

Búsqueda de inhibidores alostéricos específicos de la Quinasa de Adhesión Focal como diana terapéutica en cáncer

Tania López^{1,2*}, Marta Acebrón², Daniel Lietha²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Programa de Biología Estructural y Biocomputación, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, 28029 Madrid, España.

Resumen

La Quinasa de Adhesión Focal es una tirosina quinasa no receptora con un papel fundamental en la integración de señales de crecimiento y adhesión a la matriz extracelular, localizada en las adhesiones focales. Es una proteína multidominio de 120KDa, compuesta por los dominios FERM, Quinasa y FAT, en cuya activación tiene un papel fundamental PIP2, desencadenando su autofosforilación y unión de Src lo que permite la completa activación de la proteína. FAK está frecuentemente sobreexpresada en cáncer lo que se relaciona con la capacidad invasiva del tumor, convirtiéndose en una importante diana contra el cáncer. En este proyecto se lleva a cabo la búsqueda de inhibidores alostéricos para FAK, en lugar de inhibidores del sitio ATP, con el objetivo de aumentar la especificidad y disminuir los efectos secundarios. Para ello, previamente, se realizó un Fragment Screening mediante NMR y Virtual Screening para la búsqueda de moléculas de bajo peso molecular que se unieran a nuestra proteína diana y una posterior selección de estas mediante SRP. En este trabajo nos centramos en el estudio a nivel atómico de la unión entre los compuestos seleccionados y FAK mediante técnicas de cristalización y difracción de rayos X. Para ello se llevó a cabo la purificación de la proteína y co-cristalización de esta con los diferentes compuestos, obteniéndose cristales a partir de los que, mediante métodos de difracción de rayos X, se obtuvieron los patrones de difracción. El mapa de densidad electrónica del complejo se obtuvo por análisis informático, permitiéndonos observar la región de unión del compuesto a la proteína, así como los aminoácidos con los que interaccionaba directamente. En este trabajo se muestra el mapa de densidad electrónica de FAK junto con uno de los compuestos seleccionados.

Palabras clave: Quinasa de Adhesión Focal; Inhibidores Alostericos; Fragment Screening; Co-cristalización; Cristalografía de Rayos X.

Cita: Tania López, Marta Acebrón, Daniel Lietha (2015) Búsqueda de inhibidores alostéricos de la Quinasa de Adhesión Focal como diana terapéutica en cáncer. *Dianas* 4(1): e20150908. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150908. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 22 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Tania López Briones et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: tanielopbri@gmail.com



Introducción

La Quinasa de Adhesión Focal (FAK) es una tirosina quinasa no receptora con un papel fundamental en la integración de señales de crecimiento y adhesión a matriz extracelular [1]. Se localiza en las adhesiones focales, formadas por complejos de proteínas adaptadoras unidas a las colas citoplasmáticas de las integrinas que conectan la Matriz Extra Celular (MEC) con los filamentos de actina del interior celular [2]. Es activada por integrinas y su señalización es importante para la migración, proliferación y supervivencia celular [3, 4].

Se trata de una proteína multidominio de 120 KDa compuesta por el dominio FERM en N-terminal, seguido de un linker de aproximadamente 50 residuos, un dominio quinasa central, una región de baja complejidad rica en prolina de aproximadamente 220 residuos y el dominio Focal Adhesion Targetin (FAT) en C-terminal. Mientras que el dominio FAT es fundamental para la unión de FAK a las adhesiones focales a través de la unión a paxilina, FERM está implicado en la regulación catalítica de FAK [1].

En su estado inactivo, el dominio FERM está unido al dominio quinasa bloqueando tanto el sitio de autofosforilación, Tyr397, como el acceso al bolsillo del sitio activo y al loop de activación [5]. La activación de FAK puede ser iniciada por la unión a integrinas y por señales procedentes de receptores de factores de crecimiento [6]. Recientemente se ha descrito el papel de PIP2 en la activación de FAK [1].

La unión de PIP2 al dominio FERM de FAK, da lugar a la unión de esta a la membrana e induce el desensamblaje de la conformación de autoinhibición, exponiendo el loop de activación, y el linker con el sitio de autofosforilación y el sitio de unión para Src, permitiendo la rápida autofosforilación del residuo de Tyr397. A continuación Src se une mediante sus dominios SH2 y SH3 al residuo Tyr397 fosforilado y al motivo PxxP respectivamente, ambos localizados en el linker. Src lleva a cabo la fosforilación de los residuos Tyr576 y Tyr577 en el loop de activación, dando lugar a la completa activación de FAK [5] (Figura 1).

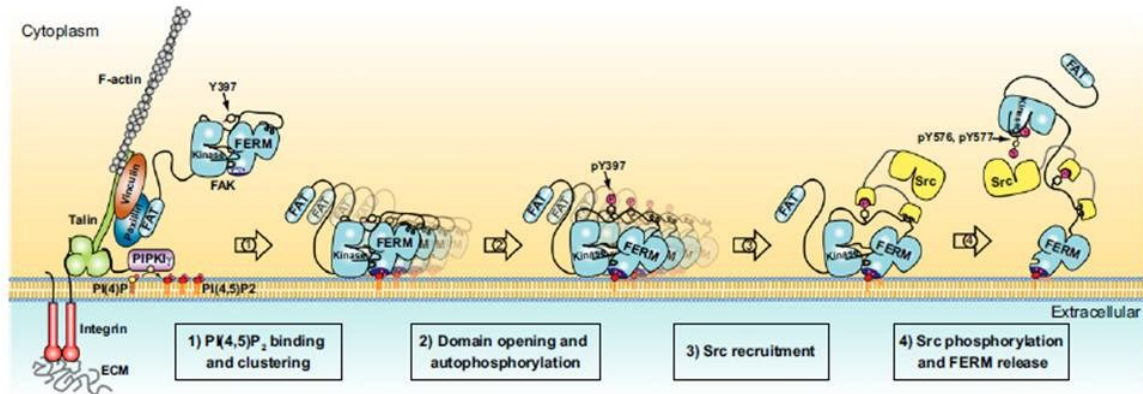


Figura 1.- Modelo esquemático de la activación de FAK mediada por integrinas. La adhesión celular a la MEC mediada por receptores de integrinas, da como resultado la agrupación de las integrinas y reclutamiento de proteínas de las adhesiones focales, formando estructuras de adhesión que unen las integrinas con la actina del citoesqueleto. El reclutamiento de PIP5K en las adhesiones focales da lugar a un incremento de los niveles de PIP2 en este punto. PIP2 se une al dominio FERM, desencadenando la unión de FAK a la membrana (paso1). Como resultado los dominios FERM y quinasa adoptan una conformación abierta, permitiendo la autofosforilación de la Tyr397 (paso2) y la unión de la proteína Src (paso3). Src fosforila los residuos Tyr 576 y Tyr 577 del loop de activación, dando lugar a la completa activación de FAK.

El complejo FAK/Src activado actúa uniendo y fosforilando un gran número de proteínas presentes en las adhesiones focales, como paxilina [7] y p130Cas[8], y proteínas de señalización implicadas en vías de regulación de la adhesión, movilidad y fenotipo invasivo, así como en señales de crecimiento y supervivencia [6]. FAK se encuentra frecuentemente sobreexpresada en varios cánceres humanos. Su sobreexpresión está altamente correlacionada con la capacidad invasiva del tumor, por ello, FAK se ha convertido en una importante diana para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer [1].

En los últimos años han surgido pequeñas moléculas inhibitoras de FAK como quimioterapéuticos. Estos compuestos pueden ser divididos en inhibidores competitivos del sitio ATP de la quinasa como, TAE226, PF-573,228, VS-4718, GSK2256098, y compuestos que actúan sobre la función de andamiaje de FAK como, C4, R2, Y11 [9]. Sin embargo, estos fármacos solo bloquean uno de los dos papeles de FAK en la célula.

El objetivo de este proyecto es el diseño de nuevas moléculas que inhiban tanto la función catalítica, como la función estructural de FAK con alta especificidad. Para ello se buscan moléculas simples de bajo peso molecular que puedan funcionar como inhibidores del sitio alostérico de FAK, en lugar de inhibidores convencionales que se dirigen al sitio de unión de ATP, disminuyendo así su toxicidad. Se ha abordado la búsqueda de estos inhibidores mediante el Fragment Screening como método de descubrimiento de nuevos fármacos. El Fragment Screening está basado en el desarrollo de fármacos a partir de moléculas de bajo peso molecular (120-150Da) que serán optimizadas racionalmente, controlando las propiedades del compuesto, hasta el desarrollo de un nuevo fármaco con una buena eficiencia de unión a la proteína [10,11].

El Fragment Screening se realizó en etapas iniciales de este proyecto mediante una aproximación experimental por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con ^{19}F y mediante Virtual Screening por simulación dinámica molecular. Posteriormente, los compuestos seleccionados, se analizaron mediante SPR (Surface Plasmon Resonance) (Biacore).

El estudio de la unión de estos fragmentos a la molécula diana (FAK) se ha realizado mediante la determinación de la estructura tridimensional del complejo por medio de cristalografía de rayos X. Esta es una de las técnicas físicas más potentes, ya que proporciona una fotografía tridimensional a escala atómica del material cristalizado, para la que se requiere la obtención de cristales de proteína adecuados. En un experimento de difracción de rayos X, cuando un haz de rayos X incide sobre un cristal, hace vibrar los electrones de estos convirtiéndose en nuevos focos de radiación X emitida en cualquier dirección, fenómeno conocido como "dispersión". Estos rayos X emitidos, pueden interferir entre sí de

manera destructiva, pero al estar los átomos de un cristal ordenados de manera regular y periódica, en determinadas direcciones las ondas interfieren constructivamente y se refuerzan para dar lugar a lo que se denomina "difracción", cumpliéndose la ley de Bragg. Estos haces difractados inciden sobre un detector electrónico, generándose el espectro de difracción, mediante el cual se obtiene el mapa de densidad electrónica, a partir del que se realiza el trazado de la cadena polipeptídica y el refinamiento de la estructura obteniéndose finalmente el modelo estructural de la proteína [12].

Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es llevar a cabo la co-cristalización de la proteína FAK junto con una serie de moléculas de bajo peso molecular previamente obtenidas mediante Fragment Screening. Para ello es necesario la purificación de los distintos dominios de la proteína con los que se llevará a cabo la co-cristalización y la búsqueda de las condiciones de cristalización de estos. A partir de los cristales obtenidos por co-cristalización de la proteína y el compuesto se realizarán experimentos de difracción de rayos X que nos proporcionen los patrones de difracción a partir de los cuales obtendremos el mapa de densidad electrónica. Mediante el mapa de densidad electrónica se pretende evaluar si el compuesto se une o no a nuestra proteína, región a la que se une, así como las principales características de la unión, aminoácidos con los que tiene una interacción directa y estructura del sitio de unión. Esta información nos permitirá en un futuro, optimizar de manera racional estas moléculas de bajo peso molecular, hasta moléculas de mayor tamaño que funcionen como inhibidores alostéricos contra FAK como diana contra el cáncer.

Métodos y Resultados

Purificación de la proteína

Para llevar a cabo los experimentos de cristalografía de rayos X es fundamental la purificación de la proteína de la cual se quieren obtener los cristales para difracción. En nuestro caso se purificaron distintos dominios de FAK, el dominio FERM 31-399, el dominio quinasa (previamente purificados) y el dominio FERM 31-405, cuya purificación se realizó durante mi estancia.

La construcción FERM 31-405 provista de una secuencia Strep tag, se obtuvo por PCR y fue clonada en el vector de expresión pOPINF (Novagen) mediante la técnica de In-Fusion HD. Este vector proporciona a la proteína una cola de seis histidinas y un sitio de reconocimiento para la proteasa *PreScission* en el extremo N-terminal. Con el vector recombinante se transformó la cepa bacteriana de *E.coli XL-1 blue* donde se amplificó y purificó a partir de una Giga Prep (6L de cultivo) siguiendo el protocolo del Kit Quiagen Plasmid, obteniéndose un total de 12 mg de DNA plasmídico. El plásmido purificado se utilizó para transfectar dos litros de cultivo de células HEK (Human Embryonic Kidney cells) en suspensión. Tras dos días y medio de transfección a 37°C y 95% de humedad, se recogieron las células por centrifugación, y se resuspendieron en Buffer de resuspensión (50mM Tris pH7, 200mM NaCl, 5% Glicerol, 2mM TCEP, 1mM PMSF). Para la extracción de la proteína se sonicaron las células durante 15 minutos con un sonicador Vibra Cell 75042. El lisado celular se ultracentrifugó a 50000rpm y 4°C durante 1h y, tras recuperar la fracción soluble (sobrenadante) se pasó por un filtro con un diámetro de poro de 0,45µm.

La purificación se realizó a 4°C, mediante distintas técnicas cromatográficas. En primer lugar se realizó una cromatografía de afinidad a níquel utilizando una columna de afinidad Chelating HP (High Performance) de 1ml equilibrada con 5 volúmenes (5ml) de tampón A (20mM Tris pH8, 500mM NaCl, 5% Glicerol, 10mM Imidazole, 2mM TCEP). Tras alcanzarse los valores basales de absorbancia a 280nm, las proteínas unidas a la columna se eluyeron mediante un gradiente lineal de tampón con una elevada concentración de imidazol, tampón B (20mM Tris pH8, 150mM NaCl, 5% Glicerol, 500mM Imidazol, 2mM TCEP), en 60 volúmenes de columna (60ml), recogiendo fracciones de 1,9ml. Las fracciones correspondientes al pico de la absorbancia a 280nm, se analizaron por el electroforesis SDS-PAGE junto con las muestras correspondientes a las fracciones soluble e insoluble y el FT (Flowthrough o proteínas no retenidas por la columna) (izquierda, Figura 2).

Posteriormente, se realizó una segunda cromatografía de afinidad, Strep-Tactin, basada en la unión de nuestra construcción a través la secuencia Strep, péptido sintético de 8 aminoácidos, a la Estreptavidina de la fase estacionaria. Se utilizó una columna de 5ml equilibrada con 5 volúmenes (25ml) de tampón A (20mM Tris pH8, 200mM NaCl, 5% Glicerol, 2mM TCEP). Una vez cargada la muestra y alcanzados los basales de absorbancia a 280nm, la proteína se eluyó con un 100% de buffer de elución, buffer B (20mM Tris pH8, 200mM NaCl, 5% Glicerol, 2mM TCEP, 2,5mM Destiobiotina), recogiendo fracciones de 1,9ml. Las fracciones de interés, coincidentes con el pico de la absorbancia a 280nm se analizaron por el electroforesis SDS-PAGE junto las muestras Total cargado y FT (centro, Figura 2). Tras esta cromatografía se obtuvo la proteína prácticamente pura, tan solo se observaba una banda contaminante entorno a los 45KDa de peso molecular en tinción con Coomassie. La secuencia Strep presenta una alta especificidad de unión.

Por último se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel que permite separar moléculas en función de su tamaño. Se utilizó la columna Superdex 200 16/60 Semi Prep (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con 20mM Tris pH8, 200mM NaCl, 5% Glicerol, 2mM TCEP. El volumen máximo de muestra que proporciona una buena resolución en esta columna es de 4,8 ml, por lo que fue necesario concentrar la muestra obtenida anteriormente (10ml) por centrifugación a 3800rpm y 4°C, utilizando un concentrador Centriprep Amicon Ultra System (Millipore) con un tamaño de poro de 10 kDa. La muestra se cargó sobre la columna, tras lo cual se comenzó a pasar buffer GF (Tris pH8 20mM, NaCl 200mM, 5% Glicerol, TCEP 2mM) a la vez que se recogían fracciones de 1,9ml. Tras este último paso se obtuvo el dominio FERM 31-405 de la proteína con un alto grado de pureza, como puede observarse en el gel correspondiente a la electroforesis SDS-PAGE final (derecha, Figura 2), que fue concentrada del modo anteriormente descrito hasta 8mg/ml, pureza y concentración adecuados para llevar a cabo los experimentos de unión de los fragmentos y posterior cristalización.

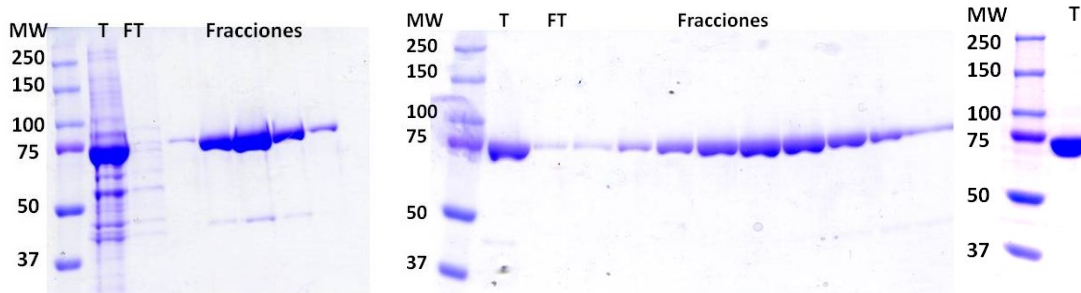


Figura 2.- SDS-PAGE al 15% teñido con Coomassie de los distintos pasos de la purificación del dominio FERM 31-405 de la proteína FAK. En el último gel, correspondiente al último paso de la purificación, se observa una sola banda de proteína entorno a los 75 KDa correspondiente al dominio FERM 31-405. MW, patrón de peso molecular; T, muestra tras la purificación.

Fragment Screening

En etapas iniciales de este proyecto se llevó a cabo la búsqueda de fragmentos de bajo peso molecular que se unieran alostéricamente a la proteína diana, FAK. El Fragment Screening, se realizó mediante RMN y Virtual Screening a partir de una librería de 2000 moléculas del programa de Terapias Experimentales del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas). Se obtuvieron 60 compuestos con afinidad por FAK. Se hizo un estudio de interacción de estos fragmentos mediante SPR, en el que se seleccionaron aquellos compuestos que se unían a los dominios de la proteína (Tabla 1).

Construcción Proteína	Compuestos
FERM 31-399	FH17, A8, A10, A11, A16, A19, A33, A35, A36, A37, A40, A41, A45, A46, A47
FERM 31-405	VSC1, VSC2, VSC4, VSC5, VSC7, VSJ18, VSJ19, VSJ20, VSJ33, VSJ39, VSJ46
QUINASA	VSC1, VSC3, VSC4, VSC7, VSC8, VSJ12, VSJ14, VSJ17, VSJ18, VSJ19, VSJ44, VSJ46, VSCFAKK1, VSCFAKK4, VSCFAKK7

Tabla 1.- Lista final de compuestos seleccionados mediante SPR para cada una de las construcciones de la proteína.

Co-cristalización de FAK con los distintos compuestos

Las distintas construcciones de la proteína FAK se co-cristalizaron con los diferentes compuestos en placas VDX de 24 pocillos (Hampton Research) utilizando el método de difusión de vapor en gota colgante empleando las condiciones de cristalización de la proteína (PEG 4000 17%, 0.2M MgCl₂, 0.1M Tris pH8.5, 0.01M TCEP).

El método de cristalización de proteínas mediante difusión de vapor en gota colgante se basa en alcanzar la sobresaturación mediante difusión de vapor. En este método, una gota formada por un pequeño volumen de la disolución de proteína y de la solución de cristalización, se equilibra contra un reservorio de mayor volumen que contiene la disolución de cristalización a una concentración superior a la que quedará en la gota tras mezclarla con la proteína a cristalizar. El equilibrio se consigue por difusión de las especies volátiles (agua o solvente orgánico), hasta que las concentraciones de precipitantes en gota y reservorio se igualan. La concentración de la proteína y el precipitante en la gota ocurre lenta y gradualmente, favoreciendo una cristalización ordenada [13].

Se mezclaron, 1µl de la disolución de la proteína (6,5mg/ml en 20mM Tris pH8, 150mM NaCl, 5% Glicerol, 2mM TCEP), previamente incubada con el compuesto, con 1µl de la disolución de cristalización sobre un cubreobjetos siliconizado, que se invierte para sellar el pocillo con el reservorio,

de modo que la gota queda colgando hacia dentro del pocillo sellado. Las gotas se equilibraron frente a 500 μ l de la disolución de cristalización. Las placas fueron almacenadas a 18°C.

Para la co-cristalización del complejo proteína-ligando, es necesario incubar previamente cada uno de los compuestos, con la construcción correspondiente de FAK, a 4°C durante toda la noche, en un ratio 1:10 (Proteína: Compuesto). La proteína debe incubarse con una solución sobresaturada del compuesto para facilitar la unión, sin embargo, puesto que los compuestos se encuentran disueltos en DMSO, la relación entre la concentración de proteína y compuesto no debe sobrepasar 1:10.

Se montaron un total de 30 placas de cristalización que fueron observadas periódicamente para detectar el crecimiento de cristales. Se obtuvieron cristales para los compuestos señalados en negro en la tabla 2. En la Figura 3 se pueden observar imágenes de algunos de los cristales obtenidos. En algunos casos fue necesario realizar una ronda de optimización de las condiciones de cristalización con el fin de mejorar la forma y tamaño del cristal y en consecuencia la resolución de este.

Construcción Proteína	Compuestos
FERM 31-399	FH17, A8, A10, A11, A16, A19, A33, A35, A36, A37, A40, A41, A45, A46, A47
FERM 31-405	VSC1, VSC2, VSC4, VSC5, VSC7, VSJ18, VSJ19, VSJ20, VSJ33, VSJ39, VSJ46
QUINASA	VSC1, VSC3, VSC4, VSC7, VSC8, VSJ12, VSJ14, VSJ17, VSJ18, VSJ19, VSJ44, VSJ46, VSCFAKK1, VSCFAKK4, VSCFAKK7

Tabla 2.- Lista final de compuestos seleccionados mediante SPR para cada una de las construcciones de la proteína. En negro se indican los compuestos para los que se obtuvieron cristales con las condiciones de cristalización de la proteína completa.

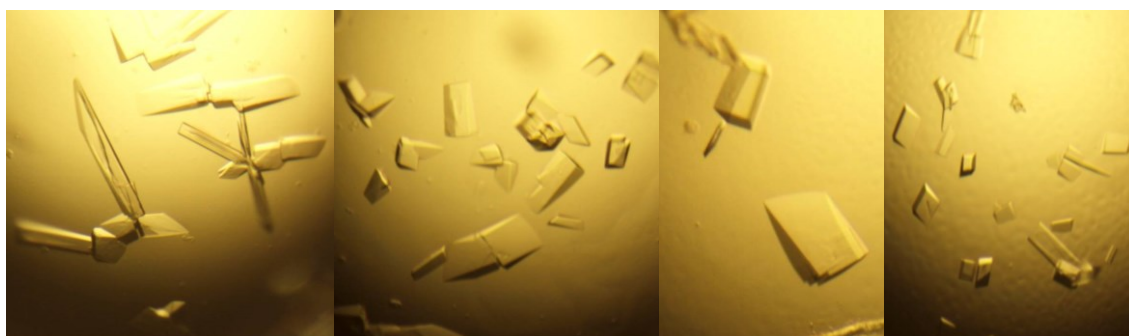


Figura 3.- Cristales obtenidos mediante co-cristalización de la proteína junto con los compuestos VSJ18, VSJ20 (FERM 31-405), VSC7 y VSJ46 (quinasa) respectivamente.

En aquellos compuestos para los que, empleando las condiciones de cristalización de la proteína, no se obtuvieron cristales, se llevó a cabo una nueva búsqueda de las condiciones de cristalización empleando distintos screens comerciales. Para ello se emplearon los robots TECAN 100 y Cartesian MicroSys (Genomic Solutions) para la dispensación de las distintas condiciones del screening y preparación de las placas de cristalización MRC de 96 pocillos (Emeral BioSystems) respectivamente. El robot Cartesian permite la dispensación de gotas de 150nl de proteína y 150nl de la disolución de cristalización formándose gotas de 300nl que se equilibran, empleando el método de difusión de vapor en gota sentada, frente a 60 μ l de disolución de cristalización en las placas MRC de 96 pocillos. Estas placas se introducen en granjas de cristalización (Formulatrix), que mantienen la temperatura constante a 18°C y realizan fotografías de cada uno de los pocillos de cada placa siguiendo la secuencia de Fibonacci que fueron observadas periódicamente mediante el programa Rock Marker.

En un primer lugar, se empleó el screening comercial JSCG+ (Jena) para todos los compuestos para los que no se obtuvieron cristales (en gris en la tabla 2). Se intentaron reproducir aquellas condiciones en las que crecieron cristales en placas VDX de 24 pocillos, mediante el método de difusión de vapor en gota colgada a 18°C, consiguiéndose cristales de proteína con los compuestos VSC2 y A36.

Se realizaron dos nuevas búsquedas de las condiciones de cristalización para aquellos compuestos con los que no se había logrado la co-cristalización junto con la proteína. Se utilizaron los screens comerciales PACT y WizardCryo (Quiagen). Tras la observación de las imágenes se intentaron reproducir las condiciones para las cuales se obtuvieron cristales en placas VDX de 24 pocillos, mediante el método de difusión de vapor en gota colgada a 18°C. Se obtuvieron cristales para los compuestos FH17, A11, A16, A35 y A37.

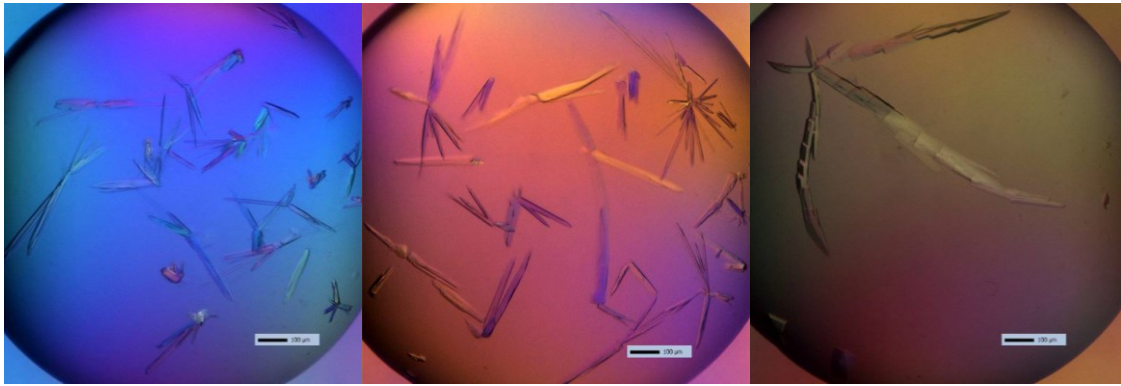


Figura 4.- Cristales obtenidos mediante co-cristalización del dominio FERM 31-399 de la proteína junto con el compuesto A36 en la búsqueda de nuevas condiciones de cristalización mediante el screening comercial JSCG+ (Jena).

No se consiguieron cristales de los compuestos A10, A19, A33, A40, A46 y A47 con el dominio FERM 31-399 y del compuesto VSC5 con el dominio FERM 31-405. Los primeros se intentaron reproducir a partir de las condiciones obtenidas para el FH17, puesto que son compuestos análogos a este, obteniéndose cristales para los compuestos A10, A19, A33 y A40.

Para aquellos compuestos para los que no fue posible obtener cristales mediante la técnica de co-cristalización (A46, A47, VSC5) se llevó a cabo la técnica de Soaking que consiste en introducir un cristal de proteína en una solución con alta concentración del compuesto (ligando) durante 10-30 minutos, tiempo suficiente para que el compuesto se una si el sitio de unión es accesible en el cristal [14].

Los cristales obtenidos se recogieron en finos loop de nylon de entre 0.05-1.0mm de diámetro y se almacenaron en nitrógeno líquido. Con el fin de evitar que los cristales se rompan al ser congelados, fueron pretratados con una solución crioprotectora (15% ETG, 22% PEG 4000, 100mM LiSO₄ (quinasa) MgCl₂ (FERM), 100mM Tris pH8.5).

Recopilación y Análisis de los datos de difracción de Rayos-X

Los experimentos de difracción se llevaron a cabo en el Síncrotrón Alba en Barcelona, España. Durante el experimento de difracción se hace incidir un haz monocromático de rayos X del orden de 1Å sobre los cristales obtenidos. El cristal, recogido en el loop, se montó en el extremo de una cabeza goniométrica que hace girar al cristal en intervalos pequeños, del orden de 0,5°, mientras que sobre él inciden rayos X. Los haces difractados fueron recogidos sobre un detector electrónico (PILATUS 6M).

Posteriormente se procedió al análisis de los datos de difracción obtenidos, en el cual, el objetivo principal es la determinación de la densidad electrónica, $\rho(xyz)$, para cada punto de la celdilla elemental cristalina partiendo del espectro de difracción. Para ello es necesario la resolución de la ecuación *Transformada de Fourier*. En ella intervienen unas magnitudes denominadas *factores de estructura* que corresponden a la dispersión de los rayos X por los átomos de una celdilla elemental. En realidad son ondas y como tales pueden describirse por sus módulos y fases [12]. Las fases no se pueden medir experimentalmente, ya que los datos se recogen en dos dimensiones, por lo que hay que recurrir a distintos métodos para poder solucionar el problema de la fase. Nosotros empleamos el método de Remplazamiento Molecular, en el cual, se dispone de un modelo estructural de la proteína que se alinea con la densidad electrónica obtenida de los datos recogidos, y que posteriormente será refinado usando distintos programas informáticos. Solucionado el problema de la fase, se calculó la función de densidad electrónica para cada punto de la celdilla, y se representaron estos valores obteniéndose el mapa de densidad electrónica.

En la imagen central de la figura 5 podemos observar una zona del mapa de densidad electrónica del dominio quinasa de FAK co-cristalizada con VSC7 en superposición con la estructura del dominio quinasa de FAK ya publicada (PDB: 4D5K). Se observa una nube de densidad electrónica no alineada con el modelo (verde) y que no corresponde a moléculas de agua u otras posibles moléculas pequeñas procedentes de la solución. Esto puede corresponderse con la densidad electrónica del compuesto co-cristalizado con la proteína. Al comparar la estructura química de VSC7 (Imagen derecha, Figura 5) con la nube de densidad electrónica se puede observar una alta coincidencia en la forma de ambos. En el mapa de densidad podemos identificar los aminoácidos con los que interacciona directamente el compuesto, residuos H482, Q529, L525 y Y528. En pasos posteriores se añadirá al modelo la estructura química del compuesto y se verá si alinea con la nube, comprobando si efectivamente corresponde a este.

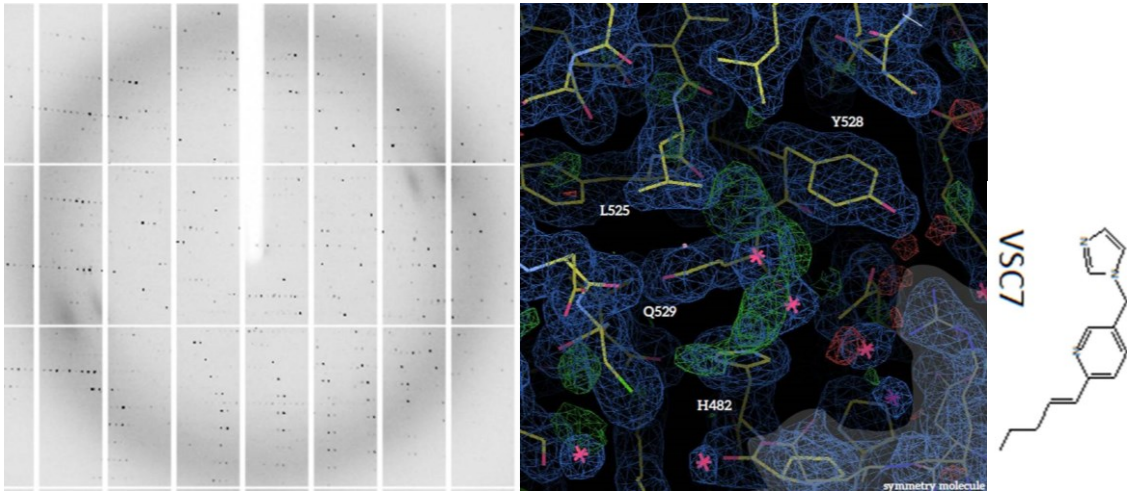


Figura 5.- Izquierda, patrón de difracción del cristal correspondiente al dominio quinasa co-cristalizado con el compuesto VSC7 con una resolución de 1.9Å. Centro, zona del mapa de densidad electrónica del dominio quinasa con el compuesto VSC7 en superposición con la estructura del dominio quinasa de FAK ya publicada (PDB: 4D5K), en la que se observa una nube de densidad electrónica no coincidente (verde) posiblemente correspondiente al compuesto VSC7, así como los aminoácidos con los que interacciona este directamente. Derecha, estructura química del compuesto VSC7.

En la figura 6 se muestra la estructura tridimensional de FAK, en concreto, de los dominios FERM y quinasa, así como el linker entre ambos. Se puede observar la localización de la zona de unión del compuesto VSC7 que se encontraría unido al dominio quinasa, fuera del sitio ortostérico (sitio ATP), en uno de los bolsillos alostéricos de la proteína. Estos resultados colocan al compuesto VSC7 como un potencial candidato a inhibidor alostérico de FAK a partir del cual desarrollar mediante un diseño racional nuevos fármacos inhibidores de esta proteína.

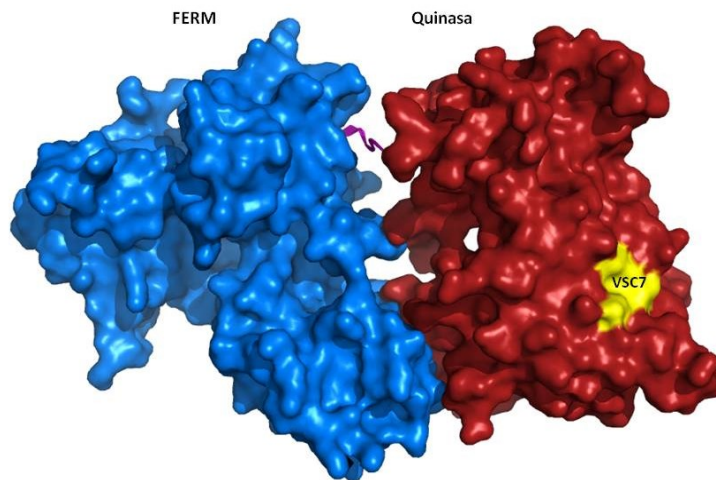


Figura 6.- Estructura tridimensional de los dominios FERM (azul) y quinasa (rojo), así como el linker entre ambos. La imagen se ha realizado con el programa informático pymol a partir de la estructura de FAK ya publicada (PDB: 4D5K) en la que se observa en amarillo la región del dominio quinasa a la que se une alostéricamente el compuesto VSC7.

Discusión

La proteína FAK actúa uniendo y fosforilando un gran número de proteínas presentes en las adhesiones focales y proteínas de señalización implicadas en vías de regulación de la adhesión, movilidad y fenotipo invasivo, así como en señales de crecimiento y supervivencia [6]. Una desregulación de su papel como proteína estructural y señalizadora desencadena la aparición de distintos tipos de cáncer y su sobreexpresión está altamente correlacionada con la capacidad invasiva del tumor[1]. Por ello, FAK constituye una importante diana para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

Este trabajo está enfocado a la búsqueda de nuevos inhibidores alostéricos de FAK mediante Fragment Screening y el estudio de la unión de estos a la molécula diana mediante técnicas de biología estructural que nos permiten conocer, de manera detallada, la zona de la proteína a la que se une el compuesto, la estructura tridimensional del bolsillo al que se une, o los aminoácidos con los que interacciona de manera directa. Un conocimiento exhaustivo de las características de la unión permite, mediante un proceso de

optimización química racional, el desarrollo de moléculas de mayor tamaño con las características adecuadas para constituir un fármaco efectivo contra FAK.

Diferentes autores del campo de la biología estructural [12] consideran, la cristalografía de rayos X como una de las técnicas físicas más potentes para la resolución de problemas estructurales de la materia sólida ordenada, frente a otras técnicas encaminadas al mismo fin. Esta presenta grandes ventajas, ya que un estudio estructural proporciona una fotografía tridimensional a escala atómica del material cristalizado. En el caso de las proteínas permite obtener la estructura tridimensional, incluyendo plegamiento, y detalles de un gran significado físico-químico (distancias y ángulos de enlace, estado térmico vibracional de los átomos, empaquetamiento cristalino, etc.) claves para entender su función biológica. Y presentan la RMN como técnica alternativa, de alta resolución, para la determinación estructural de moléculas en disolución, pero esta presenta la limitación del tamaño molecular que en la actualidad se encuentra entorno a los 60-80KDa [15].

Un estudio de cristalografía requiere la obtención de cristales sobre los que desarrollar los experimentos de difracción. En este trabajo se ha optado por la co-cristalización como método de obtención de cristales de la proteína junto al compuesto consiguiéndose muy buenos resultados y aunque hasta el momento, solo se dispone del mapa de densidad electrónica para uno de ellos, este nos ha permitido comprobar que el compuesto, tal y como se deseaba, se encuentra unido a la proteína en uno de los bolsillos alostéricos de esta.

Otro autores consideran el soaking como un mejor método de cristalización de una proteína junto a un ligando determinado, por un lado debido a que esta técnica puede ser sistematizada para su empleo en campañas de High-Throughput Fragment Screening, y a que la unión del ligando no provoca cambios en las condiciones de cristalización de la proteína ya que esta se encuentra cristalizada cuando se pone en contacto con el compuesto, facilitando el proceso [10]. Sin embargo, la naturaleza de la técnica de co-cristalización es más fiel a las condiciones celulares, en las que la proteína a la que se unirá el compuesto se encuentra en solución acuosa y no formando cristales.

Los resultados obtenidos para el compuesto VSC7, nos han permitido corroborar que las técnicas y metodología empleadas son las adecuadas para alcanzar los objetivos de este trabajo, por lo que es solo cuestión de tiempo y trabajo disponer de todos los mapas de densidad electrónica que nos permitan encontrar y comparar los distintos sitios de unión y las características de esta, seleccionando aquellos compuestos más adecuados para el proceso de optimización química racional que nos lleve al desarrollo de un nuevo fármaco altamente específico y eficaz contra FAK.

Agradecimientos

A todos los componentes del grupo de Señalización y Adhesión Celular, dirigido por el Dr. Daniel Lietha del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, es especial a Marta Acebrón y a Pilar Redondo por toda la ayuda brindada para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Goñi, G.M., C. Epifano, J. Boskovic, M. Camacho-Artacho, J. Zhou, A. Bronowska, M.T. Martín, M.J. Eck, L. Kremer, F. Gräter, F.L. Gervasio, M. Perez-Moreno and D. Lietha. 2014. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *PNAS*. 111(31):3177-3186.
2. Schiller, H.B. and R. Fässler. 2013. Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Rep*. 14(6):509-519.
3. Schaller, M.D. 2010. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanism and novel functions. *J Cell Sci*. 123(Pt 7):1007-1013.
4. Zhao, X. and J.L. Guan. 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 63(8):610-615.
5. Lietha, D., X. Cai, D.F.J. Ceccarelli, Y. Li, M.D. Schaller and M.J. Eck. 2007. Structural basis for the autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell*. 129(6):1177-1187.
6. McLean, G.W., N.O. Carragher, E. Avizienyte, J. Evans, V.G. Brunton and M.C. Frame. 2005. The role of Focal Adhesion Kinase in cancer, a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*. 5(7):505-515.
7. Schaller, M.D. and J.T. Parsons. 1995. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxilin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol*. 15(5):2635-2645.
8. Tachibana, K., T. Urano, H. Fujita, Y. Ohashi, K. Kamiguchi, S. Iwata, H. Hirai and C. Morimoto. 1997. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by Focal Adhesion Kinase. A putative

- mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J Biol Chem.* 272(46):29083-29090.
9. Sulzmaier, F.J., C. Jean and D.D. Schlaepfer. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* . 14(9): 598-610.
 10. Davies, T.G. and I.J. Tickle. 2012. Fragment screening using X-ray crystallography. *Top Curr Chem.* 317:33-59.
 11. Rees, D.C., M. Congreve, C.W. Murray and R. Carr. 2005. Fragment-based lead discovery: leads by design. *Drug discovery today.* 10(14):987-992.
 12. Hermoso, J.A and M. Martínez-Ripoll. 2003. Estructura de proteínas por cristalografía de rayos X. In: C. Gomez-Moreno and J. Sancho, editors. *Estructura de proteínas.* Barcelona: Ariel S.A. 253-285.
 13. Rubio, V. 2003. La cristalización de proteínas. In: C. Gomez-Moreno and J. Sancho, editors. *Estructura de proteínas.* Barcelona: Ariel S.A. 233-252.
 14. Rowlett, R.S. 2006. *Protein X-Ray Crystallography Methods.* Hamilton: Department of Chemistry, Colgate University. 71.
 15. Jiménez, M.A. 2003. Estructura de proteínas por RNM. In: C. Gomez-Moreno and J. Sancho, editors. *Estructura de proteínas.* Barcelona: Ariel S.A. 311-332.