

SOBREEXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL DOMINIO TIROSINA-CINASA DE LA ONCOPROTEÍNA BCR-ABL RECOMBINANTE

Ricardo Méndez-Osorio,¹ Luis E. García-García,¹ Edwin Pérez-Rodríguez,¹ David López-Ramírez,¹ Edson R. Sánchez-Monroy,¹ Enrique García-Hernández,² Manuel B. García-Curiel² y Axel Luviano^{1,2,*}

¹ Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Batalla del 5 de mayo esq. Fuerte de Loreto s/n, Ejercito de Oriente, 09230, México, D.F. ² Instituto de Química, UNAM, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, 04360, México, D.F. *axel.luviano@comunidad.unam.mx

Introducción

En la leucemia mieloide crónica (LMC) se expresa la translocación t(9;22)(q(34;q11), conocida como cromosoma filadelfia. El producto transcripcional es el gen *BCR-ABL* que transcribe para la proteína Bcr-Abl. La actividad aumentada de tirosina-cinasa de la proteína Bcr-Abl es crucial para la generación de células transformadas presentes en la enfermedad, por lo que la inhibición de la actividad catalítica se ha convertido en un importante objetivo farmacológico al momento de desarrollar fármacos contra la LMC. El Imatinib es un fármaco que tiene alta afinidad por la cinasa Abl y es clínicamente exitoso en el tratamiento de leucemias Bcr-Abl positivas como en LMC; aunque la generación de resistencia al fármaco ha ocasionado la búsqueda de nuevos agentes inhibidores de esta enzima.^(1,2) Con la finalidad de comprender a fondo los parámetros estructurales y energéticos del funcionamiento y la inhibición de Bcr-Abl, en este trabajo se describe la sobreexpresión y purificación del dominio catalítico de la proteína Bcr-Abl recombinante en sistema de bacteria. A su vez, se reporta la caracterización espectroscópica por dicroísmo circular y la asociación con Imatinib y otros inhibidores mediante fluorescencia.

Metodología

La secuencia codificante del dominio cinasa Abl clonada en el vector pET23a y el gen de la fosfatasa YopH clonada en el vector pCDFDuet fueron cotransformados en células de *E. coli* BL21DE3 y crecidos en medio Luria-Bertani suplementado con kanamicina y estreptomycin. Los cultivos fueron inducidos con IPTG y la expresión se realizó bajo agitación constante durante 18 h a 25 °C. Al cabo de este tiempo, las células fueron lisadas y la proteína recombinante purificada mediante técnicas cromatográficas de alta resolución. Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-700.

Resultados y discusión

El dominio catalítico de la proteína Bcr-Abl fue sobreexpresado en células de *E. coli* y en un primer paso purificada mediante cromatografía de afinidad seguida de una cromatografía de intercambio iónico, las fracciones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes obteniendo bandas que corresponden al peso molecular del dominio. El rendimiento fue de 15 mg/L. El análisis de dicroísmo circular presento los mínimos característicos de α -hélice a 208 y 220 nm y mostró al realizar el barrido de temperatura de 20 a 80 °C un desplegamiento de tipo irreversible y una transición de nativo a desnaturizado monofásica.

Conclusiones

Se logró la sobreexpresión y purificación del dominio cinasa de la proteína Abl. El espectro de dicroísmo circular revela una proteína α , β . Al análisis del desplegamiento térmico revela una transición monofásica que inicia alrededor de los 35 °C lo que indica la inestabilidad de la proteína y un proceso de desnaturización irreversible, sin embargo, sería interesante estudiar la irreversibilidad del proceso empleando agentes químicos.

Palabras clave: proteína recombinante, dicroísmo circular, tirosina-cinasa Abl.

Bibliografía

- (1) Hantschel O, Superti-Furga G. (2004) Nat Rev Mol Cell Biol. vol 5: pp 33-44.
- (2) Goldman JM, Melo JV. N Engl J Med. 2001; 344: 1084-1086.