

Quispe Patricia A.¹, León Ignacio E.¹, Lavecchia Martín J.¹

¹CEQUINOR (UNLP-CONICET-CICBA) Bv. 120 N° 1465
quispepatricia@quimica.unlp.edu.ar

FAK

La quinasa de adhesión focal, FAK, es una proteína fundamental en los procesos de invasión y metástasis tumoral, y está constituida por tres dominios (ver Fig. 1).

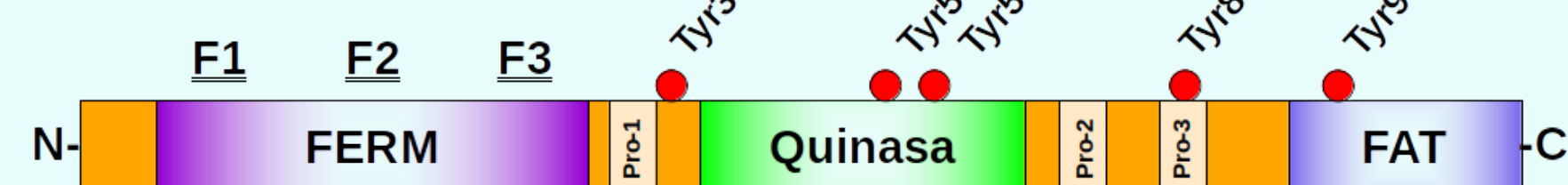


Figura 1. Estructura de los dominios de FAK

La inhibición de FAK como estrategia terapéutica ha sido ampliamente estudiada en cáncer y se han diseñado fármacos dirigidos al sitio de unión a ATP. Sin embargo, en los últimos años FERM ha cobrado relevancia como blanco molecular, dado que su interacción con quinasa mantiene a FAK en una conformación inactiva en ausencia de señales (ver Fig. 2). Es la fosforilación del residuo Tyr397, localizado en una región enlazadora entre FERM y quinasa la que inicia una compleja cascada de fosforilaciones que culminan en la disociación del complejo y la activación de FAK.

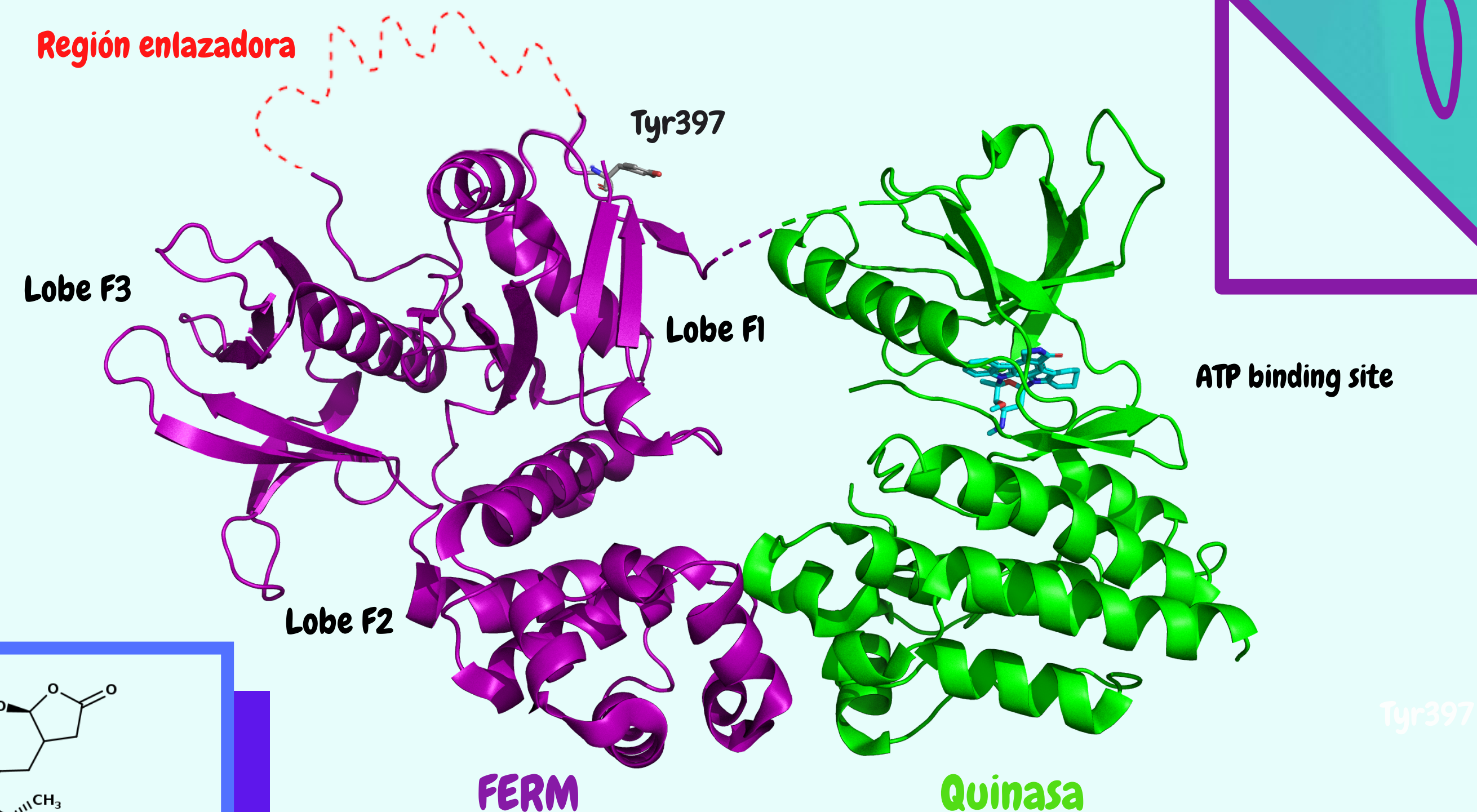


Figura 2. Estructura de FAK en conformación autoinhibida

Regiones diana propuestas en FERM

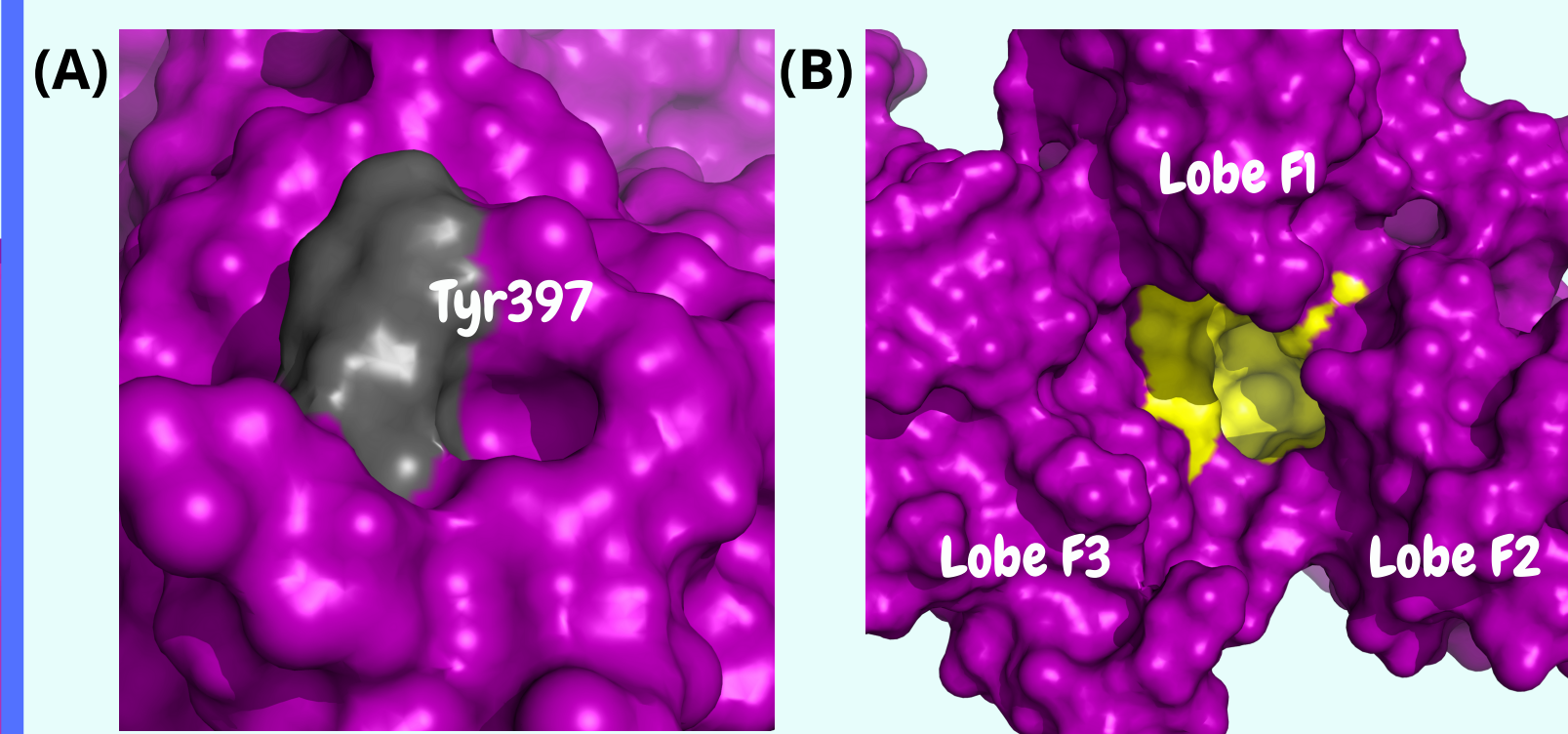
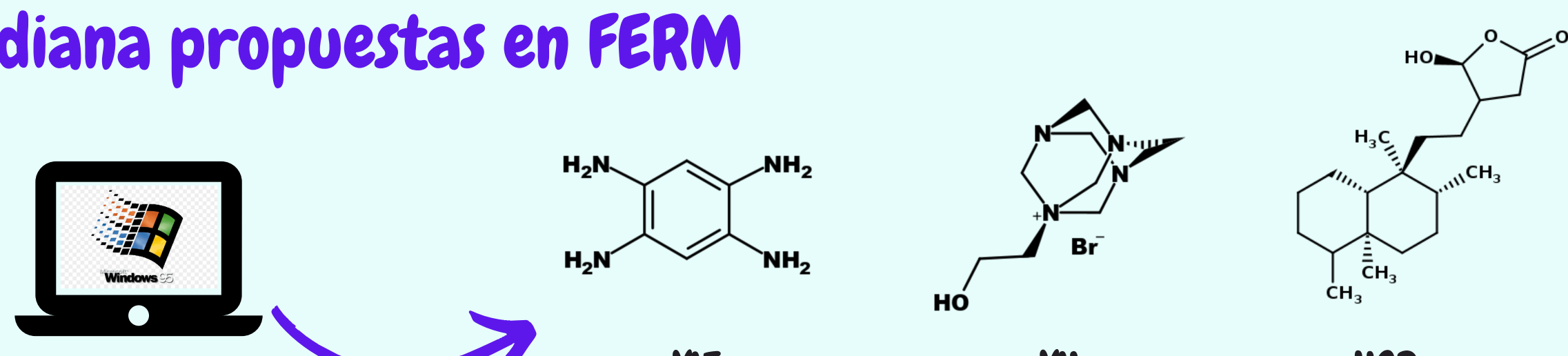


Figura 3. Sitios de unión de inhibidores propuestos por acoplamiento molecular (A) sitio propuesto para Y11 e Y15. (B) Sitio propuesto para HCD

Tres moléculas inhibitoras de la disociación del complejo FERM-quinasa han sido desarrolladas computacionalmente (1,2), y sus sitios de unión propuestos en FERM son un pequeño bolsillo en torno a Tyr397, y una cavidad localizada entre los subdominios (Lobes) F1, F2, y F3 (ver Fig. 3), sin embargo, la interacción entre estas moléculas y el dominio no ha sido estudiada en detalle.



Motivación

- Estudiar la dinámica conformacional del bolsillo en torno a Tyr397, ya que recientemente ha sido descrita una estructura cristalina con el sitio bloqueado, Fig. 4 (ver *Estudio conformacional de FERM*).
- Estudiar la *drugabilidad* del dominio completo y su potencialidad de unir ligandos (ver *Estudios de accesibilidad farmacológica*).
- Complementar el estudio computacional realizado sobre los tres inhibidores, el cual solo contempló acoplamiento molecular (ver *Modos de unión de los inhibidores*).

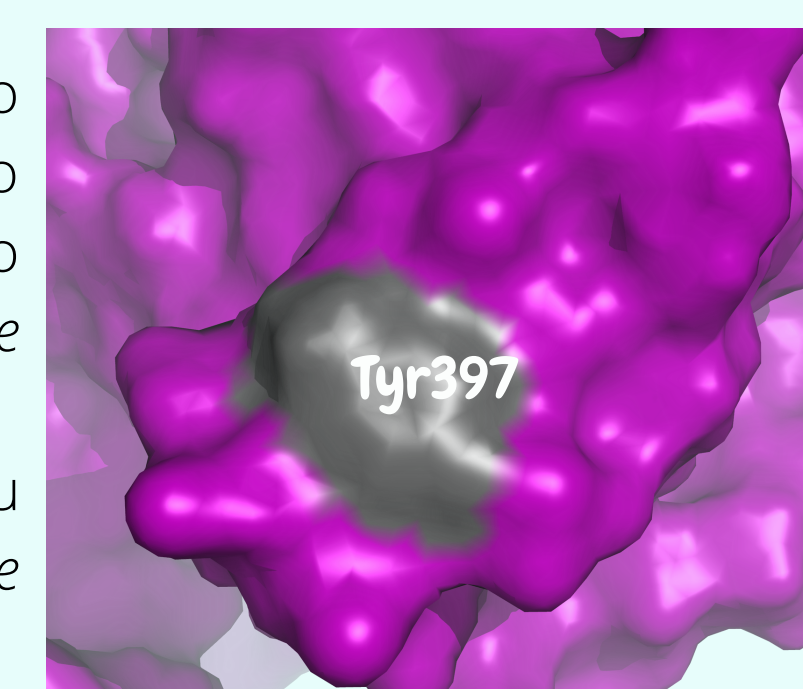


Figura 4. Tyr397 bloqueando la accesibilidad al bolsillo.

Metodología

La estructura de FERM empleada para los estudios corresponde a la especie *G. gallus* (PDB ID **2al6**).

El modelado del loop (KLANNKQGRSHTVSVSET) se realizó con los servidores RCD+ Fast loop modeling server y Moodloop (Modeller). El modelo resultante fue descripto con el campo de fuerza AMBER14SB y sometido a una simulación de dinámica molecular (DM) por 75ns.

La trayectoria de DM fue agrupada en clusters utilizando como criterio de similitud el RMSD, y la estructura promedio de cada cluster fue seleccionada para análisis posteriores.

Estudio conformacional de FERM

1) Modelado de loops y Dinámica molecular

20 aminoácidos no resueltos en la región enlazadora (ver Fig. 2) debieron ser modelados como paso previo a la simulación de dinámica molecular, debido a su cercanía al bolsillo estudiado (ver Fig. 3A). Durante la simulación no se observaron marcados cambios geométricos o de volumen en otras cavidades a excepción del bolsillo en torno a Tyr397, el cual fluctuó entre las conformaciones "abierta" y "cerrada" (ver Fig. 5).

2) Clusterizado de conformaciones

El clusterizado de la trayectoria de DM a nivel del bolsillo (ver Fig. 3A) permitió vigilar los cambios conformacionales en Tyr397 que pudieran afectar su capacidad de unir ligandos. En los clusters obtenidos fueron observadas ambas conformaciones reportadas (ver Fig. 5), y el volumen de la cavidad fue reducido en el cluster bloqueado, aún así durante el gran parte del tiempo de simulación la conformación "con el sitio Tyr397 libre" fue mayoritaria.

Estudios de accesibilidad farmacológica

La *drugabilidad* de FERM fue evaluada por dinámica molecular en mezclas acuosas de pequeñas moléculas orgánicas (sondas). La predicción de *hot-spots* con este método se basa en el cálculo de la densidad de sondas por región en presencia y ausencia de proteína, y la estimación de una energía libre de unión en cada uno. Dentro de los mejores 5 sitios detectados luego de una DM de 40ns se encuentra la cavidad entre F1, F2, F3, pero no el sitio Tyr397 (ver Fig. 3A). Se utilizó una metodología diferente para complementar estos resultados: DogSiteScorer se basa en el cálculo de tres descriptores que describen volumen, hidrofobicidad, y 'enclosure' y permitió identificar entre 14-18 cavidades. Los sitios de mejor *score* se muestran en la figura 6A, el sitio P5 que solo se identificó en una estructura y con un *score* desfavorable también fue incluido.

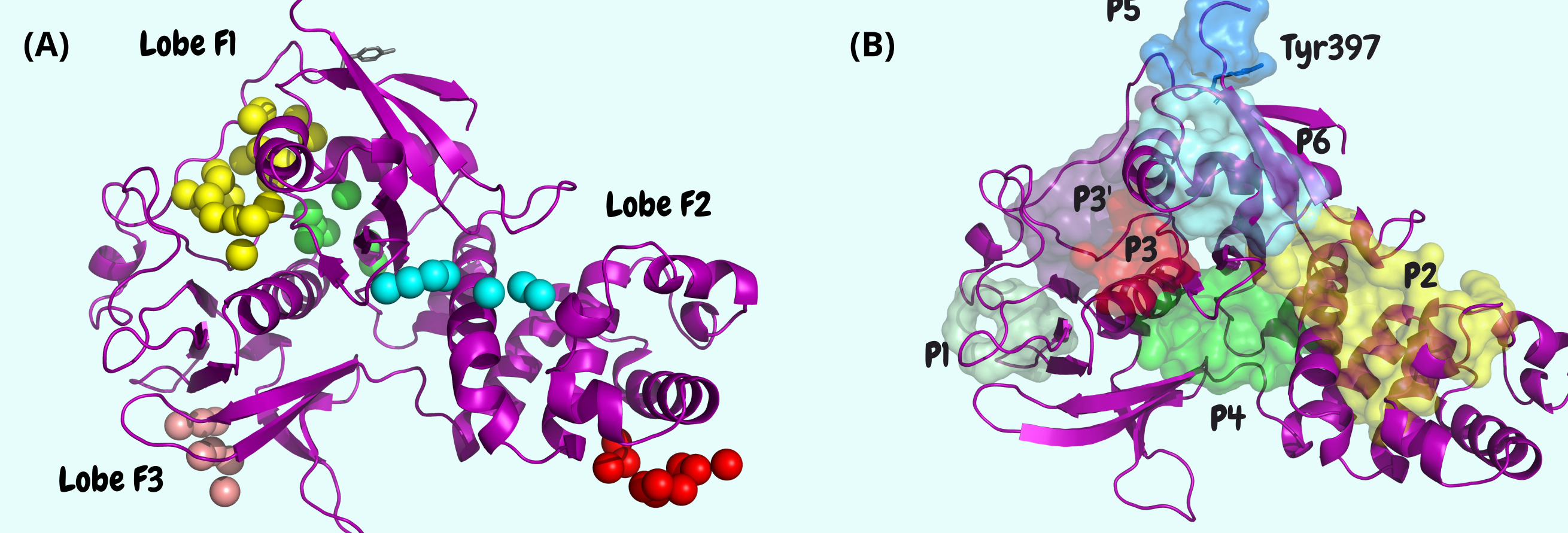


Figura 6. (A) Sitios farmacológicamente accesibles en FERM determinados por dinámica molecular. (B) Sitios identificados con DogSiteScore.

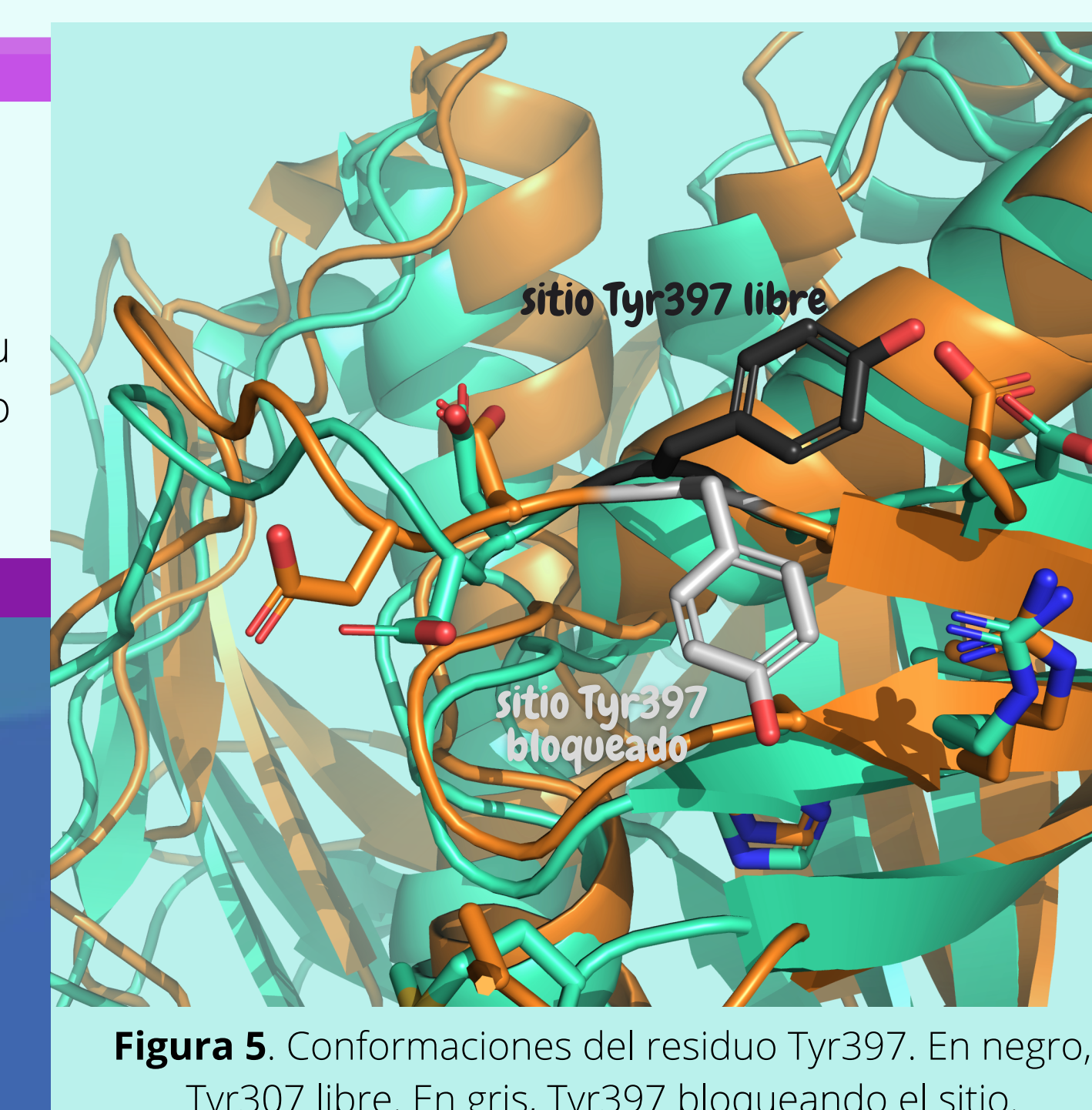
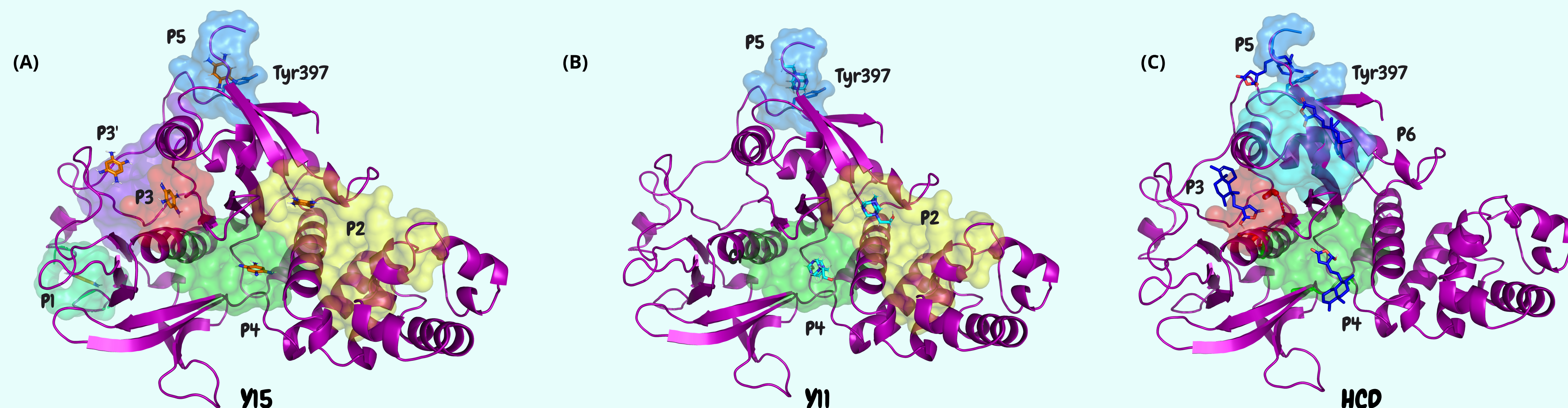


Figura 5. Conformaciones del residuo Tyr397. En negro, Tyr397 libre. En gris, Tyr397 bloqueando el sitio.

Posibles modos de unión de los inhibidores en FERM

Con el objetivo de evaluar el sitio de unión más probable para los compuestos Y11, Y15 y HCD se llevaron a cabo estudios de acoplamiento y dinámica molecular de 15ns.



En base a las simulaciones de DM y las entalpías de unión calculadas, se observa que Y15 no exhibe una clara diferencia de interacción entre P3 y P4 (ver tabla 2). Por otro lado, bajo ninguna condición de DM el compuesto se mantuvo de forma estable en P5, lo que se contraponen a la suposición de que podría interactuar allí.

Las entalpías de unión (tabla 2) indican que Y11 exhibe una mejor tendencia a unión al el bolsillo P4 que a cualquier otra región, incluyendo Tyr397. Estos resultados se contraponen a lo propuesto en literatura para este inhibidor.

En base a las entalpías de unión (tabla 2), HCD exhibe una mejor tendencia de unión en el bolsillo P4 que en otras regiones en FERM. Estos resultados están de acuerdo con lo planteado en el trabajo base.

Metodología
Los sistemas moleculares para las simulaciones de *drugabilidad* en presencia de sondas fueron preparados y analizados con el plugin para VMD DRUGUI implementado en PRODY (<http://prody.csb.pitt.edu/drugui/>). La proteína y las sondas (isopropanol acetamida, acetato, isobutano e isopropilamina) fueron modelados con el campo de fuerza CHARMM y la mezcla fue preparada en una relación 10:1 (agua/sondas). Para los cálculos de *drugabilidad* con DogSiteScore se utilizó el servidor Proteins+ (<https://proteins.plus>) aplicado sobre 5 conformaciones de FERM obtenidas del clusterizado.

	Y15	Y11	HCD
P1	-12.7 (2,2)	--	--
P2	inestable	-21.4 (5,2)	--
P3	-16.3 (2,6)	--	-24.1 (2,6)
P3'	inestable	--	--
P4	-16.7 (3,6)	-31.0 (2,8)	-29.7 (2,9)
P5	inestable	-14.09 (2,8)	-26.1 (2,6)
P6	--	--	Inestable

Tabla1. Entalpías de unión entre los ligandos y FERM, estimadas con MM-GBSA (despreciando la contribución entrópica). En los sitios señalados como inestables el cálculo no se pudo realizar

Metodología

Los estudios de acoplamiento fueron realizados utilizando los programas Autodock Vina, SMINA (Vinardo), FRED, Autodock4 y FLARE, y como parte del pre-procesamiento los ligandos fueron optimizados con el método semiempírico PM6 (implementado en MOPAC). Las DMs fueron realizadas con NAMD2. El receptor fue descripto con el campo de fuerza AMBER14SB, y los ligandos con GAFF. La energía libre de unión ligando-FERM (ΔG) fue estimada con el método de mecánica molecular MM-GBSA (con y sin entropía incluida en el cálculo).

Conclusiones

Creemos que este análisis puede ayudar a generar conocimiento acerca de FERM como diana terapéutica en la inhibición farmacológica de FAK. No pudimos corroborar que el sitio Tyr397 fuese *drugable*, y en contraposición con lo propuesto en literatura, los inhibidores Y11 e Y15 parecen no interactuar bien en el sitio, el cual exhibe alta plasticidad conformacional. A su vez, ambos podrían interactuar más favorablemente en otras regiones de FERM, incluyendo a P4, otro sitio propuesto para el cual si pudimos corroborar la interacción con HCD. El análisis de trayectorias y clusterizado permitió observar que las conformaciones reportadas en literatura a nivel de Tyr397 se interconvierten entre sí, y que la flexibilidad del residuo tiene un gran efecto sobre el volumen expuesto de la cavidad. El abordaje de este dominio como diana terapéutica presenta mucha incertidumbre, y el escaso conocimiento experimental sobre los modos de unión de sus potenciales inhibidores dificulta un abordaje computacional sólido, para la búsqueda de nuevas drogas antitumorales.