una conformación que imposibilita estéricamente la unión de Mg^{2+} . La fosforilación de la Tyr-412 que se encuentra en el loop de activación, conduce a una interacción electrostática con Arg-405, estabilizando una conformación del loop abierta y expuesta al solvente, permitiendo el acceso del péptido sustrato al sitio catalítico (**Figura 6B**) (36, 42–44). En la conformación cerrada del loop, la tirosina del loop no está fosforilada, y se encuentra formando un puente de hidrógeno con el aspartato catalítico (Asp-382). Esta interacción oculta al sitio catalítico, y el loop mimetiza al péptido sustrato (**Figura 6B**) (36, 44). La hélice αC también sufre un cambio conformacional dependiendo del estado en que se encuentra el dominio tirosina cinasa (DFG-in o DGF-out). El Glu-305 está interaccionando con la Lys-290 orientando a la hélice αC de una manera muy particular(43, 45).

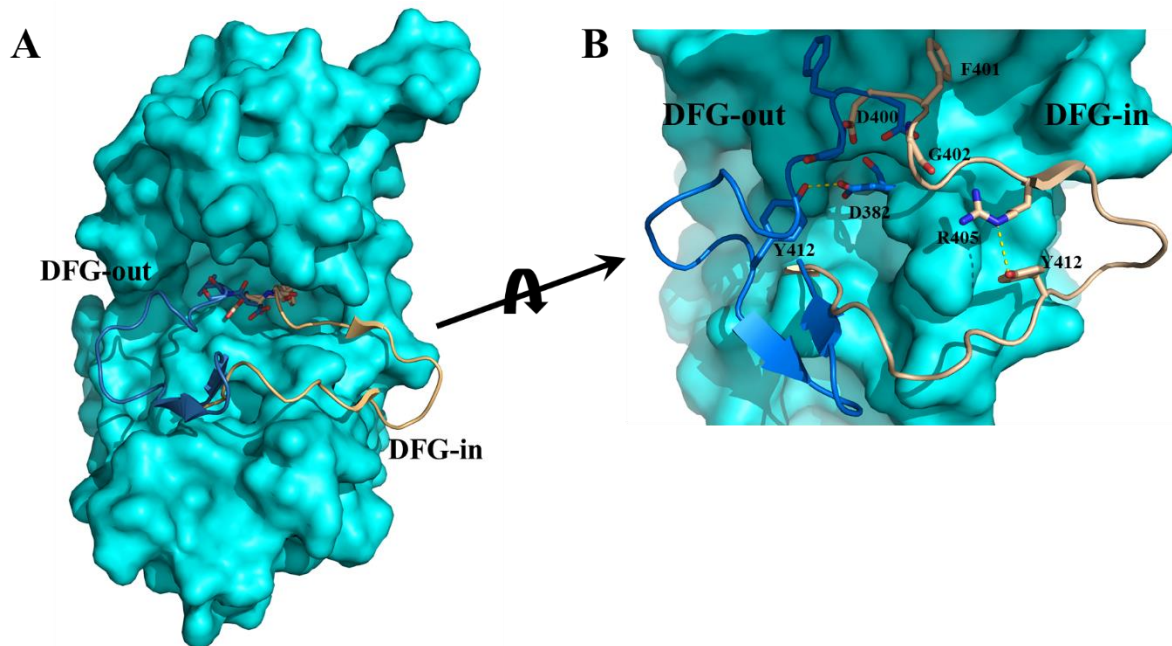


Figura 6. Conformación DFG-in y DFG-out del loop de activación en el dominio TK. A). El loop de activación puede oscilar entre dos conformaciones, una DFG-out (conformación inactiva), donde el loop se encuentra oculto al solvente mimetizando al péptido sustrato en el sitio activo y la conformación DFG-in (conformación activa) donde el loop se encuentra más expuesto al solvente permitiendo la entrada del ATP al sitio catalítico. B) La secuencia consenso DFG se encuentra orientada en el sentido contrario con respecto a la otra. La conformación inactiva se encuentra estabilizada por la interacción entre la tirosina catalítica (Y412) y un ácido aspártico del lóbulo C, mientras que la conformación activa la tirosina catalítica está interaccionando directamente con la arginina⁴⁰⁴ del mismo loop de activación (PDB: 1OPJ y 2GQG).

1.5 Cambios conformacionales globales entre la forma activa e inactiva de Abl

Estudios cristalográficos (34, 46) y cinéticos (47) han descrito a grandes rasgos el modo de regulación de Abl. De forma normal, la proteína es capaz de oscilar entre dos conformaciones, una cerrada o autoinhibida y otra abierta o activa (**Figura 7**) (34, 35, 46–49). Con base en su arquitectura modular, Abl posee varios elementos estructurales con conformaciones particulares en sus formas abierta o cerrada. De manera general, se han descrito tres motivos estructurales regulatorios clave para la actividad enzimática: i) el loop de activación altamente flexible que actúa como “compuerta” permitiendo el acceso de ATP, ii) la interacción SH3 con el linker de SH2 y TK (linker^{SH2-TK}), que es importante para mantener a Abl en una conformación cerrada; la pérdida de esta interacción permite la apertura de Abl y el incremento de su actividad y iii) un hueco hidrofóbico en el dominio C que une al grupo miristoilo (37), permitiendo actuar a la CAP como abrazadera estabilizadora de la conformación cerrada (**Figura 7A**) (36, 46).

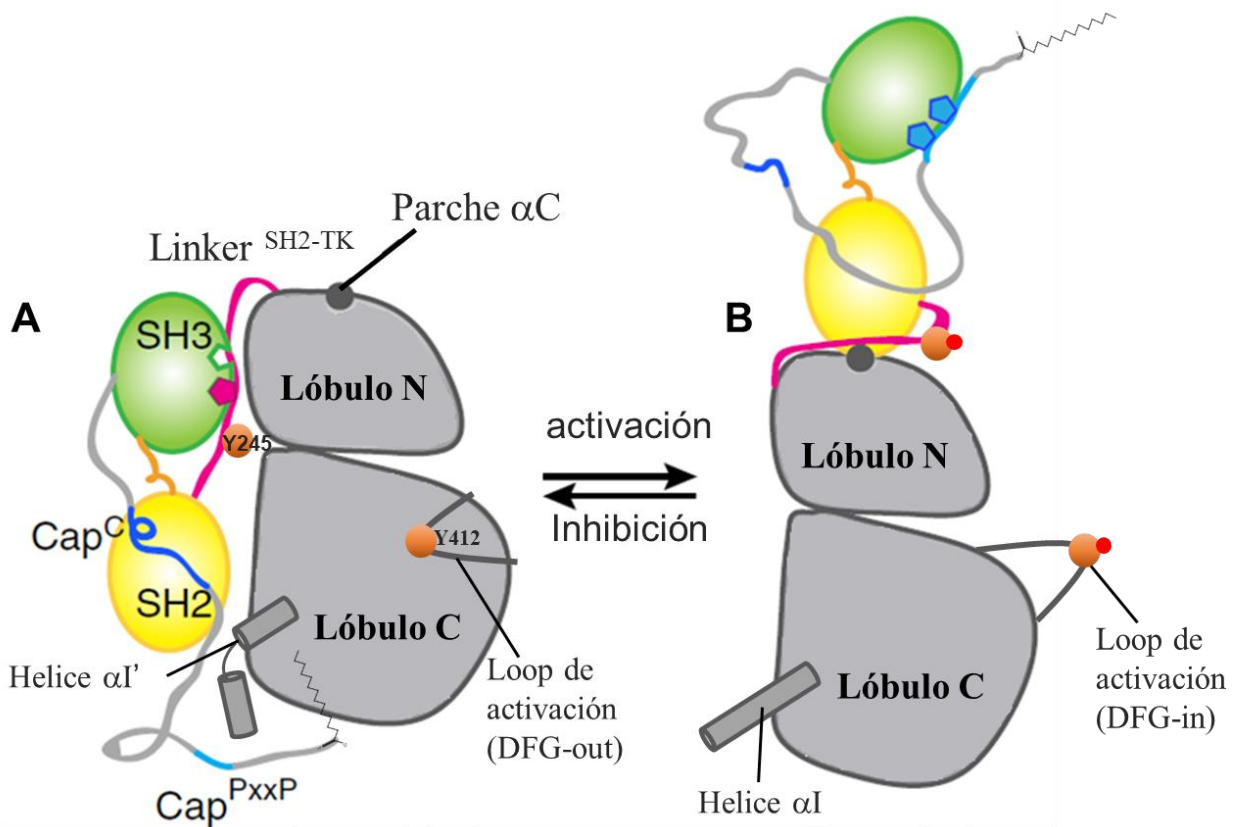


Figura 7. Esquema de las conformaciones de Abl. A) Conformación autoinhibida o cerrada estabilizada por una interacción del grupo miristoilo de la CAP con el lóbulo C del dominio cinasa. B) Conformación extendida o abierta favorecida por la fosforilación de los residuos Y-226 y Y-393 (círculos naranjas) (adaptado de Saleh T, *et al.*(35))

Se han resuelto estructuras cristalográficas de una construcción de Abl que contiene a los dominios SH3-SH2, donde se observan dos conformaciones, una conformación cerrada que está unida a miristato y al inhibidor ATP competitivo PD166326 (**Figura 8**), y una conformación abierta unida también a un inhibidor competitivo, pero en ausencia del grupo miristoilo en el sitio alostérico. En esta última estructura no se resuelve el dominio SH3, aunque se observa densidad difusa sobre el SH2 (34).

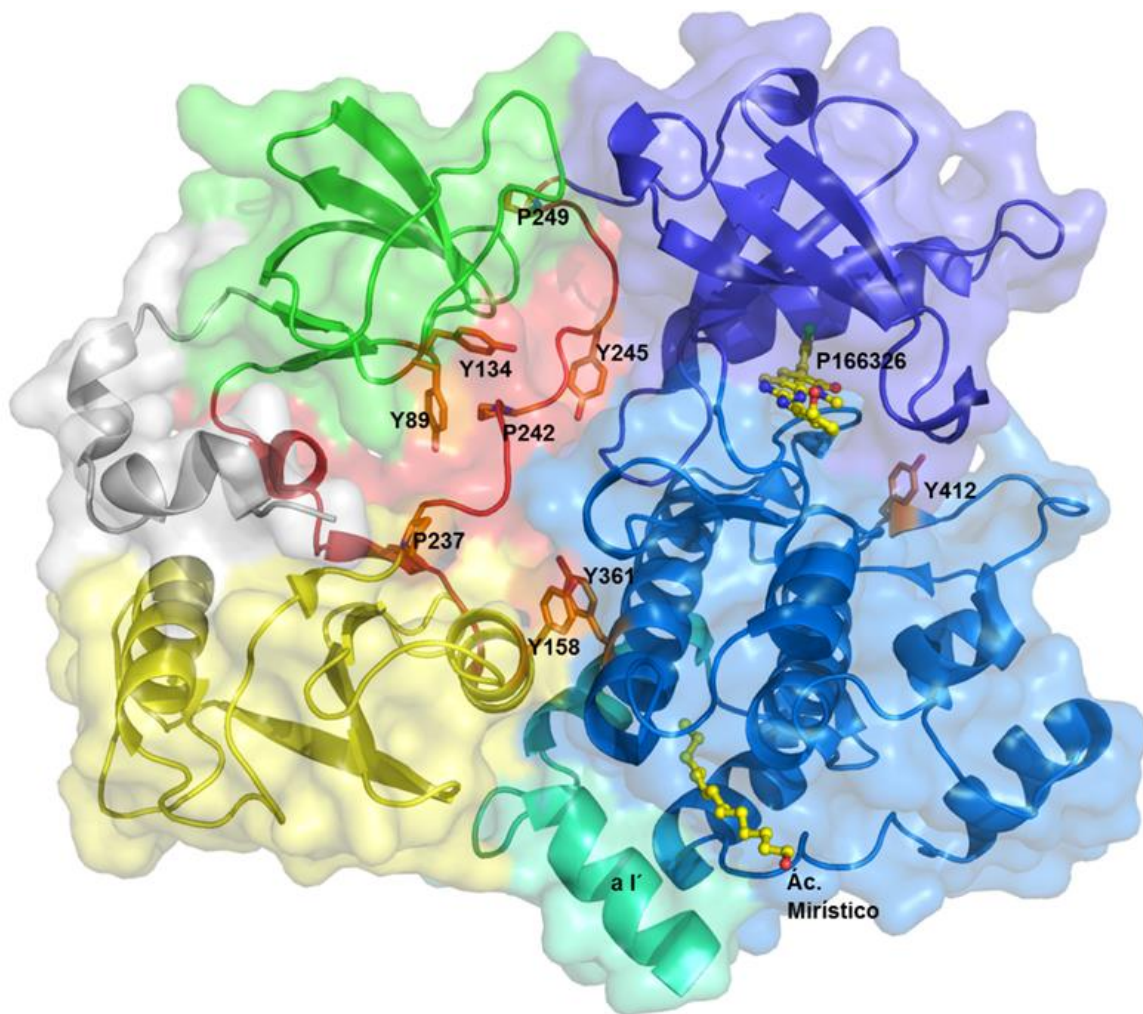


Figura 8. Estructura cristalográfica de Abl en conformación cerrada. En color azul el lóbulo C y una molécula de ácido mirístico (color amarillo), en morado el lóbulo N. En la interfaz del bidominio se encuentra unido al inhibidor PD166326. En rojo se muestra el *linker* LPXXP que une al dominio cinasa con el dominio SH2 (amarillo), este último con el residuo Y-158 interacciona hidrofólicamente con el residuo Y-361 del lóbulo C. Los residuos Y-89 y Y-134 del dominio SH3 (verde) interaccionan con el residuo P-242 del *linker* LPXXP, que adopta una estructura PPII gracias a los residuos P-237, P-242 y P-249. (PDB: 2FO0).

La conformación cerrada es compacta, estabilizada por la unión del grupo miristoilo a la cavidad hidrofóbica del lóbulo C. 12 de los 14 carbonos que componen la cadena alifática del miristoilo quedan ocluidos en la cavidad (**Figura 9A**), provocando el doblamiento de la hélice- αI , que en la conformación abierta se encuentra recta (**Figura 9B**). El doblamiento de la hélice permite el contacto del SH2 con el lóbulo C, contacto que está impedido cuando la hélice- αI está recta. La interacción SH2-lóbulo C está dada por interacciones electrostáticas entre varios residuos de ambos dominios, además de varias aguas estructurales que sirven como puente. Adicionalmente, se observa una interacción de apilamiento de anillos entre Y-158 y Y-361 (**Figura 9C**) (34, 46, 49).

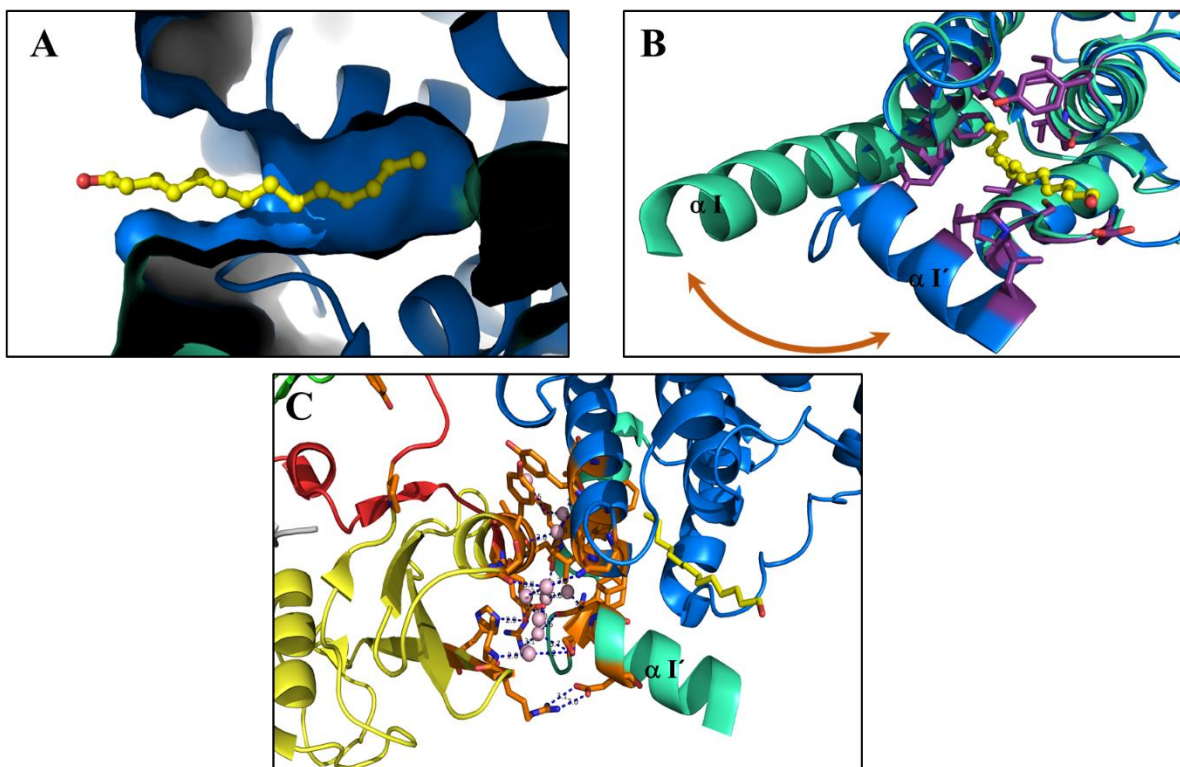


Figura 9. Inhibición alostérica de Abl por la unión del ácido mirístico. A) El ácido mirístico se entierra en la cavidad hidrofóbica del lóbulo C, B) provocando el doblamiento de la hélice- αI , cambio que permite que C) el dominio SH2 interactúe con el lóbulo C del dominio TK a través de contactos electrostáticos entre varios aminoácidos y aguas estructurales en la interfase (esferas rosas), además del apilamiento de anillos de Y-89 y Y-134. (PDB: 2FO0 y 3PYY)

En la conformación cerrada, se observa al dominio SH3 interactuando con la hélice tipo PPII del linker^{SH2-TK}. El principal contacto que contribuye a estabilizar la unión entre SH3 y el linker^{SH2-TK} se da entre los residuos Y-89 y Y-134 contenidos en el SH3, que interactúan directamente con uno de los residuos de prolina del motivo PXXP (**Figura 8**) (36, 50).

Para que Abl transite de una conformación cerrada a una conformación abierta es necesario la fosforilación de residuos de tirosina que participan en la estabilización de la conformación cerrada como son la Y-89, Y-134, Y-158 y Y-361, en las que se incluyen la tirosina catalítica en el loop de activación (Y-412) y una tirosina en el linker^{SH2-TK} (Y-245). La fosforilación del residuo Y-245 permite la separación de los dominios SH3 y SH2 del dominio cinasa (37, 47). De esta manera, el dominio SH2 ahora es trasladado a una región llamada “parche αC ” localizada en la parte superior del lóbulo N del TK, estabilizado por interacciones hidrofóbicas (34, 47, 49, 51) donde un residuo de isoleucina (I-164) contenido en el SH2 es importante para la interacción (**Figura 10**). Se ha mostrado experimentalmente que la mutación I164E provoca una disminución considerable de la actividad enzimática, al interrumpir la interacción entre el SH2 y el lóbulo N de TK, mientras que otra mutante (T231R) que refuerza la interacción SH2-lóbuloN aumenta la actividad catalítica hasta 3 veces comparado con el TK aislado (47, 51).

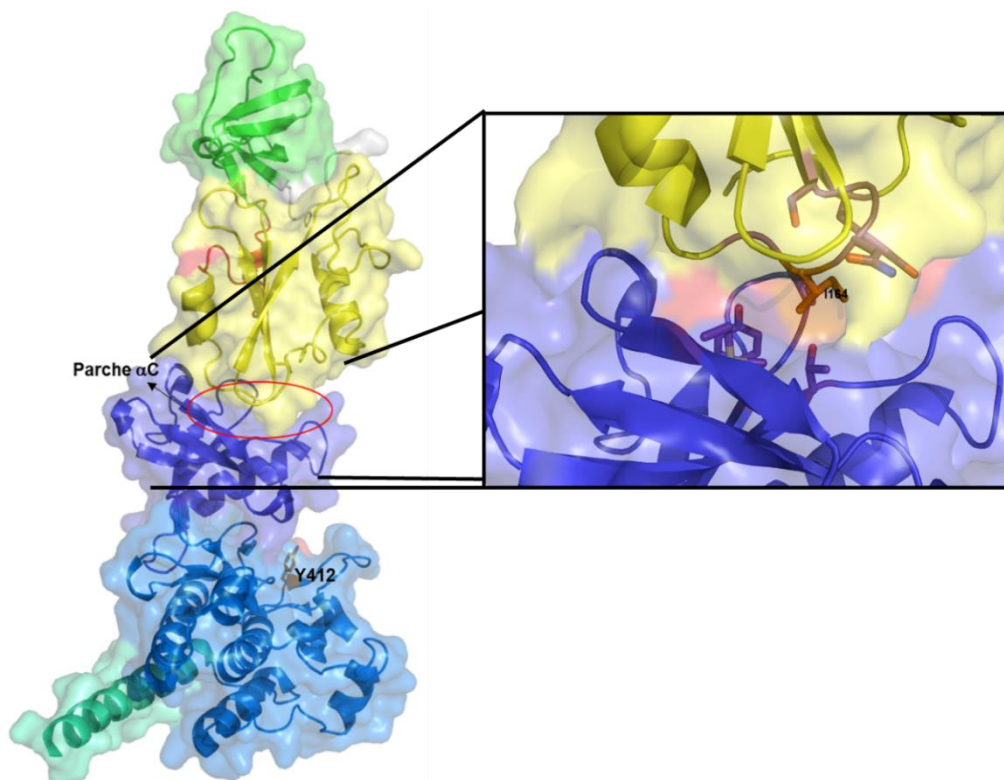


Figura 10. Modelo estructural de Abl en conformación abierta. El dominio SH2 (amarillo) interactúa con el lóbulo-N del dominio cinasa (morado) para estabilizar a la conformación activa de la proteína. La Ile-164 juega un papel crítico en esta interacción (acercamiento). El dominio SH3 (verde) fue generado alineando el dominio SH2 de la estructura de SH2-SH3 (PDB 1OPL) a la estructura de los dominios SH2-TK (2Abl).

1.6 Estrategias farmacológicas contra la proteína de fusión Bcr-Abl

La estrategia farmacológica más utilizada hasta el momento para inhibir la actividad catalítica de la proteína quimérica Bcr-Abl (impidiendo la fosforilación de sustratos que desencadenan una cascada de señalización que desregulan el ciclo normal celular, llevando a un fenotipo maligno a la célula), ha consistido en el desarrollo de fármacos inhibidores que compitan por el sitio de unión a ATP (**Figura 11**) (52). A la fecha se han reportado más de 100 diferentes moléculas que inhiben eficientemente Bcr-Abl. Sin embargo, solo cinco fármacos han sido aprobados por la FDA (53, 54).

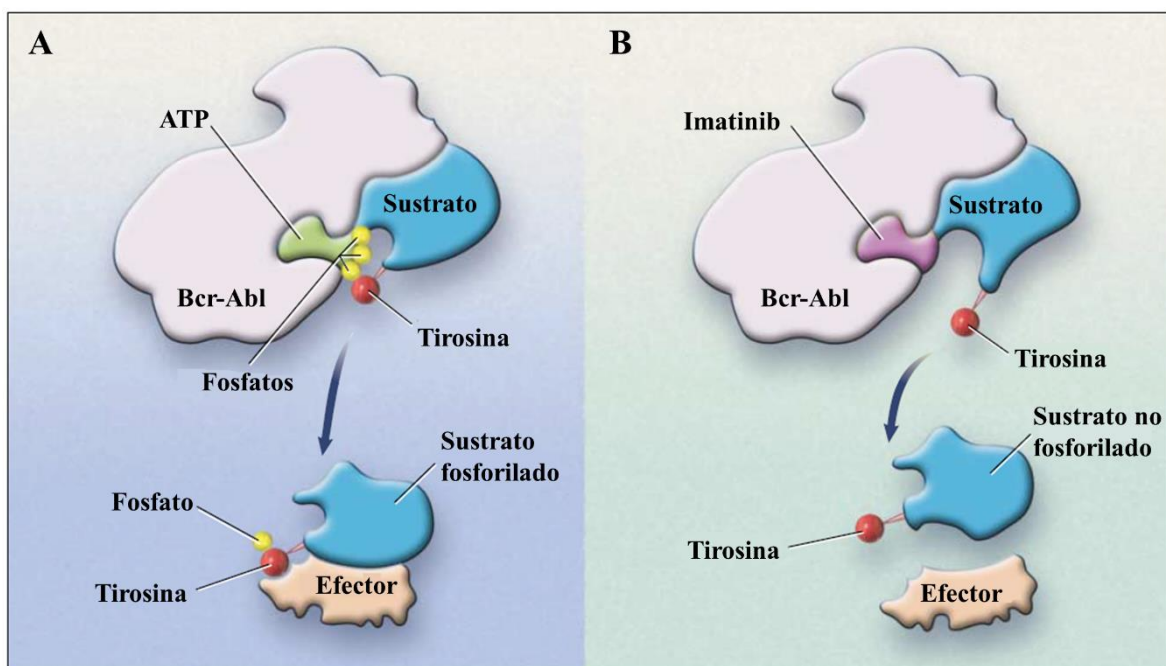


Figura 11. Estrategia farmacológica para inhibir a Bcr-Abl. A) En LMC la proteína de fusión Bcr-Abl fosforila a sus sustratos, que así pueden ser reconocidos por sus proteínas efectoras, desencadenando vías de señalización desreguladas en la enfermedad. B) El imatinib se une competitivamente al sitio de unión de ATP en Bcr-Abl, lo que impide la fosforilación del sustrato, interrumpiendo la señalización a blancos efectoras en la célula. (adaptado de Goldman, *et al*(52)).

El fármaco de primera línea para los pacientes con LMC en fase crónica es imatinib (Gleevec, Novartis Pharmaceuticals) (**Figura 12A**). La terapia con este fármaco extiende la supervivencia de los pacientes hasta por 10 años. Con todo, la resistencia a este fármaco ha sido un gran problema. La resistencia está dada por varios eventos moleculares como son la amplificación génica de Bcr-Abl, la sobreexpresión de proteínas transportadoras de fármacos y proteínas de la familia Src, así como mutaciones puntuales, entre otros. La causa más común es la aparición de mutaciones puntuales que se presentan en alrededor del 75% de pacientes con

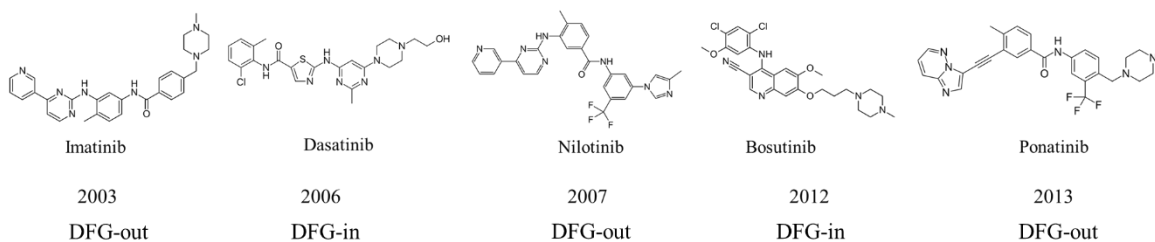
resistencia a imatinib. Más de 30 mutaciones han sido reportadas clínicamente, algunas de las cuales flanquean el sitio de unión de imatinib, evitando así la unión. No obstante, la mayoría de las mutaciones se encuentran a lo largo de la proteína (55–58). Se ha propuesto que estas mutaciones alejadas al sitio de unión alteran la flexibilidad de la proteína, llevándola a conformaciones que no pueden ser reconocidas por imatinib (36).

El alto grado de resistencia o poca tolerancia hacia imatinib por la población con Ph+, ha motivado la búsqueda de nuevos fármacos eficaces contra la resistencia a imatinib. Dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb), nilotinib (Tasigna, Novartis Pharmaceuticals) y bosutinib (Bosulif, Pfizer) (**Figura 12A**) pertenecen a fármacos de segunda generación, inhibidores de Bcr-Abl aprobados clínicamente que se han posicionado como un tratamiento de segunda línea para los pacientes con LMC. Estos inhibidores son potentes contra diferentes mutaciones resistentes a imatinib, pero presentan menor tolerancia farmacológica (59).

Dasatinib es hasta 325 veces más efectivo que imatinib en ensayos *in vitro*, teniendo actividad sobre 14 mutaciones que son resistentes a imatinib. Dasatinib induce una respuesta citogenética completa en aproximadamente el 52% de los pacientes resistentes a imatinib y 80% a los que presentan intolerancia a imatinib (60). Dentro de las mutaciones que causan resistencia, la sustitución de Thr-315 por una Ile (T315I) se presenta en alrededor del 20% de los pacientes, mostrando resistencia a los fármacos de primera y segunda generación (61). Ponatinib (Iclusig, ARIAD Pharmaceuticals), inhibidor de tercera generación, es el único efectivo contra la mutación T315I (**Figura 12A**) (62). Este fármaco es administrado en la fase crónica o blástica de la LMC, cuando ningún otro inhibidor es efectivo. Sin embargo, el uso de ponatinib también puede llevar a efectos secundarios graves como fallas en corazón, hígado y páncreas, entre otros muchos, que pueden causar la muerte del paciente (61, 63). Es importante resaltar que, a pesar de todos los esfuerzos para desarrollar inhibidores efectivos para tratar la enfermedad, continúan apareciendo nuevas mutaciones, como la recientemente reportada T316L, para las cuales los fármacos aprobados son poco eficaces (64). La inhibición alostérica de Abl es un campo que recientemente ha despertado gran interés. Se han sintetizado fármacos como GNF-5(65) y Abl001 (Novartis Pharmaceuticals) (66) que se unen al sitio de unión a miristoilo, generando una inhibición alostérica (**Figura 12B**). La importancia de estos inhibidores alostéricos radica en que se ha optimizado el uso de terapias duales para eliminar células en cultivo que expresan resistencia a fármacos competitivos de ATP (67, 68).

Estrategias Farmacológicas

A) COMPETITIVOS



Único activo para la mutación T315I

B) ALOSTÉRICOS

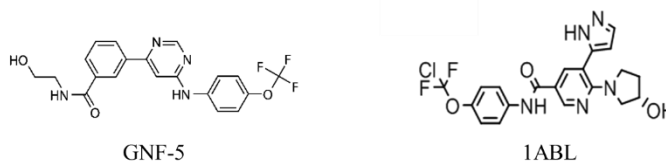


Figura 12. Estructuras químicas de A) inhibidores ATP-competitivos e B) inhibidores alostéricos de Bcr-Abl. Los inhibidores se unen a dos conformaciones diferentes, ya sea DFG-in o DFG-out.

1.7 Cambios estructurales en el dominio TK tras la unión de inhibidores ATP competitivos.

Investigaciones estructurales sobre el dominio TK han revelado que el modo de unión al sitio de reconocimiento de ATP difiere entre inhibidores farmacológicos, generando distintos cambios en elementos estructurales como el loop de activación, el P-loop y la hélice αC . Aunque se desconoce la estructura apo del dominio TK, estructuras resueltas con rayos X revelan de manera general que los fármacos se unen a dos conformaciones diferentes del loop de activación, ya sea DGF-out (inactivo) para imatinib (44), nilotinib (69) y ponatinib (70) o una conformación DFG-in (activo) para dasatinib (71) y bosutinib (**Figura 12A** y **Figura 13**) (72).

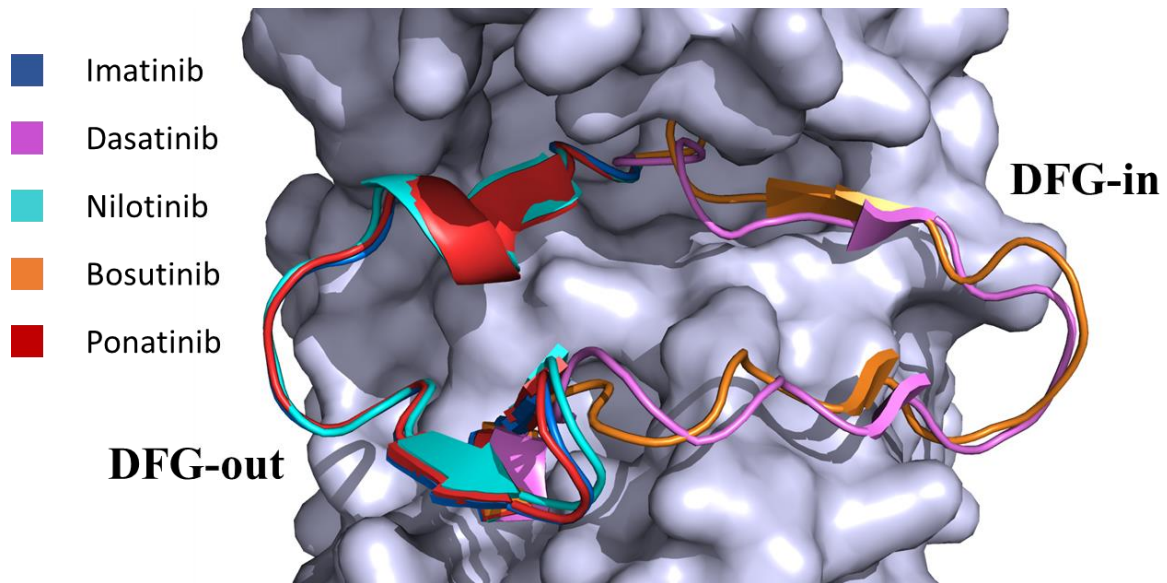


Figura 13. Estructuras resueltas por rayos X que revelan la estructuración del loop de activación. Se muestra el loop de activación tras la unión de cada inhibidor ATP competitivo en código de colores.

El imatinib se entierra en un hueco hidrofóbico que se acopla en la interfase de los lóbulos del dominio TK, siendo estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno entre al menos 6 residuos e interacciones de tipo hidrofóbico de otros residuos cercanos. Imatinib se une a una conformación DFG-out del loop de activación (**Figura 13**). Tras la unión, el P-loop es atraído hacia adentro del sitio catalítico permitiendo formar interacciones cercanas con el inhibidor. La hélice αC reconoce al fármaco por medio de un ácido glutámico que es orientado hacia un grupo amino del inhibidor (44). El dasatinib también se une al sitio de unión a ATP entre los dos lóbulos del dominio TK. Los sitios de unión de dasatinib e imatinib se superponen parcialmente, extendiéndose en direcciones opuestas dentro de la proteína. A diferencia del imatinib, el dasatinib se une a la conformación DFG-in, donde el loop de activación está expuesto al solvente en una conformación activa (**Figura 13**). Además, el P-loop está más extendido en la estructura unida a dasatinib que a imatinib (71).

1.8 Termodinámica de la interacción proteína-ligando

Todos los procesos biológicos son finamente regulados por eventos de asociación molecular de tipo no covalente. Procesos como la replicación de DNA, la comunicación celular, la sinapsis neuronal, la acción de las hormonas, el ingreso y degradación de fuentes de energía son solo algunos ejemplos en los cuales las interacciones proteicas tienen un papel protagonista. El conocer a detalle la forma en que interaccionan las proteínas con sus ligandos tanto cualitativa como cuantitativamente, constituye una herramienta clave para la comprensión de las bases

moleculares de los procesos celulares fundamentales, del funcionamiento proteico, de las enfermedades y del mecanismo de acción de fármacos (73,74).

Canónicamente, es posible describir una interacción biomolecular a través de dos factores distintos y a la vez interdependientes. El factor estructural, que depende de la complementariedad de la proteína con su ligando, y el factor energético, asociado a cómo las fuerzas moleculares se combinan para hacer de la interacción proteica un proceso espontáneo, es decir, la termodinámica del proceso de asociación. El objetivo de conocer la termodinámica de un proceso de unión no está sólo enfocado en incrementar el conocimiento sobre los factores subyacentes que contribuyen a la relación estructura-estabilidad-función proteica; a su vez, permite la construcción de un marco cuantitativo que conlleve al desarrollo de modelos energético-estructurales útiles en el diseño específico de fármacos e ingeniería de proteínas (74–76).

El marco termodinámico cuantitativo que permite definir las bases energéticas de un proceso de unión biomolecular puede ser descrito en términos de los parámetros termodinámicos de cambio de energía libre de asociación (ΔG_a), cambio de entalpía de asociación (ΔH_a), cambio de entropía de asociación (ΔS_a) y cambio en la capacidad calorífica ΔC_p (77). La formación de un complejo proteína-ligando puede ser expresado de la forma más simple por la relación $[P] + [L] \leftrightarrow [PL]$, donde $[P]$ y $[L]$ son las concentraciones de las especies reactantes de proteína P y ligando L libres, respectivamente y $[PL]$ es la concentración del complejo formado en condiciones de equilibrio. Bajo estas condiciones, la distribución del complejo y de las moléculas libres está definida por la constante de asociación K_a , o su expresión recíproca en términos de disociación K_d :

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

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

A su vez, la estabilidad de un complejo proteico está dada por la diferencia en el ΔG_a de las moléculas interactuantes y el complejo formado, por lo que, K_a y K_d dependen directamente de esta función de estado de acuerdo a la relación (73, 78):

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

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

El valor de ΔG_a dicta la condición de equilibrio y determina la espontaneidad del proceso, aportando información sobre cómo las fuerzas moleculares se combinan para hacer de la asociación un proceso favorable. En un proceso de asociación que se lleva a cabo a T constante, el ΔG_a puede ser disectado en sus componentes termodinámicos ΔH_a y ΔS_a mediante la relación(79):

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

La asociación entre dos moléculas puede ser favorecida por contribuciones negativas de ΔH (entálpicamente dirigida) y/o positivas de ΔS (entrópicamente dirigida). Se dice que el parámetro que dirige la reacción es el que posee el valor favorable más alto. Cuando los dos términos son favorables y de valores similares, se dice que la asociación es tanto entálpico como entrópicamente dirigida (79, 80).

El ΔH_a se puede dividir en dos componentes, uno intrínseco (ΔH_{intr}) y otro de solvatación (ΔH_{solv}) (80):

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

El primero de los términos (ΔH_{intr}) es relativo a la creación de nuevas interacciones electrostáticas y contactos de van der Waals entre P y L debido a su complementariedad estereoquímica, por lo que resulta un componente favorable en la formación del complejo. El segundo componente (ΔH_{solv}) es relativo a la desolvatación de grupos debido a la interacción P-L, en donde son eliminadas las interacciones electrostáticas establecidas entre moléculas del solvente y los reactantes. El costo energético de remover estas moléculas del solvente resulta generalmente en un componente entálpico desfavorable (79).

La entropía está relacionada con el cambio de grados de libertad. Las principales contribuciones al ΔS_a son la entropía de solvatación (ΔS_{solv}), la entropía conformacional (ΔS_{conf}) y la entropía roto-traslacional ($\Delta S_{r/t}$):

$$\Delta S_a = \Delta S_{solv} + \Delta S_{conf} + \Delta S_{r/t} \quad (\text{ec. 6})$$

ΔS_{solv} es favorable para la asociación, ya que se origina de la liberación de las moléculas de agua al existir una desolvatación parcial o completa de la interfase de unión de la proteína y el ligando. Este efecto es el predominante en la asociación de grupos hidrofóbicos. El ΔS_{conf} casi siempre es desfavorable, ya que el proceso de unión por lo general involucra el congelamiento

de enlaces rotables covalentes sencillos en la proteína y el ligando. $\Delta S_{r/t}$ está asociado a la reducción del número de partículas en el medio debido a la asociación P-L. Antes de la unión, cada molécula interactuante posee 3 grados de libertad traslacional y 3 de libertad rotacional. Al unirse en una sola partícula, se pierde la mitad de estos grados de libertad, por lo que es una contribución siempre desfavorable y de la misma magnitud independientemente del tipo de complejo formado. Para un proceso de asociación bimolecular, diversos estudios tanto empíricos como teóricos han calculado el valor $\Delta S_{r/t}$ entre -4 y -10 cal mol⁻¹ K⁻¹. El valor consenso es de -8 cal/mol K para interacciones proteicas (79).

Los cambios conformacionales acoplados a la interacción proteína-ligando constituyen la base fundamental de la cooperatividad, el alosterismo y en general de la regulación de las proteínas. En este sentido, el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) juega un papel primordial en la determinación de la energética asociada al plegamiento proteico y al reconocimiento molecular o interacción proteína-ligando (ΔC_{p_a}), ya que es un sensor de los rearrreglos del solvente inducidos por cambios en la exposición de solutos como producto de la interacción. En otras palabras, indica los cambios conformacionales que tienen lugar en la proteína tras la unión del ligando (81, 82).

En interacciones P-L, el ΔC_{p_a} conecta los parámetros termodinámicos con información estructural debido a que es asociado al cambio de áreas superficiales accesibles polares al solvente (ΔASA_p) y no polares (ΔASA_{np}) (82). Diversos estudios con compuestos modelo y datos de proteínas han relacionado la solvatación de ASA_{np} y ASA_p con el incremento y decremento del valor ΔC_{p_a} , respectivamente, de acuerdo a la parametrización (81, 82):

$$\Delta C_{p_a} = \alpha \Delta ASA_{np} + \beta \Delta ASA_p \quad (\text{ec. 7})$$

donde α y β son coeficientes de área para la solvatación de grupos no polares y polares respectivamente. De acuerdo a Murphy y Freire (83), la exposición de áreas no polares al solvente ocasiona un incremento de la capacidad calorífica ($\alpha = 0.45$ cal (K mol Å²)⁻¹), mientras que el ocultamiento de áreas no polares genera un decremento ($\beta = -0.26$ cal (K mol Å²)⁻¹).

De acuerdo con la ec. 7, el valor experimental depende básicamente de la cantidad de área que cambia su exposición al solvente al formarse el complejo. Por tanto, ΔC_{p_a} es un parámetro muy útil para estimar la extensión de los cambios conformacionales en eventos proteicos como el reconocimiento molecular.

2. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de la LMC sufrió una revolución empleando fármacos que inhiben a la proteína Bcr-Abl uniéndose competitivamente al sitio de reconocimiento de nucleótidos. Sin embargo, más de 20 mutaciones reportadas clínicamente confieren resistencia a fármacos ATP-competitivos. La mayoría de estas mutaciones ocurren cercanas al sitio catalítico de la enzima, por lo que ha surgido el interés de encontrar sitios de inhibición alternativa. En este contexto, la inhibición alostérica a través de la interacción con el sitio de reconocimiento del grupo miristoilo de Bcr-Abl se ha posicionado como una potencial ruta farmacológica en la terapia contra LMC. A pesar de la vasta información estructural reportada de Abl con diversos ligandos, los determinantes energéticos que dictan la afinidad entre los inhibidores y la enzima blanco son prácticamente desconocidos, así como la contribución que ejercen los dominios SH y el sitio alostérico en la eficiencia de inhibición. Por otro lado, dado que no se ha resuelto experimentalmente la estructura de la proteína apo, sigue sin esclarecerse la extensión de los cambios estructurales que sufre la enzima al formar complejos con ligandos/sustratos naturales o con inhibidores farmacológicos. Para contribuir a la comprensión de las bases energéticas de la inhibición farmacológica y la autorregulación de Abl, en este trabajo realizamos una caracterización calorimétrica de la interacción de la construcción recombinante SH3-SH2-TK (SH-Abl) con imatinib y dasatinib, dos inhibidores que difieren marcadamente en su modo de unión a la enzima. Además, con el fin de evaluar el efecto de la ocupación del sitio alostérico, se realizaron determinaciones de interacción de los inhibidores con la enzima tridominio previamente saturada con ácido mirístico. Las variaciones entre los parámetros de unión en presencia y ausencia del inhibidor alostérico permitieron cuantificar los efectos cooperativos alostéricos. Además, la comparación con parámetros de unión previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación para la interacción de imatinib y dasatinib con el dominio TK aislado, permitió definir los efectos energéticos ejercidos por los dominios de homología SH2 y SH3. Esta información podrá facilitar la construcción de un marco termodinámico que sea útil en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (84).

3. HIPÓTESIS

La regulación de la actividad catalítica por parte de inhibidores farmacológicos de la oncoproteína Bcr-Abl involucra la cooperación entre diferentes elementos estructurales de la proteína más allá del sitio ortostérico, los cuales pueden ser determinados cuantitativamente mediante la caracterización de las firmas termodinámicas de la interacción de SH-Abl con inhibidores competitivos y alostéricos.

4. OBJETIVO GENERAL

Elucidar las bases energético-estructurales de la inhibición competitiva y alostérica en la tirosina-cinasa Abl.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sobreexpresar y purificar la construcción SH-Abl recombinante.
2. Caracterizar mediante dicroísmo circular el plegamiento y la termorresistencia de SH-Abl.
3. Determinar los parámetros energéticos de la interacción de SH-Abl con los fármacos imatinib y dasatinib mediante calorimetría de titulación isotérmica.
4. Determinar los parámetros energéticos de interacción de SH-Abl con imatinib y dasatinib en presencia de un inhibidor tipo alostérico.
5. Cuantificar los efectos de cooperatividad entre el sitio activo y el sitio alostérico de SH-Abl.
6. Elucidar los parámetros energéticos de cooperatividad de los dominios SH2/SH3.
7. Estimar la extensión de los rearrreglos conformacionales acoplados a la formación de los distintos complejos de SH-Abl estudiados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Vectores de expresión

Para la expresión recombinante de SH-Abl, se utilizaron dos plásmidos. Por un lado, el vector de expresión pET28a-SH-Abl, que codificó para una construcción de la proteína Abl que contiene a los dominios SH2, SH3 y el dominio TK. Por otro lado, el vector pCDFDuet-1-YopH, que codificó para la fosfatasa YopH. Ambos vectores fueron proporcionados por el Dr. John Kuriyan de la Universidad de California en Berkeley, EU. Como marcadores de selección, el pET28a-SH-Abl tiene la resistencia a kanamicina y el pCDFDuet-1-YopH la resistencia a estreptomicina. Ambos plásmidos fueron replicados en células de *E. coli* DH5 α por separado. Esta cepa es utilizada ampliamente en tecnología de DNA recombinante y sirve para la multiplicación de vectores o plásmidos con alta eficiencia; tiene dos mutaciones importantes, la *endA1* y la *hsdR17*, que eliminan la actividad endonucleasa de las células (85). Una colonia de células transformadas fue seleccionada y cultivada toda una noche en 15 mL de medio LB suplementado con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico correspondiente. Posteriormente, el cultivo fue usado para la extracción y purificación del plásmido usando un kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®, US), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.2 Transformación de células

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) fue cotransformada con ambos vectores (pET28a-SH-Abl y pCDFDuet-1-YopH) para la sobreexpresión de SH-Abl recombinante. Esta cepa contiene el lisógeno λDE3 que porta el gen para la ARN polimerasa T7, y se utiliza para la expresión de proteínas recombinantes en alta cantidad. Además, es deficiente en las proteasas Lon y OmpT (86). Las cepas BL21(DE3) y DH5 α fueron creadas químicamente competentes por la Dra. Patricia Cano del Instituto de Química, UNAM. La transformación fue realizada por el método de choque térmico. Alícuotas de 50 μL de células competentes almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron descongeladas en hielo por 5 min. Se adicionó 1 μL de DNA plasmídico ($\approx 50\text{ ng}$) y se incubaron en un baño de hielo por 30 min. Al cabo de este tiempo, fueron incubadas a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s en un equipo *thermoblock* (*Accublock digital dry bath, Labnet, US*) y sumergidas en hielo por 2 min (choque térmico). A continuación, se adicionaron 200 μL de medio LB, y se dejaron recuperar por 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, las células fueron plaqueadas en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el desarrollo visible de colonias transformantes ($\approx 18\text{ h}$).

5.3 Sobreexpresión de SH-Abl

Un preinóculo preparado a partir de una colonia de células cotransformadas BL21(DE3) y resuspendido en 30 mL de medio LB suplementado con kanamicina (25 µg/mL) y estreptomycin (25 µg/mL) (medio LB+KS) se incubó a 37 °C, con agitación constante 200 rpm, alrededor de 10 h en un equipo Excella E24 incubator Shaker (New Brunswick®). A continuación, el preinóculo fue repartido en matraces *fernbach* de 2 L de capacidad conteniendo cada uno 1.5 L de medio LB+KS. Los cultivos fueron crecidos a 37 °C y 200 rpm alrededor de 6-8 h, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 1.0 (OD₆₀₀≈1). A continuación, los cultivos fueron inducidos con 1 mM de IPTG y se incubaron a 18 °C durante 18 h (sobreexpresión). Al cabo de este tiempo, el paquete celular se colectó por centrifugación a 6000 rpm por 8 minutos en tubos Falcon® de 50 mL con una centrífuga Beckman-Coulter rotor JA-14. Una vez obtenidos los paquetes celulares, éstos fueron almacenados a -4 °C o lisados para su purificación inmediata.

5.4 Lisis celular

Los paquetes celulares obtenidos de la sobreexpresión fueron resuspendidos en 25 mL de amortiguador de lisis suplementado con PMSF (1 mM) como inhibidor de proteasas. Las células fueron lisadas mediante sonicación en un equipo Sonicator 3000 (Misonix, Inc, US) con una potencia de 6 watts y ciclos de 10 s en encendido y 90 s en apagado hasta acumular un total de 6 min de encendido. El lisado fue centrifugado a 15000 rpm por 30 min, para separar el detrito celular del extracto crudo. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm (Merck Millipore).

5.5 Purificación de SH-Abl

El extracto crudo obtenido de la lisis celular fue aplicado a una columna de afinidad a Ni⁺² HisTrap FF (GE Healthcare) de 5 mL acoplada a una bomba peristáltica (mod. P-1, GE Healthcare) mediante el siguiente protocolo:

- [1] 3 volúmenes de columna (CV) de agua desionizada
- [2] 5 volúmenes de amortiguador A-Ni (equilibrar la columna)
- [3] Extracto crudo (se colecta la fracción no retenida)
- [4] 5 volúmenes de amortiguador A-Ni (se colecta la fracción lavado)
- [5] 5 volúmenes de amortiguador B-Ni (se colecta la fracción elución-Ni)
- [6] 5 volúmenes de amortiguador B-Ni (lavado de la comuna)

- [7] 3 volúmenes de agua desionizada (lavado de la comuna)
- [8] 3 volúmenes de etanol al 20 % (para almacenar)

La fracción eluída (Elución-Ni) se diluyó 3 veces con agua desionizada para diluir la concentración de NaCl (Crudo de la Q; C_Q) y fue aplicada a una columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF (GE Healthcare) de 5 mL acoplada a una bomba peristáltica aplicando el siguiente protocolo:

- [1] 3 volúmenes de agua desionizada
- [2] 4 volúmenes de amortiguador A-Q (para equilibrar la columna)
- [3] Elución-Ni (se colectó la fracción no retenido-Q)
- [4] 4 volúmenes de amortiguador A-Q (se colectó la fracción lavado del no retenido-Q)
- [5] 5 volúmenes de amortiguador B-Q (se colectó la fracción elución-Q)
- [6] 4 volúmenes de amortiguador B-Q (lavado de la comuna)
- [7] 3 volúmenes de agua desionizada (lavado de la comuna)
- [8] 2 volúmenes de EtOH al 20 % (para almacenar)

Todas las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes. La expresión y purificación fueron descritas previamente por Nagar *et al.*, 2002 (44).

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

El análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación de SH-Abl fueron analizadas empleando un gel de poliacrilamida al 12 % con una fracción concentradora al inicio del gel que contenía una concentración de poliacrilamida del 4 %. El marcador de peso molecular empleado fue *BLUEstain 2 Protein ladder* (Gold Bio, US). Las muestras fueron preparadas mezclando 20 µL de cada fracción colectada con 20 µl de amortiguador de carga y calentadas en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Una vez aplicadas las muestras, la migración electroforética procedió a 90 V hasta que el indicador de azul de bromofenol llegara aproximadamente 0.5 cm antes del final del gel (≈50-60 min). Posteriormente, el gel fue fijado con una solución que contenía 10 % de ácido acético glacial, 50 % de MeOH y 40 % de agua destilada durante 15 minutos y teñido con una solución de azul de Comassie al 0.1 %. Una vez teñido, se lavó y se dejó una noche con agua para eliminar el exceso de colorante.

5.7 Cuantificación y preparación de muestras

La fracción de elución obtenida de la cromatografía de intercambio iónico se dializó en una membrana de corte de 28-30 kDa/35 mm (Spectra/Por[®] 2 Dry Standard RC Dialysis Tubing, Spectra Labs, US) contra amortiguador de calorimetría (ver Anexo 1) a 4 °C por alrededor de 18 h. La proteína dializada se filtró por una membrana de 0.22 µm y el filtrado fue diafiltrado y concentrado en un sistema Amicon con una membrana de 30 kDa de corte (Amicon[®] Ultra 15 mL Centrifugal Filters Merck Millipore, US) mediante centrifugación a 4,500 rpm y periodos de 10-15 minutos, intercambiando por tres ocasiones con amortiguador de calorimetría. Las concentraciones utilizadas fueron del rango de 10-30 µM.

Para el caso de las titulaciones de SH-Abl en presencia de ácido mirístico, la proteína fue incubada en amortiguador de calorimetría suplementado con 50 µM de ácido mirístico (Amortiguador-myr), por 18h a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la muestra fue filtrada por una membrana de 0.22 µm y se le dieron tres intercambios con Amortiguador-myr. Los ligandos fueron preparados en el mismo amortiguador, usando las concentraciones ya mencionadas. Una vez preparado el amortiguador-myr, se sometió a un baño sonicador por 15 min para disolver de manera eficiente el ácido mirístico (Myr).

La cuantificación de concentración de proteína se realizó por lectura de la absorbencia a 280 nm (A₂₈₀) en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, US) empleando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. El cálculo se realizó utilizando un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{280} = 96720 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ estimado mediante el servidor Expasy-ProtParam tool (87) asumiendo que todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos. La muestra a cuantificar se preparó diluyendo la proteína 1:5 con amortiguador de calorimetría y obteniendo la lectura directamente del equipo, el cual descuenta de forma automática el blanco, ya que cuenta con doble haz. La fórmula utilizada para el cálculo de la concentración de la proteína [P] a partir de la A₂₈₀ y tomando en cuenta el factor de dilución fue:

$$[P] = A_{280}/\epsilon_{280} \quad (\text{ec. 8})$$

5.8 Espectrometría de masas

Los espectros de masas tipo MALDI-TOF (del inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) fueron obtenidos en un instrumento MALDI-TOF Microflex Bruker Daltonics a cargo de la Q. Eréndira García Ríos del Instituto de Química UNAM. La muestra se preparó

diluyendo 1:20 la proteína purificada con agua desionizada a una concentración final de 10 μM . Se utilizó una matriz de ácido sinapínico.

5.9 Análisis de dicroísmo circular

Para la determinación del contenido de estructura secundaria, se utilizó la técnica de dicroísmo circular (DC). Las muestras proteicas se dializaron contra agua desionizada y se ajustaron a una concentración final de 0.05 mg/mL, la proteína fue disuelta en amortiguador 5 mM TRIS HCl pH 8.0, 15 mM de NaCl, 0.5 % de glicerol, 0.5 mM de MgCl_2 , 0.125 mM de DTT, apropiado para los experimentos. Los espectros fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco Inc, Easton, MD, US) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier. Las mediciones fueron realizadas en el UV lejano (190-250 nm) a una velocidad de barrido de 10 nm/min con una resolución de 1 nm, utilizando una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales.

También se realizaron perfiles de desplegamiento térmico con barridos de temperatura en un intervalo de 20-90 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ monitoreando el cambio de elipticidad a 208 nm (longitud de onda constante) con una resolución de 1 $^{\circ}\text{C}$. El perfil de replegamiento térmico se realizó con una velocidad de enfriamiento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en todos los casos.

Para procesar los datos, se transformó el valor de elipticidad observada a elipticidad molar ($\text{grado}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$) utilizando la ecuación 13.

$$[\theta]_{mrw} = \frac{\theta_{obs} * MW}{[P] * d} \quad (\text{ec. 9})$$

donde $[\theta]_{mrw}$ es la elipticidad molar, θ_{obs} es la elipticidad observada en miligrados (mdeg), MW es el peso molecular promedio por residuo, [P] es la concentración de proteína en mg/cm^3 y d es el paso óptico de la celda en cm. La deconvolución de los datos de DC para estimar el contenido de estructura secundaria se realizó empleando el programa K2D3^[93].

5.10 Calorimetría de titulación isotérmica

Las mediciones calorimétricas se realizaron en un microcalorímetro ITC₂₀₀ (MicroCal, Inc.). Los datos fueron analizados y ajustados a un modelo de un sitio de unión empleando el

software Origin 7.0. La proteína SH-Abl fue ajustada a una concentración de 10-30 μM para ser colocada en la celda de reacción, mientras que las concentraciones de los ligandos en la jeringa fueron de 150-200 μM y de 100-150 μM para imatinib y dasatinib, respectivamente. La proteína fue solubilizada en solución amortiguador 50 mM TRIS-HCl pH 8.0, suplementada con 150 mM de NaCl, 5 % de glicerol, 5 mM de MgCl_2 , 10 mM de imidazol.

Para el caso del dodecil sulfato de sodio (SDS), se usaron concentraciones de 200 μM . Todos los ligandos fueron preparados en amortiguador de calorimetría y, de ser requerido, el pH fue ajustado al mismo valor de la proteína empleando NaOH 1M. El protocolo de titulación fue de una inyección de 0.2 μL , seguido de 18-25 inyecciones de 2 μL con intervalos de 1.5-2 min entre inyecciones, con agitación constante a 700 rpm. Para restar los calores de dilución del ligando en la isoterma de titulación se realizaron experimentos blancos o de dilución que consisten en la adición de ligando a la solución amortiguador sin proteína bajo el mismo esquema utilizado para la solución proteica. Todas las muestras fueron desgasificadas en alto vacío durante 20 min, manteniendo las muestras a temperatura constante en una estación de desgasificación y termostato MicroCal ThermoVac2.

5.11 Cálculo de Área Superficial Accesible al Solvente (ASA)

El cambio de áreas superficiales accesibles al solvente tanto polar (ΔASA_p) como apolar (ΔASA_{ap}) fue calculado a partir de estructuras de rayos X, mediante modelos de área superficial empleando el software NACCESS (88). Se determinaron las áreas superficiales a partir de las estructuras cristalográficas de los complejos de TK con imatinib (PDB 2HYY) y dasatinib (PDB 2GQG).

6. RESULTADOS

6.1 Sobreexpresión y purificación de SH-Abl

La posibilidad de estudiar el funcionamiento de las proteínas y su interacción con ligandos mediante experimentos biofísicos, bioquímicos y estructurales implica obtener cantidades considerables de muestra proteica con una alta pureza, del orden de miligramos, por lo que en este trabajo se procedió a la producción recombinante de SH-Abl usando la bacteria *E. coli*. Esta construcción consta de 482 aminoácidos (79 al 534, siguiendo la numeración de la isoforma 1b silvestre de Abl), comprendiendo los dominios de regulación SH3 (79-140), SH2 (146-236) y el dominio catalítico (261-534). SH-Abl fue expresada en células de la cepa *E. coli* BL21(D3), empleando el método descrito por Froger y Hall (89) con mínimas variaciones. La cepa fue doblemente transformada con un plásmido que codifica para la fosfatasa YopH. Esto debido a que Abl puede fosforilar blancos inespecíficos en la célula, por lo que la co-expresión de una fosfatasa ayuda a mantener la homeostasis celular en el grado de fosforilación. En la **Figura 14** se muestra un esquema general de los protocolos de expresión y purificación utilizados en la producción de SH-Abl.

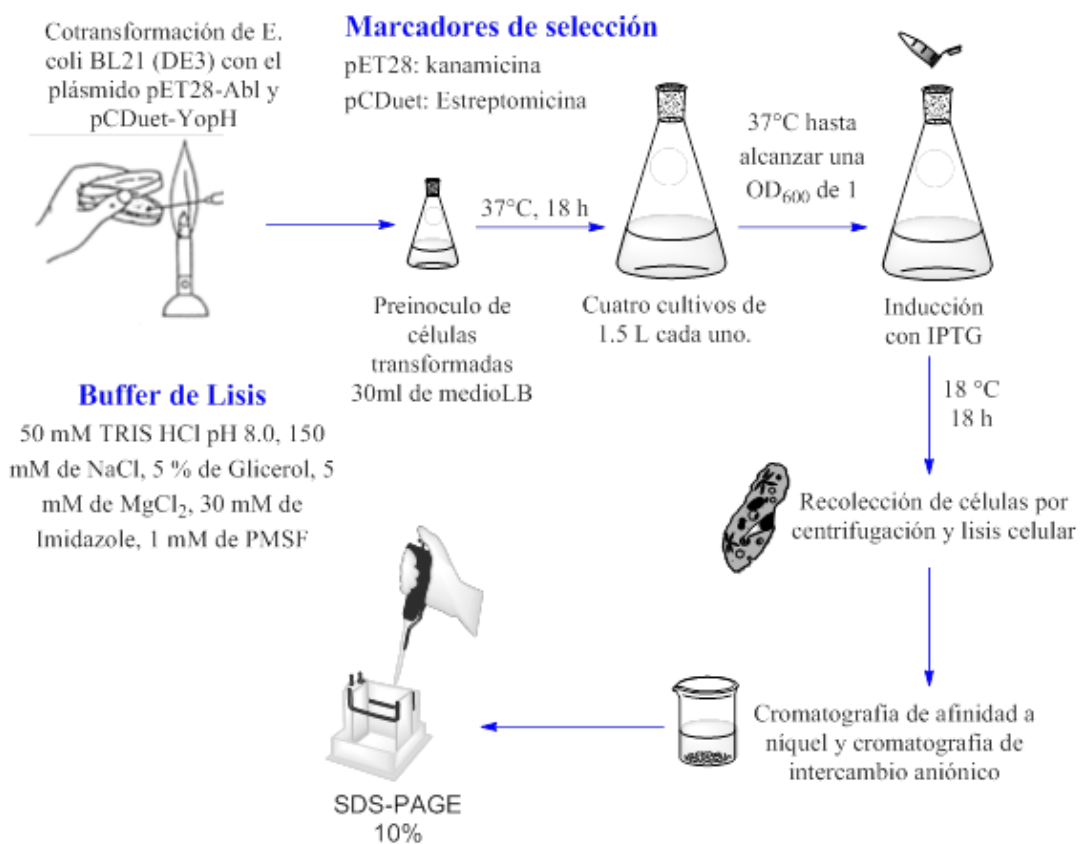


Figura 14. Esquema general de expresión y purificación de SH-Abl.

Después de la producción y lisis del paquete celular, el lisado fue centrifugado, y el extracto crudo sobrenadante (C) fue aplicado a una columna de cromatografía de afinidad a níquel como primer paso. En esta cromatografía, la proteína se une a la resina debido a la etiqueta de histidinas (Hisx6) presente en el extremo N-terminal. Las diferentes fracciones se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE, en donde la muestra de la fracción de elución (E_{Ni}) mostró dos bandas alrededor de 55 kDa y 51 kDa, que corresponden al peso aproximado de SH-Abl y la fosfatasa YopH, respectivamente (**Figura 15A**).

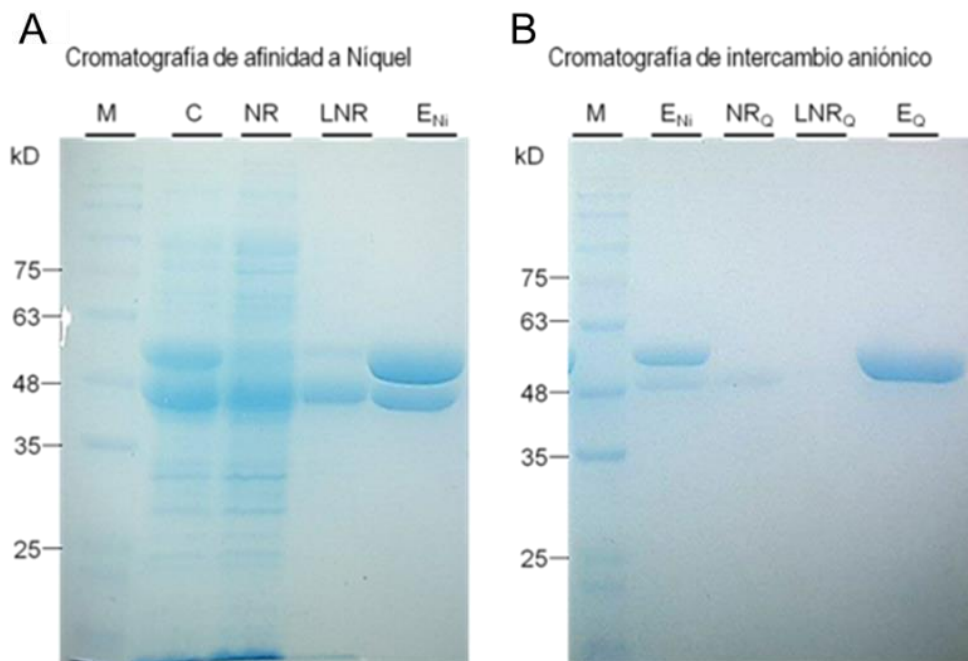


Figura 15. Geles de poliacrilamida del proceso de purificación de SH-Abl. A) Cromatografía de afinidad a níquel. M: Marcador de peso molecular, C: Lisado crudo, NR: No retenido, LNR: Lavado de lo no retenido, E_{Ni} : Elución de la columna de níquel con imidazol. B) Cromatografía de intercambio aniónico. M: Marcador de peso molecular, E_{Ni} : Eluido de la columna de níquel, NR_Q : No retenido Q, LNR_Q : Lavado de lo no retenido Q, E_Q : Elución Q.

Debido a la unión inespecífica de YopH a la resina, la fracción de elución de la columna de níquel (E_{Ni}) fue aplicada a una columna de intercambio iónico, aprovechando la diferencia entre los puntos isoeléctricos de ambas proteínas (**Tabla 1**). A pH 8.0, las cargas netas de las proteínas son negativa y positiva para SH-Abl y YopH, respectivamente, por lo que al pasarlas por una resina que está cargada negativamente, SH-Abl es retenida, mientras que permite la elución de YopH. Un segundo análisis por electroforesis SDS-page mostró finalmente una sola banda en la elución que corresponde al peso molecular de SH-Abl (**Figura 15B**).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de SH-Abl y YopH.				
Proteína	PM (kDa)	pI	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	N ^R
SH-Abl	54.4	5.75	98585	482
YopH	50.9	8.92	18910	468

PM: peso molecular en kilodaltones. pI: punto isoeléctrico. ϵ : Coeficiente de extinción molar. N^R: número de residuos.

Un criterio adicional que indicó la pureza e identidad de la proteína fue obtenido del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. La muestra se concentró hasta 10-30 μM y se intercambi6 la solución por agua desionizada con un sistema Amicon usando una membrana de corte de 30 kDa. El espectro de MALDI-TOF mostr6 un ion molecular m/z correspondiente al peso molecular de SH-Abl, cuyo valor es de 54.4 kDa (**Figura 16**), lo cual es consistente con el resultado de SDS-PAGE.

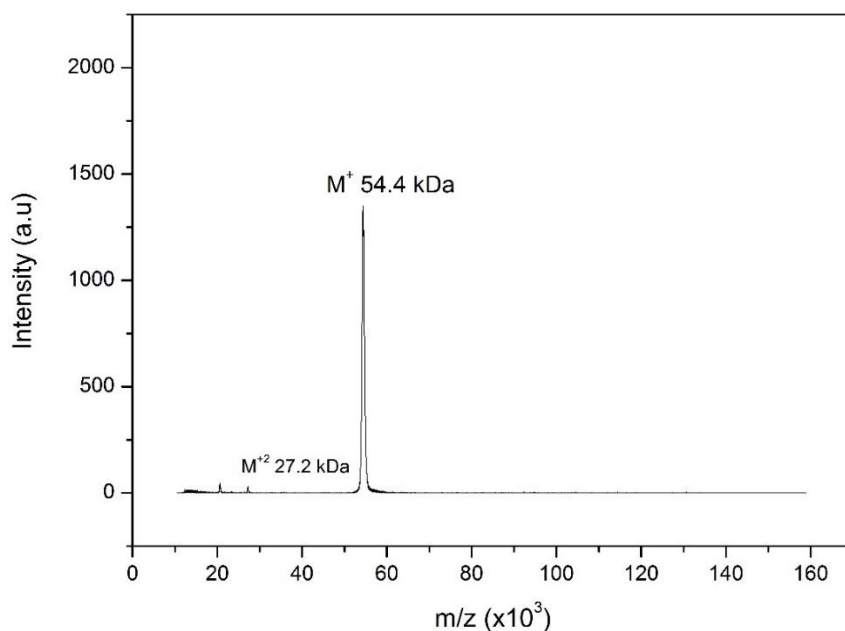


Figura 16. Espectrometría de masas MALDI-TOF de SH-Abl obtenida de la cromatografía de intercambio iónico.

El rendimiento de SH-Abl recombinante fue del orden de 6.6-10 mg/L de medio de cultivo.

6.2 Plegamiento y estabilidad térmica de SH-Abl

Para comprobar el plegamiento de SH-Abl, se realizaron experimentos de dicroísmo circular. El DC es una técnica espectroscópica cuya señal en la región del UV lejano depende

del contenido de estructura secundaria de las proteínas (Apéndice 1). De tal forma, permite determinar el contenido de hélices α y hebras β . Además, permite diferenciar una proteína con estructura tridimensional definida de una proteína desestructurada. Por tanto, es útil para estudiar procesos que involucren cambios conformacionales como el plegamiento/desplegamiento, o la interacción intermolecular acompañados de ajustes estructurales sustanciales (90, 91).

En la **Figura 17** se muestra el espectro de DC de SH-Abl a 20 °C (símbolos azules), el cual muestra una forma típica de proteínas α/β , con lo cual se evidencia que la proteína contiene estructura secundaria y está plegada. Se puede observar un mínimo a 208 nm que es característico de hélices- α , mientras que el mínimo negativo a 222 nm es apenas aparente por la contribución de hebras- β , como se ha observado en otras proteínas como la lisozima, que tiene una composición de ambas estructuras secundarias (92). Mediante el programa K2D3 (93), se estimó la proporción de hélices- α y hebras- β de los espectros de dicroísmo obtenidos como 32 y 15%, respectivamente.

Para conocer la estabilidad térmica y establecer la ventana experimental de temperatura en la que es posible realizar las mediciones calorimétricas, se realizaron barridos de temperatura de SH-Abl en un intervalo de 20 a 90 °C, monitoreando el cambio de elipticidad molar a 208 nm. El espectro de DC obtenido a 90 °C mostró claras diferencias con respecto al de temperatura ambiente, indicando un cambio sustancial de estructura secundaria (**Figura 17**, esferas rojas). Para saber si esta pérdida de estructura secundaria era reversible, la muestra se regresó nuevamente a 20 °C (**Figura 17**, esferas verdes), sin observarse que se recupera la elipticidad de la especie nativa. Como se puede observar en la **Figura 18**, el perfil de perturbación térmica de SH-Abl exhibió un patrón aparentemente monofásico, el cual no concluyó a la mayor temperatura muestreada. Para comparación, se muestra el perfil del desplegamiento de TK-Abl obtenido bajo las mismas condiciones de barrido (datos obtenidos del mismo equipo de trabajo, referencia Trejo Pérez (95)), el cual exhibe un proceso aparentemente bifásico, que ocurre a temperaturas significativamente menores que lo observado con SH-Abl.

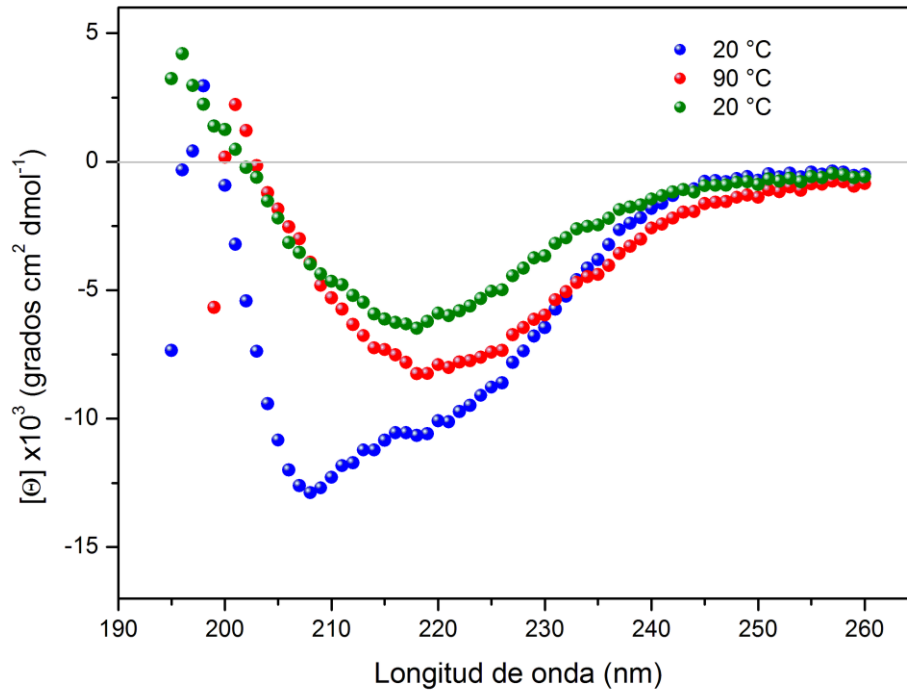


Figura 17. Espectros de dicroísmo circular. La proteína SH-Abl fue sometida a un ciclo de calentamiento/enfriamiento en el intervalo de 20 a 90°C. Los espectros fueron registrados en las temperaturas límite del intervalo.

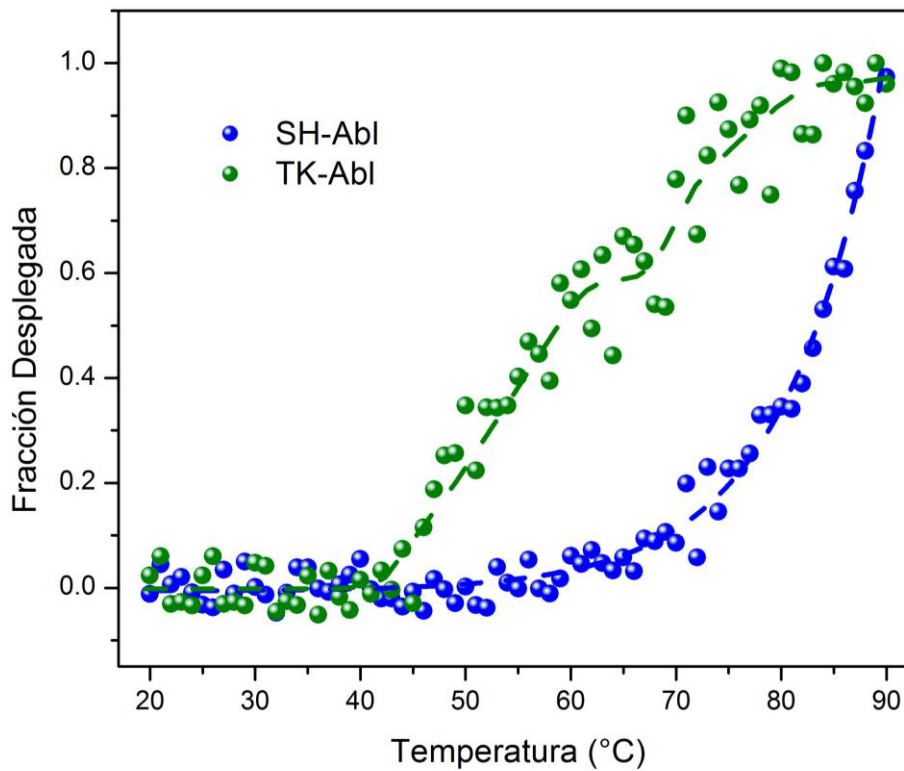


Figura 18. Perfil de desplegamiento térmico de SH-Abl y TK-Abl. Se monitoreó el proceso a una longitud de onda fija de 208 nm, barriendo a 1 °C/min. Las proteínas fueron disueltas en amortiguador de 5 mM TRIS HCl pH 8.0, 15 mM de NaCl, 0.5 % de glicerol, 0.5 mM de MgCl₂, 0.125 mM de DTT.

6.3 Caracterización termodinámica de unión entre SH-Abl a inhibidores ATP competitivos

Con la finalidad de conocer los determinantes energéticos que rigen la unión de SH-Abl a inhibidores ATP competitivos, se realizó la caracterización termodinámica de la interacción de SH-Abl con imatinib y dasatinib mediante calorimetría de titulación isotérmica en función de la temperatura (Apéndice 2). Las mediciones calorimétricas se realizaron en el intervalo de 20 a 35 °C. El intervalo de temperaturas fue definido de acuerdo al trabajo global del grupo de investigación donde se observó una perturbación térmica en el plegamiento del dominio TK por arriba de los 35°C (95). En la **Figura 19** se muestran ejemplos de titulaciones calorimétricas, donde se pueden observar los potenciogramas (paneles superiores) y las isotermas de unión (paneles inferiores). Los valores de K_a y ΔH_a fueron determinados mediante un ajuste no lineal a un modelo de un solo sitio de unión (ecu. 19, apéndice 2, pág. 68). Los parámetros termodinámicos se muestran en la **Tabla 2**. Tanto la unión de imatinib como dasatinib a SH-Abl fueron procesos exotérmicos en todo el intervalo de temperatura estudiado.

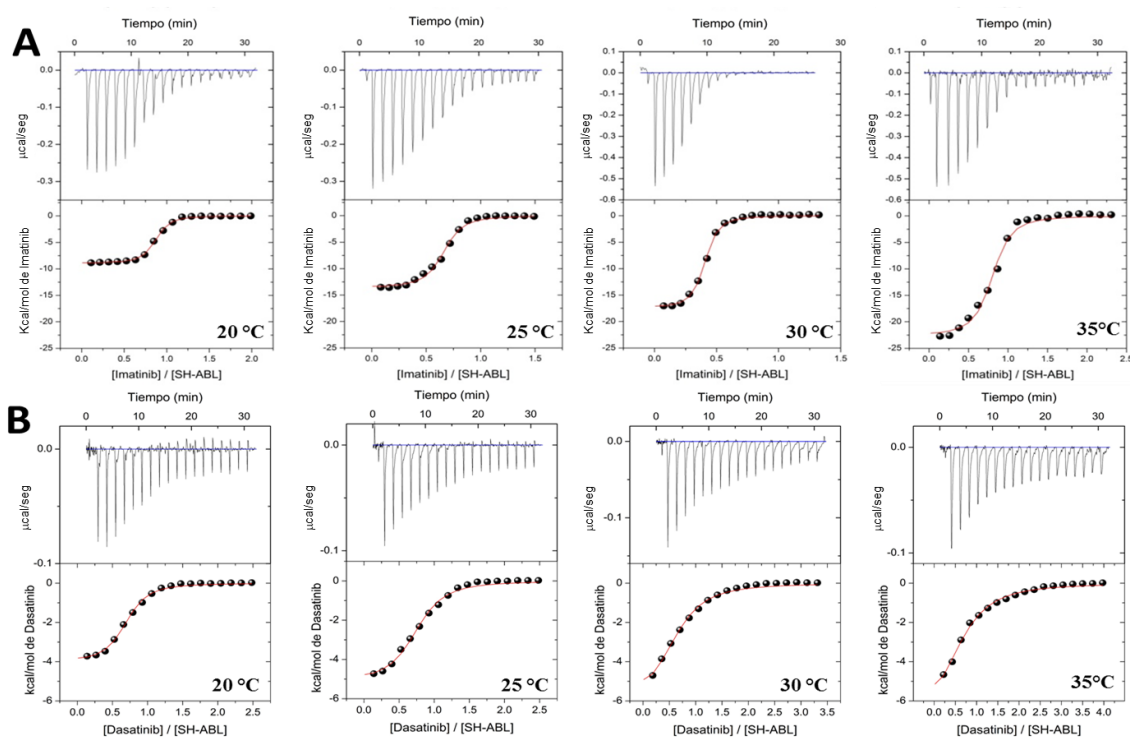


Figura 19. Isotermas de titulación calorimétrica. Ejemplos de titulación calorimétrica, potenciogramas (parte superior) e isotermas de unión (parte inferior) de la asociación de SH-Abl con (A) imatinib y (B) dasatinib a diferentes temperaturas obtenidos mediante ITC.

Tabla 2: Parámetros termodinámicos de la interacción de SH-Abl con imatinib y dasatinib a diferentes temperaturas obtenida mediante ITC

Ligando	T (°C)	K_a (μM^{-1})	K_d (nM)	ΔH_a (kcal/mol)	$-T\Delta S_a$ (kcal/mol)	ΔG_a (kcal/mol)
imatinib	20	7.3±1.2	135±22	-8.9±0.1	-0.3	-9.2
	22.5	5.7±0.7	175±21	-11.6±0.2	2.5	-9.1
	25	5.2±0.9	192±33	-13.6±0.2	4.5	-9.1
	27.5	3.1±0.3	320±31	-15.5±0.2	6.6	-8.9
	30	2.8±0.3	357±38	-17.4±0.3	8.5	-8.9
	32.5	2.2±0.4	448±81	-20.4±1.1	11.6	-8.8
	35	1.9±0.1	512±27	-22.7±0.5	13.9	-8.8
dasatinib	20	3.3±0.4	296±36	-4.0±0.1	-4.8	-8.8
	22.5	3.0±0.3	333±33	-4.5±0.1	-4.3	-8.8
	25	2.1±0.3	469±67	-5.1±0.2	-3.5	-8.6
	27.5	1.1±0.2	926±168	-5.6±0.2	-2.7	-8.3
	30	1.0±0.0	1000±20	-6.2±0.1	-2.1	-8.3
	32.5	0.9±0.1	1045±116	-6.7±0.2	-1.7	-8.4
	35	0.7±0.0	1429±143	-7.4±0.6	-0.8	-8.2

K_a ; Constante de asociación. K_d ; constante de disociación, fue calculado como $1/K_a$. ΔG_a ; energía libre de Gibbs de asociación, fue calculada mediante la ecuación $\Delta G_a = -RT \ln K_a - T\Delta S_a$. ΔH_a ; cambio de entalpía de asociación. $-T\Delta S_a$; componente entrópico, fue calculado a partir de la ecuación $\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a$. T; Temperatura.

En el caso de imatinib, la afinidad disminuyó de 7.3 a 1.9 μM^{-1} al incrementarse la temperatura de 20 a 35 °C. El proceso fue dirigido casi exclusivamente por el componente entálpico, con un componente entrópico desfavorable después de los 20 °C. La unión de SH-Abl a dasatinib mostró afinidades ligeramente menores (3.3 a 0.7 μM^{-1}) que imatinib. Al igual que imatinib, la unión fue dirigida entálpicamente, aunque con contribuciones significativamente menos negativas. En cambio, la unión de dasatinib mostró un componente entrópico favorable en todo el intervalo de temperatura.

6.4 Efecto del ácido mirístico en la unión de inhibidores ATP competitivos

Como se mencionó anteriormente, Abl posee un sitio hidrofóbico autorregulatorio en el lóbulo C del dominio catalítico (TK), capaz de unir un grupo miristoilo. Nagar *et al.* (37), mediante estudios calorimétricos, reportaron un valor de $K_d = 2.3 \mu\text{M}$ para la interacción directa del grupo miristoilo unido a la secuencia N-terminal GQQPGKVLGDQRRPSL de la región cap (Cap-Myr) con el dominio C, sin reportar valores de ΔH . En nuestro caso, no nos fue posible cuantificar experimentalmente esta interacción, dado que el Myr mostró una solubilidad no apropiada para realizar las mediciones. Para avanzar al siguiente objetivo y determinar el grado en que afecta la presencia de Myr en la unión de inhibidores, se realizaron mediciones calorimétricas del complejo Myr•SH-Abl con imatinib y dasatinib. SH-Abl fue pre-incubada en amortiguador de calorimetría suplementado con 80 μM de Myr. Con esta concentración de Myr

y considerando una K_d de 2.3 μM , más del 97% de la proteína se encontraría saturada por el inhibidor. Las curvas de titulación y los parámetros de interacción se muestran en la **Figura 20** y en la **Tabla 3**, respectivamente. Los potenciogramas mostraron señales exotérmicas para todos los complejos. Un modelo de un solo sitio de unión fue ajustado a las curvas calorimétricas. La pre-unión de Myr a SH-Abl cambió drásticamente los parámetros de unión de SH-Abl por los inhibidores. Ambos eventos de unión fueron dirigidos entálpicamente, con un componente entrópico desfavorable.

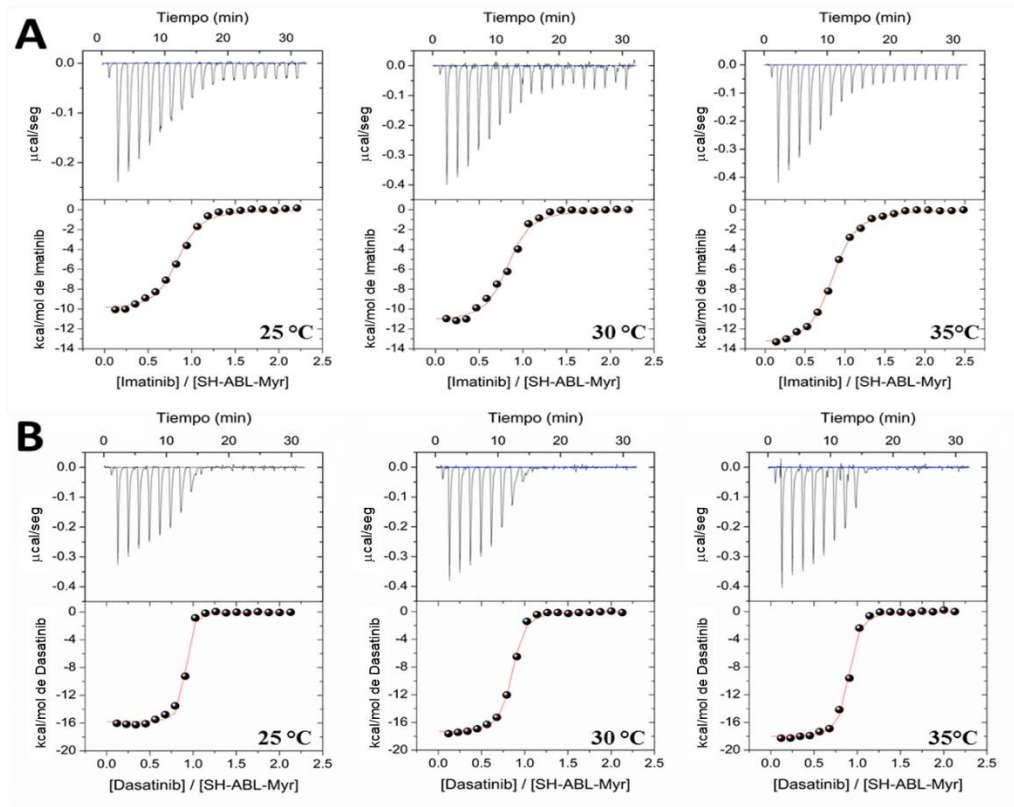


Figura 20. Isothermas de titulación calorimétrica de la interacción de Myr•SH-Abl con inhibidores ATP competitivos. Ejemplos de titulación calorimétrica, potenciogramas (parte superior) e isothermas de unión (parte inferior) de la asociación de SH-Abl•Myr con (A) imatinib y (B) dasatinib a diferentes temperaturas obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica. La proteína fue co-solubilizada con 80 μM de Myr en solución amortiguadora 50 mM TRIS-HCl pH 8.0, suplementada con 150 mM de NaCl, 5 % de glicerol y 5 mM de MgCl_2 .

Tabla 3: Parámetros termodinámicos de la interacción de Myr•SH-Abl con imatinib y dasatinib a diferentes temperaturas obtenida mediante ITC

Ligando	T (°C)	K_a (μM^{-1})	K_d (nM)	ΔH_b (kcal/mol)	$-T\Delta S_b$ (kcal/mol)	ΔG_b (kcal/mol)
imatinib	25	2.9±0.5	345±59	-10.1±0.2	1.3	-8.8
	30	2.7±0.6	370±82	-11.3±0.3	1.5	-9.8
	35	2.5±0.2	400±32	-13.7±0.2	3.8	-9.9
dasatinib	25	46.7±12.0	21±5	-15.8±0.3	5.4	-10.4
	30	30.0±4.2	33±5	-17.0±0.2	5.6	-11.4
	35	6.7±0.7	149±15	-18.1±0.3	7.5	-10.6

K_a : Constante de asociación. K_d : constante de disociación, fue calculado como $1/K_a$. ΔG_a : energía libre de Gibbs de asociación, fue calculada mediante la ecuación $\Delta G_a = -RT \ln K_a - T\Delta S_a$. ΔH_a : cambio de entalpia de asociación. $-T\Delta S_a$: componente entrópico, fue calculado a partir de la ecuación $\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a$. T; Temperatura.

En el caso de la interacción de imatinib con el complejo Myr•SH-Abl, los parámetros de unión mostraron una dependencia térmica pequeña en relación con la observada en ausencia del tensoactivo. Es también de resaltar que los valores de K_a son similares a los obtenidos sin el inhibidor alostérico, mientras que ΔH_a y ΔS_a resultaron significativamente menos negativos. En contraste, Myr provocó un incremento de ~ 1 orden de magnitud en la afinidad de SH-Abl por dasatinib. Esta unión fue exclusivamente dirigida por el componente entálpico, a diferencia de SH-Abl aislada, cuyo componente entrópico fue favorable en ausencia de Myr.

6.5 Cambios en la capacidad calorífica acoplados a la unión de inhibidores

El cambio en la capacidad calorífica es una propiedad clave en la caracterización termodinámica de una asociación proteica, ya que es un sensor de los rearrreglos del solvente alrededor del soluto. En consecuencia, aporta información cuantitativa sobre los cambios conformacionales que tienen lugar en la formación del complejo. La calorimetría de titulación isotérmica constituye la herramienta más poderosa y precisa para la determinación del ΔC_{p_a} (77, 78). La realización de titulaciones a diferentes temperaturas permitió determinar el ΔC_{p_a} mediante el análisis de la dependencia térmica del ΔH_a ($\Delta C_{p_a}^H = \delta\Delta H_a/\delta T$). Como se puede observar en la **Figura 21**, todos los complejos estudiados mostraron una tendencia lineal simple, por lo que el $\Delta C_{p_a}^H$ fue calculado a partir del ajuste de una línea recta a los datos experimentales correspondientes. Alternativamente, el ΔC_{p_a} puede ser calculado a partir del análisis del ΔS_a en función de la temperatura ($\Delta C_{p_a}^S = \delta\Delta S_a/\delta \ln T$). La cercanía numérica dentro del mismo orden de magnitud entre $\Delta C_{p_a}^{\Delta H}$ y $\Delta C_{p_a}^S$ es considerada como un control interno de la calidad de las mediciones calorimétricas (**Tabla 4**). El ΔC_{p_a} obtenido para el complejo SH-Abl con imatinib fue considerable, siendo de alrededor 4 veces más negativo que el observado para el complejo

con dasatinib. En presencia de Myr, el ΔC_p^a con imatinib se redujo a menos de la mitad en relación con el observado en ausencia del inhibidor alostérico. En contraste, el Myr mostró un efecto marginal sobre el ΔC_p^a de unión a dasatinib.

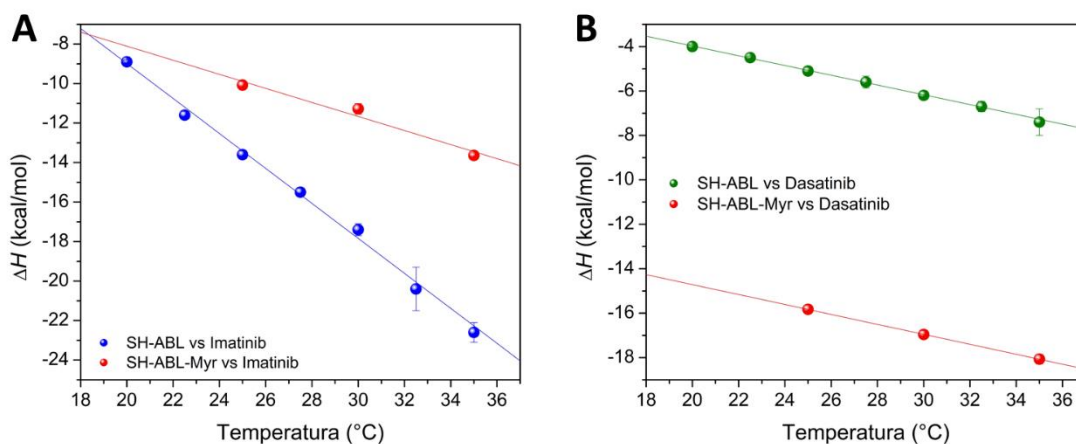


Figura 21. Dependencia térmica del ΔH_a y ΔS_a . Entalpías de asociación en función de la temperatura para la interacción de SH-Abl con (A) imatinib y (B) dasatinib en presencia y ausencia de Myr. Las líneas continuas corresponden a un ajuste lineal, en donde el ΔC_p^a determina el valor de la pendiente.

Tabla 4. Cambio en la capacidad calorífica de SH-Abl al unir a sus ligandos.

$\Delta C_p^a^H$	-885±19	-219±13	-363±22	-224±26
$\Delta C_p^a^S$	-903±25	-275±10	-241±120	-188±97
imatinib	+	-	+	-
dasatinib	-	+	-	+
Myr	-	-	+	+

$\Delta C_p^a^H$, cambio en la capacidad calorífica calculado mediante $\delta\Delta H_a/\delta T$. $\Delta C_p^a^S$, cambio en la capacidad calorífica calculado mediante $\delta\Delta S_a/\delta \ln T$. Tanto el $\Delta C_p^a^H$ como el $\Delta C_p^a^S$ están dados en $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$.

Para corroborar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de $\Delta C_p^a^S$ y $\Delta C_p^a^H$ se realizaron pruebas de t de students con el software graphpad (103).

6.6 Termodinámica de unión entre SH-Abl y dodecilsulfato de sodio (SDS)

Experimentos de DC han mostrado que el SDS ejerce un efecto conformacional y estabilizante sobre TK-Abl que asemeja al exhibido por Myr, sugiriendo que ambos tensoactivos interactúan con la proteína de manera similar (94). Esto es de esperarse, debido a que el SDS contiene una cadena alifática de 12 carbonos, similar a la cadena de 14 carbonos de Myr. Por lo tanto, se realizó la caracterización de la unión de SDS a SH-Abl, dado que la hidrosolubilidad de este tensoactivo es suficientemente alta ($\text{CMC} \approx 8 \text{ mM}$) para realizar las determinaciones calorimétricas. En la **Figura 22** se muestran las curvas de titulación para este complejo. En la **Tabla 5** se muestran los parámetros termodinámicos de unión en función de la temperatura.

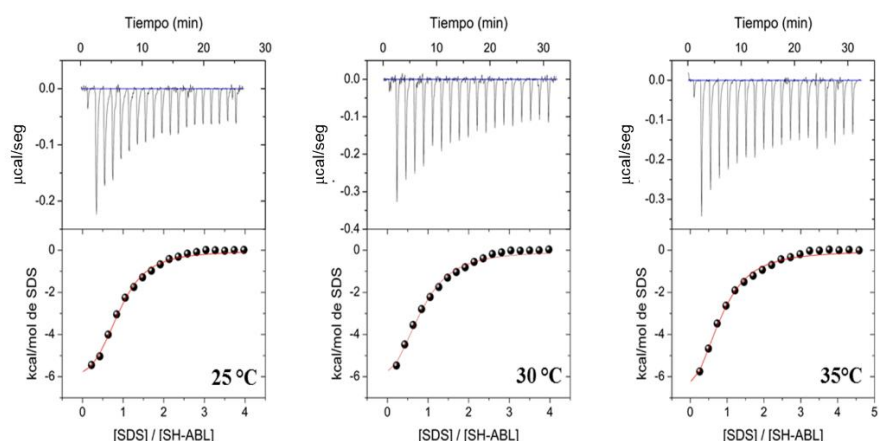


Figura 22. Isotermas de titulación calorimétrica. Potenciogramas (parte superior) e isotermas de unión (parte inferior) de la asociación de SH-Abl con dodecilsulfato de sodio (SDS) a diferentes temperaturas obtenidos mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Tabla 5. Parámetros termodinámicos de la interacción de SH-Abl con SDS a diferentes temperaturas obtenida mediante ITC.

Proteína	Ligando	T (°C)	K_a (μM^{-1})	K_d (μM)	ΔH_a (kcal/mol)	$-T\Delta S_a$ (kcal/mol)	ΔG_a (kcal/mol)	$\Delta C_{p_a}^H$ ($\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
SH-Abl	SDS	25	0.38 ± 0.06	2.6 ± 0.4	-6.9 ± 0.3	-0.7	-7.6	-153 ± 15
		30	0.24 ± 0.04	4.2 ± 0.7	-7.8 ± 0.7	-0.4	-8.2	
		35	0.27 ± 0.05	3.6 ± 0.6	-8.4 ± 0.8	0.0	-8.4	

$\Delta C_{p_a}^H$, cambio en la capacidad calorífica, fue calculado mediante $\Delta C_{p_a}^H = \delta\Delta H/\delta T$.

La unión de SH-Abl con SDS se caracterizó por una constante de afinidad moderada, en el orden micromolar bajo, la cual disminuyó al aumentar la temperatura. La unión fue dirigida entálpicamente, mostrando un componente entrópico marginalmente favorable que se desvanece alrededor de los 35°C. El $\Delta C_{p_a}^H$ asociado a este complejo fue de $-153 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, valor pequeño comparado con los observados con los fármacos inhibidores ATP competitivos (**Figura 23**).

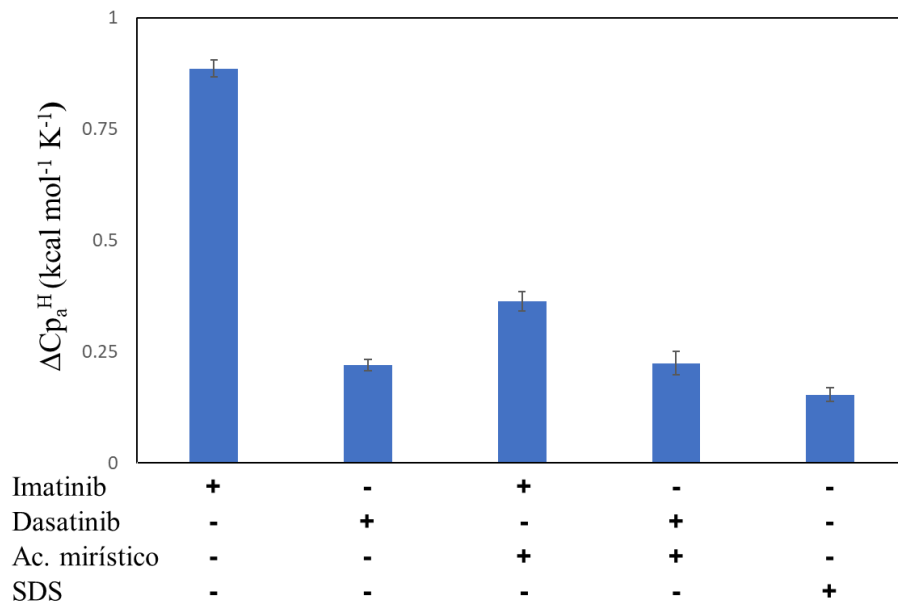


Figura 23. Comparación del $\Delta C_{p_a}^H$ de SH-Abl y sus diferentes ligandos. Es de notar que el mayor valor de ΔC_{p_a} corresponde a la unión de imatinib, presumiblemente debido a un mayor cambio conformacional que sufre la proteína tras la unión de este inhibidor.

Discusión

6.7 Los dominios SH3-SH2 afectan la estabilidad térmica del dominio TK

El plegamiento y la integridad estructural de SH-Abl recombinante fue evaluada mediante dicroísmo circular. Los espectros revelaron que la enzima posee un plegamiento que corresponde a proteínas con estructura secundaria tipo α/β (**Figura 17**). La deconvolución de los espectros mediante el software K2D3 indicó que SH-Abl contiene 32 y 15% de hélice α y hebra β , respectivamente, lo cual es consistente con la estructura secundaria observada por rayos X (PDB 1FO0), la cual presenta 30% hélices α y 21% de hebras β (46). Además, los barridos térmicos mostraron un perfil de desplegamiento claramente definido, lo que constituye una prueba adicional de que SH-Abl se encuentra plegada. Estas mediciones también aportaron información sobre la contribución de los dominios SH3 y SH2 a la estabilidad del dominio TK. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo mostraron que el dominio TK aislado presenta un perfil de desplegamiento de tipo bifásico (94, 95), el cual ocurre entre los 40 y 90 °C. Este patrón fue reproducido en el presente trabajo (**Figura 18**). La presencia de los dominios SH2 y SH3 produce una clara estabilización de la proteína, ya que el inicio del desplegamiento ocurre aproximadamente 30 °C arriba de lo observado con el dominio TK aislado.

6.8 La unión de imatinib a SH-Abl es marginalmente más afín que con dasatinib, aunque con firma termodinámica disímil

Los parámetros obtenidos por ITC para los complejos SH-Abl con imatinib muestran un ΔH_a favorable, siendo el parámetro que dirige de forma exclusiva la unión. Esto sugiere la formación de numerosas interacciones electrostáticas, a pesar de que el imatinib induce a SH-Abl a adquirir una conformación abierta (49). La entropía de unión es desfavorable prácticamente en todo el intervalo de temperatura estudiado, lo que indica una alta estructuración proteica tras la unión de imatinib; esto es consistente con experimentos de RMN con SH-Abl que han mostrado que el dominio N y el loop de activación sufren una rigidización tras la unión de imatinib (49). A diferencia del imatinib, la unión del dasatinib a SH-Abl fue tanto entálpica como entrópicamente dirigida. En este caso, la contribución entálpica fue mucho menos favorable que la observada con imatinib. No obstante, la entropía favorable hace que las afinidades por los dos inhibidores sean similares, resultando aproximadamente dos veces más afín en el caso del imatinib. La estructura 3D del complejo SH-Abl•dasatinib aún es desconocida.

6.9 La presencia de Myr aumenta la afinidad por dasatinib, sin alterarla significativamente por imatinib

El efecto mutuo de los inhibidores farmacológicos imatinib/dasatinib y Myr en la unión a SH-Abl está contenido en la magnitud de la constante de cooperatividad heterotrópica $q(\kappa)$, que se define por la relación de las constantes de unión de cada inhibidor en presencia y ausencia de Myr ($\kappa = K_{Myr+}/K_{Myr-}$. $\kappa > 1$ (< 1) indica cooperatividad positiva (negativa), mientras que $\kappa = 1$ indica ausencia de cooperatividad. Los parámetros de cooperatividad de las funciones de estado correspondientes resultan de la relación directa entre los dos eventos de unión (96):

$$\Delta g = -RT \ln \kappa = -RT \ln (K_{Myr+}/K_{Myr-}) \quad (\text{ec. 10})$$

$$\Delta h = \Delta H_{Myr+} - \Delta H_{Myr-} \quad (\text{ec. 11})$$

$$\Delta s = \Delta S_{Myr+} - \Delta S_{Myr-} \quad (\text{ec. 12})$$

$$\Delta c_p = \Delta C_{pMyr+} - \Delta C_{pMyr-} \quad (\text{ec. 13})$$

donde los subíndices Myr- y Myr+ corresponden a la asociación del inhibidor a SH-Abl en ausencia y presencia de Myr, respectivamente. Los datos en la **Tabla 6** muestran que la presencia del inhibidor alostérico tiene impactos diferentes sobre las firmas termodinámicas de interacción de la cinasa con los dos inhibidores ATP competitivos. En el caso del imatinib, la constante de afinidad se mantuvo prácticamente sin variación ($\kappa \sim 1$). No obstante, el inhibidor alostérico hace considerablemente menos favorable la entalpía de unión, especialmente a mayores temperaturas, mientras que la entropía resulta similarmente menos desfavorable. En contraste, Myr y dasatinib muestran una cooperatividad positiva ($\kappa > 1$), aumentando la afinidad por el inhibidor ATP competitivo en un orden de magnitud. En este caso, la interacción es mucho más exotérmica en presencia de Myr, mientras que el componente entrópico pasa de favorable a desfavorable.

Los resultados del ΔC_p revelaron que en ausencia de Myr, existe un mayor ocultamiento de áreas al unir imatinib que en ausencia del inhibidor alostérico (Myr). Dado que Myr e imatinib unen preferentemente la forma cerrada de la proteína, se sigue que la incubación con Myr “pre-organiza” a SH-Abl, de manera que la posterior unión de imatinib provoca cambios de área menores. En el caso del dasatinib, se obtuvieron valores de ΔC_p muy parecidos en presencia o ausencia de Myr. Como este inhibidor farmacológico une a la forma abierta de la cinasa, lo más probable es que la coincidencia de valores de ΔC_p se deba a fenómenos de compensación de

áreas que se ocultan y se exponen en la transición de SH-Abl dependientes de la presencia o ausencia del inhibidor alostérico

Tabla 6. Parámetros termodinámicos de cooperatividad para la interacción heterotrópica en la unión de Myr e inhibidores ATP-competitivos a SH-Abl

Ligando	T (°C)	κ	Δh (kcal/mol)	$-T\Delta s$ (kcal/mol)	Δg (kcal/mol)	Δcp (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
imatinib	25	0.56	3.5	-3.2	0.3	522
	30	0.96	6.1	-7	-0.9	
	35	1.32	9	-10.1	-1.1	
dasatinib	25	22.2	-10.7	8.9	-1.8	-5
	30	30.0	-10.8	7.7	-3.1	
	35	9.6	-10.7	8.3	-2.4	

6.10 Los inhibidores imatinib y dasatinib llevan a SH-Abl a adoptar conformaciones diferentes que dependen del efecto del inhibidor alostérico

Estudios estructurales por RMN y difracción de rayos X del dominio cinasa aislado de Abl han mostrado que imatinib y dasatinib inducen diferentes conformaciones de la proteína. El imatinib se une a la forma inactiva o DFG-*out*, en donde el *loop* de activación se encuentra plegado hacia el sitio activo, en la intercara del bidominio cinasa, ocultándose parcialmente del solvente, mientras que dasatinib se une a la conformación activa o DFG-*in*, en donde el mismo *loop* adquiere un plegamiento que lo aleja del sitio activo, quedando con una exposición parcial al solvente (**Figura 6**)(44). Sin embargo, aún no se conoce la estructura del *loop* de activación en la forma *apo* de TK-Abl. Para el caso de SH-Abl, no se conocen a detalle los efectos estructurales de la presencia de los dominios SH3-SH2 sobre el *loop* de activación en su forma *apo* ni en su forma unida a imatinib o dasatinib. Por otro lado, estudios por SAXS muestran que la forma *apo* de SH-Abl se encuentra en una conformación cerrada, similar a la observada cristalográficamente en presencia de un inhibidor alostérico (48, 49). La presencia de un inhibidor alostérico provoca que la enzima se compacte aún más que la forma *apo*; una conformación similarmente cerrada se observó al co-incubar a SH-Abl con inhibidor alostérico e imatinib (49). En cambio, en ausencia del inhibidor alostérico, imatinib induce una conformación extendida de la proteína. De manera similar, estructuras de rayos X revelan que la conformación de SH-Abl unido a P166326, un inhibidor que une el mismo sitio que dasatinib, es compacta o extendida en presencia o ausencia del regulador alostérico, respectivamente (34).

Mediciones en función de la temperatura permitieron obtener los valores de cambio en la capacidad calorífica de asociación (ΔCp_a), que pueden ser tomados como indicadores de la

extensión de los cambios conformacionales ocurridos en la formación de los diferentes complejos estudiados (81, 82). Los cambios conformacionales acoplados a la unión de dos ligandos por parte de una proteína constituyen la base de la cooperatividad, del alosterismo, y, en general, de la regulación proteica.

El ΔCp_a puede ser disectado en dos componentes elementales:

$$\Delta Cp_a = \Delta Cp^{\text{rig}} + \Delta Cp^{\text{conf}} \quad (\text{ec. 14})$$

ΔCp tipo cuerpo rígido (ΔCp^{rig}) está relacionado con el ocultamiento de residuos en la interfaz de interacción solo por la ocupación del ligando (es decir, la unión tipo cuerpo rígido con el sitio de la proteína preformado), y ΔCp conformacional (ΔCp^{conf}) contiene la contribución de los rearrreglos conformacionales netos que tienen lugar en la proteína tras la unión de un ligando. ΔCp^{rig} puede ser calculado directamente a partir del cambio de áreas tanto polar (ΔASA_p) como apolar (ΔASA_{ap}), de acuerdo a la parametrización de Murphy y Freire (83) (ec.7). A su vez, ΔASA_p y ΔASA_{ap} pueden ser estimados a partir del análisis de las estructuras de rayos X del complejo correspondiente. Se determinaron las áreas superficiales a partir de las estructuras cristalográficas de los complejos de TK con imatinib (PDB 2HYY) y dasatinib (PDB 2GQG) empleando el software NACCESS (88). Para el imatinib, los cambios de área fueron: $\Delta ASA_p = -177 \text{ \AA}^2$ y $\Delta ASA_{ap} = -966 \text{ \AA}^2$; los valores correspondientes para dasatinib fueron: $\Delta ASA_p = -210 \text{ \AA}^2$ y $\Delta ASA_{ap} = -718 \text{ \AA}^2$. A partir de estos valores, se calcularon los valores de ΔCp^{rig} (**Tabla 7**, columna 4). Con estos datos, se calcularon los valores de ΔCp^{conf} mediante la ecuación 14 (Tabla 7, columna 5). Asumiendo que SH-Abl sigue el patrón de hidropatía en el ocultamiento de áreas observado estadísticamente en la formación de contactos proteína-proteína, los valores de ΔCp^{conf} fueron transformados a valores de cambio de área total ($\Delta ASA_t^{\text{conf}}$, **Tabla 7**, columna 6) mediante:

$$\Delta Cp^{\text{conf}} = \alpha f_{ap} \Delta ASA_t^{\text{conf}} + \beta f_p \Delta ASA_t^{\text{conf}} \quad (\text{ec. 15})$$

donde f_{ap} (0.677) y f_p (0.323) corresponden a las fracciones promedio de áreas no polares y polares de interfases proteína-proteína, respectivamente (97). Finalmente, $\Delta ASA_t^{\text{conf}}$ fue transformado al número de residuos que se ocultan tras la unión de ligando (N^R , **Tabla 7**, columna 7), asumiendo que cada residuo oculta un área promedio de -47 \AA^2 (98):

$$N^R = -\Delta ASA / 47 \quad (\text{ec. 16})$$

Tabla 7. Análisis de ΔC_p^a de la interacción de SH-Abl con inhibidores en ausencia y presencia de Myr.

Ligando	ΔC_p	ΔC_p^{rig}	ΔC_p^{conf}	ΔASA_t^{conf}	N^R
imatinib	-885	-388	-497	-2252	+48
dasatinib	-219	-266	47	+213	-5
imatinib/Myr	-363	-388	25	+113	-2
dasatinib/Myr ⁺	-224	-266	42	+190	-4

Como se puede observar en la **Tabla 7**, SH-Abl sufre cambios conformacionales de diferente magnitud al unir imatinib o dasatinib. En el caso del imatinib, el valor de ΔC_p^{rig} es aproximadamente 40% del valor total de unión. De lo cual se desprende que la transición conformacional involucra el ocultamiento de una superficie molecular de $\sim 2200 \text{ \AA}^2$ o 48 residuos. En contraste, la unión de imatinib en presencia de Myr está acompañada por un cambio neto prácticamente nulo en exposición de áreas ($\sim 100 \text{ \AA}^2$ o 5 residuos). Este cambio pequeño puede deberse ya sea a que la asociación del imatinib con SH-Abl preunida a Myr ocurre como si fuera una unión de tipo cuerpo rígido o debido a que la proteína sufre cambios conformacionales que provocan exposiciones y ocultamientos de áreas de magnitud similar. En la forma unida al inhibidor alostérico GNF-5, SH-Abl interactúa con imatinib en una conformación cerrada, es decir, sin que el inhibidor ATP competitivo induzca el desacoplamiento de los dominios SH3-SH2 del bidominio cinasa (49). Es probable que esto mismo suceda en presencia de Myr. Además, se ha postulado que el Myr lleva al loop de activación a una conformación cerrada, la cual es compatible con el modo de unión de imatinib. Bajo este panorama, sería explicable la coincidencia entre el ΔC_p de asociación (ΔC_p^a) obtenido para la interacción del complejo Myr•SH-Abl con imatinib y el ΔC_p^{rig} calculado de las estructuras cristalográficas. En el caso de la unión de dasatinib, el ΔC_p^a es prácticamente idéntico al ΔC_p^{rig} en presencia o ausencia de Myr (**Tabla 7**), sugiriendo que en ningún caso dasatinib induce un desacoplamiento de los dominios SH3-SH2 del bidominio, y que muy probablemente están ocurriendo cambios compensados en exposición/ocultamiento de áreas.

6.11 Contribución de los dominios SH3 y SH2 a la unión de inhibidores a TK-Abl.

En nuestro grupo de trabajo, se ha caracterizado la unión de los inhibidores imatinib y dasatinib al dominio catalítico aislado de Abl (**Tabla 8**) (95). Comparando esta información con los datos termodinámicos de la construcción SH-Abl obtenidos en el presente estudio, podemos

determinar los parámetros de cooperatividad entre los dominios de regulación SH2-SH3 y los inhibidores farmacológicos imatinib/dasatinib.

Tabla 8. Parámetros termodinámicos para la unión de TK -Abl a inhibidores determinados por ITC a 35 °C*.

Ligando	K_a ($\times 10^6 M^{-1}$)	K_d (nM)	ΔH_b (kcal/mol)	$-T\Delta S_a$ (kcal/mol)	ΔG_a (kcal/mol)	ΔCp^H ($cal mol^{-1} K^{-1}$)	ΔCp^S ($cal mol^{-1} K^{-1}$)
imatinib	11.5±1.7	87±12	-16.7±0.1	6.8	-9.9	-855	-814
dasatinib	1.1±0.2	909±165	-15.6±0.2	7.1	-8.6	-770	-800

*Datos tomados de (95).

Como se puede observar en la **Tabla 9**, los dominios SH exhiben una cooperatividad negativa con respecto al reconocimiento de ambos inhibidores. Este efecto resalta más en la unión a imatinib; la presencia de los dominios SH disminuye la afinidad del inhibidor aproximadamente 6 veces, debido a un efecto cooperativo entrópico desfavorable, que supera la entalpía de cooperatividad favorable. El reconocimiento de dasatinib también es afectado negativamente por la presencia de los dominios SH, aunque en menor medida que para imatinib. En el caso de este inhibidor, el componente cooperativo de entropía es favorable, en tanto que el de entalpía es desfavorable. El efecto de cooperatividad sobre la capacidad calorífica también resultó disímil entre los dos inhibidores. Mientras que Δcp con imatinib fue prácticamente nulo, con dasatinib se observa un cambio positivo grande. Estos resultados revelan con claridad que las construcciones TK-Abl y SH-Abl no son termodinámicamente equivalentes, y que la unión de imatinib y dasatinib ejercen cambios conformacionales disímiles en ambas proteínas.

Tabla 9. Parámetros de la cooperatividad termodinámica para la contribución heterotrópica de los dominios SH3 y SH2 en la unión de inhibidores a TK-Abl

Ligando	κ	Δh (kcal/mol)	$-T\Delta s$ (kcal/mol)	Δg (kcal/mol)	Δcp ($cal mol^{-1} K^{-1}$)
imatinib	0.17	-6.0	7.1	2.1	-35
dasatinib	0.64	8.2	-7.9	0.3	551

6.12 El dodecilsulfato de sodio (SDS), un posible buen emulador del ácido mirístico

Debido a la baja solubilidad del Myr y, por tanto, la dificultad para realizar titulaciones directas entre este tensoactivo y SH-Abl, decidimos ocupar al SDS como ligante alostérico, ya que mostró una solubilidad adecuada para realizar las determinaciones. Datos de DC obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el SDS y el Myr ejercen efectos muy semejantes en la conformación y estabilidad estructural de SH-Abl y TK-Abl ((94) y datos no publicados). El valor de K_d ($2.3 \mu\text{M}$ a 25°C) obtenido en el presente trabajo para SDS resultó muy cercano al reportado previamente por Hantschel et al. (37) para el Cap-Myr. Cabe resaltar que de la construcción Myr-GQQPGKVLGDQRRPSL, solo el grupo Myr hace contacto directo con la proteína. Por tanto, se puede considerar al SDS como un emulador apropiado del Myr en la interacción con SH-Abl. Los parámetros de unión de SDS a SH-Abl muestran que la interacción fue dirigida entálpicamente, con una contribución entrópica marginal. Esta firma termodinámica corresponde al así llamado “efecto hidrofóbico no clásico”, el cual ha sido relacionado con cavidades hidrofóbicas como el de las lipocalinas, cavidades que representan un medio desfavorable para las moléculas de agua (99). Estos sitios de unión están sub-óptimamente hidratadas, por lo que la unión al ligando tiene que pagar un costo entálpico disminuido por la desolvatación de la proteína (100). Esta desolvatación reducida, a la vez, permite explicar el por qué la entropía de unión típicamente juega un papel marginal en la estabilización del complejo en una interacción hidrofóbica no clásica. Como se puede observar en la **Figura 24**, el sitio de unión alostérico de Abl presenta la característica de ser una cavidad hidrofóbica muy semejante a la de las lipocalinas, semejanza que podría explicar el efecto hidrofóbico no clásico exhibido por esta enzima en su interacción con SDS.

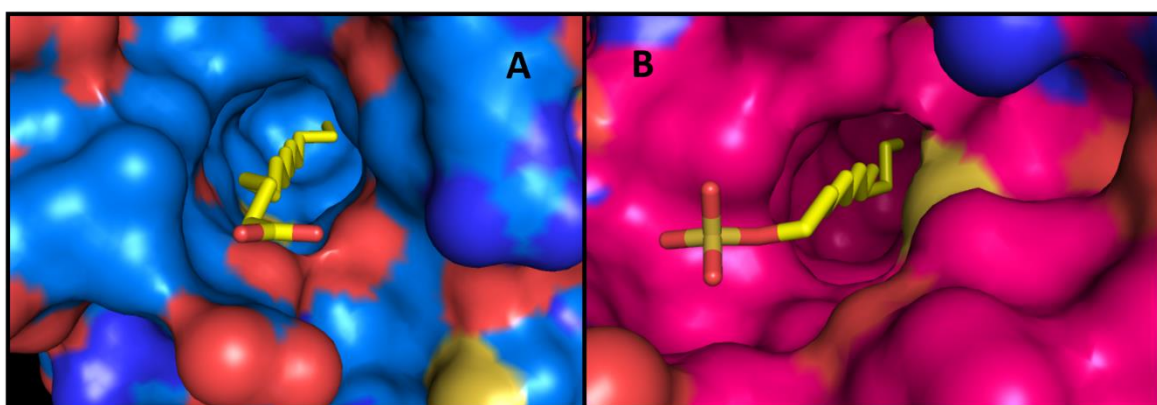


Figura 24. Comparación del sitio de unión de Tk-Abl con Myr (pdb 1opk (34)) y de la lipocalina β -lactoglobulina bovina con SDS (pdb 4gny (101)). Se aprecia la semejanza entre las cavidades de ambas proteínas, caracterizadas por ser profundas, con poca accesibilidad al solvente y de fuerte carácter hidrofóbico.

7. Conclusiones

A pesar de la abundante información que existe sobre las bases estructurales de la desregulación e inhibición farmacológica de la tirosina cinasa Bcr-Abl, los determinantes energéticos del reconocimiento molecular de esta enzima oncogénica han sido muy poco estudiados. Esta carencia de información impide formular relaciones cuantitativas entre propiedades conformacionales, dinámicas y energéticas de la interacción, factor clave para el desarrollo de nuevas rutas de regulación farmacológica de la enzima. En este estudio, realizamos una caracterización detallada de los parámetros energéticos de interacción de los inhibidores farmacológicos imatinib y dasatinib con la construcción tri-dominio SH3-SH2-TK Abl. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la ocupación del sitio alostérico de la proteína con Myr en el reconocimiento de los inhibidores competitivos. Por otro lado, la comparación con datos de unión del dominio TK-Abl condujo a cuantificar los efectos energéticos que ejercen los dominios de homología SH en la interacción con inhibidores farmacológicos. Ambos inhibidores mostraron una afinidad similar (en el orden μM bajo) por SH-Abl. No obstante, las contribuciones entálpicas y entrópicas difirieron significativamente entre los dos inhibidores, lo cual está en concordancia con los diferentes modos de unión observados en las estructuras cristalográficas correspondientes. Interesantemente, la ocupación del sitio alostérico por Myr provocó un aumento significativo de la afinidad de SH-Abl por dasatinib, mientras que la afinidad por imatinib fue marginalmente afectada. Estos datos indican que, al menos en lo que respecta al componente de potencia farmacológica basado en la afinidad de unión, es más conveniente el uso del dasatinib en terapias duales de inhibidores competitivos y alostéricos en pacientes con LMC. La comparación de las firmas termodinámicas de unión de SH-Abl y TK-Abl mostraron contribuciones energéticas significativamente diferentes entre ambas construcciones. Consideramos, por tanto, que la construcción tri-dominio, por ser la más cercana a la proteína quimérica Bcr-Abl, debería ser la unidad mínima para el desarrollo de nuevos fármacos para inhibir a la cinasa.

8. Bibliografia

1. Roskoski R (2015) A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 100:1–23.
2. Robinson DR, Wu Y-M, Lin S-F (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19(49):5548–5557.
3. Suga H, et al. (2012) Genomic survey of premetazoans shows deep conservation of cytoplasmic tyrosine kinases and multiple radiations of receptor tyrosine kinases. *Sci Signal* 5(222):ra35.
4. Hubbard SR, Till JH (2000) Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu Rev Biochem* 69(1):373–398.
5. Hanks SK, Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200:38–62.
6. Hubbard SR, Miller WT (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19(2):117–23.
7. Schenk PW, Snaar-Jagalska BE (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1449(1):1–24.
8. Robertson, Tynan, Donoghue (2000) RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* 16(8):368.
9. Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411(6835):355–365.
10. Paul MK, Mukhopadhyay AK (2004) Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 1(2):101–115.
11. Druker BJ, et al. (2001) Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N Engl J Med* 344(14):1038–1042.
12. Hidalgo M, et al. (2001) Phase I and Pharmacologic Study of OSI-774, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Malignancies. *J Clin Oncol* 19(13):3267–3279.
13. Lombardo LJ, et al. (2004) Discovery of *N*-(2-Chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a Dual Src/Abl Kinase Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays. *J Med Chem* 47(27):6658–6661.
14. Slamon DJ, et al. (2001) Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783–792.
15. Berezov A, et al. (2002) Disabling Receptor Ensembles with Rationally Designed Interface Peptidomimetics. *J Biol Chem* 277(31):28330–28339.
16. Hantschel O (2012) Allosteric BCR-ABL inhibitors in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: novel opportunities for drug combinations to overcome resistance. *Haematologica* 97(2):157–9.
17. Fong TA, et al. (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59(1):99–106.
18. Irby RB, Yeatman TJ (2000) Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19(49):5636–5642.
19. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19(13):3159–3167.
20. Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM (2013) Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer* 13(8):559–571.
21. Vlahovic G, Crawford J (2003) Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* 8(6):531–8.
22. ROWLEY JD (1973) A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining.

- Nature* 243(5405):290–293.
23. Hanlon K, Copland M (2017) Chronic myeloid leukaemia. *Medicine (Baltimore)* 45(5):287–291.
 24. Colicelli J (2010) ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal* 3(139):re6.
 25. Park A-R, et al. (2012) Regulation of dendritic arborization by BCR Rac1 GTPase-activating protein, a substrate of PTPRT. *J Cell Sci* 125(19):4518–4531.
 26. Bartram CR, et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306(5940):277–80.
 27. Ganguly SS, Plattner R (2012) Activation of abl family kinases in solid tumors. *Genes Cancer* 3(5–6):414–25.
 28. American Cancer Society. Key Statistics for Chronic Myeloid Leukemia.
 29. Avilés-Vázquez S, Chávez-González A, Mayani H (2013) Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). 149.
 30. Alvarado IM (2016) Consenso de leucemia mieloide crónica por hematólogos del ISSSTE Consensus on chronic myelogenous leukemia by hematologists of the ISSSTE. *Rev Hematol Mex Rev Hematol Mex Rev Hematol Mex* 171717(111):34–6234.
 31. Kantarjian H, et al. (2012) Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* 119(9):1981–1987.
 32. Hantschel O, Superti-Furga G (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl Tyrosine Kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(1):33–44.
 33. Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G (2002) Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 108(2):247–59.
 34. Nagar B, et al. (2003) Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112(6):859–71.
 35. Saleh T, Rossi P, Kalodimos CG (2017) Atomic view of the energy landscape in the allosteric regulation of Abl kinase. *Nat Struct Mol Biol* 24(11):893–901.
 36. Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smithgall TE (2013) Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J Biol Chem* 288(8):5443–50.
 37. Hantschel O, et al. (2003) A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 112(6):845–57.
 38. Fabbro D, et al. (2010) Inhibitors of the Abl kinase directed at either the ATP- or myristate-binding site. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1804(3):454–462.
 39. Zhang J, et al. (2010) Targeting Bcr–Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* 463(7280):501–506.
 40. Mayer BJ, Hirai H, Sakai R (1995) Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr Biol* 5(3):296–305.
 41. Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS (2002) Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol* 9(2):117–20.
 42. Levinson NM, et al. (2006) A Src-Like Inactive Conformation in the Abl Tyrosine Kinase Domain. *PLoS Biol* 4(5):e144.
 43. Reddy EP, Aggarwal AK (2012) The ins and outs of bcr-abl inhibition. *Genes Cancer* 3(5–6):447–54.
 44. Nagar B, et al. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 62(15):4236–43.
 45. Shan Y, et al. (2009) A conserved protonation-dependent switch controls drug binding in the Abl kinase. *Proc Natl Acad Sci* 106(1):139–144.
 46. Nagar B, et al. (2006) Organization of the SH3-SH2 Unit in Active and Inactive Forms of the c-Abl Tyrosine Kinase. *Mol Cell* 21(6):787–798.
 47. Lamontanara AJ, Georgeon S, Tria G, Svergun DI, Hantschel O (2014) The SH2 domain of Abl kinases regulates kinase autophosphorylation by controlling activation loop accessibility. *Nat Commun* 5:5470.
 48. Badger J, et al. (2016) c-Abl Tyrosine Kinase Adopts Multiple Active Conformational States in Solution. *Biochemistry* 55(23):3251–3260.

49. Skora L, Mestan J, Fabbro D, Jahnke W, Grzesiek S (2013) NMR reveals the allosteric opening and closing of Abelson tyrosine kinase by ATP-site and myristoyl pocket inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 110(47):E4437–E4445.
50. Chen S, Brier S, Smithgall TE, Engen JR (2007) The Abl SH2-kinase linker naturally adopts a conformation competent for SH3 domain binding. *Protein Sci* 16(4):572–581.
51. Lorenz S, Deng P, Hantschel O, Superti-Furga G, Kuriyan J (2015) Crystal structure of an SH2-kinase construct of c-Abl and effect of the SH2 domain on kinase activity. *Biochem J* 468(2):283–91.
52. Goldman JM, Melo J V. (2001) Targeting the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 344(14):1084–1086.
53. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH (2015) FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 36(7):422–439.
54. Wang Q, Zorn JA, Kuriyan J (2014) A Structural Atlas of Kinases Inhibited by Clinically Approved Drugs. *Methods Enzymol* 548:23–67.
55. Roskoski R (2003) STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 309(4):709–17.
56. Shah NP (2005) Loss of Response to Imatinib: Mechanisms and Management. *Hematology* 2005(1):183–187.
57. Waller CF (2014) Imatinib Mesylate. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, pp 1–25.
58. Bixby D, Talpaz M (2009) Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2009(1):461–76.
59. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD (2007) Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7(5):345–356.
60. Hochhaus A, et al. (2008) Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 22(6):1200–1206.
61. Rahem RM, Abuhmood AA, Hussein L (2017) Association of T315I mutation with resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with CML attended the Oncology-Hematology center in Al-Najaf city of Iraq. *Karbala Int J Mod Sci* 3(4):231–240.
62. Huang W-S, et al. (2010) Discovery of 3-[2-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-*N*-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a Potent, Orally Active Pan-Inhibitor of Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR-ABL) K. *J Med Chem* 53(12):4701–4719.
63. Dorer DJ, et al. (2016) Impact of dose intensity of ponatinib on selected adverse events: Multivariate analyses from a pooled population of clinical trial patients. *Leuk Res* 48:84–91.
64. Wang D, Pan H, Wang Y (2017) T315L: a novel mutation within BCR-ABL kinase domain confers resistance against ponatinib. *Leuk Lymphoma* 58(7):1733–1735.
65. Li Y, et al. (2012) Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 3-(1-*H*-1,2,3-Triazol-1-yl)benzamide Derivatives as Potent Pan Bcr-Abl Inhibitors Including the Threonine³¹⁵→Isoleucine³¹⁵ Mutant. *J Med Chem* 55(22):10033–10046.
66. Lee BJ, Shah NP (2017) Identification and characterization of activating ABL1 1b kinase mutations: impact on sensitivity to ATP-competitive and allosteric ABL1 inhibitors. *Leukemia* 31(5):1096–1107.
67. Iacob RE, Zhang J, Gray NS, Engen JR (2011) Allosteric Interactions between the Myristate- and ATP-Site of the Abl Kinase. *PLoS One* 6(1):e15929.
68. Wylie AA, et al. (2017) The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR–ABL1. *Nature* 543(7647):733–737.
69. Weisberg E, et al. (2005) Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7(2):129–41.
70. Zhou T, et al. (2011) Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chem Biol Drug Des*

- 77(1):1–11.
71. Tokarski JS, et al. (2006) The Structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to Activated ABL Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants. *Cancer Res* 66(11):5790–5797.
 72. Levinson NM, Boxer SG (2012) Structural and Spectroscopic Analysis of the Kinase Inhibitor Bosutinib and an Isomer of Bosutinib Binding to the Abl Tyrosine Kinase Domain. *PLoS One* 7(4):e29828.
 73. Kawasaki Y, Freire E (2011) Finding a better path to drug selectivity. *Drug Discov Today* 16(21–22):985–90.
 74. Chaires JB (2008) Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. *Annu Rev Biophys* 37(1):135–151.
 75. de Azevedo WF, Dias R (2008) Experimental approaches to evaluate the thermodynamics of protein–drug interactions. *Curr Drug Targets* 9(12):1071–6.
 76. FREIRE E (2008) Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov Today* 13(19–20):869–874.
 77. Pulido NO, Chavelas EA, Turner F, García-Hernández E (2008) Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. *Advances in Protein Physical Chemistry*, eds García-Hernández E, Fernández-Velasco DA (Transworld Research Network, India), pp 115–138.
 78. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L (2004) Thermodynamics of protein–ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res* 24(1–2):1–52.
 79. Homans SW (2006) Dynamics and Thermodynamics of Ligand–Protein Interactions. *Bioactive Conformation I* (Springer Berlin Heidelberg), pp 51–82.
 80. Du X, et al. (2016) Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci* 17(2):144.
 81. Prabhu N V, Sharp KA (2005) Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem* 56:521–48.
 82. Vega S, Abian O, Velazquez-Campoy A (2016) On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochim Biophys Acta* 1860:868–878.
 83. Murphy KP, Freire E (1992) Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem* 43:313–61.
 84. Schön A, Freire E (2016) Enthalpy screen of drug candidates. *Anal Biochem* 513:1–6.
 85. MCLAB MCL Competent E. Coli DH5a.
 86. New England BioLabs inc. BL21(DE3) Competent E. coli | NEB.
 87. ExPASy - ProtParam tool.
 88. Hubbard SJ, Thornton JM (1993) NACCES, computer program. *Dep Biochem Mol Biol Univ Coll London*.
 89. Froger A, Hall JE (2007) Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp* (6):253.
 90. Corrêa D, Henrique C, Ramos I, Corrêa DHA, Ramos CHI (2009) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J Biochem Res* 3(5):164–173.
 91. Greenfield NJ (2006) Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 1(6):2527–35.
 92. Raman B, Ramakrishna T, Rao CM (1996) Refolding of denatured and denatured/reduced lysozyme at high concentrations. *J Biol Chem* 271(29):17067–72.
 93. Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA, Perez-Iratxeta C (2012) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins* 80(2):374–81.
 94. García Curiel MB (2014) Estabilidad termodinámica y bases energéticas de la unión del dominio tirosina quinasa bcr-abl a nucleótidos de adenosine y su inhibidor imatinib (sti-571). Dissertation (Universidad Nacional Autónoma de México).
 95. Trejo Pérez MA (2019) Determinantes energéticos de la interacción entre moléculas inhibitorias y el dominio cinasa de la oncoproteína Bcr-Abl. Dissertation (UNAM).

96. Velazquez-Campoy A, Luque I, Freire E (2001) The application of thermodynamic methods in drug design. *Thermochim Acta* 380(2):217–227.
97. García-Hernández E, Zubillaga RA, Rodríguez-Romero A, Hernández-Arana A (2000) Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology* 10(10):993–1000.
98. Stites WE (1997) Protein–Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. doi:10.1021/CR960387H.
99. Qvist J, Davidovic M, Hamelberg D, Halle B (2008) A dry ligand-binding cavity in a solvated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17):6296–301.
100. Homans SW (2007) Water, water everywhere — except where it matters? *Drug Discov Today* 12(13–14):534–539.
101. Gutiérrez-Magdaleno G, Bello M, Portillo-Téllez MC, Rodríguez-Romero A, García-Hernández E (2013) Ligand binding and self-association cooperativity of β -lactoglobulin. *J Mol Recognit* 26(2):67–75.
102. Freire E (2004) Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discov Today Technol* 1(3):295–9.
103. Brown A (2009) Analysis of Cooperativity by Isothermal Titration Calorimetry. *Int J Mol Sci* 10(8):3457–3477.
104. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin L-N (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179(1):131–137.
103. Dotmatics, «graphpad,» [En línea]. Available: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?format=SD>. [Último acceso: 3 Agosto 2023]

APÉNDICE 1. Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica que provee información a nivel estructural de proteínas. En general, permite monitorear cambios conformacionales inducidos por diferentes factores como pH, temperatura, fármacos, ligandos, entre otros (90, 91). El fenómeno de DC se define como la diferencia entre la absorción por compuestos ópticamente activos de un componente de luz polarizada circularmente a la izquierda y otro componente de luz polarizada circularmente hacia la derecha (90).

En proteínas, el DC en la región del UV lejano (180-250 nm) permite estimar la estructura secundaria y su conformación debido a la absorción del enlace peptídico (**Figura 25**). De tal forma, que permite diferenciar el contenido relativo de hélices- α , hebras- β y secuencias no repetitivas. El DC permite diferenciar entre una estructura proteica plegada de una desplegada y en ciertos casos o bajo ciertas condiciones las transiciones presentes en el proceso de desplegamiento/plegamiento. Esto último permite caracterizar las especies que se encuentran involucradas en la vía de plegamiento (90, 91).

Las amidas como cromóforos tienen dos transiciones electrónicas, denominadas $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ que muestran DC en 210-220 nm y en 190 nm, respectivamente. En el caso de las hélices- α , la transición $n \rightarrow \pi^*$ es causante de una banda negativa con un mínimo a 222 nm y en el caso de las hebras- β una banda negativa con un mínimo a 216-218 nm. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es responsable en el caso de hélices- α de una banda positiva con un máximo a 190 nm y una banda negativa con un mínimo a 208 nm, así mismo es causante de una banda positiva con máximo a 198 nm, característica de hebras- β (**Figura 25**). Una banda que tiende al negativo con un mínimo alrededor de 200 nm indica la ausencia de estructura secundaria regular, como lo es una proteína desplegada.

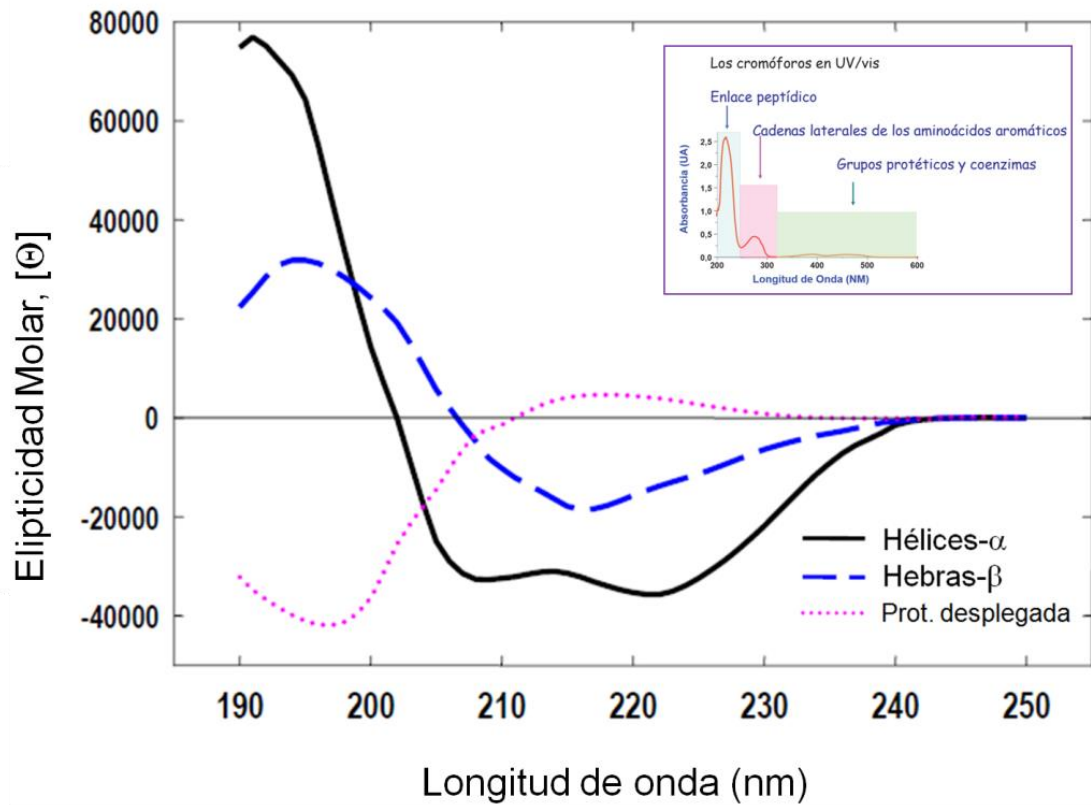


Figura 25. Espectros de DC característicos para hélices- α , hebras- β y secuencias no repetitivas de proteínas. El espectro para una proteína con estructura predominante de hélices- α (línea negra) presenta dos bandas negativas de magnitud similar con mínimos en 222 y 208 nm, y una banda positiva con un máximo en 190 nm. El espectro para una proteína con estructura predominantemente hebras- β (línea discontinua azul) presenta una banda negativa con un mínimo en 216-220 nm, y una banda positiva con un máximo alrededor de 195 nm. El espectro para una proteína desplegada o secuencias no repetitivas (p. ej. giros, lazos) presenta una banda que tiende al negativo con un mínimo alrededor de 200 nm (línea punteada rosa). En el inserto se muestran los cromóforos de las proteínas en la región del espectro electromagnético del UV/visible. Adaptado de Correa y Ramos (90).

Apéndice 2. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

La herramienta más poderosa en la actualidad para determinar las propiedades energéticas de una reacción de asociación proteína-ligando es la calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés *Isothermal Titration Calorimetry*)(78, 102). Esta herramienta es capaz de determinar en un solo experimento los valores de constante de unión (K_a), estequiometría (n), ΔG_a , ΔH_a , ΔS_a . El ΔC_p puede ser determinado mediante la dependencia del ΔH_a con respecto a la temperatura, ya sea realizando mediciones independientes a diferentes temperaturas o en un solo experimento a través del método de calorimetría de titulación multitérmica (77).

El calorímetro de titulación isotérmica está compuesto de dos celdas idénticas rodeadas por una cubierta adiabática. Un sensor detecta la diferencia de temperatura entre las celdas y a su vez entre las celdas y la cubierta. En el experimento, la muestra de proteína por lo general es colocada en la celda de muestra y la celda de referencia es llenada con solución amortiguadora o agua. En una jeringa acoplada se coloca el ligando. Antes de comenzar la titulación, una potencia constante es aplicada a la celda de referencia. Esta señal activa el circuito de alimentación eléctrica localizado en la celda de muestra y representa la línea base. Experimentalmente, se observa directamente la potencia aplicada para mantener la temperatura de las dos celdas igual (isotérmicamente) dependientes del tiempo (**Figura 26**). Durante la titulación, después de cada adición de pequeñas alícuotas de ligando, el calor absorbido o liberado en la celda de muestra es medido con respecto a la celda de referencia. Para una reacción exotérmica, la temperatura de la celda de muestra se incrementará, y la potencia de alimentación será disminuida para mantener la diferencia de temperatura entre las dos celdas constante. Para una reacción endotérmica, la temperatura de la celda de muestra disminuye, por lo que el instrumento incrementa el poder de alimentación(77, 78).

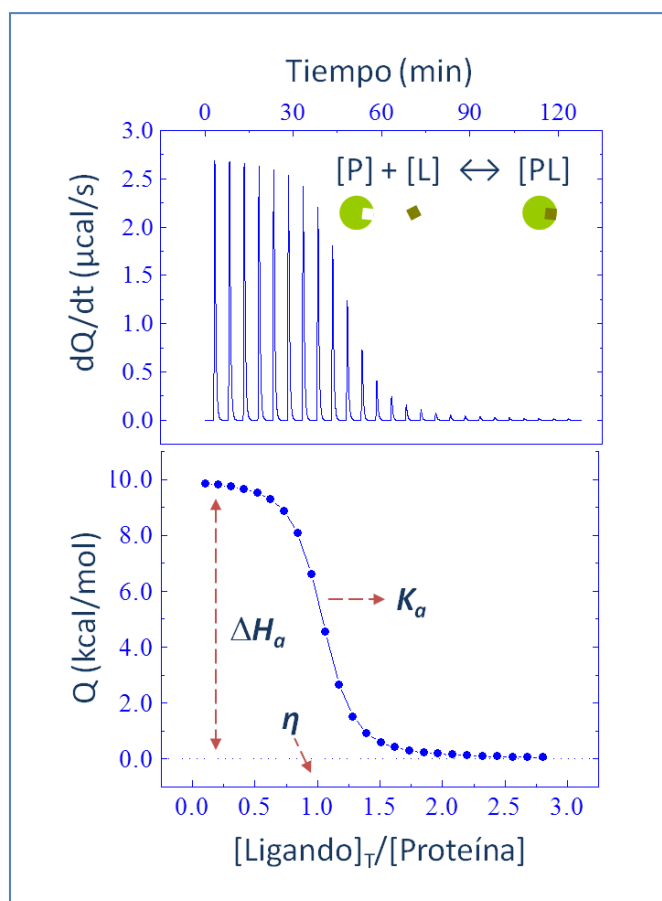


Figura 26. Experimento típico de ITC. En la parte superior se muestran los datos crudos obtenidos mediante la titulación de una proteína [P] con un ligando [L]. Cada pico corresponde al potencial aplicado o disminuido para mantener la celda de referencia y la celda experimental a la misma temperatura. Al normalizar estos datos en función de la concentración se obtiene una isoterma de unión (parte inferior). El ajuste no lineal de un modelo de unión permite determinar directamente el valor de ΔH_a (que determina la altura de la isoterma), la estequiometría n (la cual ocurre en el punto de inflexión de la curva), y la K_a (que determina lo abrupto del cambio de pendiente instantánea de la curva).

Al inicio del experimento la celda de reacción es llenada con un volumen efectivo (V_0) de proteína que es detectado caloriméricamente. En cada inyección de ligando, un volumen de líquido sale de la celda de referencia, que es igual al volumen de la inyección (v) disminuyendo ligeramente la concentración de la proteína. Para el análisis de las isothermas hay que corregir el total de las concentraciones tanto de la proteína $[P]_t$ como del ligando $[L]_t$ después de cada inyección (i). Esto se realiza mediante las ecuaciones 17 y 18 para la corrección del ligando y la proteína(102, 103).

$$[L]_{t,i} = [L]_0 \left(1 - \left(1 - \frac{v}{V_0} \right)^i \right) \quad (\text{ec. 17})$$

$$[P]_{t,i} = [P]_0 \left(1 - \frac{v}{v_0}\right)^i \quad (\text{ec. 18})$$

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

Después de cada inyección, como resultado de la unión la concentración del ligando libre $[L]$, la proteína libre $[P]$ y del complejo cambian $[PL]$. En la interacción, hay un intercambio de calor medido por el equipo como la energía necesaria para mantener la temperatura constante en $\mu\text{cal/s}$. Para cada inyección, el calor asociado (Q) a la reacción se obtiene integrando el área bajo la curva de cada pico, que es proporcional a la fracción de ligando unido $[PL]$ (104).

$$Q = \frac{n[M]_t V_0 \Delta H}{2} \left[1 + \frac{[X]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{nK_a[M]_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{[X]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{nK_a[M]_t}\right)^2 - \frac{4[X]_t}{n[M]_t}} \right] \quad (\text{ec. 19})$$

A medida que la proteína se satura con el ligando, las magnitudes de los picos disminuyen hasta que el tamaño del pico refleja el calor de solo la dilución, dando como resultado una curva sigmoidea para un modelo de un solo sitio de unión (104).

De esta curva, denominada isoterma de unión, se extraen por ajuste de regresión no lineal los parámetros K_a , ΔH_a , y la estequiometría n en un solo experimento (**Figura 26**) (78). El ΔG_a se calcula a partir de la K_a según la ecuación 3 y el valor de ΔS_a se calcula a partir de la ecuación 4. Adicionalmente, el análisis del ΔH_a a diferentes temperaturas nos permite calcular el valor del cambio en la capacidad calorífica de asociación (ΔC_{p_a}) (ec. 20)(77, 78).

$$\Delta C_{p_a} = \delta \Delta H / \delta T \quad (\text{ec. 20})$$

ANEXOS:

Soluciones amortiguadoras, reactivos y medios

Medio LB (Luria-Bertani)	10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 15 g de agar (solo para medio solido), aforar a 1 L con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.
Medio YEP(D) liquido	16 g de triptona, 5 g de NaCl y 10 g de extracto de levadura aforar a 1 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Medio SD-URA liquido	12 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos. 16.5 g de casamino ácidos, 200 mg de adenina y 150 mg de tirosina, se afora a 1.5 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Glucosa al 20%	100 g de glucosa, aforar a 0.5 L con agua desionizada. Esterilizar en autoclave
Galactosa al 20%	200 g de galactosa, aforar a 1 L con agua desionizada. Se filtra por una membrana de 0.22 µm. Esterilizar en autoclave.
Solución Drop Out 100X	0.6 g de Leucina y 0.4 g de Triptófano en 100 mL de agua desionizada
10X TE	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA. Se filtra por una membrana de 0.22 µm.
1X TE/LiAc	4 mL de agua desionizada, 0.5 mL TE 10X, 0.5 mL Li/Ac 1 M. Se filtra por una membrana de 0.22 µm
1X TE/LiAc/PEG	4 mL de PEG 50%, 0.5 mL TE 10X, 0.5 mL Li/Ac 1 M. Se filtra por una membrana de 0.22 µm
Buffer de lisis	50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl ₂ , 30 mM de Imidazol, 1 mM de PMSF (inhibidor de proteasas). Se filtra por una membrana de 0.22 µm.

Buffer A-Ni	50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl ₂ , 30 mM de Imidazol. Se filtra por una membrana de 0.22 µm.
Buffer B-Ni	50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl ₂ , 500 mM de Imidazol. Se filtra por una membrana de 0.22 µm
Buffer A-Q	15 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl, 1.5 % de Glicerol, 1.5 mM de MgCl ₂ . Se filtra por una membrana de 0.22 µm.
Amortiguador A-S	15 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl, 1.5 % de Glicerol, 1.5 mM de MgCl ₂ . Se filtra por una membrana de 0.22 µm.
Amortiguador B-Q	50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 1 M de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl ₂ . Se filtra por una membrana de 0.22 µm.
Amortiguador de Calorimetría	50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 5 % de Glicerol, 5 mM de MgCl ₂ , 0.5 mM de DTT. Se filtra por una membrana de 0.22 µm.
Amortiguador de tanque 10X	250 mM TRIS-base, 200 mM de Glicina, 1% SDS.
Amortiguador de carga 4X	200 mM TRIS-HCl pH 8.0, 400 mM de DTT, 40% de Glicerol, 8% de SDS, 0.4% de Azul de bromofenol.
Antibióticos (Ampicilina)	Se preparó la solución patrón de antibiótico pesando 1 g de polvo y aforando a 100 mL y cada solución fue filtrada en esterilidad mediante una membrana de 0.22 µm.