



Universidad
de Alcalá

**TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA**

**Análisis y presentación de la estructura
y función de una proteína.**

Estudio de la estructura y función de K-RAS.

Autor: Carlos Vázquez García

Tutor: Ángel Herráez Sánchez

Curso Académico: 2015/2016

AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

D. Angel Herráez Sánchez

profesor del Departamento de Biología de Sistemas

como tutor del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de D. **Carlos Vázquez García**

Titulado


Análisis y presentación de la estructura y función de una proteína. Estudio de la estructura y función de K-RAS.

INFORMA que ha sido realizado y redactado por el alumno Carlos Vázquez García bajo mi dirección, alcanzando los objetivos de aprendizaje y las competencias transversales previstas en la guía docente de la asignatura (artículo 10 de la normativa).

Con esta fecha considero APTO el mencionado trabajo, y autorizo a su presentación y defensa pública.

Alcalá de Henares, 6 de junio de 2016

Fdo.: Angel Herráez



Este trabajo cuenta con materiales adicionales que facilitarán la comprensión del mismo durante la lectura de esta memoria. Todas las figuras están disponibles en alta resolución en la versión web. Dichos contenidos pueden ser encontrados en:

Proteopedia

Versión en línea del trabajo con modelos tridimensionales incluidos.

Enlace web: <http://goo.gl/TYXNWI>

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN DEL TRABAJO	9
2. PALABRAS CLAVE	10
3. INTRODUCCIÓN	11
4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	11
5. METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	12
5.1. Metodología	12
5.2. Materiales	12
6. DESARROLLO, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6.1. Estudio de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de K-RAS ...	14
6.1.1. Análisis de la estructura primaria.....	14
6.1.2. Análisis de la estructura secundaria	16
6.1.3. Análisis de la estructura terciaria	17
6.2. Función y mecanismo de K-RAS. Ligandos y sitios de unión.	18
6.2.1. Mecanismo de activación e inactivación de K-RAS	18
6.2.2. Bolsillo de la proteína.....	19
6.2.3. Guanosín 5'-trifosfato (GTP).....	20
6.2.4. Guanosín 5'-difosfato (GDP).....	21
6.2.5. Cation magnesio 2+	22
6.2.6. Nuevos ligandos	23
6.2.6.1. 4-bromobenzotiol	23
6.2.6.2. Benzimidina	24
6.2.6.3. N-{1-[N-(2,4-diclorofenil)glicil]piperidin-4-il}etinilsulfonamida.....	25
6.3. Mutaciones en K-RAS.....	25
6.3.1. Leucemia	26
6.3.2. Cáncer de pulmón.....	26
6.3.3. Cáncer gástrico.....	27
7. CONCLUSIONES.....	28
8. ANEXO.....	29
9. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Variación de la secuencia de K-RAS 2B con respecto a K-RAS 2A...	15
Tabla 2. Estructuras secundarias, posiciones y longitud en K-RAS 2A	16
Tabla 3. Principales residuos que conforman el bolsillo principal de K-RAS....	20
Tabla 4. Sustituciones de aminoácidos que pueden generar cáncer gástrico.	27
Tabla 5. Abreviaturas de los 20 aminoácidos más comunes.....	29

Figura 1. Reacción de condensación para generar un enlace peptídico	14
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de K-RAS 2A.	15
Figura 3. Cascada de señales por la ruta MAP quinasas.....	18
Figura 4. Interacciones del GNP con el bolsillo de K-RAS	20
Figura 5. Esquema de interacciones del GDP con el bolsillo de K-RAS.	22
Figura 6. Interacciones del GDP con el bolsillo de K-RAS	22
Figura 7. Interacciones del Mg ²⁺ con el bolsillo de K-RAS	22
Figura 8. Interacciones del 4-bromobenzotiol en un nuevo bolsillo de K-RAS .	23
Figura 9. Interacciones de la benzimidina en un nuevo bolsillo de K-RAS	24
Figura 10. Interacciones de N-{1-[N-(2,4-diclorofenil)glicil]piperidin-4-il}etinilsulfonamida en un nuevo bolsillo de K-RAS	25

1. RESUMEN DEL TRABAJO

RESUMEN

El estudio estructural y molecular representa una de las líneas de vanguardia en los avances de la medicina actual. Este trabajo de fin de grado pretende integrar los conocimientos adquiridos durante los estudios de Grado en Farmacia, al mismo tiempo que desea ser de ayuda para aquellos que se interesen por la temática tratada. Teniendo en cuenta la relevancia actual del cáncer en nuestra sociedad, se aborda el análisis de K-RAS, una de las proteínas con amplia implicación en las enfermedades neoplásicas. Para poder comprender su funcionamiento y alteraciones es necesario estudiar de manera ordenada y sistemática su naturaleza, estructura y función. Este acercamiento, desde un punto de vista académico, puede ayudar a comprender tanto al estudiante de ciencias como a aquellos más veteranos, la biología de esta proteína. Se analizarán de un modo integrativo las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la proteína, al mismo tiempo que se estudiarán los ligandos y sitios de unión a la misma. Por otro lado, se realizará una breve aproximación a las mutaciones y su implicación en procesos oncológicos. De forma similar se abordarán las dianas terapéuticas que se barajan en la actualidad, y se intentarán correlacionar desde un punto de vista académico con los datos de la estructura.

ABSTRACT

The structural and molecular study represents one of the front lines in medical advances of our modern medicine. This study aims to integrate the knowledge acquired during the Degree in Pharmacy. At the same time it aims to be helpful for those who are interested in the subject of cancer. Due to the current relevance of cancer in our society, analysis of K-RAS, one of the proteins with broad involvement in neoplastic diseases is discussed. To understand how this protein works, it is necessary to study this macromolecule in a systematic way. This study will be written from an academic point of view, and it may help students to understand better this protein. The primary, secondary and tertiary structures of K-RAS will be analyzed in an integrative way. The most frequent ligands and mutations will be also included in this study, and they will be linked with the structure changes. The new targets in this molecule will be also mentioned from an academic point of view, in correlation with the protein structure.

2. PALABRAS CLAVE

Palabras clave: K-RAS, estructura, función, ligandos, mutaciones

Keywords: K-RAS, structure, function, ligands, mutations

3. INTRODUCCIÓN

Las proteínas RAS son una familia de enzimas con actividad GTPasa [1], es decir, que son catalizadores de una reacción de hidrólisis donde el sustrato (GTP) es atacado por una molécula de agua. Esto produce la escisión del grupo fosfato terminal liberando dicho grupo y generando GDP. Estas proteínas tienen una importancia notoria en los procesos oncológicos, pues su función está estrechamente ligada al control de la proliferación celular [1]. Este control se establece mediante las rutas de señalización en cascada que surgen de los receptores situados en la superficie celular [1]. Hoy en día estas macromoléculas son dianas muy relevantes en la investigación contra el cáncer a pesar de su descubrimiento en 1960 [2]. La superfamilia de enzimas RAS consta de las subfamilias K-RAS, N-RAS y H-RAS [2].

Como el título del trabajo expone, el estudio se fundamentará en el análisis de K-RAS. Este enzima consta de dos isoformas denominadas 2A y 2B. De ambas dos se seleccionará para este trabajo la isoforma 2A por tener el reconocimiento de secuencia canónica [3]. Esto quiere decir que el orden o secuencia de los aminoácidos que la componen es la más frecuente y utilizada.

4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos del presente estudio son:

1. Conocer las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la proteína K-RAS.
2. Analizar y describir los lugares de unión y ligandos. Se realizará con un abordaje a nivel de interacciones moleculares complementándose con vistas tridimensionales (versión web).
3. Conocer algunas mutaciones más frecuentes de la proteína y su relación con la aparición de enfermedad.
4. Razonar la variación en la funcionalidad de la proteína como consecuencia de las mutaciones y cambios en su estructura.

5. METODOLOGÍA Y MATERIALES

5.1. Metodología

El desarrollo de este trabajo se fundamenta en el uso de las tecnologías de la información con tres fines:

1. Consulta de bibliografía relevante, científica y actual.
2. Obtención de imágenes bidimensionales de apoyo para la comprensión estructural de la proteína.
3. Preparación de modelos moleculares tridimensionales para facilitar la conceptualización espacial.

Las bases de datos que fueron consultadas a tal efecto fueron:

- Pubmed [Portal en línea]: Biblioteca Internacional de los Institutos Nacionales de Salud en Estados Unidos.
- RCSB [Portal en línea]: Biblioteca de estructuras moleculares. Empleada al mismo tiempo como nicho de enlaces sobre información acerca de la proteína.
- UniProt [Portal en línea]: Biblioteca con información sobre función y secuencia de proteínas.

Puntualmente se hará uso de bibliografía procedente de presentaciones utilizadas durante la exposición en congresos de oncología [7].

5.2. Materiales

Los materiales para el desarrollo del trabajo han consistido fundamentalmente en software de visualización de estructuras tridimensionales en formato PDB. A continuación, se citan sus nombres y respectivas versiones:

- Jmol Versión 13.0
- UCSF Chimera Versión 1.10.2 64-bit
- JSmol Versión 14.4.1 2016 (Visualizador para navegador)
- Google Chrome Versión 49.0.2623.87
- Proteopedia: portal en línea de carácter público que permite la publicación de contenidos relacionados con proteínas y otras moléculas. El presente trabajo cuenta con una versión en línea publicada en esta plataforma,

permitiendo una fácil visualización de los modelos tridimensionales a los que se hará mención posteriormente.

Para la representación de las estructuras, análisis y comprensión tridimensional se han empleado fundamentalmente los dos primeros programas. Cabría destacar su utilidad para descubrir las diferentes interacciones que se establecen entre ligandos y residuos: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, etc. Por otra parte, para la virtualización de los contenidos se emplea la plataforma Proteopedia (<http://www.proteopedia.org>), y que contiene una versión complementaria al informe impreso.

6. DESARROLLO, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudio de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de K-RAS

6.1.1. Análisis de la estructura primaria

La estructura primaria de una proteína está conformada por una secuencia de residuos de aminoácidos unidos de forma covalente. Estos residuos son la unidad estructural más básica de la proteína, y se conectan entre sí por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro, generando por tanto un enlace covalente denominado enlace peptídico. Además, la reacción de condensación libera una molécula de agua por cada enlace formado.

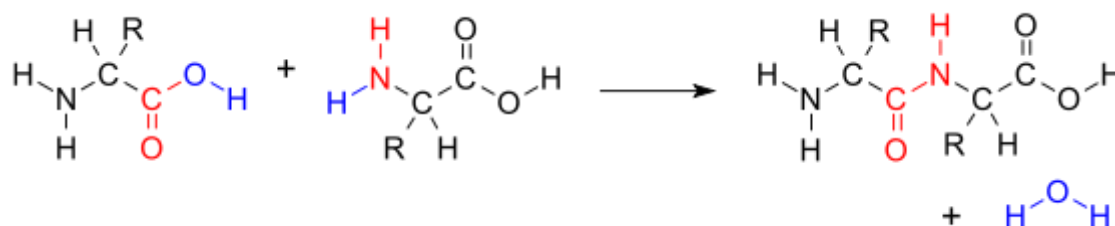


Figura 1. Reacción de condensación entre dos aminoácidos para generar un enlace peptídico [9].

El análisis de la estructura primaria provee una base conceptual para poder empezar a trabajar con la proteína. Esta secuencia de residuos es la responsable de las estructuras secundaria y terciaria.

En el apartado 6.2 de este trabajo, donde se estudian los ligandos de la proteína, se tendrá muy en cuenta la secuencia de aminoácidos y la naturaleza de los mismos.

La proteína K-RAS en su forma canónica (2A) está formada por 189 aminoácidos con la siguiente secuencia:

```

      10      20      30      40      50
MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVWIDGET
      60      70      80      90     100
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI
      110     120     130     140     150
KRVKDESDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ
      160     170     180
RVEDAFYTLV REIRQYRLKK ISKEEKTPGC VKIKKCIIM

```

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de K-RAS 2A [10].

De forma adicional a esta secuencia existen muchas otras que responden a polimorfismos, generando isoformas como la mencionada K-RAS 2B. También existen otras secuencias producidas por mutaciones, que tendrán un apartado específico en este trabajo. Centrando esta introducción en los polimorfismos, hay que aclarar que éstos son variaciones silenciosas en la secuencia de aminoácidos que mantienen la funcionalidad de la proteína, por lo que no deben suponer a priori un problema en la salud de un organismo vivo. Aplicando este concepto a este estudio, la isoforma K-RAS 2B no presenta una variación en su función a pesar de los cambios en su secuencia. Para ver en detalle esta particularidad se adjuntan las variaciones de la isoforma 2B con respecto a la 2A.

Sustituciones de aminoácidos de K-RAS 2A que dan lugar a K-RAS 2B	
Posiciones 151-153	RVE → GVD
Posiciones 165-189	QYRLKKISKEEKTPGCVKIKKCIIM → KHKEKMSKDGKKKKKKSKTKCVIM

Tabla 1. Variación de la secuencia de K-RAS 2B con respecto a K-RAS 2A [11].

Las posiciones involucradas en este polimorfismo parten desde el aminoácido número 151. Como se verá posteriormente, los bolsillos de unión a la proteína cuentan con la participación de los aminoácidos situados en posiciones muy inferiores dentro de la secuencia. Este hecho se traduce en la conservación del entorno que permite la correcta interacción entre bolsillo y ligando, y por tanto, una preservación de la función original.

6.1.2. Análisis de la estructura secundaria

El plegamiento local entre residuos de aminoácidos es lo que se conoce bajo el nombre de estructura secundaria de una proteína. Existen diferentes tipos de estructuras secundarias, a saber: hélices alfa, hojas plegadas beta y giros beta. Estas conformaciones locales están íntimamente relacionadas con la estructura primaria, pues son los puentes de hidrógeno, entre residuos próximos, las principales fuerzas que dirigen estos plegamientos. En la siguiente tabla se adjunta la distribución de las distintas conformaciones locales o estructuras secundarias que posee K-RAS.

Tipo de estructura	Posiciones	Longitud	Vista gráfica
Lámina Beta	3 – 9	7	
Hélice Alfa	16 – 25	10	
Lámina Beta	38 – 46	9	
Lámina Beta	49 – 57	9	
Hélice Alfa	60 – 62	3	
Hélice Alfa	65 – 74	10	
Lámina Beta	76 – 83	8	
Hélice Alfa	87 – 91	5	
Hélice Alfa	93 – 104	12	
Lámina Beta	111 – 116	6	
Lámina Beta	120 – 122	3	
Hélice Alfa	127 – 137	11	
Lámina Beta	141 – 143	3	
Giro Beta	146 – 148	3	
Hélice Alfa	152 – 164	13	

Tabla 2. Estructuras secundarias, posiciones y longitud de las mismas en K-RAS 2A [11].

De acuerdo a los datos expuestos en la tabla 2, la presencia de hélices alfa abarca un 33,86% del total de la estructura, mientras que las láminas beta aportan un 23,80%. El tener en cuenta estos porcentajes servirá a continuación para clasificar a la proteína como globular o fibrosa.

6.1.3. Análisis de la estructura terciaria

La estructura terciaria de una proteína es el plegamiento que tiene en su totalidad la cadena polipeptídica, o lo que es lo mismo, la distribución espacial global que adoptan los residuos que la conforman. Durante la síntesis de la mayor parte de las proteínas se produce un proceso de plegamiento. Este fenómeno va generando dominios, regiones autónomas de la proteína que se pliegan de forma independiente, es decir, sin importar las otras regiones.

Por lo tanto, la estructura terciaria surge a medida que los dominios son sintetizados y se van plegando. De esta manera queda patente la relación entre aminoácidos y estructura terciaria. Este nivel estructural es el más relevante de la proteína, pues determina, al fin y al cabo, su función biológica.

Este estudio pretende ser integrativo, y por ello, en este apartado es conveniente remarcar qué tipo de proteína es K-RAS en lo relativo a su estructura terciaria. Las proteínas pueden clasificarse en función de su estructura terciaria en fibrosas y globulares. Como se puede apreciar en los porcentajes mencionados en el apartado 6.1.2 existe un predominio de hélices alfa sobre láminas beta. Esto dota a la proteína de cierta esfericidad haciendo que sea clasificada como una proteína globular.

La estructura terciaria de una proteína se puede ver estabilizada por las interacciones que se establecen entre las cadenas laterales de los residuos. A continuación, se analizarán las interacciones que permiten mantener la estructura terciaria de forma estable, y que como se comentó anteriormente, están estrechamente vinculadas con la estructura primaria; la naturaleza de los aminoácidos, su estructura química, conferirán la disponibilidad de puentes de hidrógeno.

Como se puede apreciar en el modelo del apartado 6.1.3. (disponible en la web) existe una gran cantidad de puentes de hidrógeno (a pesar de que el modelo solo muestra los puentes entre los átomos del esqueleto). Esto favorece que la estructura terciaria sea estable. No debe confundirse la estabilidad con la rigidez, pues las proteínas son macromoléculas dotadas de flexibilidad, una flexibilidad que permite su cambio de conformación y, con éste, su función biológica.

6.2. Función y mecanismo de K-RAS. Ligandos y sitios de unión.

Este apartado cobra especial relevancia al entender que los ligandos y los sitios de unión son aspectos estrechamente relacionados con la función de una proteína. Un ligando es aquella molécula susceptible de unirse a una proteína. Pero la unión no se realiza en cualquier parte, sino en una región específica que se denomina bolsillo. Es en este lugar donde se dan determinadas circunstancias que permiten el acomodamiento del ligando. Generalmente las interacciones suelen ser electrostáticas e hidrofóbicas, y van acompañadas de una correcta disposición espacial en la proteína que genera cavidades apropiadas para el ligando. Una idea a reseñar sobre este concepto es que dependiendo del ligando la proteína se plegará y actuará de un modo u otro. Antes de comenzar a hablar en detalle sobre los ligandos y el bolsillo, hay que recordar que un enzima puede tener algún otro sitio donde ciertas moléculas puedan unirse para modular la función de la proteína. Este tipo de regulación recibe el nombre de regulación alostérica, y se verá reflejado fundamentalmente en el apartado 6.2.6. Nuevos ligandos.

6.2.1. Mecanismo de activación e inactivación de K-RAS

En la introducción de este trabajo se comentó la intensa participación de esta proteína en la regulación de la proliferación celular. De forma intuitiva y asequible se podría decir que K-RAS actúa como un interruptor en la cascada de señalización celular. Para ello se sirve de dos ligandos: GTP (Guanosín 5'-trifosfato) y GDP (Guanosín 5'-difosfato). Cuando el GDP está unido en el bolsillo o sitio de unión la proteína se encuentra en una conformación inactiva.

El GDP puede ser reemplazado por GTP mediante una ruta de señalización mediada

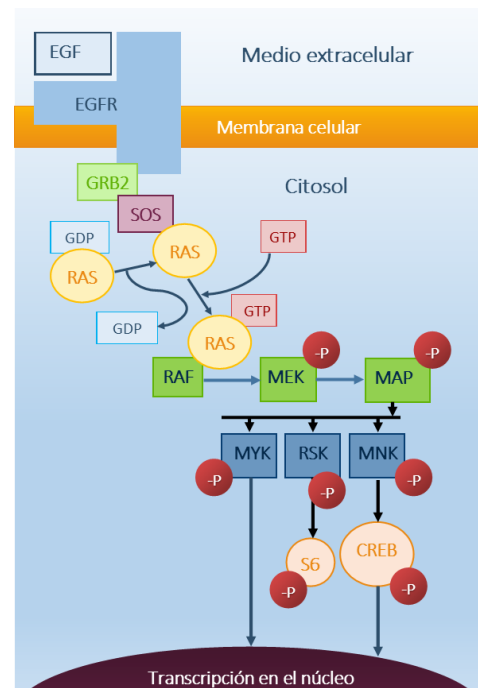


Figura 3. Cascada de señales por la ruta MAP quinasa que parte del receptor de crecimiento epidérmico.

por proteínas SOS, provocando un cambio de conformación hacia la forma activa. Tras este fenómeno la proteína transmite una cascada de señales vía MAP quinasas que desemboca en el núcleo y promueve la transcripción de genes específicos.

La desactivación o vuelta a la conformación inicial tiene un mecanismo basado en una reacción de hidrólisis, en la que el sustrato (GTP) situado dentro del centro catalítico o bolsillo del enzima, y con la ayuda del catión Mg^{2+} , es transformado en GDP. El proceso tiene su origen con el ataque del par electrónico del oxígeno del agua sobre el grupo fosfato terminal, concretamente sobre el fósforo que actúa como centro nucleófilo. Como consecuencia de este ataque se produce la escisión del grupo fosfato terminal, a través del enlace P-O-P.

En la figura 3 se puede observar la compleja cascada de señales en la que interviene K-RAS. La función de esta proteína toma parte prácticamente en los inicios de la cascada. Este hecho tiene importancia al entender que, si las mutaciones se hacen presentes también en las proteínas situadas cascada abajo, la regulación de la proliferación celular estará afectada en más eslabones de la cadena. Por lo tanto, se deduce y así ocurre en la realidad, que, aunque se pueda actuar sobre K-RAS la cascada de señalización seguirá afectada más abajo.

Una vez comentado brevemente el mecanismo se estudiarán los ligandos susceptibles de unirse a la proteína.

6.2.2. Bolsillo de la proteína

Como se mencionó líneas arriba el bolsillo es el lugar de unión con los ligandos. En el caso de esta proteína existe un bolsillo relevante al que se denominará principal, pues será el que incorpore en su interior a GTP y GDP [4]. Sin embargo, estudios actuales están encontrando "bolsillos accesorios" en la proteína, y que son descritos gracias a la cristalización de esta proteína con moléculas experimentales [5].

Antes de comenzar a describir la estructura del bolsillo hay que mencionar que el número de residuos que intervienen y sus disposiciones espaciales varían

En la figura 4 se puede observar cómo GNP presenta numerosas interacciones con los aminoácidos de la proteína, lo cual dota de complejidad a la interacción ligando-bolsillo.

La existencia de enlaces sencillos entre los átomos que forman la estructura del GTP permiten que la molécula pueda tener cierta libertad de rotación. Por este motivo el GTP tiene cierta flexibilidad y puede acomodarse fácilmente en el bolsillo. Los enlaces fosfodiéster pueden ejemplificar esta afirmación, pues se puede observar cómo las uniones entre fósforo (P) y oxígeno (O) permiten esa rotación característica de un enlace sencillo.

Al permitir esta libertad geométrica, los átomos de oxígeno, mediante su nube electrónica, pueden establecer interacciones con otros átomos como el cofactor de la proteína, el catión Mg^{2+} .

Sabiendo que la molécula de GTP favorece el cambio de conformación de la proteína hacia su forma activa, y teniendo en cuenta la figura anterior, se puede abordar de forma más cómoda el siguiente ligando, que es el responsable de su conformación inactiva, el GDP.

6.2.4. Guanosín 5'-difosfato (GDP)

La estructura de este nucleótido es semejante a la del GTP. La diferencia más notoria que se hace patente con respecto a la figura anterior es la carencia de uno de los tres grupos fosfato.

Las interacciones entre las cadenas laterales de los residuos de la proteína y los dos grupos fosfato son menores en comparación con el ligando anterior.

Por otro lado, se puede observar cómo el número, ángulo y disposición espacial de los residuos ha cambiado. Del mismo modo, se puede apreciar cómo el resto de la estructura del nucleótido establece diferentes interacciones. Esto tiene una repercusión cuanto menos a nivel local de la estructura terciaria.

En las siguientes figuras se pueden apreciar de mejor manera las interacciones entre el GDP y los residuos que forman el bolsillo.

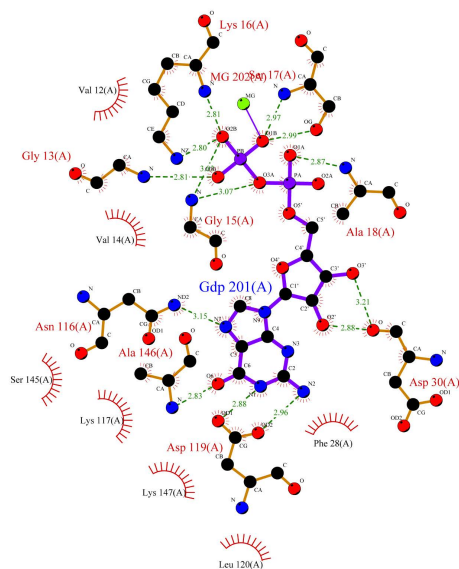


Figura 5. Interacciones del GDP con el bolsillo de K-RAS [13].

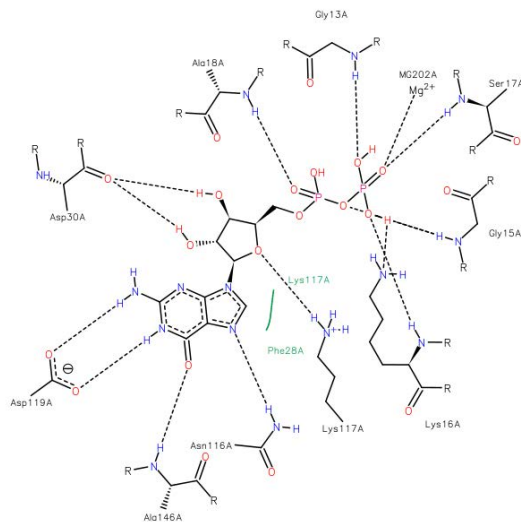


Figura 6. Esquema de interacciones del GDP con el bolsillo de K-RAS [14]. Líneas discontinuas negras: puentes de hidrógeno e interacciones con el catión magnesio. Líneas verdes: interacciones hidrofóbicas.

El hecho de haber focalizado la atención, líneas más arriba, sobre los enlaces fosfodiéster tiene una justificación didáctica, pues el resto de la molécula es similar y es más difícil apreciar los cambios. Con estas variaciones llamativas es posible ejemplificar lo mencionado desde el comienzo del trabajo: el resultado tridimensional de una estructura tiene su base a nivel atómico.

6.2.5. Cation magnesio 2+

Antes de comentar este subapartado cabe destacar que el magnesio 2+ no es un ligando estrictamente, sino un cofactor. Los cofactores suelen ser iones metálicos como el Fe, Mg, Mn, Zn o Co [6]. Estos componentes favorecen el correcto alineamiento del enzima y el sustrato, y tal afirmación se puede observar a continuación.

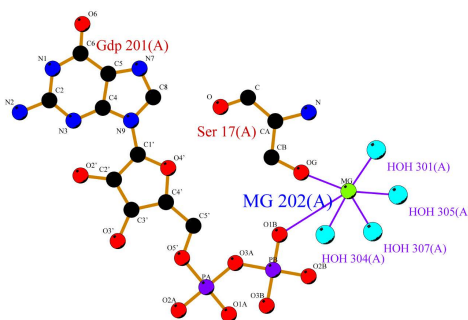


Figura 7. Interacciones del Mg^{2+} con el bolsillo de K-RAS [15].

Considerando la carga del catión Mg^{2+} es esperable que las interacciones electrostáticas que establezca sean con estructuras cuya carga sea de signo opuesto. En la figura 7 se puede ver con quién se establecen dichas interacciones.

Por una parte, se puede ver cómo existe una interacción con un oxígeno del grupo fosfato terminal, así como con el oxígeno del grupo OH de la serina. Teniendo en cuenta el detalle de que Mg^{2+} está interaccionando con la proteína a través de la serina 17 y también con el GDP, lo más lógico es pensar que está favoreciendo la correcta alineación, lo cual estaría en consonancia con la definición anterior de cofactor.

En la misma figura también se puede ver cómo Mg^{2+} establece interacciones con moléculas de agua, y al igual que en el caso anterior, es la nube electrónica de oxígeno la que está participando.

6.2.6. Nuevos ligandos

El estudio de la proteína K-RAS está en constante desarrollo. Por ello en este trabajo se incluirán algunos ejemplos de nuevos ligandos descubiertos.

6.2.6.1. 4-bromobenzotiol

En este caso el ligando es una molécula con un marcado carácter apolar, pues el anillo de benceno sin sustituyentes presenta un momento dipolar de 0 Debyes. Por lo tanto, es lógico pensar que el ambiente en el que se puede situar de forma estable la molécula es un ambiente hidrofóbico, proporcionado parcialmente en este caso por leucina 56.

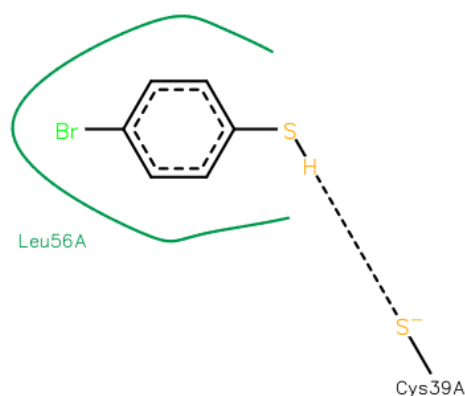


Figura 8. Interacciones del 4-bromobenzotiol en un nuevo bolsillo de K-RAS [16].

Así mismo, se puede apreciar cómo el grupo tiol (SH) establece interacciones con el azufre de cisteína, favoreciendo el acomodamiento. Este lugar de unión puede ser perfectamente un centro alostérico de la proteína [16].

6.2.6.2. Benzimidina

Otro ligando no habitual es la benzimidina. Este ligando fue usado en un estudio relativamente reciente [5]. En dicho estudio los autores explican cómo esta molécula es capaz de unirse a un bolsillo de la proteína distinto al habitual, ocasionando la inhibición de la actividad de intercambio GTP/GDP vía proteínas SOS.

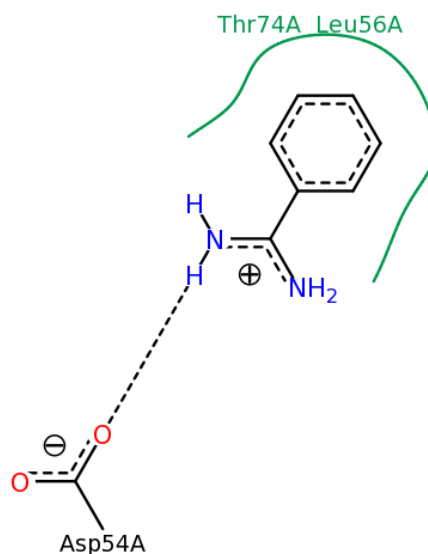


Figura 9. Interacciones de la benzimidina en un nuevo bolsillo de K-RAS [17].

En palabras sencillas, esta molécula provoca un cambio conformacional que inactiva a la proteína, y esto impide que tenga lugar la proliferación celular; es por tanto una posible nueva estrategia en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Si acudimos a la tabla 3 donde se especifican los principales aminoácidos que forman el bolsillo se observa cómo efectivamente treonina 74 y leucina 56 no aparecen, por tanto, esto podría ser otro centro alostérico. Como en el caso anterior, se puede observar la importancia del ambiente hidrofóbico para el anillo de benceno proporcionado por estos dos aminoácidos.

Llama la atención el puente de hidrógeno establecido entre el grupo carboxilo (desprotonado a pH fisiológico) y el grupo amino. El donador del puente de hidrógeno sería el grupo amino, y el aceptor sería el grupo carboxilo desprotonado del aspártico.

6.2.6.3. N-{1-[N-(2,4-diclorofenil)glicil]piperidin-4-il}etinilsulfonamida

Este ligando es otra muestra de la relevancia de K-RAS en la clínica oncológica. Una de las vías más eficaces para inhabilitar o cambiar la conformación de una proteína es la unión a la misma de forma covalente. En la actualidad algunos fármacos consiguen este tipo de inactivación, como Omeprazol, que es capaz de formar puentes disulfuro entre el azufre de la bomba de protones (ATPasa H⁺/K⁺) y el azufre de la molécula medicamentosa. En este particular caso el ejemplo es parecido, pues observamos cómo el azufre de la cisteína establece una interacción muy fuerte con el carbono de la etanosulfonamida. Lo importante a reseñar sobre este ligando es que es selectivo, es decir, que solamente puede interactuar con la cisteína que aparece en la proteína mutada, ausente en la nativa o inalterada. Esto representa un resultado muy prometedor porque significaría la simbiosis entre alta eficacia y selectividad.

Del mismo modo que en ligandos anteriores, la presencia de anillos bencénicos se ve favorecida por un entorno hidrofóbico otorgado por los aminoácidos que se rodean de líneas rojas.

6.3. Mutaciones en K-RAS

Las mutaciones en K-RAS son una cuestión de excepcional relevancia en las enfermedades neoplásicas, pues pueden ser futuras dianas terapéuticas en el tratamiento oncológico. Por ello en este trabajo destinaremos este epígrafe final a hablar de las mismas.

Las mutaciones de una proteína son consecuencia de la alteración del material genético presente en el núcleo celular. Este hecho se produce de forma aleatoria innumerables veces en la vida de un organismo, permitiendo la evolución, pero

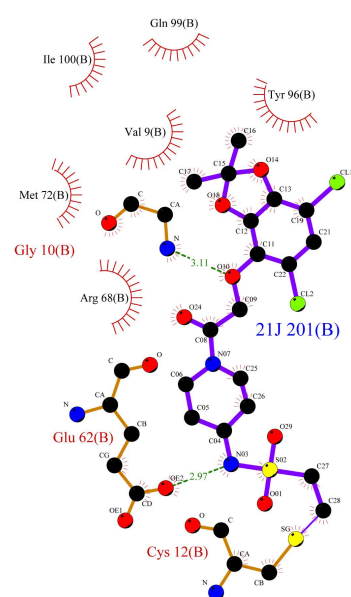


Figura 10. Interacciones de N-{1-[N-(2,4-diclorofenil)glicil]piperidin-4-il}etinilsulfonamida en un nuevo bolsillo de K-RAS [13].

al mismo tiempo la aparición de enfermedad. Por fortuna, en la especie humana existen numerosos procesos de control que ayudan a evitar y corregir las mutaciones. Sin embargo, cuando las mutaciones aparecen y no son corregidas en genes críticos como el que codifica esta proteína, existe una probabilidad elevada de que aparezca una de las enfermedades que azota con dureza a nuestra civilización, el cáncer. La proteína K-RAS está involucrada en procesos malignos como la leucemia, el cáncer gástrico, cáncer de páncreas y colon, entre otros. En la práctica clínica el diagnóstico del estado mutacional de K-RAS es vital para predecir una respuesta terapéutica frente a anticuerpos monoclonales como Cetuximab y Paninitumab, que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico o (EGFR en inglés) impidiendo la activación de K-RAS (en estado nativo) cascada abajo [8].

Sin embargo, cuando K-RAS se encuentra mutada en su conformación activa la cascada de señalizaciones está activada permanentemente provocando la división celular de forma incontrolada. Por ello, algunas investigaciones se focalizan en encontrar ligandos que sean capaces de unirse a la proteína mutada a modo de recuperar su conformación inactiva, abriendo de este modo una nueva línea de tratamiento en los pacientes oncológicos. Este mecanismo se encuentra esquematizado en la figura número 3 de este trabajo.

Comentadas las ideas anteriores que justifican la importancia del análisis estructural de las mutaciones, es momento de exponer algunas de ellas.

6.3.1. Leucemia

Una de las mutaciones más frecuentes es la que ocurre en la posición 10, producida por una inserción de guanina (G -> GG) [3]. Esta mutación provoca que la actividad GTPasa disminuya, es decir, que el GTP está más tiempo en el bolsillo de la proteína y por tanto favoreciendo la conformación activa [3]. En términos cinéticos esto se traduce en que la velocidad de disociación del GDP aumenta y la del GTP disminuye.

6.3.2. Cáncer de pulmón

La sustitución de glicina por serina o ácido aspártico en posición 12 es uno de los fenómenos que pueden dar lugar al comienzo de esta enfermedad [11]. La

posición 12 ocupada por glicina es partícipe del bolsillo de la proteína, con lo cual se puede predecir una alteración funcional. Esta mutación también puede darse en cáncer gástrico para el que dedicamos el siguiente subapartado.

6.3.3. Cáncer gástrico

Para esta enfermedad neoplásica se ponen de manifiesto más posibles mutaciones en comparación con los dos ejemplos anteriores:

Aminoácidos y posiciones implicadas en el cáncer gástrico	
Posición 5	sustitución de lisina por asparagina
Posición 12	sustitución de glicina por ácido aspártico, serina o valina
Posición 13	sustitución de glicina por ácido aspártico
Posición 59	sustitución de alanina por treonina

Tabla 4. Sustituciones de aminoácidos en el bolsillo susceptibles de generar cáncer gástrico [11].

Revisando la tabla 3, y verificando estas 4 mutaciones, los aminoácidos en posición 12, 13 y 59 son participantes del bolsillo principal. Esto vuelve a reforzar la idea de que la alteración estructural implica una alteración espacial y por lo tanto también funcional.

7. CONCLUSIONES

1. El estudio de la estructura de las proteínas es sin duda una de las principales herramientas para comprender sus funciones. Gracias a la secuenciación y a la cristalización de las mismas se puede realizar un análisis que permita correlacionar datos físicos, químicos y biológicos.
2. A lo largo de este trabajo se ha podido ilustrar de manera asequible que la función de una proteína está estrechamente ligada a su estructura. De aquí se deduce, que una alteración estructural puede conducir a una alteración de la función. Del mismo modo, un abordaje estructural puede conducir a la restauración de la función, siendo esta estrategia en K-RAS una vía prometedora en el tratamiento del cáncer.
3. Aunque el abordaje de este trabajo se realiza de manera sencilla, la conceptualización y razonamiento adquiridos durante el Grado en Farmacia se muestran útiles para acometer investigaciones prácticas como la aquí realizada.

8. ANEXO

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Tabla 5. Abreviaturas de los 20 aminoácidos más comunes [19].

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E. and Bar-Sagi D. (2011) Ras oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 11, 761-774.
- [2] Fernández-Medarde, Santos E., (2011). Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer*. 2, 344–358.
- [3] Uniprot.org, (2016). KRAS - GTPase KRas precursor - Homo sapiens (Human) - KRAS gene & protein. [En línea] Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01116> [Visitado 15 Mar. 2016].
- [4] Sun Q, Phan J, Friberg AR, Camper DV, Olejniczak ET, Fesik SW. Second-site screening of K-Ras in the presence of covalently attached first-site ligands [En línea] Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4Q03> [Visitado 15 Mar. 2016].
- [5] Maurer T., Garrenton L.S., Oh A., Pitts K., Anderson D.J., Skelton N.J., Fauber B.P., Pan B., Malek S., Stokoe D., Ludlam M.J., Bowman K.K., Wu J., Giannetti A.M., Starovasnik M.A., Mellman I., Jackson P.K., Rudolph J., Wang W., Fang G., (2012). Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 109:5299-5304.
- [6] Sancho López, P., (2010). Actividad enzimática. [ebook] Alcalá de Henares: Pilar Sáncho López, p.5. Disponible en: http://www3.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/temas/tema-7_catalisis-enzimatica.pdf [Visitado 16 Mar. 2016].
- [7] Bollag, G., Adler, F., elMasry, N., McCabe, P., Conner, E., Thompson, P., McCormick, F. and Shannon, K. (1996). Biochemical characterization of a novel KRAS insertion mutation from a human leukemia. *journal of biological chemistry*, 271, 32491-32494.
- [8] Fletcher. C., (2011). Panitumumab: The KRAS story. [En línea] Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2011/11/WC500118101.pdf [Visitado 16 Mar. 2016].
- [9] V8rik, 17 January 2009. Basic amino acid condensation. [Imagen] Disponible en: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AminoacidCondensation.svg> [Visitado 16 Mar. 2016].

- [10] UniProt, (n.d.). K-RAS 2A Sequence. [Imagen] Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01116> [Visitado 16 Mar. 2016].
- [11] Uniprot.org, (2016). KRAS - GTPase KRas precursor - Homo sapiens (Human) - KRAS gene & protein. [En línea] Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01116> [Visitado 16 Mar. 2016].
- [12] Tong Y, Tempel W, Shen L, Arrowsmith CH, Edwards AM, Sundstrom M, Weigelt J, Bochkarev A, Park H, Structural Genomics Consortium (SGC), (2009). Human K-Ras (Q61H) in complex with a GTP analogue. [Imagen] Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3gft/bound/GNP> [Visitado 16 Mar. 2016].
- [13] Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., Shokat, K.M., (2013). Crystal structure of small molecule vinylsulfonamide 7 covalently bound to K-Ras G12C. [Imagen] Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4m1o/bound/GDP> [Visitado 16 Mar. 2016]
- [14] Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., Shokat, K.M., (2013). Crystal structure of small molecule vinylsulfonamide 7 covalently bound to K-Ras G12C. [Imagen] Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=4M1O> [Visitado 16 Mar. 2016].
- [15] Sun, Q., Phan, J., Friberg, A., Camper, D.V., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W., (2014). Second-site screening of K-Ras in the presence of covalently attached first-site ligands. [Imagen] Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4q03/bound/MG> [Visitado 16 Mar. 2016].
- [16] Sun, Q., Phan, J., Friberg, A., Camper, D.V., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W., (2014). Second-site screening of K-Ras in the presence of covalently attached first-site ligands. [Imagen] Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=4Q03> [Visitado 16 Mar. 2016].
- [17] Oh, A., Maurer, T., Garrenton, L.S., Pitts, K., Anderson, D.J., Skelton, N.J., Fauber, B.P., Pan, B., Malek, S., Stokoe, D., Ludlam, M., Bowman, K.K., Wu, J., Giannetti, A.M., Starovasnik, M.A., Mellman, I., Jackson, P.K., Ruldolph, J., Fang, G., Wang, W. (2012). Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. [Imagen] Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=4DSO> [Visitado 16 Mar. 2016].

[18] Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., Shokat, K.M., (2013). Crystal structure of small molecule vinylsulfonamide 7 covalently bound to K-Ras G12C.

[Imagen] Disponible en:

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=4M1O> [Visitado 16 Mar. 2016].

[19] Sancho López, P., (2010). Aminoácidos. [ebook] Alcalá de Henares: Pilar Sancho López, p.5.

Disponible en: http://www3.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/temas/tema-3a_aminoacidos.pdf [Visitado 16 Mar. 2016].

