

Sandra Arroyo Urea

Receptor de Dopamina 3. Modulación por fármacos y oligomerización

Director/es

Velázquez Campoy, Adrián
García Nafría, Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

RECEPTOR DE DOPAMINA 3. MODULACIÓN POR FÁRMACOS Y OLIGOMERIZACIÓN

Autor

Sandra Arroyo Urea

Director/es

Velázquez Campoy, Adrián
García Nafría, Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2025



Tesis Doctoral

Receptor de Dopamina 3. Modulación por
fármacos y oligomerización

Autor

Sandra Arroyo Urea

Director/es

Javier García Nafría
Adrián Velázquez Campoy

Universidad de Zaragoza
Escuela de Doctorado
2024

D. JAVIER GARCÍA NAFRÍA, Doctor en Química por la Universidad de York e Investigador Ramón y Cajal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

Y D. ADRIÁN VELÁZQUEZ CAMPOY, Doctor en Física por la Universidad de Granada y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral “**Receptor de Dopamina 3. Modulación por fármacos y oligomerización**” ha sido realizada, bajo su dirección por la graduada SANDRA ARROYO UREA, en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

ZARAGOZA, DICIEMBRE DE 2024

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (proyecto PID2020-113359GA-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033), el programa Ramón y Cajal, de los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) y la Diputación General de Aragón (DGA). El doctorando ha sido beneficiario de una subvención de la DGA (periodo 2020-2024) destinada a la contratación de personal investigador predoctoral (BOA20201210014) y de una subvención de la DGA destinada al fomento de la movilidad de personal investigador predoctoral en formación para el año 2024 (BOA20240517024). Número de expediente MVB_06_24.



AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, después de estos 4 años sí que me gustaría agradecer (y reconocer) a la gente que me ha acompañado en esta “experiencia”. No me voy a enrollar porque los que habéis estado ahí ya lo sabéis, pero...**GRACIAS!**

Gracias a mis directores de tesis, Javi y Adrián, por confiar en mí y permitirme desarrollar la tesis doctoral con la beca DGA. Especialmente a Javi, por enseñarme el trabajo de laboratorio, sí, pero también por fomentar mi desarrollo como investigadora. Tienes razón, no soy la misma que hace cuatro años y me siento súper afortunada de haber estado en tu grupo. Así que para ser tu primera vez como director, not bad! 😊

Recuerdo también especial a esos BIFIsaurios que habitaban el BIFI cuando llegué y me ayudaron cuando no sabía ni por donde me daba el aire. En especial a Ana G por su ayuda en esos primeros meses en el laboratorio y a Ana J, por aguantar mis mil y una preguntas sobre la DGA y su papeleo y por integrarme tan rápido, aunque esto aplica a prácticamente todos los que estaban allí. No me puedo dejar a Andrés, nuestro experto en baculovirus, el día de Andalucía aquí no será lo mismo sin ti...aún te echamos de menos!

Además, me gustaría agradecer a todos los que me han acompañado día tras día, durante estos últimos (intensos) cuatro años en el laboratorio. A las “spice G_s”, Ángela e Iris que han “sufrido” la tesis conmigo casi desde el principio, sobre todo a Ángela con la que además he compartido *paper*, poyata, buffers, células y dramas varios. También a los BHs (con IP incluida); a Carlos porque la estancia en UK no hubiera sido lo mismo sin ti (y la escritura de la tesis en el ZCAM tampoco, *oh god*) y a Irene a con la que no sólo he compartido productivas horas matutinas en el lab, también piques futbolísticos que ayudaban a desconectar (a pesar de tener un gusto péssimo). Gracias también a Polanco (compi desde el día 1 de tesis, pero también de neuromoles y BIFIcosas varias), a Alejandra, Jorge A y Nacho por los cafés y los post-neuromoles. Aunque la batería social se agota, es verdad que con vosotros se agota más despacio 😊 . También quiero incluir a las nuevas (algunas no tan nuevas ya...) incorporaciones, María(s), Natalia, Irene β,

Blanca y Victoria que han renovado el personal del BIFI, inyectando nueva energía. Todos hacéis del BIFI un lugar especial y gracias a vosotros esto ha sido mucho más llevadero! A ellos se suman los recién llegados JGNs: Dani, Josep y Guille, que sin duda mantendrán la posición de nuestro grupo como el más top del BIFI 😊.

Como no, tengo que acordarme también de mis amigos de toda la vida, los de Jaén, los CSV: Elena, Ara, JC y David. Nuestros reencuentros son siempre un chute de energía que me ayudan a reiniciar y recargar pilas así que, por eso, gracias!

Igualmente, me gustaría agradecer, pero también dedicar esta tesis a mi familia. A mis padres, Jose y Eva por su apoyo incondicional, y por ser mis mayores fans 😊. Esto es vuestro también!! Y a mi her, Eva, por comprenderme como nadie (ya lo sabes), y estar siempre ahí. Os quiero y os admiro (la fan soy yo de vosotros).

Además, me gustaría acabar dedicando, aunque sea este par de líneas, a mi abuelo Juli. Sé que estaría muy orgulloso, así que esto también va para él.

Sin enrollarme más, gracias a todas las personas que, nombradas o no explícitamente aquí, han hecho que estos cuatro años sean inolvidables. Ahora, a seguir!

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
RESUMEN	15
ABREVIATURAS	17
LISTADO DE FIGURAS	21
Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	26
1.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	27
1.1.1 Definición y clasificación	27
1.1.2 Estructura y activación	27
1.1.3 Farmacología en GPCRs: Conceptos de potencia y eficacia.....	29
1.1.4 Señalización celular.....	30
1.2 GPCRs como diana terapéutica.....	41
1.2.1 Relevancia farmacológica.....	41
1.2.2 Desafíos y oportunidades en el desarrollo de fármacos dirigidos a GPCRs ..	42
1.3 Receptores de dopamina.....	46
1.3.1 Receptor de dopamina 3.....	48
1.4 Objetivos	50
Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS	53
2.1 Clonaje molecular.....	54
2.1.1 Ensamblaje in vivo	54
2.1.2 Generación de constructos	56
2.2 Producción de GPCRs y complejos de GPCRs para determinación estructural ..	58
2.2.1 Mantenimiento de cultivos celulares	60
2.2.2 Expresión y purificación del complejo D ₃ R:Gαβγ:scFv16 unido a ligando bitópico FOB02-04A	60
2.2.3 Expresión y purificación de los complejos D ₃ R:Gαβγ:scFv16 unido a ligando bitópico AB04-88 y SK-609	61
2.2.4 Expresión y purificación de dímeros de D ₃ R unidos a ligando bivalente C13	62
2.2.5 Generación de proteoliposomas de D ₃ R.....	63

2.3 Producción de vesículas con D ₃ R derivadas de células HEK293T para determinación estructural	65
2.3.1 Mantenimiento de cultivos celulares	65
2.3.2 Generación de GMPVs con D ₃ R.....	65
2.3.3 Marcaje de MTH y recogida de vesículas	66
2.4 Producción de nanoanticuerpos específicos a D ₃ R.....	66
2.4.1 Expresión y purificación del D ₃ R-ΔICL3	66
2.4.2 Expresión y purificación de nanoanticuerpos dirigidos a D ₃ R	67
2.4.3 Inmunoprecipitación de D ₃ R: nanoanticuerpo	68
2.5 Análisis bioquímico de proteínas	68
2.5.1 Electroforesis SDS-PAGE	68
2.5.2 Electroforesis en gel nativo	69
2.5.3 Inmunodetección por “Western-Blot”	69
2.6 Crio-microscopía electrónica	70
2.6.1 Crio-microscopía electrónica de partícula única (crio-ME).....	71
2.6.2 Crio-tomografía electrónica (crio-TE)	82
2.7. Ensayos celulares	87
2.7.1 Ensayo de activación de GPCRs	88
2.7.2 Ensayo de cuantificación de receptor en superficie	90

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

.....	93
3.1 Selectividad D ₃ R vs D ₂ R. Problema de fármacos actuales	94
3.2 Determinación estructural del complejo D ₃ R:Gα ₀ βγ:scFv16 unido a FOB02-04A por crio-ME	97
3.3 Activación de D ₃ R inducida por FOB02-04A.....	101
3.3.1 Interfaz D ₃ R: Gα ₀ βγ. Estudio de las bases de la selectividad G ₀ /G _i	102
3.3.2 Interacción de FOB02-04A en D ₃ R	106
3.4 Bases de la selectividad de FOB02-04A en D ₃ R/D ₂ R	115
3.5 Diversidad del SBP _{2-ECL1-1} en otros receptores aminérgicos	117
3.6 Conformación alternativa de FOB02-04A	119

3.7 Diseño racional de fármacos selectivos a D ₃ R basados en la estructura del complejo D ₃ R:G ₀ αβγ:scFv16 unido a FOB02-04A.....	122
3.8 Discusión	124
3.9 Conclusiones	126

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R129

4.1 Sesgo en la señalización de D ₃ R	130
4.2 Determinación estructural del complejo D ₃ R:G ₀ αβγ:scFv16 unido a AB04-88 por crio-ME	131
4.3 Activación inducida de AB04-88 en el D ₃ R	134
4.4 Bases del sesgo a proteínas G en D ₃ R mediado por AB04-88	137
4.5 Discusión	144
4.6 Conclusiones	147

Capítulo V. Desarrollo y caracterización de nanoanticuerpos para D₃R.....150

5.1 Nanoanticuerpos. Definición y aplicaciones	151
5.2 Generación de nanoanticuerpos dirigidos a D ₃ R.....	153
5.3 Validación de la unión al D ₃ R	155
5.4 Caracterización de los nanoanticuerpos para D ₃ R	156
5.4.1 Activación de proteínas G	156
5.4.2 Predicción estructural con modelos de AlphaFold.....	157
5.4.3 Estudio de la selectividad D ₃ R/D ₂ R del nanoanticuerpo CA18977	160
5.5 Discusión	162
5.6 Conclusiones	165

Capítulo VI. Oligomerización en D₃R168

6.1 Existencia y caracterización de oligómeros de D ₃ R	169
6.2 Determinación estructural de dímeros de D ₃ R en LMNG por crio-ME.....	170
6.2.1 Obtención de dímeros en solución	170
6.2.2 Análisis de C13:D ₃ R por crio-ME	172
6.3 Determinación estructural de dímeros de D ₃ R en membrana por crio-TE.....	174
6.3.1 Estudio de oligomerización de receptores en membranas celulares nativas	174

6.3.2 Estudio de oligomerización en proteoliposomas reconstituidos	176
6.4 Discusión	180
6.5 Conclusiones	182
Capítulo VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONCLUSIONES GENERALES.....	185
Capítulo VIII. REFERENCIAS	192
ANEXOS.....	228

RESUMEN

Los receptores de dopamina pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas G aminérgicos, encontrándose principalmente en el cerebro donde participan en multitud de funciones cognitivas y motoras. Al unirse a la dopamina, éstos desencadenan una cascada de señalización intracelular a través de la activación de proteínas G (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) y β -arrestinas. Se han descrito 5 tipos de receptores dopaminérgicos, clasificados según su secuencia y función en receptores de tipo D1 (D_1R y D_5R), que señalizan por G_s activando la adenilato ciclase, y tipo D2 (D_2R , D_3R y D_4R) que señalizan por $G_{i/o}$ ejerciendo el efecto contrario. Estos últimos, y más específicamente D_2R y D_3R , constituyen las principales dianas terapéuticas de multitud de trastornos neurológicos, como la enfermedad de Parkinson y esquizofrenia. Comprender los mecanismos funcionales de señalización de estos receptores, así como el desarrollo de fármacos con propiedades optimizadas tiene el potencial de mejorar los tratamientos para estas enfermedades. Esta tesis doctoral se centra en el estudio del D_3R humano (hD_3R), donde combinando crio-microscopía electrónica, bioquímica, ensayos de señalización y colaboraciones con investigadores computacionales y químicos orgánicos, i) se abordan los mecanismos de señalización de este receptor, mostrando las bases del acoplamiento preferencial de D_3R hacia G_o , ii) se desarrollan ligandos selectivos que diferencian entre D_2R y D_3R , explotando un sitio nuevo extracelular en hD_3R que se descubre en este trabajo y que se utiliza para el desarrollo de fármacos con mayor selectividad, iii) se descifran los mecanismos por los cuales un ligando unido a la parte extracelular es capaz de activar la señalización mediada por proteínas G pero no por β -arrestinas en hD_3R , iv) se desarrollan nanoanticuerpos que modulan al hD_3R permitiendo su uso como herramientas para el estudio del receptor así como v) se pretende el estudio de la oligomerización de estos receptores en ambiente nativo, es decir, mientras se encuentran en la membrana, utilizando crio-tomografía electrónica.

ABREVIATURAS

A

AMPc: Adenosín Monofosfato-3',5' Cíclico

B

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (“Brain Derived Neurotrophic Factor”)

BRET2: Resonancia de bioluminiscencia 2 (“Bioluminescence Resonance Energy Transfer”)

C

Crio-ME: Crio-Microscopía Electrónica de partícula única

Crio-TE: Crio-Tomografía Electrónica

CHS: Colesterol HemiSuccinato

VC: Volúmenes de columna

CTF: Función de transferencia de contraste (“Contrast Transfer Function”)

CDR: Regiones determinantes de la complementariedad (“Complementarity-Determining Regions”)

D

DR: Receptor de dopamina (“Dopamine Receptor”)

DDM: DoDecil-beta-Maltósido

DOPC: 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (“2,3-Dioleoyl-glycerO-1-PhosphoCholine”)

DQE: Eficiencia cuántica (“Detective Quantum Efficiency”)

E

ECLs: Búcles extracelulares (“Extracellular Loops”)

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares (“Extracellular-Signal-Regulated Kinase”)

EMA: Agencia Europea del medicamento (“European Medicines Agency”)

EGFP: Proteína fluorescente verde (“Enhanced Green Fluorescent Protein”)

ESRF: Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón (“European Synchrotron Radiation Facility”)

EMDB: base de datos de microscopía electrónica (“Electron Microscopy Data Bank”)

F

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (“Food and Drug Administration”)

FSC: Correlación de Fourier (“Fourier Shell Correlation”)

G

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G (“G protein Coupled Receptors”)

GRK: Quinasa de GPCRs (“G protein coupled Receptor Kinase”)

GPVs: Vesículas gigantes derivadas de la membrana plasmática (“Giant Plasma Membrane Vesicles”)

H

HASS: Secuencia señal de hemaglutinina (“HemAgglutinin Signal Sequence”)

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase”)

I

IPTG: IsoPropil- β -D-1-TioGalactopiranósido

IUPHAR: Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (“International Union of Basic and Clinical Pharmacology”)

ICLs: Bucle intracelulares (“Intracellular loops”)

L

LMNG: Lauril Maltosa Neopentil Glicol

M

MD: Dinámica molecular (“Molecular Dynamics”)

MTH: Metalotioneína (“Metalothionein”)

N

NeCEN: Centro Holandés de Nanoscopia Electrónica (“Netherlands Centre for Electron Nanoscopy”)

O

OBS: Sitio ortostérico (“Orthosteric Binding Site”)

P

PEI: Polietilamina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)

PP: Farmacóforo primario (“Primary Pharmacophore”)

PBS: Tampón fosfato salino (“Phosphate Buffer Saline”)

R

RET: Transferencia de energía de resonancia (“Resonance Energy Transfer”)

RMSD: Raíz del error cuadrático medio (“Root Mean Square Deviation”)

S

SDS: Docecilsulfato sódico (“Sodium Dodecyl Sulfate”)

Sf9: *Spodoptera frugiperda*

SEM: Desviación estándar de la media (“Standard Error of the Mean”)

SBP: Sitio alostérico o secundario (“Secondary Binding Pocket”)

T

TM: Hélice TransMembrana

Tni: *Trichoplusia ni*

TCE: 2,2,2-TriCloroEtanol

V

VHH: Dominio de unión a inmunoglobulina (“Variable Heavy domain of Heavy chain”)

W

WT: Salvaje (“Wildtype”)

LISTADO DE FIGURAS

Figura I.1. Estructura y mecanismo de activación de GPCRs.....	28
Figura I.2.Caracterización farmacológica de ligandos en GPCRs.	29
Figura I.3.Señalización canónica de un GPCR.....	31
Figura I.4. Señalización de GPCRs mediada por proteínas G según la G_α activada.	32
Figura I.5.Modelos de unión y activación de GPCRs.	35
Figura I.6.Fenómeno de agonismo sesgado.....	36
Figura I.7.Funciones de la oligomerización en GPCRs.	39
Figura I.8.Dianas farmacológicas de GPCRs establecidas.	42
Figura I.9.Promiscuidad de fármacos dirigidos a GPCRs aminérgicos.....	43
Figura I.10.Señalización mediada por los receptores de dopamina.....	47
Figura I.11.Conservación de secuencia entre D₂R y D₃R.	49
Figura II.12. Diseño de cebadores para la técnica de ensamblaje in vivo.....	55
Figura II.13. Protocolo estándar para el clonaje molecular por recombinación in vivo.	56
Figura II.14. Constructos clonados en pBacPak8 para la generación de baculovirus recombinantes.....	57
Figura II.15. Sistema de expresión de baculovirus FlashBAC™ ULTRA.....	59
Figura II.16. Técnica de crio-microscopía electrónica.	70
Figura II.17. Protocolo general para el procesado de datos derivados de crio-ME... 	72
Figura II.18. Estimación de la CTF (panel izquierdo) y espectro de potencia (panel derecho).	73
Figura II.19. Correlación de Fourier (FSC).	75
Figura II.20. Protocolo general para el procesado de datos derivados de crio-TE. ...	83
Figura II.21. Ensayos disponibles para el estudio de la señalización mediada por GPCRs.	88
Figura II.22. Ensayo TRUPATH.	89

Figura III.23. Ejemplos de fármacos utilizados actualmente en la clínica para el tratamiento de esquizofrenia (antagonistas) y enfermedad de Parkinson (agonistas).	95
.....
Figura III.24. Estructura química de un ligando bitópico.	96
Figura III.25. Purificación del complejo D₃R:Gα_{OA}βγ:scFv16 unido a FOB02-04A y validación de la mutación L^{3.41}W.	97
Figura III.26. Efecto del centrado del sitio de unión del ligando en la caja de crio-ME.	98
.....
Figura III.27. Crio-ME para la obtención del mapa del complejo D₃R:G_{OA} unido a FOB02-04A.	99
Figura III.28. Calidad del mapa de crio-ME y ajuste del modelo de los complejos D₃R:G_O unidos a FOB02-04A.	100
Figura III.29. Activación de D₃R inducida por FOB02-04A.	102
Figura III.30. Acoplamiento de G_O y G_i a D₃R.	103
Figura III.31. Comparación de la interacción G_O vs G_i en D₃R.	105
Figura III.32. Interacción de FOB02-04A en D₃R.	107
Figura III.33. Comparación del sitio de unión en D₃R para FOB02-04A (rojo), rotigotina (azul) y pramipexol (verde).	109
Figura III.34. Contribución de H29^{1.32} a la activación de D₃R inducida por FOB02-04A.	111
.....
Figura III.35. Activación de la variante ΔG94ECL1 inducida por FOB02-04A (azul oscuro) y quinpirol (azul claro).	114
Figura III.36. Contribución de G94^{ECL1} a la selectividad D₃R/D₂R.	116
Figura III.37. Diversidad del SBP_{2-ECL1-1} en receptores aminérgicos.	118
Figura III.38. Conformación A vs Conformación B.	121
Figura III.39. Estructuras químicas y afinidades de compuestos diseñados tomando como molécula de origen FOB02-04A.	123
Figura III.40. Curvas de concentración-respuesta para D₃R WT tras la activación de G_{OA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de AB13-46A, AB13-73A y AB13-74A.	124
.....
Figura IV.41. Señalización sesgada a proteína G mediada por AB04-88.	131

Figura IV.42. Crio-ME para la obtención del mapa del complejo D₃R:G_{OA} unido a AB04-88.	132
Figura IV.43. Complejo de crio-ME de AB04-88 unido a D₃R:G_Oαβγ:scFv16.	133
Figura IV.44. Sitio de unión de AB04-88 en D₃R.	135
Figura IV.45. Modo de unión de ligandos sin sesgo (pramipexol) y ligandos con sesgo a proteína G (AB04-88 y SK-609) en D₃R.	139
Figura IV.46. Análisis de la región intracelular de la TM7-H8 en D₃R unido a AB04-88.	141
Figura IV.47. Interacción TM3-TM7 en complejo de AB04-88 unido a D₃R:G_Oαβγ:scFv16.	143
Figura V.48. Estructura de anticuerpos convencionales y nanoanticuerpos.	151
Figura V.49. Purificación del constructo D₃R-ΔICL3.	153
Figura V.50. Descripción de los clones de nanoanticuerpos generados.	154
Figura V.51. “Western blot” con el anticuerpo conjugado anti-His para el reconocimiento de los nanoanticuerpos eluidos en complejo con el D₃R.	155
Figura V.52. Activación de proteína G mediada por CA18977 en D₃R.	156
Figura V.53. Predicción estructural de AlphaFold para las estructuras de D₃R unidas a los nanoanticuerpos CA18977, CA19073 y CA19081.	158
Figura V.54. Comparación estructural del modo de unión de CA18977 y CA19073 en D₃R (según modelos de AlphaFold).	159
Figura V.55. Vista desde arriba del sitio de unión de los nanoanticuerpos en la estructura del D₃R y su unión relativa a las estructuras en estado activo (unida a FOB02-04A, PDB 9F33, en amarillo) e inactivo (unida a eticloprida, PDB 3PBL, en rosa).	159
Figura V.56. Activación de CA18977 en D₃R y D₂R.	161
Figura V.57. Modo de unión del nanoanticuerpo CA18977 en D₂R..	162
Figura VI.58. Estructura y unión de ligandos bivalentes.	171
Figura VI.59. Gel nativo “stain-free” de muestra pura de D₃R unido a ligando C13.	172
Figura VI.60. Procesado de datos de crio-ME para la muestra de D₃R unida al ligando bivalente C13.	173

Figura VI.61. Marcaje de D₃R y formación de GMPVs.....	175
Figura VI.62. Comparación de GPMVs observados en las recogidas de datos.	176
Figura VI.63. Comparación de liposomas multilamelares y unilamelares en crio-TE.	
.....	177
Figura VI.64. Comparación de liposomas control y liposomas con D₃R incorporado.	
.....	178
Figura VI.65. Esquema del proceso de picado, extracción y procesado de los pseudo-subtomogramas.	179

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

1.1.1 Definición y clasificación

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen la mayor familia de receptores en la superficie celular del cuerpo humano, con un 2 % del genoma codificando para GPCRs^{1,2}. Presentan una expresión ubicua y son capaces de reaccionar a diversos estímulos (olor, hormonas, neurotransmisores, péptidos, lípidos, fotones...), convirtiendo estas señales extracelulares en una respuesta intracelular a través de la interacción con una proteína transductora, ejerciendo un papel clave en la comunicación celular¹. Atendiendo a su secuencia y grado de conservación, los GPCRs se pueden clasificar en 4 subfamilias o clases (A, B, C y F). Sin embargo, análisis filogenéticos posteriores han permitido una clasificación más precisa basada en las relaciones evolutivas entre receptores, definiéndose 5 subfamilias: Rodopsina (clase A), Secretina (clase B), Glutamato (clase C), Adhesión y “Frizzled/Taste2”, siendo la familia de la rodopsina (GPCRs de clase A) la más numerosa, incluyendo aproximadamente el 80 % de todos los GPCRs^{2,3}.

1.1.2 Estructura y activación

A pesar de su diversidad y clasificación en diferentes subfamilias, todos los GPCRs se caracterizan por presentar una estructura común de 7 hélices transmembrana (TMs) conectadas por 3 bucles extracelulares (ECLs) y tres bucles intracelulares (ICLs) y una hélice H8 paralela a la bicapa lipídica en el extremo carboxilo (Figura I.1A)⁴. La primera estructura de un GPCR que se resolvió fue la del receptor de rodopsina bovino en estado inactivo⁵, convirtiéndose en el prototipo de los GPCRs de clase A y dando nombre a esta familia. Posteriormente, la resolución de la estructura cristalina del receptor de opsina en complejo con una proteína G junto con otras estructuras posteriores en estado activo permitió desvelar los cambios estructurales que subyacen a la activación⁶, identificando un mecanismo de activación común en GPCRs de clase A,

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

donde motivos altamente conservados (PIF, NP_{xx}Y, DRY, “toggle switch”) permiten conectar el sitio de unión a ligando a nivel extracelular con la región intracelular (Figura I.1B)⁷⁻⁹. De hecho, la conservación de ciertos residuos en los dominios transmembrana de los GPCRs de clase A ha permitido establecer una nomenclatura genérica para facilitar la comparación e identificación de los motivos conservados entre diferentes GPCRs, adoptando esta nomenclatura en el presente trabajo (nomenclatura Ballesteros-Weinstein). Este sistema asigna a cada residuo dos números, donde el primer número indica la TM y el segundo su posición relativa al residuo más conservado en esa TM, al que se asigna el número 50¹⁰.

En una secuencia ordenada, la activación del receptor se inicia con la unión de un ligando (agonista), lo que provoca una reorganización en el receptor del motivo PIF ($I^{3.40}$, $P^{5.50}$, $F^{6.44}$) y cambios en el residuo $W^{6.48}$, también conocido como “toggle switch” ocasionando una apertura del extremo intracelular de la TM6 y un desplazamiento de la TM7 hacia el núcleo del receptor (Figura I.1B).

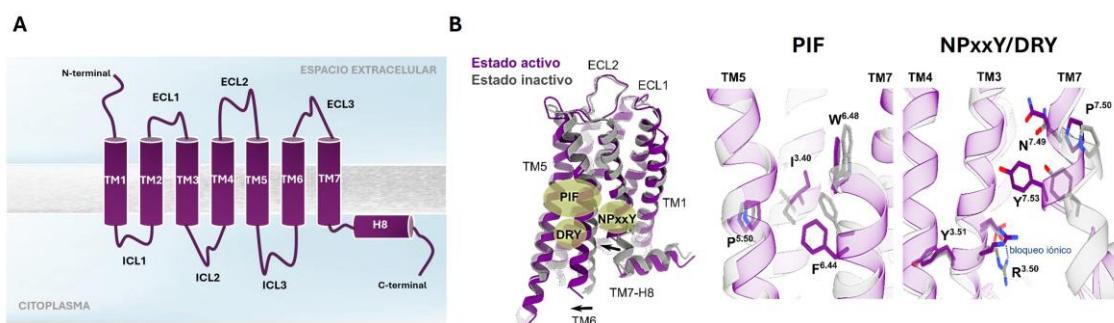


Figura I.1. Estructura y mecanismo de activación de GPCRs. **A)** Estructura clásica de un GPCR, conformado por siete 7 TMs con el extremo amino terminal expuesto al exterior de la membrana y el carboxilo terminal dirigido hacia el interior celular. **B)** Superposición de las estructuras en estado activo e inactivo de un GPCR genérico de clase A (panel izquierdo) y principales motivos implicados en la activación (panel derecho).

Paralelamente, el motivo NP_{xx}Y ($N^{7.49}$, $P^{7.50}$, $Y^{7.53}$) en la TM7 experimenta cambios conformacionales y estabiliza el estado activo del receptor mediante un puente de hidrógeno entre los residuos $Y^{7.53}$ e $Y^{5.58}$ o a través de una molécula de agua. Por su

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

parte, el desplazamiento de la TM6 deriva en la rotura del enlace iónico entre los residuos D(E)^{6.30} y R^{3.50} en el motivo DRY (D(E)^{3.49} R^{3.50} Y^{3.51}) presente en el estado inactivo, abriendo la región intracelular para permitir el acoplamiento y activación de la proteína transductora, y la subsiguiente respuesta celular^{2,7,9}.

1.1.3 Farmacología en GPCRs: Conceptos de potencia y eficacia

La interacción de un ligando con un GPCR puede producir efectos diferentes según si el ligando actúa como agonista, antagonista o agonista inverso (Figura I.2A). Los agonistas se unen y activan al receptor iniciando una cascada de señalización mientras que los antagonistas se unen al receptor, pero su unión no tiene ningún efecto sobre la actividad de este. Por su parte, un agonista inverso no sólo bloquea la unión de otros ligandos, también inhibe la actividad basal o constitutiva del receptor disminuyendo su señalización¹¹.

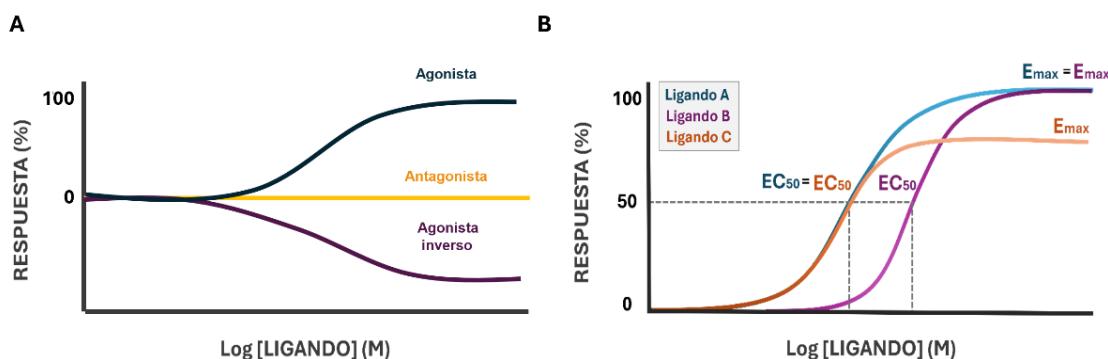


Figura I.2. Caracterización farmacológica de ligandos en GPCRs. A) Curvas concentración respuesta obtenidas tras la unión de un agonista (azul), antagonista (naranja) y agonista inverso (morado) en un GPCR. **B)** Ejemplo de curvas concentración-respuesta para diferentes agonistas. El Ligando A (azul) es más potente que el Ligando B (morado) (se requiere menos concentración de ligando para desencadenar una respuesta), y ambos son agonistas totales, generando la máxima respuesta a altas concentraciones. Sin embargo, el Ligando C (naranja) no es capaz de generar la máxima respuesta posible, considerándose un agonista parcial.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Asimismo, la capacidad de un agonista para activar y promover una respuesta se puede definir mediante dos parámetros: potencia y eficacia. La potencia se relaciona con la cantidad necesaria para desencadenar una respuesta y se cuantifica con la EC₅₀ (concentración de ligando a la que se consigue la mitad del efecto máximo). Ligandos más potentes requieren dosis menores para alcanzar el mismo efecto que ligandos menos potentes (Figura I.2B). Por otro lado, la eficacia (E_{max}) se define como el efecto máximo que puede generar el ligando, lo que depende no sólo de su capacidad para activar total o parcialmente los receptores (eficacia intrínseca) sino también de la densidad de receptores y la eficiencia de la señalización característicos del sistema biológico en estudio^{12,13}. Así, agonistas totales son capaces de producir una respuesta máxima del 100 % mientras que los agonistas parciales, aunque ocupen todos los receptores, generan una respuesta menor (Figura I.2B). Ambos parámetros (potencia y eficacia) pueden determinarse a partir de curvas concentración-respuesta permitiendo comparar el perfil farmacológico de diferentes ligandos en estudios *in vitro*. Para estudios preclínicos se representan curvas dosis-respuesta y se evalúa un efecto en el organismo completo (por ejemplo, capacidad motora).

1.1.4 Señalización celular

Clásicamente la señalización a través de GPCRs se ha explicado a través del modelo de complejo ternario, donde el receptor alterna entre tres estados: inactivo, activo y unido a agonista y proteína G¹⁴. La unión del agonista al receptor desencadena un cambio conformacional en su parte intracelular permitiendo el acoplamiento y activación de una proteína G que se encuentra unida a GDP en su estado inactivo y consta de tres subunidades (G $\alpha\beta\gamma$). Como resultado, la subunidad G α intercambia la molécula de GDP por GTP lo que ocasiona la disociación de la G α del receptor y de G $\beta\gamma$. Estas subunidades pueden a continuación unirse a diferentes efectores, activando o inhibiendo la producción de diferentes mensajeros secundarios dando lugar a una respuesta celular (Figura I.3). La señal termina cuando la actividad GTPasa de la subunidad G α hidroliza el GTP a GDP y fosfato, retornando a su estado basal¹⁵.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

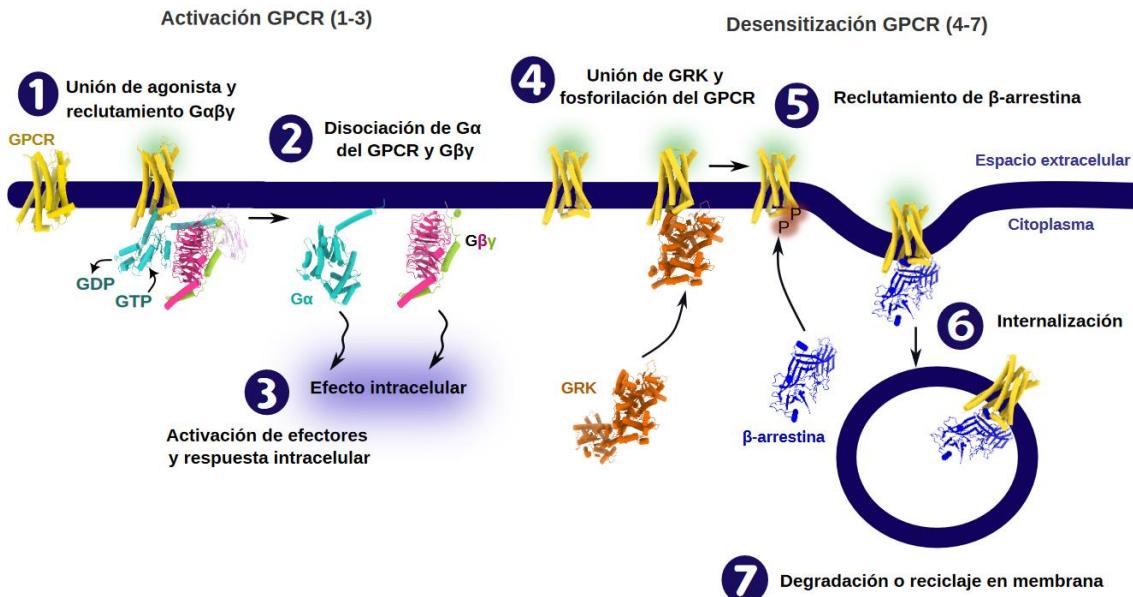


Figura I.3. Señalización canónica de un GPCR. La unión del agonista al GPCR deriva en la apertura de la TM6 permitiendo el acoplamiento de $\text{G}\alpha\beta\gamma$. El intercambio de GDP a GTP por $\text{G}\alpha$ lleva a la dissociación del complejo y activación de diferentes efectores (1-3). La estimulación persistente ocasiona la fosforilación del receptor y reclutamiento de β -arrestina para su internalización, evitando la exposición a agonista (4-7).

La activación prolongada por parte del agonista deriva en la desensibilización del receptor, lo que comprende la fosforilación en su extremo carboxilo terminal o en el ICL3 por una quinasa de GPCRs (GRK) y la posterior unión de una β -arrestina, que se transloca a la membrana plasmática iniciándose la internalización del receptor y con ello el cese de la señalización¹⁶ (Figura I.3).

1.1.4.1 Vías de señalización

Proteínas G

El acoplamiento de la proteína $\text{G}\alpha\beta\gamma$ al receptor se produce principalmente a través de dos interfaces establecidas entre el receptor y la subunidad $\text{G}\alpha$, una situada entre la hélice carboxilo terminal $\alpha 5$ de la subunidad $\text{G}\alpha$ y la parte intracelular de TM3, TM5 y

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

TM6 y una segunda entre el ICL2 del receptor y el extremo amino terminal de la subunidad G α junto con la hélice $\alpha 5$ y los bucles que conectan las hebras β ¹⁷. En concreto, las interacciones establecidas por la hélice carboxilo terminal $\alpha 5$ de la subunidad G α con el receptor resultan determinantes para la selectividad que presentan los receptores para acoplar a proteínas G, dependiendo la respuesta intracelular desencadenada de la subunidad G α activada^{17,18} (Figura I.4). La literatura describe hasta cuatro familias diferentes de proteínas G $\beta\gamma$ clasificadas según su subunidad G α : G_s (G_{olf} y G_s) favorece la activación de la adenilato ciclase promoviendo la formación de adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc), G_{i/o} (G_{i1}, G_{i2}, G_{i3}, G_o, G_z, G_{t1}, G_{t2} y G_{gust}) inhibe la formación de AMPc, G_{q/11} (G_q, G₁₁, G₁₄, G₁₅) activa la fosfolipasa C aumentando la señalización por calcio (Ca²⁺) y G_{12/13} (G₁₂ y G₁₃) activa las GTPasas RhoA (Figura I.4)¹⁹.

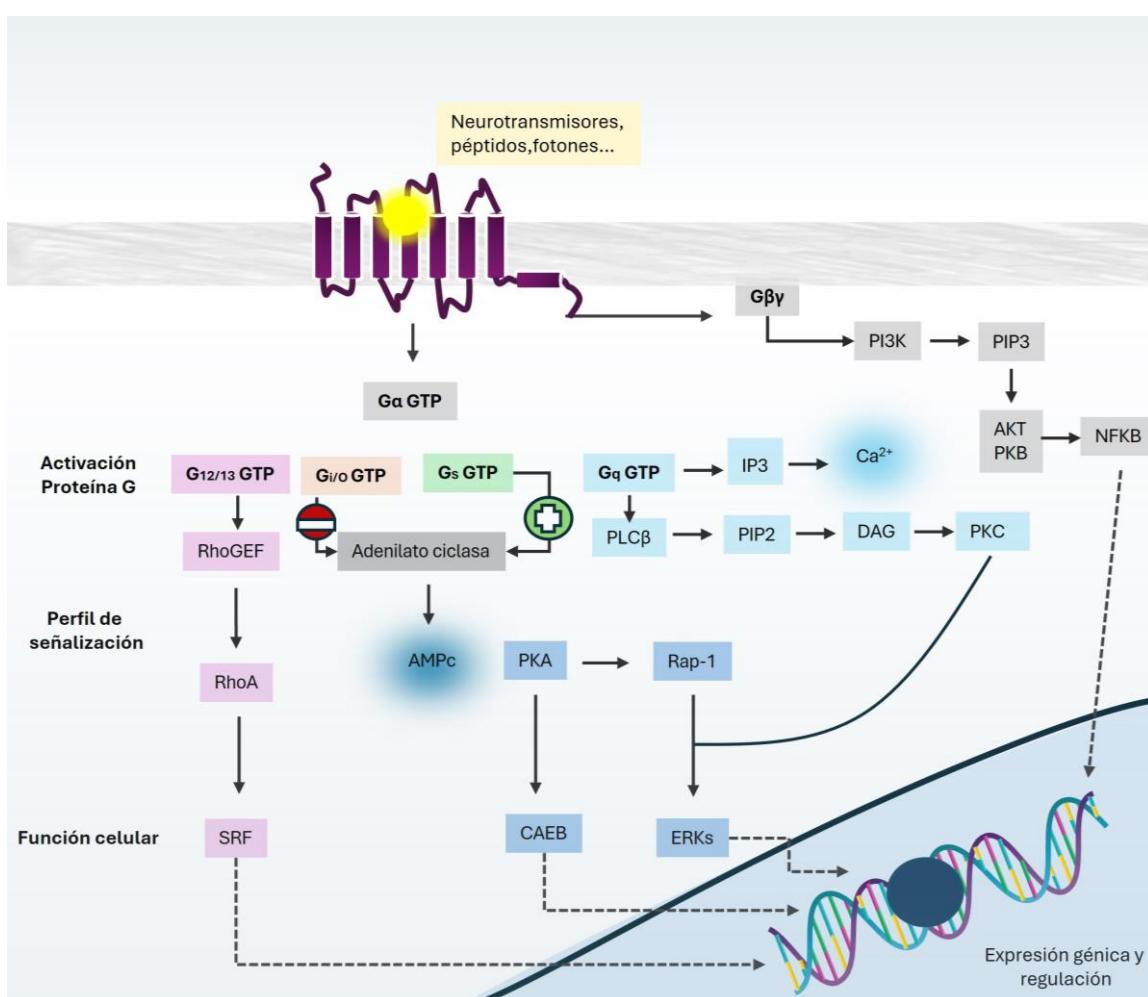


Figura I.4. Señalización de GPCRs mediada por proteínas G según la G α activada.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Sin embargo, se ha descrito que más de la mitad de los GPCRs son promiscuos, pudiéndose acoplar a varias familias, lo que añade un nivel más de complejidad al estudio de la señalización mediada por estos receptores. Además, también se han descrito diferentes isoformas para las subunidades $G\beta\gamma$ (5 isoformas para $G\beta$ y 13 para $G\gamma$), permitiendo multitud de combinaciones que pueden derivar en diferentes cascadas de señalización^{18,20,21}.

β -Arrestinas

La activación por β -arrestinas se asocia generalmente a procesos de desensibilización, internalización y tráfico del receptor que varían atendiendo a la GRK, el patrón de fosforilación presente y la β -arrestina activada²², siendo la conformación del complejo GPCR: β -arrestina determinante para la subsiguiente respuesta celular. Además de la clásica vía de señalización mediada por proteínas G, donde la β -arrestina interviene tras la activación de la $G\alpha\beta\gamma$, los GPCRs también pueden activar vías de señalización independientes de proteínas G mediadas por β -arrestinas, las cuales sirven de adaptadores para interaccionar con otras proteínas de señalización, resultando típicamente en la activación de quinasas activadas por mitógenos^{16,22}.

A diferencia de las proteínas $G\alpha\beta\gamma$, sólo se han descrito hasta la fecha 4 isoformas de arrestinas: Arrestina-1 y Arrestina-4 se expresan en el sistema visual mientras que Arrestina-2 (β -Arrestina 1) y Arrestina-3 (β -Arrestina 2) son de expresión ubicua y las que se acoplan a la mayoría de GPCRs²². En concreto, el acoplamiento al GPCR puede darse en dos configuraciones, una en la que interaccionan solo con el extremo carboxilo terminal fosforilado del receptor y otra en la que las β -arrestinas, además de interaccionar con el extremo carboxilo terminal fosforilado, establecen contactos con el núcleo del receptor ocultando el sitio de unión a proteína G²³. De esta manera, el acoplamiento de los receptores con β -arrestinas inhibe el acoplamiento con proteínas G.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Quinasas de GPCRs (GRKs)

Además de su papel en la desensibilización de GPCRs mediada por β -arrestina, las GRKs pueden modular directamente la señalización de los GPCRs a través de la fosforilación o interacción con otras proteínas presentes en la célula²⁴. Se han reportado hasta siete GRKs diferentes clasificadas en 3 subfamilias: GRK1 y GRK7, GRK2 (GRK2 y GRK3) y GRK4 (GRK4, GRK5, GRK6), siendo GRK2-3 y GRK5-6 de expresión ubicua y, en consecuencia, las responsables de la regulación de la mayoría de los GPCRs. Por ejemplo, se ha descrito que GRK2 puede interaccionar con receptores tirosina-quinasa, dímeros $G\beta\gamma$, moduladores de subunidades de proteínas G, factores de transcripción, proteínas y moduladores del citoesqueleto, ligasas de ubiquitina o diferentes enzimas relevantes para la señalización²⁵.

1.1.4.2 Modulación de la señalización mediada por GPCRs

La existencia de varias proteínas transductoras y la propia dinámica conformacional de los GPCRs, que fluctúan entre diferentes estados conformacionales en equilibrio, evidencian un escenario más complejo que el planteado inicialmente con el modelo ternario. El modelo cúbico es una extensión del modelo ternario, donde se contempla la existencia de diferentes estados conformacionales del receptor (activos e inactivos) e integra la unión de varias proteínas transductoras (también en estados inactivos del receptor), ofreciendo una visión más realista (y compleja) sobre la señalización de los GPCRs (Figura I.5)²⁶.

Este equilibrio dinámico en el receptor puede verse influenciado por la unión de ligandos (agonismo sesgado) o la interacción con otros GPCRs (oligomerización). Otros factores que pueden influir en la respuesta celular derivada de la señalización por GPCRs son la localización específica del receptor en la membrana, su distribución subcelular y señalización desde compartimentos intracelulares^{27,28} o la interacción con lípidos específicos (por ejemplo, colesterol), proteínas moduladoras de la actividad de los receptores²⁹ o proteínas de unión a Ca^{2+} ^{30,31}.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

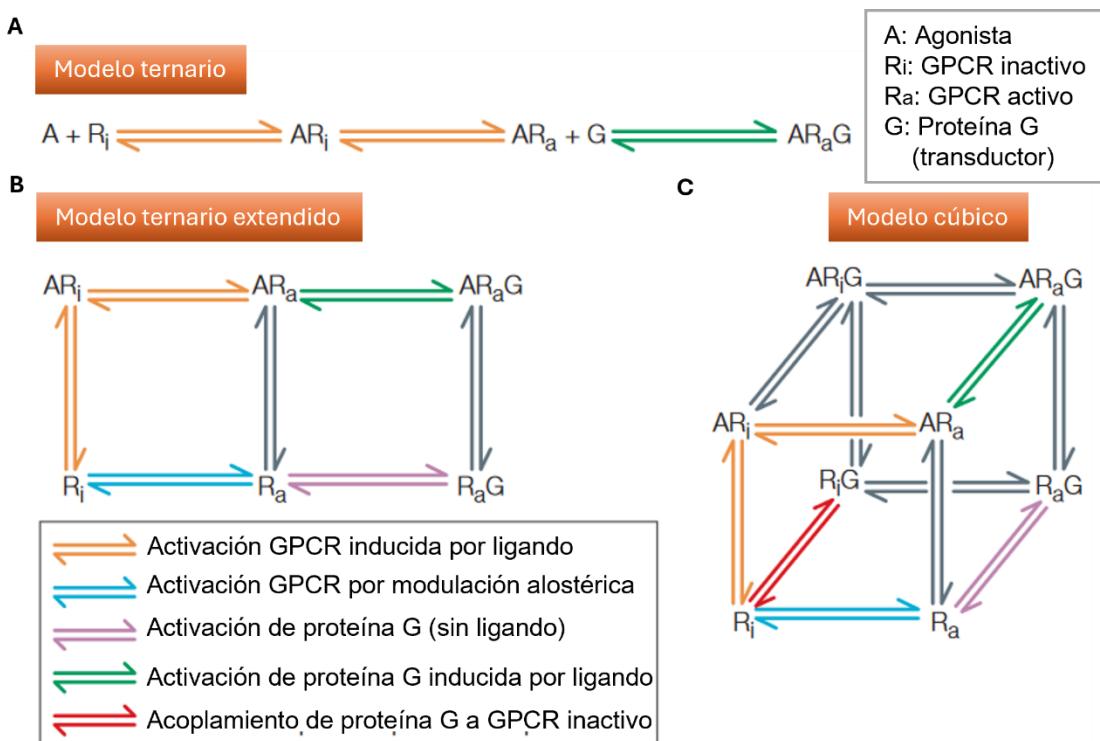


Figura I.5. Modelos de unión y activación de GPCRs. **A)** Modelo ternario: un agonista se une a un receptor inactivo induciendo un cambio conformacional al estado activo que puede acoplarse a una proteína G. **B)** Modelo ternario extendido: contempla la activación del GPCR y acoplamiento a una proteína G independiente de ligando (actividad constitutiva). **C)** Modelo cúbico: incluye la formación de complejos mixtos de no señalización entre el receptor en estado inactivo y la proteína G. Imagen modificada de³².

Agonismo sesgado

Los GPCRs se encuentran en constante equilibrio entre múltiples conformaciones activas e inactivas. Dentro de esa gran diversidad conformacional, existen conformaciones específicas del receptor que son capaces de acoplar preferentemente diferentes proteínas transductoras. La unión de un ligando puede estabilizar dichos estados conformacionales y, en consecuencia, favorecer la activación de ciertas rutas de señalización frente a otras (sesgo de señalización). Este fenómeno se conoce como agonismo sesgado o selectividad funcional³³. Por tanto, un ligando unido a un mismo receptor puede presentar una potencia y eficacia diferentes para distintas rutas de

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

señalización (Figura I.6), actuando por ejemplo como agonista total para la activación de la proteína $\text{G}\alpha\beta\gamma$ y como agonista parcial para el reclutamiento de β -arrestina, siempre con respecto a un ligando de referencia (por ejemplo, el ligando endógeno o un ligando equilibrado, que señalice equitativamente por las dos vías), y definido para un sistema biológico concreto en estudio.

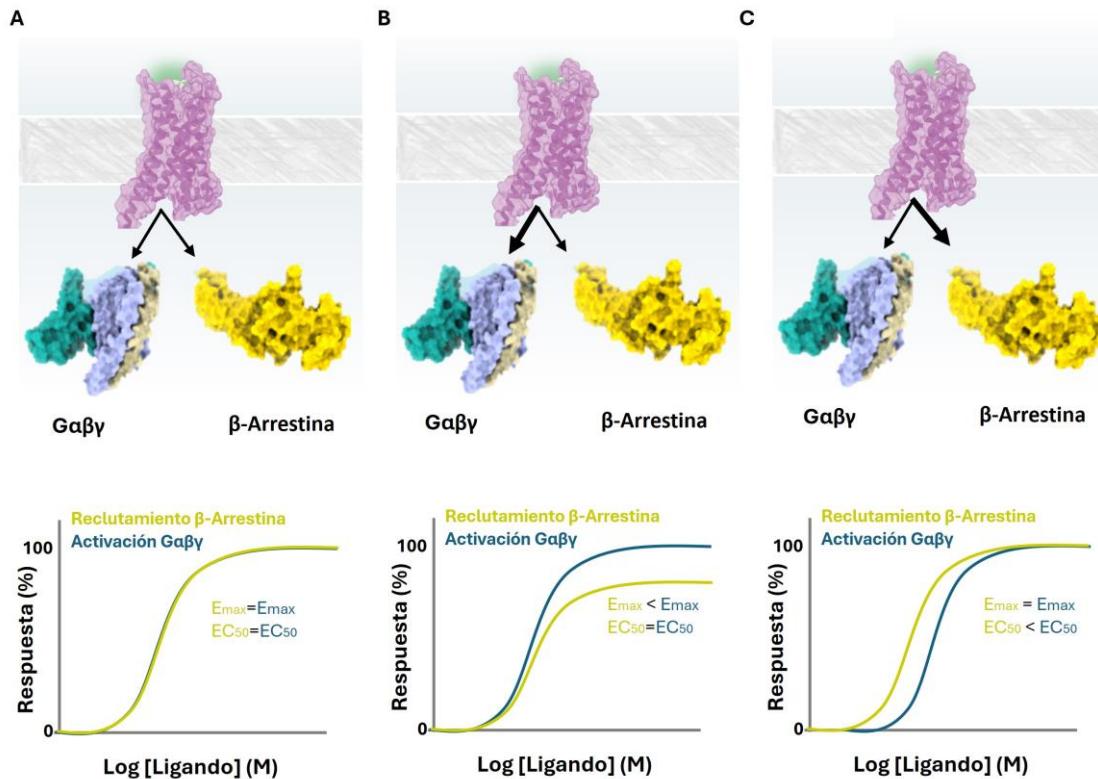


Figura I.6. Fenómeno de agonismo sesgado. **A)** La unión del ligando al receptor activa de manera equilibrada la ruta de las proteínas G y β -arrestinas, con la misma potencia y eficacia (ligando de referencia). **B)** La interacción ligando-receptor resulta en una mayor activación de la proteína G, presentando una eficacia menor para el reclutamiento de β -arrestina con respecto al ligando de referencia. **C)** Ambas rutas de señalización pueden ser igualmente activadas por el ligando, pero se necesita una mayor concentración para activar la proteína G (el ligando es menos potente para la ruta de las proteínas G) con respecto al ligando de referencia.

En la literatura se ha descrito sesgo natural mediado por algunos péptidos endógenos para los receptores opioides, sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes laboratorios son inconsistentes^{34,35}. Esta falta de reproducibilidad en los perfiles de

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

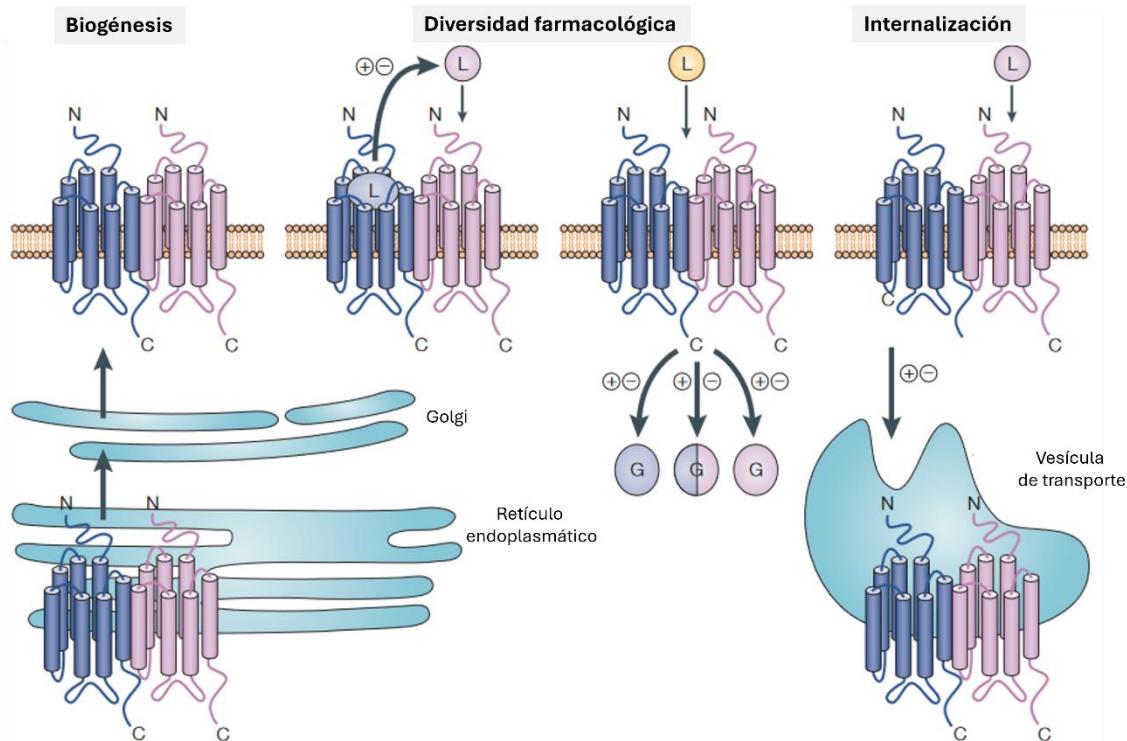
sesgo funcional definidos para un ligando, que difieren entre ensayos y laboratorios, dificulta su caracterización funcional, así como la traslación de nuevos fármacos descubiertos *in vitro* a la clínica. Por ejemplo, las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) generalmente asociadas a activación de GRKs y β-arrestina también pueden ser activadas por las cuatro familias de proteínas G³⁶, no siendo por tanto la fosforilación de las ERKs representativa de la vía de las β-arrestinas. Además, la medición de la señal en diferentes puntos de la cascada de la señalización mediada por un receptor puede dar lugar a diferentes perfiles de eficacia para un mismo ligando, actuando como agonista parcial para ensayos que miden la disociación de proteína G y agonista total en ensayos de cuantificación de AMPc o Ca²⁺, que también dependen de la activación de la proteína Gaβ³⁷. Estas diferencias responden a diferencias en la cinética de los procesos de señalización evaluados, así como a la existencia de interacciones con otras proteínas y efectores presentes en la célula (sesgo del sistema). La evaluación de la actividad en la primera etapa de la señalización permite aislar el efecto del ligando del sesgo del sistema garantizando un mayor éxito en modelos biológicos más complejos, en los que el contexto celular también afectará a la selectividad funcional del ligando.

Oligomerización

A parte de su función como receptores monoméricos, la literatura ha descrito la existencia de oligómeros de GPCRs. De hecho, la oligomerización es esencial para la función de determinados GPCRs como los GPCRs de clase C (receptores GABA B, mGlu y CaS entre otros), donde el homo- o heterodímero de GPCRs constituye la unidad funcional³⁸. Ello ha motivado el estudio de la oligomerización en GPCRs de clase A, cuyos monómeros pueden activar proteínas G y β-arrestinas confirmando en este caso la formación de oligómeros propiedades funcionales adicionales, alterando la afinidad por ligando, induciendo sesgo o cambiando la especificidad por proteínas G³⁹. Ello añade un nivel más de complejidad al estudio de la señalización mediada por GPCRs, donde la oligomerización permitiría establecer una comunicación alóstérica entre los receptores donde un protómero se acoplaría a la proteína G heterotrimérica (subunidad

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

señalizadora), y el otro protómero modificaría la función de la subunidad señalizadora (subunidad alóstérica). Por ejemplo, se ha descrito que en heterómeros de receptores de adenosina y dopamina A_{2A}-D₂, la estimulación del receptor de adenosina A_{2A} disminuye la afinidad del receptor de dopamina D₂ (D₂R) por la dopamina, influyendo la dimerización en el reconocimiento del ligando⁴⁰. Además, también se han reportado cambios en el acoplamiento y selectividad de proteínas G dependientes de la dimerización. Por ejemplo, el receptor de cannabinoides CB₁ monomérico señaliza por G_{a*i*} (estimulando una disminución en la producción de AMPc) mientras que cuando forma heterodímeros con D₂R puede acoplarse a G_s, dando lugar al efecto contrario⁴¹. Algo parecido ocurre con los heterómeros de receptores de dopamina e histamina D₁-H₃, donde también se da un cambio de acoplamiento de G_i a G_s dependiente de la dimerización⁴². Asimismo, la dimerización también puede favorecer el acoplamiento de un transductor sobre otro, dando lugar a un sesgo de la señalización. Por ejemplo, Liu y colaboradores observaron que la oligomerización del receptor del factor activador de plaquetas inducía un sesgo hacia la activación de proteínas G, aumentando la señalización mediada por proteínas G y disminuyendo el reclutamiento de β-arrestina en células HEK293 y COS-7⁴³.



Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Figura I.7. Funciones de la oligomerización en GPCRs. Se ha reportado un importante rol de la oligomerización en biogénesis, en diversidad funcional al alterar la afinidad por ligando y la subsiguiente respuesta celular y en procesos de internalización del receptor. L= Ligando. Imagen modificada de ³².

Además de en señalización en membrana plasmática, se ha descrito un papel de la oligomerización en procesos como el tráfico intracelular, participando en la biogénesis de los GPCRs, facilitando su transporte desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática y regulando su internalización durante la endocitosis (Figura I.7). Por ejemplo, en GPCRs de clase C se sabe que para su llegada a membrana COPI se acopla a un protómero en el retículo endoplasmático y se libera cuando interacciona con el otro protómero⁴⁴. Esto también se ha descrito para algunos GPCRs de clase A, siendo la homodimerización del receptor dopaminérgico D₄, del receptor adrenérgico β₂ o la heterodimerización de receptores α_{1B}-α_{1D} determinante para la exportación del receptor desde el retículo endoplasmático y su llegada a la superficie celular⁴⁵⁻⁴⁸.

Si bien actualmente se acepta que los GPCRs de clase A también pueden formar dímeros, su naturaleza transitoria y dinámica dificulta su caracterización y la determinación de su relevancia biológica, existiendo resultados contradictorios entre laboratorios acerca de la formación de oligómeros de estos receptores. Esta controversia en torno a la existencia y relevancia funcional de oligómeros de GPCR se debe en gran medida a la dificultad de establecer de manera inequívoca las interacciones entre los receptores. Clásicamente, el estudio de la oligomerización se ha basado en ensayos de co-inmunoprecipitación, un método indirecto que implica la extracción de los receptores de las membranas y puede verse afectado por interacciones con otras proteínas, y ensayos biofísicos de transferencia de energía de resonancia (RET) en sistemas heterólogos, con sobre-expresión del receptor y basados en proximidad, no demostrando una interacción directa⁴⁹.

Según los criterios establecidos por la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR), la formación de un dímero de GPCR requiere la interacción física de los receptores y no a través de proteínas adaptadoras siendo las funciones emergentes

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

consecuencia directa de su interacción y no derivadas de un cruce de señales intracelulares. Además, debe demostrarse su existencia en tejidos y células nativas, así como observarse cambios funcionales cuando se elimina uno de los protómeros en animales para confirmar su relevancia fisiológica⁵⁰. Sin embargo, los mecanismos alóstéricos que rigen la formación de estos complejos proteicos se desconocen.

En la literatura se han reportado estructuras cristalinas homodiméricas paralelas para el receptor de rodopsina, el receptor de quimiocina CXCR4, receptores de adenosina, receptores opioides o el receptor adrenérgico β_1 , observándose diferentes interfaces de dimerización, distintas a las empleadas por GPCRs de clase C que requieren de la forma dimérica para ejercer su función⁵¹. Sin embargo, se desconoce si las interfaces observadas son biológicas o son simplemente contactos necesarios para la formación del cristal, pudiendo las condiciones de cristalización o las altas concentraciones de proteína empleadas favorecer la formación de dímeros no fisiológicos, no habiéndose demostrado la existencia de ninguna de estas estructuras *in vivo*. Un estudio reciente resolvió por crio-microscopía electrónica de partícula única (crio-ME) la estructura de un dímero de rodopsina en nanodiscos, aunque para visualizar la interfaz de dimerización fue necesario estabilizar estos complejos mediante entrecruzamiento covalente⁵². Posteriormente, se resolvió la estructura de un dímero del receptor de apelina acoplado a una proteína G mediante crio-ME a una resolución de 3,6 Å⁵³, apoyando la hipótesis de una comunicación alóstérica dentro del dímero, donde sólo un protómero se acopla a la proteína transductora. Sin embargo, también se ha descrito el acoplamiento simultáneo de dos proteínas G a un dímero en el receptor fúngico Ste2 (GPCR de clase D), sugiriendo la existencia de más de un mecanismo de señalización⁵⁴.

Además, se ha propuesto que los GPCRs no sólo dimerizan, sino que pueden formar oligómeros de mayor orden, habiéndose descrito recientemente por crio-ME las estructuras de trímeros y tetrámeros del receptor de quimiocina CXCR4 en detergente⁵⁵.

1.2 GPCRs como diana terapéutica

1.2.1 Relevancia farmacológica

Actualmente, más de un 34 % de los fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) están dirigidos a GPCRs. Debido a su localización en membrana plasmática y su amplia distribución y diversidad, los GPCRs se han constituido como clásicas dianas terapéuticas para una gran variedad de enfermedades como la alergia, enfermedades neurológicas, enfermedades cardiovasculares, tratamiento del dolor o diabetes entre otras^{56,57}. Hasta 2020 se aprobaron más de 500 fármacos para 107 GPCRs diferentes, dirigidos especialmente a receptores aminérgicos (receptores de dopamina, serotonina, histamina, acetilcolina, aminas intermedias, (nor)adrenalina) y opioides, encontrándose 500 nuevos fármacos en fase de ensayo clínico⁵⁶ (Figura I.8).

Sin embargo, más de la mitad de los GPCRs identificados aún no han sido explotados terapéuticamente⁵⁶⁻⁵⁹. Algunos ejemplos de fármacos conocidos son la cariprazina (Vraylar®) que se une a D₂R y al receptor de dopamina D₃ (D₃R) para tratar la esquizofrenia, el naloxegol (Movantik®) y naldemedina (Symproic®) que se unen a receptores μ-opioides para combatir el estreñimiento, refefenacina (Yupelri®) indicado para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que se une a receptores muscarínicos de acetilcolina o el brexpipazol (rexulti®) que se usa como antidepresivo actuando a través de receptores de serotonina 5HT_{2A}, 5HT_{1A}, 5HT₇ y D₂R^{56,59}.

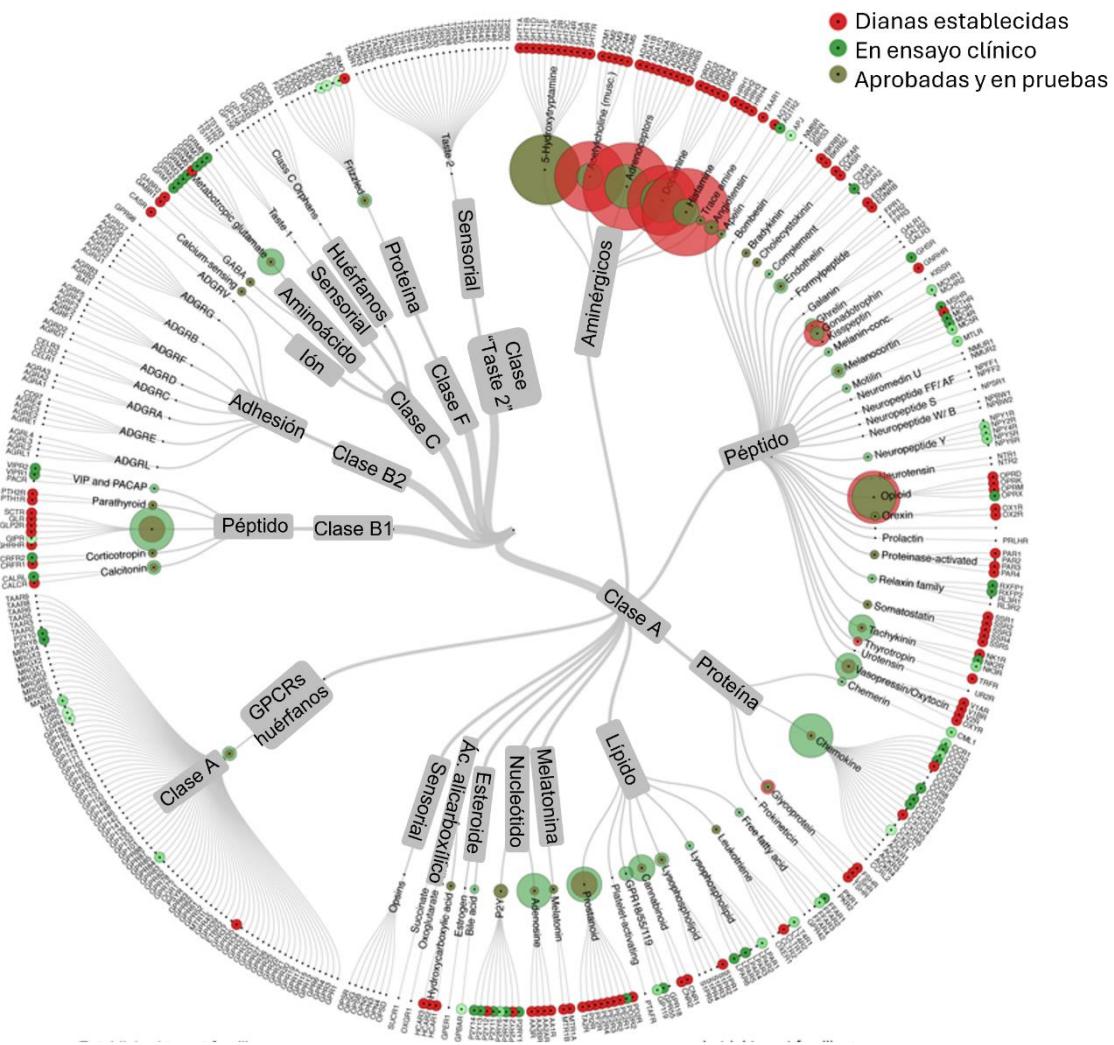


Figura I.8.Dianas farmacológicas de GPCRs establecidas. En rojo se muestran dianas con fármacos aprobados y en verde aquellas que presentan fármacos en fase de ensayo clínico. Imagen modificada de⁵⁶.

1.2.2 Desafíos y oportunidades en el desarrollo de fármacos dirigidos a GPCRs

Desde un punto de vista farmacológico la complejidad inherente a la señalización de GPCRs dificulta el desarrollo de fármacos, siendo el principal cuello de botella la traslación de los resultados preclínicos obtenidos para un fármaco en el laboratorio a la clínica, donde no presentan los efectos esperados. De hecho, sólo un 29 % de los

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

fármacos consiguen superar la fase III de ensayo clínico⁵⁶, lo que exige un conocimiento más profundo acerca de los mecanismos que subyacen a la señalización mediada por estos receptores.

Uno de los grandes desafíos que presenta el desarrollo de fármacos para GPCRs es la obtención de fármacos selectivos, que actúen exclusivamente sobre el receptor de interés. Esto resulta especialmente complicado en ciertos subgrupos de GPCRs que además de una alta similitud estructural comparten una alta conservación a nivel de secuencia, especialmente en el sitio de unión a ligando, también conocido como sitio ortostérico (OBS). Este es el caso de los receptores aminérgicos, diana farmacológica del 25 % de los fármacos dirigidos a GPCRs, donde la alta conservación en el OBS favorece a nivel fisiológico la interacción promiscua de monoaminas endógenas con varios receptores de la familia y la subsiguiente activación de sus rutas de señalización⁶⁰⁻⁶³. Esta promiscuidad también es característica de los fármacos dirigidos frente a estos receptores (Figura I.9), lo que ocasiona generalmente efectos secundarios⁶⁴.

Fármaco	Receptores	Enfermedad
Flibanserina	5-HT _{2A} , 5-HT _{1A}	Trastorno hipoactivo de deseo sexual
Cariprazina	D ₂ ,D ₃	Esquizofrenia
Aripiprazol	5-HT _{1A} ,5-HT _{2A} ,D ₂	Esquizofrenia
Droxidopa	ADB1-3,ADA2A-C,ADA1A,ADA1B,ADA1D	Hipotensión
Pramipexol	D ₂ ,D ₃	Enfermedad de Parkinson
Ropinirol	D ₂ ,D ₃	Enfermedad de Parkinson

Figura I.9. Promiscuidad de fármacos dirigidos a GPCRs aminérgicos.

Por ejemplo, varios fármacos antidepresivos y antipsicóticos cuya diana principal son los receptores dopaminérgicos, también son antagonistas de los receptores α₁ adrenérgicos, lo que contribuye a efectos secundarios como la hipotensión ortostática⁶⁵. De manera similar, agonistas del receptor muscarínico M₁, con un gran potencial para tratar el deterioro cognitivo durante la neurodegeneración, también se unen inespecíficamente a otros subtipos de receptores muscarínicos como M₂ y M₃, lo que deriva en la aparición de alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares⁶⁶. También existen casos en los que la interacción promiscua resulta beneficiosa,

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

habiéndose reportado que los antipsicóticos más eficaces son aquellos que se dirigen a múltiples GPCRs⁶⁷. Sin embargo, la alta conservación estructural y de secuencia en el OBS de receptores aminérgicos hace que el diseño racional para ambos tipos de fármacos sea complicado.

Por otro lado, además de actuar sobre el receptor de interés, la farmacología persigue el desarrollo de fármacos que actúen sólo sobre la ruta que confiera los efectos terapéuticos, evitando la activación de otras cascadas de señalización no deseadas que puedan derivar en la aparición de efectos secundarios. La capacidad de ciertos ligandos de modular selectivamente la activación de una u otra vía de señalización (agonismo sesgado) puede ser aprovechada por fármacos para activar solo determinadas rutas de señalización (responsables de los efectos terapéuticos) sin alterar otras rutas no deseadas. Por ejemplo, se ha demostrado en modelos celulares y animales que ligandos del receptor de angiotensina 1 con sesgo hacia la β-arrestina (SII-AngII, S1I8, TRV023 y TRV027) ofrecen beneficios cardiovasculares al bloquear la señalización de la proteína G y mantener la señalización de la β-arrestina⁶⁸. Por otro lado, en el receptor GPR109A los agonistas con sesgo hacia proteína G podrían ofrecer alternativas a la niacina (fármaco actual en arteroesclerosis), reduciendo efectos secundarios como el enrojecimiento, asociado a la señalización mediada por la β-arrestina en un modelo de ratón⁶⁹. Sin embargo, donde más se ha estudiado los efectos del agonismo sesgado ha sido en receptores opioides, donde estudios en animales y humanos sugieren que la señalización de la proteína G media principalmente la eficacia analgésica, mientras que la señalización de la β-arrestina interviene en muchos de los efectos adversos como depresión respiratoria, estreñimiento, tolerancia o adicción³⁵. Esto ha derivado en los últimos años al desarrollo de nuevos analgésicos como la oliceridina, aprobada en 2020 como Olynvik®, y compuestos como el PZM21 y el SR-17018 en fase preclínica, todos descritos como agonistas selectivos de receptores μ opioides y con sesgo a proteína G^{70,71}. Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que sus efectos terapéuticos vienen derivados de su acción como agonistas parciales, demostrando la complejidad técnica de caracterizar el sesgo de un ligando de una manera precisa y reproducible^{72,73}. Recientemente, Daibani y colaboradores determinaron la estructura del receptor κ opioide acoplado a la nalfurafina (Remitch®), un fármaco aprobado en la clínica para el

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

tratamiento del prurito urémico en individuos con enfermedad renal crónica en Japón. Este fármaco se une selectivamente al receptor κ opioide activando preferentemente la vía de la proteína G frente a la activación de la β-arrestina⁷⁴. Sin embargo, la nalfurafina no recibió la aprobación de la EMA ni la FDA por falta de eficacia clínica, siendo el traslado de los resultados obtenidos *in vitro* a la clínica el principal cuello de botella en el desarrollo de fármacos. La determinación estructural, junto con las simulaciones de dinámica molecular (MD) y ensayos funcionales pueden ayudar en la determinación del mecanismo del sesgo y desarrollo de fármacos más eficaces. En los últimos años se han resuelto diferentes estructuras de GPCRs unidas a agonistas con sesgo y acoplados a proteínas G o β-arrestinas reportando diferentes regiones críticas para el sesgo. Sin embargo, si estos mecanismos son comunes a todos los GPCRs o específicos de receptor aún se desconoce, lo que dificulta el diseño racional de fármacos con estas propiedades.

Por otra parte, el estudio de la oligomerización de GPCRs y su significancia funcional también son de alto interés en la farmacología, donde el desarrollo de fármacos podría explorar la modulación directa de la oligomerización o la selección de oligómeros con propiedades farmacológicas únicas. Esto último permitiría, por ejemplo, desarrollar fármacos que actúen selectivamente sobre dímeros localizados en vías de neurotransmisión específicas sin afectar a monómeros presentes en otras vías de neurotransmisión. Por ejemplo, en el tejido estriado “post-mortem” de pacientes con esquizofrenia se ha descrito una expresión significativamente mayor de dímeros de D₂R y D₃R con respecto a las especies monoméricas, sugiriendo que la regulación de la oligomerización es crítica en la enfermedad⁷⁵. Por otro lado, Gomes y colaboradores reportaron que el ligando CYM51010 induce la dimerización de receptores μ y δ opioides, presentando el heterodímero un sesgo en la señalización por proteína G, responsable de los efectos analgésicos sin ocasionar los graves efectos secundarios asociados a los opiáceos clínicos convencionales en ratones⁷⁶.

Sin embargo, aún se desconocen los residuos específicos que conforman las interfaces de los oligómeros de GPCRs, existiendo actualmente sólo una estructura GPCR dimérica acoplada a proteína G a alta resolución⁵³. Asimismo, la universalidad de la

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

oligomerización y su regulación por ligandos aún no están claras, dificultando el diseño racional de fármacos selectivos frente a estas especies oligoméricas.

1.3 Receptores de dopamina

Los receptores de dopamina forman parte del grupo de los receptores aminérgicos y constituyen una de las familias de GPCRs más estudiadas. Presentan como neurotransmisor endógeno la dopamina y se expresan mayoritariamente en el sistema nervioso central donde participan en una amplia variedad de funciones cerebrales siendo su desregulación asociada a la aparición de diversas enfermedades neurológicas (Enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, trastorno bipolar, adicción, síndrome de las piernas inquietas...)⁷⁷. Existen 5 tipos de receptores dopaminérgicos (D₁R, D₂R, D₃R, D₄R y D₅R) que se clasifican en dos grandes grupos: D₁ (D₁R, D₅R) y D₂ (D₂R, D₃R, D₄R) en función de sus propiedades farmacológicas y modulación del AMPc^{77,78}. Los receptores del grupo D₁ se localizan en regiones postsinápticas de neuronas dopaminérgicas y se acoplan a proteínas G_s, estimulando la producción de AMPc, que a su vez conduce a la producción de la proteína quinasa A, y a la transcripción en el núcleo. Por otro lado, los receptores de clase D₂ se expresan en regiones pre- y postsinápticas a excepción del D₄R que se localiza principalmente en retina y se acoplan a proteínas G_{q/10} de la familia G_{i/o} inhibiendo la formación de AMPc y activando los canales de potasio (K⁺) a través del dímero de G_{βγ} (Figura I.10).

Sin embargo, estos receptores también pueden señalizar por vías independientes a la generación de AMPc. Por ejemplo, se ha demostrado que los receptores de clase D₁ son capaces de acoplarse alternativamente a G_q⁷⁹, promoviendo la señalización por Ca²⁺. También se ha descrito para D₂R y D₃R la activación de mecanismos de señalización mediados por β-arrestina 2, independientes de proteínas G señalizando a través de la proteína quinasa B y la glucógeno sintasa quinasa 3⁷⁷. Además, se ha reportado que D₁R y D₂R pueden interactuar directamente con canales de Ca^{2+⁸⁰} y la ATPasa Na⁺/K⁺⁸¹. La activación de receptores dopaminérgicos también puede promover la activación de otros receptores (transactivación), observándose una activación cruzada de receptores

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

de tirosina quinasa. Algunos ejemplos son la transactivación del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina mediada por D₂R y D₃R⁸², el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β activado por D₄R⁸³ o el receptor del factor de crecimiento epidérmico activado por D₁R y D₂R⁸⁴.

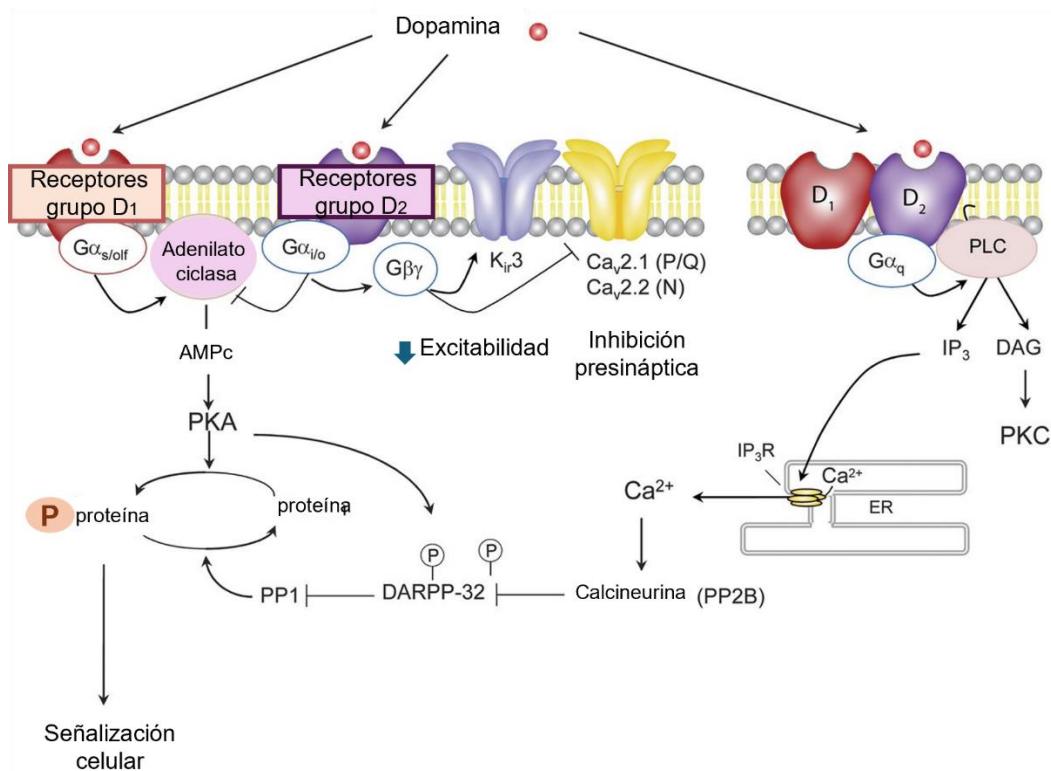


Figura I.10. Señalización mediada por los receptores de dopamina. Imagen modificada de⁸⁵.

Al igual que para otros GPCRs, la literatura también recoge la formación de dímeros entre receptores dopaminérgicos, pudiendo asociarse entre ellos formando homo- y heterodímeros modificando la dimerización las propiedades y funciones de los monómeros^{45,86}. Además, se ha descrito la dimerización de receptores dopaminérgicos, especialmente del D₂R, con otros GPCRs que incluyen receptores de adenosina (con D₁R, D₂R y D₃R), serotoninérgicos, adrenérgicos (con D₄R), de glutamato tipo NMDA (con D₂R y D₁R), de gastrina, de neuropeptido Y (con D₂R y D₃R), de oxitocina, de cannabinoides, de opioides (con D₁R), de histamina (con D₁R y D₂R), de acetilcolina (con D₂R y D₃R), de somatostatina y de aminas intermedias, observándose una diversidad de respuestas celulares y añadiendo un nivel más de complejidad al estudio de la

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

señalización de estos receptores⁸⁷. Sin embargo, existen discrepancias significativas sobre la formación y función de algunos de estos dímeros, habiéndose demostrado la mayoría a través de ensayos RET y co-inmunoprecipitación. Por ejemplo, se ha sugerido que el heterodímero D₁-D₂ puede señalizar a través de la Gα_q^{88,89} (Figura I.10) y aumentar la expresión del receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en neuronas estriatales⁹⁰. Sin embargo, otro estudio a través de ensayos de inmunohistoquímica y ensayos de proximidad en el estriado ventral de roedores y primates mostró que estos receptores no co-localizan, cuestionando la existencia o relevancia funcional de estos heterómeros⁹¹.

1.3.1 Receptor de dopamina 3

El D₃R se clonó en 1990 y pertenece a la familia de receptores tipo D₂⁹². Se han descrito al menos siete isoformas distintas del D₃R generadas mediante empalme alternativo del ARN mensajero de las cuales solo el D₃R completo y una isoforma más corta (D₃S), con 21 aminoácidos menos en el ICL3 reportada en ratón, unen dopamina. Del resto, la mejor caracterizada es la isoforma D3nf que carece de las TM6 y TM7 debido a una delección de 98 pares de bases en el gen DRD3. Sin embargo, su conservación en roedores, primates y humanos sugiere que desempeña una importante función biológica^{93,94}.

A nivel estructural, el D₃R comparte la típica arquitectura de 7 TMs de los GPCRs, siendo su estructura resuelta por primera vez en 2010, en estado inactivo⁹⁵. La dopamina se une al D₃R con una afinidad más de 100 veces superior a la que se une a D₂R o D₁R⁹⁶, lo que sugiere un importante papel del D₃R en la fisiología del cerebro. De hecho, participa en una gran variedad de funciones cerebrales, incluyendo la actividad motora, las emociones, la memoria y los mecanismos de recompensa⁷⁸. Además, presenta una expresión restringida en el cerebro, encontrándose principalmente en el cuerpo estriado ventral y en otras áreas límbicas, donde actúa como autorreceptor presináptico y receptor postsináptico, lo que lo diferencia del resto de receptores de dopamina, excepto del D₂R con quien además presenta una alta homología de

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

secuencia (78% de homología de secuencia en dominios transmembrana y del 100% en el sitio de unión a dopamina) (Figura I.11)^{97,98}. Sin embargo, su localización diferencial⁹⁹ y sus diferentes propiedades de señalización indican que, a pesar de su alto parecido estructural y de secuencia, D₂R y D₃R presentan roles funcionales únicos en el cerebro. Así, si bien el D₃R comparte la mayoría de las vías de señalización con el D₂R, siendo capaz de señalizar tanto por la vía de las proteínas G_{i/o} como por β-arrestina 2, su señalización es de 2 a 5 veces menos eficiente que la del D₂R. Además, se ha descrito que D₃R se acopla preferentemente a G_o frente a G_i, no existiendo esa selectividad por proteína G_{i/o} en D₂R¹⁰⁰. Por otro lado, ambos receptores también presentan mecanismos de desensibilización diferentes, observándose una pronunciada internalización de D₂R dependiente de GRK/β-arrestina 2 mientras que la desensibilización del D₃R parece seguir una vía alternativa, observándose una desensibilización heteróloga mediada por la proteína quinasa C¹⁰¹.

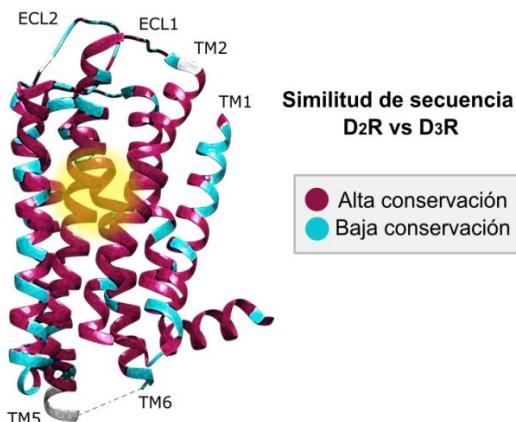


Figura I.11. Conservación de secuencia entre D₂R y D₃R. Se muestra la estructura de D₃R con un código de colores que responde a la conservación de secuencia con el D₂R. En morado se muestran regiones altamente conservadas entre ambos receptores y en turquesa regiones con una mayor diversidad de secuencia. La región en amarillo muestra el OBS, donde se une la dopamina.

Farmacológicamente, el D₃R se postula como una interesante diana terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas. Por ejemplo, su localización clave en el sistema límbico ha establecido al D₃R como principal diana terapéutica para tratar

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

la adicción¹⁰². Por otro lado, antipsicóticos actualmente utilizados para el tratamiento de la esquizofrenia actúan como antagonistas de D₂R y D₃R, dificultando su alta homología estructural y de secuencia la distinción farmacológica entre ambos receptores¹⁰³. Estudios en cerebros “post-mortem” de pacientes con esquizofrenia han demostrado que los niveles de D₃R están elevados en ciertas regiones del cerebro y que la formación de homodímeros de D₃R podría estar asociada a la patogénesis de esta enfermedad⁷⁵. D₂R y D₃R también se han establecido como clásicas dianas terapéuticas en la enfermedad del Parkinson, donde el suministro de fármacos agonistas (pramipexol, rotigotina, apomorfina) con levodopa constituye actualmente el principal tratamiento¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Aunque se unen a ambos receptores, la mayoría de estos fármacos estimulan preferentemente al D₃R. En 2021 se resolvió por primera vez la estructura del D₃R en estado activo y unido al pramipexol mostrando la unión del fármaco en el OBS, compartido por el D₂R¹⁰⁷. En concreto, la activación de D₃R se ha asociado a efectos neurotróficos y neuroprotectores en neuronas dopaminérgicas, promoviendo el aumento en la concentración de dopamina, una disminución de la acumulación de α-sinucleína, un aumento en la secreción de BDNF, una mejora de la neuroinflamación, un alivio del estrés oxidativo, y favoreciendo la neurogénesis¹⁰⁴.

1.4 Objetivos

La señalización a través de GPCRs se presenta como un proceso dinámico, complejo y altamente regulado. Comprender las bases de los mecanismos moleculares que subyacen a la activación y señalización de los GPCRs y cómo diferentes factores como el agonismo sesgado o la oligomerización pueden modularla resulta crucial para entender el funcionamiento y la fisiología de esta importante familia de receptores. Además, este conocimiento puede ayudar al desarrollo racional de nuevos fármacos mejorados. En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo-1. Comprender desde un punto de vista estructural y funcional los mecanismos subyacentes a la selectividad de nuevos fármacos selectivos para el D₃R.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Objetivo-2. Entender las bases moleculares que rigen el acoplamiento preferencial del D₃R a proteína G_O frente a G_i desde un punto de vista estructural y funcional.

Objetivo-3. Comprender las bases moleculares que rigen el sesgo de proteínas G y β-arrestinas en el D₃R y establecer un mecanismo de sesgo.

Objetivo-4. Desarrollar nanoanticuerpos específicos de D₃R como herramientas para estudiar a nivel estructural y/o funcional el D₃R y sus mecanismos de señalización.

Objetivo-5. Establecer un sistema para la determinación inequívoca de la oligomerización en GPCRs.

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

2.1 Clonaje molecular

2.1.1 Ensamblaje in vivo

Todos los constructos generados en este trabajo se obtuvieron utilizando la técnica de clonaje de ensamblaje de ADN *in vivo*^{108,109}. Esta técnica permite la recombinación de fragmentos de ADN lineales a través de regiones terminales homólogas en *Escherichia coli*. El clonaje basado en la recombinación homóloga presenta multitud de ventajas ya que no deja marcas en el fragmento de ADN y es independiente de la secuencia y dirección^{108,109}. Además, al contrario que otras técnicas de recombinación homóloga *in vivo* que requieren de cepas que expresen enzimas recombinantes específicas como Rec-A o fago recombinasas Red-ET, esta técnica se aprovecha de una vía de recombinación presente en multitud de cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el laboratorio^{108,109}. Existen otras técnicas de clonaje basadas en la recombinación homóloga de fragmentos *in vitro* (ensamblaje Gibson, “In-Fusion”), sin embargo, éstas requieren una gran cantidad de pasos y reactivos para permitir la recombinación exógena en el tubo de ensayo.

Para incorporar las secuencias homólogas a los fragmentos de ADN se diseñaron genes sintéticos (fragmentos de ADN lineal bícatenario) con las regiones de homología ya incluidas o se introdujeron con cebadores mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, todos los procedimientos de clonaje (inserción, delección, mutagénesis y sub-clonaje) requirieron del diseño de cebadores con una región 3' que hibridase con el ADN molde (región de unión al ADN molde) y una región 5' homóloga para permitir la posterior recombinación *in vivo* (Figura II.12).

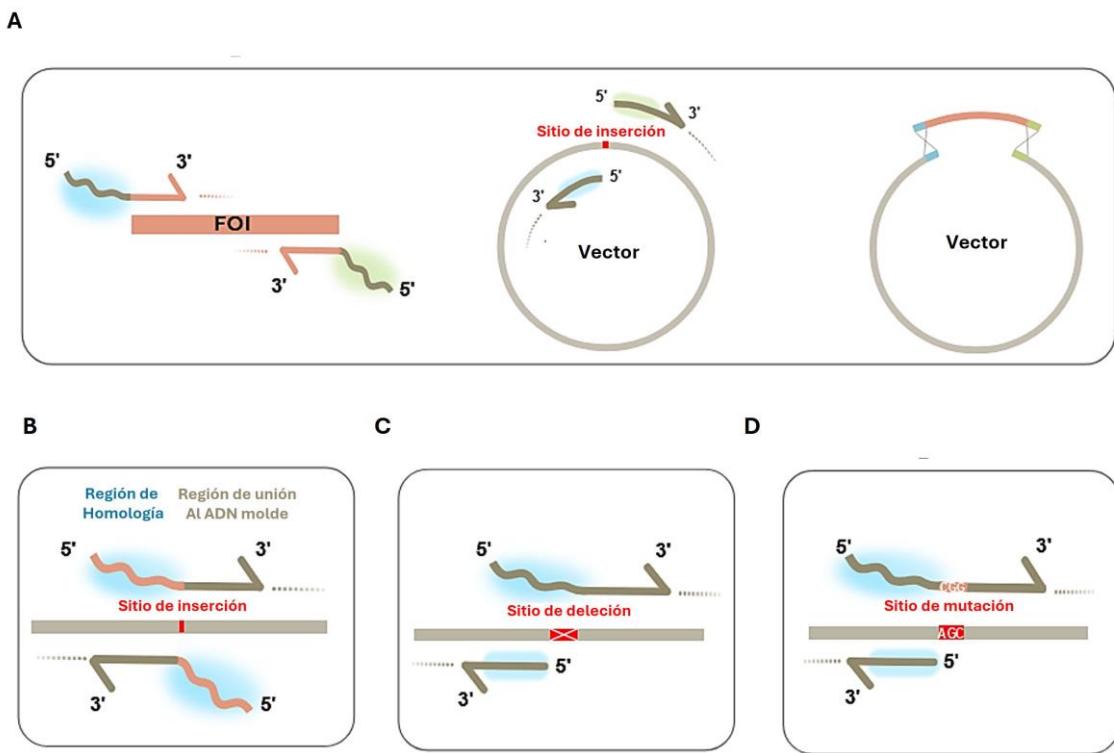


Figura II.12. Diseño de cebadores para la técnica de ensamblaje de ADN in vivo. A) Subclonaje. **B)** Inserción. **C)** Delección. **D)** Mutagénesis. FOI hace referencia al fragmento de ADN de interés. Imagen modificada de¹¹⁰.

Para eliminar el ADN parental, se realizó un tratamiento con la enzima DpnI durante 15 minutos a 37°C y se transformaron células *Escherichia coli* XL-10 Gold® por choque térmico a 42°C. En la bacteria, exonucleasas monocatenarias endógenas convierten los extremos a ADN monocatenario, permitiendo el reconocimiento y recombinación de las regiones de homología sin necesidad de añadir reactivos adicionales^{108,109}. Como resultado, cada colonia contiene copias de un único plásmido que puede ser extraído y purificado para su secuenciación. Para la purificación del ADN plasmídico se utilizó un kit de Miniprep (NzyTech) siguiendo las instrucciones del fabricante y el eluato resultante se mandó a secuenciar (Macrogen) para confirmar la secuencia de ADN. Un protocolo general del proceso de clonaje se describe en la figura II.13.

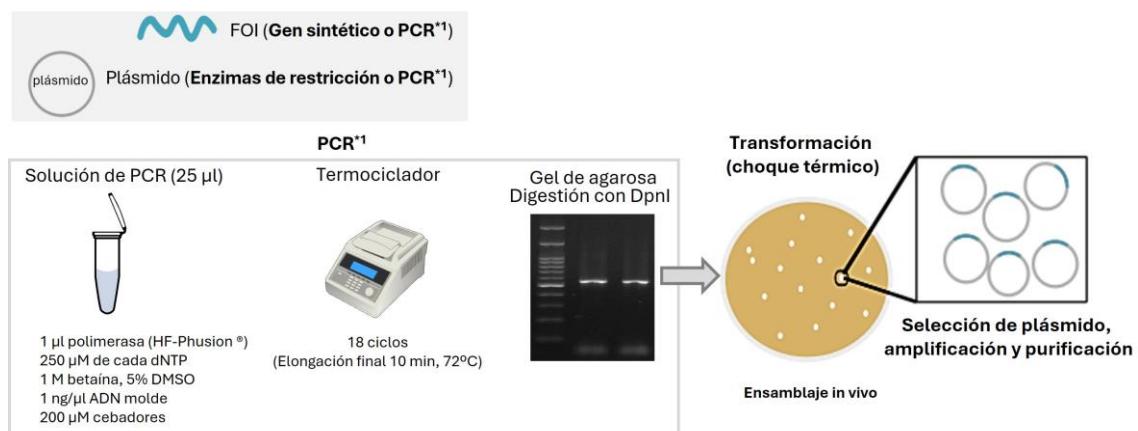


Figura II. 13. Protocolo estándar para el clonaje molecular por recombinación in vivo. Los fragmentos de ADN con las regiones de homología (generados a través de PCR o en forma de genes sintéticos) se transforman por choque térmico en *Escherichia coli*, donde tiene lugar el ensamblaje de ADN. Las colonias resultantes se crecen, purificando el ADN plasmídico y procediendo a su secuenciación. ^{*1} Hace referencia a las condiciones de PCR que se utilizaron para todos los constructos derivados de PCR. FOI: Fragmento de interés. Figura modificada de¹¹¹.

2.1.2 Generación de constructos

Para la generación de baculovirus recombinantes (sección 2.2), los genes sintéticos (Twist Bioscience) del D₃R (L119^{3,41}W) humano y de la subunidad Ga_{OA} humana (S47N, G204A, E246A, M249K y A326S) se clonaron en el pBacPak8. Para el D₃R se diseñó un gen sintético con una secuencia señal de hemaglutinina (HASS) al inicio del gen, para favorecer su tráfico hacia la membrana plasmática. Para permitir su purificación del resto de componentes celulares se fusionaron etiquetas de FLAG e histidinas a los constructos, así como un sitio de reconocimiento y corte para proteasas TEV o 3C. Además, se fusionó en el extremo amino terminal una proteína fluorescente verde (eGFP), permitiendo la evaluación de su expresión mediante microscopía de fluorescencia. Con el fin de mejorar la estabilidad y expresión del D₃R, se introdujo inicialmente la mutación L119^{3,41}W en el receptor, siendo esta variante utilizada en otros estudios estructurales previos⁹⁵. Adicionalmente, se generaron variantes del constructo D₃R sin la etiqueta de histidinas y en su forma salvaje (WT) (Figura II.14).

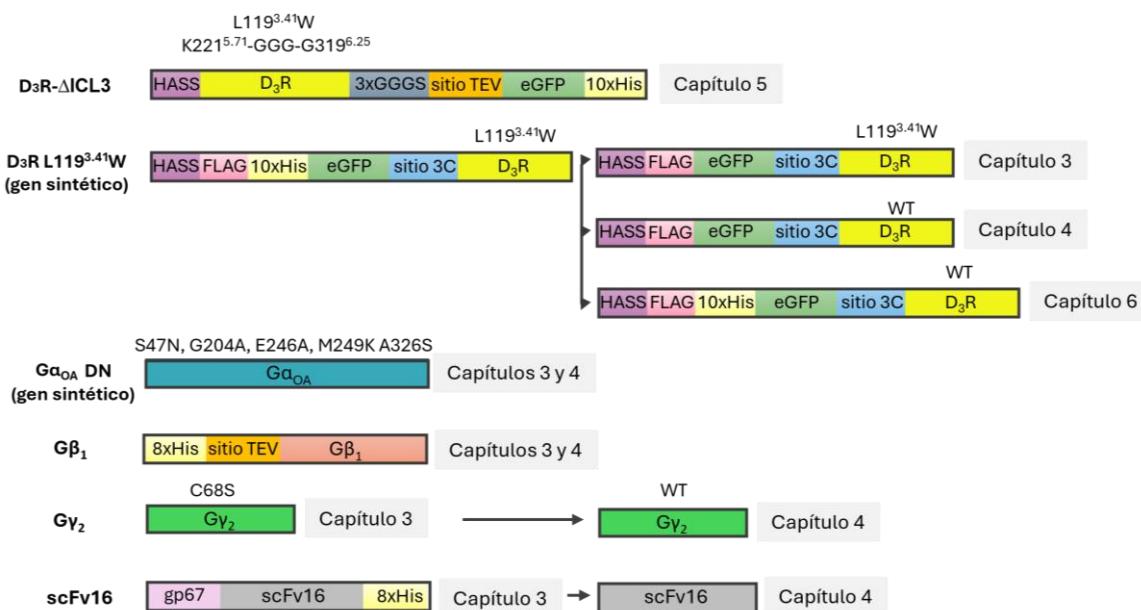


Figura II. 14. Constructos clonados en pBacPak8 para la generación de baculovirus recombinantes. Las diferentes variantes se generaron por la técnica de ensamblaje de ADN in vivo. Para cada una de ellas se indica el capítulo o capítulos de este trabajo en las que se utilizan. La variante D₃R-ΔICL3 era un constructo ya presente en el laboratorio.

Por otro lado, se diseñó un gen sintético para la subunidad Gα_{OA} modificada, incorporando mutaciones que disminuyen la afinidad por nucleótido de la Gα, limitando la disociación del complejo heterotrimérico y el receptor mejorando así la estabilidad del complejo GPCR:Gαβγ. Este tipo de proteínas G, denominadas dominantes negativas, son herramientas ampliamente utilizadas para la determinación estructural de GPCRs en estado activo¹¹². Los baculovirus de Gβ₁, Gγ₂ (C68S) y scFv16 fueron proporcionados por el laboratorio de Christopher G. Tate. El scFv16 se une a la interfaz establecida entre las subunidades Gα_{i/o} y Gβ, ayudando a mejorar la estabilidad del trímero¹¹³. Este constructo se encontraba fusionado a una etiqueta de histidinas y a un péptido señal (gp67) forzando la secreción del scFv16 al medio celular. Por procedimientos de delección, se eliminó el péptido señal y la etiqueta de histidinas en el scFv16 generando una variante de expresión intracelular (Figura II.14). Por otro lado, la mutación C68S en Gγ₂ crea una forma soluble del complejo Gβ₁γ₂ al impedir la

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

geranilgeranilación en la cisteína para su localización en membrana¹¹⁴. Por mutagénesis dirigida se revirtió la mutación consiguiendo su forma WT. Detalles sobre los baculovirus recombinantes utilizados en cada capítulo pueden encontrarse en la figura II.14.

Para los ensayos en células HEK293T (sección 2.3 y 2.7), los genes sintéticos (Gene Twist Bioscience) del D₃R humano y del D₂R (HASS-FLAG-eGFP-3C-D₂R) humano se sub-clonaron en el vector pcDNA4/TO, sobre los que se realizaron todos los mutantes. Por otro lado, para visualizar las vesículas HEK293T con los receptores D₃R y D₂R mediante crio-microscopía electrónica, se diseñaron genes sintéticos del D₃R humano y del D₂R humano fusionados en su extremo amino terminal a una o dos metalotioneínas (MTH) (HASS-FLAG-eGFP-MTH-receptor) y se clonaron en el vector pcDNA4/TO. Las metalotioneínas son metaloproteínas capaces de aceptar entre 20 y 30 átomos de oro, proporcionando un alto contraste en microscopía electrónica¹¹⁵⁻¹¹⁷.

2.2 Producción de GPCRs y complejos de GPCRs para determinación estructural

La expresión y purificación de GPCRs funcionales y homogéneos en cantidades suficientes constituye uno de los principales cuellos de botella para la determinación estructural de estos receptores. Para mantener la funcionalidad del receptor se requieren sistemas de expresión eucariota que garanticen el correcto plegamiento y la presencia de las modificaciones postraduccionales necesarias¹¹⁸. El sistema de expresión por baculovirus es el utilizado por excelencia para la expresión de GPCRs, ya que permite obtener altos niveles de expresión a bajo coste manteniendo la funcionalidad del receptor¹¹⁸. Además, los GPCRs se pueden co-expresar con proteínas G en células de insecto favoreciendo la formación del complejo *in situ*, aumentando la estabilidad del complejo heterotrimérico con el receptor.

En este trabajo se ha utilizado el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto para la producción tanto de receptores aislados como complejos de GPCRs

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

unidos a un heterotrimero de proteínas G. Todos los baculovirus recombinantes generados se han obtenido utilizando el sistema FlashBAC™ ULTRA (Oxford Expression Technologies) en células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9), siguiendo las instrucciones del fabricante. La recombinación de las secuencias homólogas en las células de insecto permite la inserción del fragmento de ADN de interés bajo el control del promotor de la polihedrina (un promotor fuerte), y restaura la función del gen ORF1629, esencial para la replicación, permitiendo que el ADN viral se replique y produzca baculovirus recombinantes a altos niveles (Figura II.15).

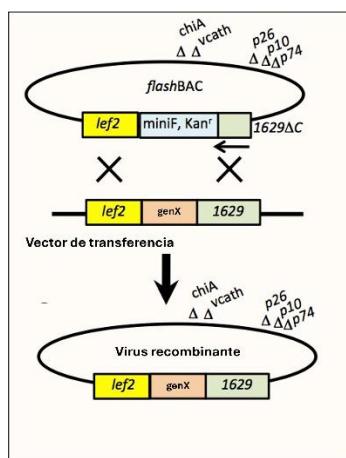


Figura II.15. Sistema de expresión de baculovirus FlashBAC™ ULTRA. Implica la co-transfección (proporción 1:1) de ADN lineal de un baculovirus (*Autographa californica*), genéticamente modificado para impedir su replicación viral, junto con un plásmido de transferencia (en este trabajo pBacPak8) que contiene el fragmento de ADN de interés flanqueado por las regiones de homología. Figura modificada de¹¹⁹.

Tras generar un título elevado de virus, las células de insecto en fase de crecimiento logarítmico se infectaron con los baculovirus recombinantes para estimular la producción de proteínas. Para la expresión de proteínas se utilizaron células *Trichoplusia ni* (Tni) ya que este tipo celular presenta mayores niveles de expresión de proteína que las células Sf9¹²⁰. Tras 48 h, las células se recogieron por centrifugación (700 g, 10 minutos) y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

Para la lisis celular y solubilización, se requiere de la extracción de las membranas de los receptores o sus complejos con proteínas G heterotriméricas sin comprometer su estructura y función. Debido a su naturaleza anfipática, los detergentes permiten la extracción de proteínas de membrana insertándose en la bicapa lipídica y formando micelas, evitando así la desnaturización y agregación del receptor¹²¹. En este trabajo, las muestras se purificaron en presencia de detergente y utilizando cromatografía de afinidad en columna con resina TALON. El cobalto de la resina se une específicamente a etiquetas de histidinas, permitiendo la purificación de constructos fusionados a esta etiqueta. El imidazol compite con las histidinas por la unión al cobalto de la resina, permitiendo la elución de la proteína de interés. Como paso final de purificación, se empleó cromatografía de exclusión molecular, permitiendo aislar por tamaño la proteína de interés. La pureza de la muestra obtenida se verificó mediante electroforesis en gel (sección 2.5.1).

2.2.1 Mantenimiento de cultivos celulares

Las células de insecto Sf9 y Tni se cultivaron en suspensión a 29°C en medio ESF921 (Oxford Expression Systems). Los cultivos se mantuvieron en un incubador no humidificado con agitación orbital a 180 rpm. Los pases celulares se realizaron cada 48 h, de una densidad celular de 2-3 millones de células/ml a 0,5 millones de células/ml.

2.2.2 Expresión y purificación del complejo D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a ligando bitópico FOB02-04A

Se co-infectaron células Tni (2-3 millones de células/ml) con baculovirus de D₃R (HASS-FLAG-eGFP-3C-D₃R L^{3.41W}), Gα_{OA} dominante negativa, 8xHis-Gβ₁ y Gγ₂ (C68S) (relación 1:1:1:1) al 3 % para cada baculovirus y se incubaron a 29°C durante 48 h. A continuación, las células se recogieron y congelaron en nitrógeno líquido almacenándose a -80°C hasta su uso. Para favorecer la formación del complejo in situ, las células se incubaron con 10 μM de FOB02-04A en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

NaCl, 10 % de glicerol, 20 mU/mL de apirasa y cóctel de inhibidores de proteasas durante 30 minutos a 4°C y seguidamente se solubilizaron con el detergente lauril maltosa neopentil glicol 0,5% (p/v) (LMNG, Antrace) suplementado con 0,071% (p/v) de colesterol hemisuccinato (MP Biomedicals™) a 4°C durante 1 h. La muestra se centrifugó para eliminar los restos celulares (3.990 g, 30 minutos) y el sobrenadante se incubó con resina TALON Superflow (GE Healthcare Life Sciences) a 4°C hasta el día siguiente. A continuación, la resina se lavó con 20 volúmenes de columna (VC) de 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, 0,007:0,001% LMNG/CHS, 10 µM FOB02-04A y 5 mM de imidazol, seguidos de 20 CV del mismo tampón con 20 mM de imidazol. La muestra se eluyó con 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, LMNG 0,003%, 10 µM FOB02-04A y 250 mM imidazol. A continuación, el complejo se concentró e incubó con scFv16 puro en una proporción molar de 1:1,1 (FOB02-04A:D₃R:Gαβγ: scFv16) a 4°C durante 30 minutos. El complejo multiproteico resultante se purificó con una columna Superosa 6 Increase 10/300 GL (Cytiva) equilibrada en 20 mM HEPES pH 7,5, 25 mM NaCl, 0,003:0,0004% LMNG/CHS y 10 µM FOB02-04A. La pureza se verificó mediante análisis de fluorescencia en geles “stain free” (sección 2.5.1) con un Chemidoc. La proteína pura se concentró a 2,8 mg/ml y se añadió el ligando FOB02-04A hasta una concentración final de 50 µM.

2.2.3 Expresión y purificación de los complejos D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a ligando bitópico AB04-88 y SK-609

Se co-infectaron células Tni (2-3 millones de células/ml) con baculovirus de D₃R (HASS-FLAG-eGFP-3C-D₃R WT), Gα_{OA} dominante negativa, 8xHis-Gβ₁, Gγ₂ y scFv16 (relación 1:1:1:1:1) al 3 % cada baculovirus y se incubaron a 29°C durante 48 h. A continuación, el sedimento celular se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso. Como paso previo a la lisis celular, las células se incubaron con 10 µM de ligando AB04-88 o SK-609 en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, 20 mU/mL de apirasa y cóctel de inhibidores de proteasas durante 30 minutos a 4°C para favorecer la formación del complejo del receptor con el heterotrimero de proteínas G y el scFv16. Para la solubilización, se añadió LMNG al 0,5% (p/v)

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

suplementado con CHS al 0,071% (p/v) y se dejó incubar a 4°C durante 1 h. La suspensión se centrifugó (3.990 g, 30 minutos) y el sobrenadante se incubó con resina TALON Superflow (GE Healthcare Life Sciences) a 4°C. Al día siguiente, la resina se lavó con 20 VC de 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, 0,007:0,001% LMNG/CHS, 10 µM de ligando y 5 mM de imidazol, seguidos de 20 VC del mismo tampón con 20 mM de imidazol. La muestra se eluyó con 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, LMNG 0,003%, 10 µM de ligando y 250 mM imidazol. A continuación, el complejo se concentró e incubó a 4°C durante 30 minutos con scFv16 puro en una proporción molar de 8:1 ($D_3R-Ga\beta\gamma$:scFv16) para garantizar la presencia y unión de scFv16 en los complejos de $D_3R-Ga\beta\gamma$:scFv16. La muestra se purificó con una columna Superosa 6 Increase 10/300 GL (Cytiva) equilibrada en 20 mM HEPES pH 7,5, 25 mM NaCl, 0,003:0,0004% LMNG/CHS y 10 µM de ligando. La pureza de la muestra se verificó mediante análisis de fluorescencia en geles “stain free” (sección 2.5.1) con un Chemidoc. La proteína pura se concentró a 2,3 mg/ml y se saturó con 40 µM de ligando (AB04-88 o SK-609).

2.2.4 Expresión y purificación de dímeros de D_3R unidos a ligando bivalente

C13

Se infectaron células Tni (2-3 millones de células/ml) al 3 % con el baculovirus de D_3R (HASS-FLAG-10xHis-eGFP-3C- D_3R WT) y tras 48 h el sedimento celular se recogió e incubó con 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol y cóctel de inhibidores de proteasas con 5 µM de ligando bivalente C13 durante 30 minutos a 4°C. Para la lisis celular, se utilizó LMNG 0,5% (p/v) suplementado con 0,071% (p/v) de CHS a 4°C durante 1 h. A continuación, la muestra se centrifugó a 3.990 g durante 30 minutos y el sobrenadante se incubó con resina TALON Superflow (GE Healthcare Life Sciences) durante 4 h a 4°C. Tras dos pasos de lavado con 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM de NaCl, 10 % de glicerol, 1 µM de ligando bivalente C13 y 0,007:0,001% LMNG/CHS con 5 mM y 20 mM de imidazol (40 VC), la muestra se eluyó en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, 1 µM de ligando bivalente C13, 0,003:0,0004% LMNG/CHS y 250 mM de imidazol. La muestra concentrada se cargó en

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

una columna Superosa 10/300 GL (Cytiva) equilibrada con 20 mM HEPES pH 7,5, 25 mM NaCl, 0,003:0,0004% LMNG/CHS y 1 µM de ligando bivalente C13. La superposición de varios picos en el cromatograma dificultó la identificación de la especie dimérica, por lo que las fracciones resultantes se incubaron con proteasa pura 10xHis-3C (proporción molar 1:10, proteasa:D₃R) durante 4 h a 4°C. A continuación, la muestra se cargó en una columna de níquel (Cytiva) equilibrada en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, LMNG 0,003% y 5 µM de ligando bivalente C13. Al perder la etiqueta de histidinas tras el corte con la proteasa, sólo la 10xHis-3C interaccionó con la columna, eluyendo el D₃R en el sobrenadante (purificación negativa). La pureza y la presencia de dímero en solución se verificaron por electroforesis en gel nativo (sección 2.5.2). La muestra se concentró y la proteína pura (1,13 mg/ml) se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.2.5 Generación de proteoliposomas de D₃R

2.2.5.1 Expresión y purificación del D₃R en detergente

Se infectaron células Tni (2-3 millones de células/ml) al 3 % con el baculovirus de D₃R (HASS-FLAG-10xHis-eGFP-3C-D₃R WT) y tras 48 h se recogió y congeló en nitrógeno líquido el sedimento celular. Las células se solubilizaron con el detergente Dodecil-Beta-Maltósido 0,5% (p/v) (DDM, Anatrace) suplementado con 0,071% (p/v) de CHS en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl y cóctel de inhibidores de proteasas. La muestra clarificada (3.990 g, 30 minutos) se incubó con resina TALON Superflow (GE Healthcare Life Sciences) a 4°C hasta el día siguiente. Tras realizar dos pasos de lavado con 20 VC de HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,03:0,004% DDM/CHS con 5 mM y 20 mM de imidazol respectivamente, la muestra se eluyó en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, DDM 0,03% y 250 mM de imidazol. La muestra concentrada se cargó en una columna Superosa 10/300 GL (Cytiva) equilibrada en 20 mM HEPES pH 7,5, 25 mM NaCl, 0,003:0,0004% DDM/CHS. La pureza se verificó mediante análisis de fluorescencia en geles “stain free” (sección 2.5.1) con un Chemidoc. La proteína pura (1,2 mg/ml) se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.2.5.2 Preparación de liposomas

Para la preparación de liposomas, se utilizó el método por hidratación en capa fina¹²². Lípidos de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) se disolvieron en cloroformo (31,8 mM) y 125 µl se sometieron a evaporación en un rotavapor a 50°C. Tras la evaporación del disolvente, los lípidos se hidrataron en 50 mM Tris y 200 mM NaCl favoreciendo la formación espontánea de los liposomas. A continuación, los liposomas de DOPC (2mM) se sometieron a 5 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

2.2.5.3 Reconstitución del D₃R en liposomas y purificación de proteoliposomas

Los liposomas de DOPC se incubaron a temperatura ambiente con detergente DDM (proporción molar 1:1). Tras 3 h, los liposomas se sometieron a un proceso de extrusión de 30 ciclos en el que la mezcla lipídica se pasó repetidamente por un mini extrusor (Avanti Polar Lipids) con un filtro de policarbonato de 200 nm, para conseguir su homogeneización y unilameridad. Seguidamente, el D₃R purificado en DDM (sección 2.2.5.1) se incubó con la mezcla lipídica (proporción molar 1:50, D₃R:DOPC) durante 1 h a 4°C. Para eliminar el detergente, la muestra se incubó dos veces con Bio-Beads®SM (Biorad) (proporción en peso 10:1, adsorbente:DDM) durante 1 h y 30 minutos a 4°C. A continuación, la muestra se incubó con resina TALON Superflow (GE Healthcare Life Sciences) durante 1 h a 4°C para aislar los proteoliposomas de los liposomas vacíos. Tras dos pasos de lavado con 50 mM Tris pH 7,5, 200 mM de NaCl con 5 mM y 20 mM de imidazol (40 VC), la muestra se eluyó en 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl y 250 mM de imidazol. Los proteoliposomas se recuperaron por centrifugación (21.000 g, 45 minutos) y se resuspendieron en 50 mM Tris y 150 mM de NaCl.

2.3 Producción de vesículas con D₃R derivadas de células HEK293T para determinación estructural

Las vesículas gigantes derivadas de la membrana plasmática (GMPVs) carecen de citoesqueleto y son representativas de la composición nativa y organización de la membrana plasmática^{123–125}, permitiendo la transfección de D₃R en células HEK293T y la formación de vesículas de membrana el estudio del receptor en un sistema nativo.

2.3.1 Mantenimiento de cultivos celulares

Las células HEK293T se cultivaron en adherencia con medio DMEM con 10 % (v/v) de suero bovino fetal, suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂. Los pases celulares se realizaron cada 48 h, con diluciones 1/5.

2.3.2 Generación de GMPVs con D₃R

Se transfecaron de manera transitoria células HEK293T (2-3 millones de células/ml) en un flask T75 con el constructo de D₃R fusionado a MTH (HASS-FLAG-eGFP-MTH-D₃R WT). La polietilamina (PEI) se utilizó como agente de transfección en proporción 2:1 (PEI MAX®: ADN) y se incubó a 37°C y 5 % de CO₂. Pasadas 48 h desde la transfección, las células se lavaron por duplicado con un tampón fosfato salino 1X (PBS) hipotónico (1,06 mM KH₂PO₄, 2,97 mM Na₂HPO₄ y 155 mM NaCl) diluido al 30 % con agua ultrapura milliQ® estéril. A continuación, las células se incubaron con un tampón hiperosmótico (200 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,75 mM CaCl₂, 100 mM bicina pH 8,5) a 37°C y 5 % de CO₂ hasta el día siguiente para la generación de vesículas. Este método de vesiculación utiliza un lavado hipotónico, seguido de una incubación con un tampón osmótico que estresa las células para que produzcan vesículas (de 5 a 25 µm de tamaño) sin llegar a su ruptura¹²⁶. A continuación, se recogió el sobrenadante y se centrifugó para eliminar los restos celulares (200 g, 10 minutos).

2.3.3 Marcaje de MTH y recogida de vesículas

El sobrenadante con los GMPVs se trató durante 15 minutos en oscuridad con 1 mM de AuCl para permitir el marcaje de la MTH. La incorporación del oro genera un alto contraste en el microscopio electrónico, permitiendo detectar un único receptor entre el material biológico que se encuentra en las membranas celulares^{115,127}. A continuación, la muestra se sometió a un proceso de extrusión de 30 ciclos con un mini extrusor (Avanti Polar lipids) utilizando un filtro de 200 nm para homogeneizarlas y permitir su entrada en la rejilla de microscopía. La muestra extruida se centrifugó por duplicado (21.000 g, 45 minutos) y el sedimento celular se resuspendió en 10-20 µl para la preparación de rejillas de crio-microscopía electrónica.

2.4 Producción de nanoanticuerpos específicos a D₃R

El proceso de descubrimiento y producción de nanoanticuerpos comprende la preparación del inmunógeno, inmunización de la llama, obtención de los clones de nanoanticuerpos generados y su selección, cribado y validación¹²⁸. El proceso de inmunización y cribado de los nanoanticuerpos fue realizado por Alison Lundqvist en el centro de Biología Estructural VIV-VUB (INSTRUCT-ERIC, Bélgica)¹²⁸.

2.4.1 Expresión y purificación del D₃R-ΔICL3

Para la inmunización de la llama, se purificó en detergente LMNG el constructo D₃R-ΔICL3 (HASS-D₃R L^{3,41}W ΔICL3-GGG-TEV-eGFP-10xHis). Según lo descrito para la producción de GPCRs (sección 2.2), se infectaron células Tni (2-3 millones de células/ml) al 3 % con el baculovirus de D₃R-ΔICL3 y tras 48 h se recogió y congeló en nitrógeno líquido el sedimento celular. Las células se incubaron en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, 5 µM de eticloprida y cóctel de inhibidores de proteasas durante 30 minutos a 4°C y seguidamente se solubilizaron con LMNG al 0,5% (p/v) suplementado con 0,071% (p/v) de CHS a 4°C durante 1 h. La muestra se clarificó

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

por centrifugación (3.990 g, 30 minutos) y se incubó con resina TALON Superflow (GE Healthcare Life Sciences) durante 1 h a 4°C. Para eliminar interacciones inespecíficas de otras proteínas, se realizaron dos pasos de lavado con 20 VC con 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM de NaCl, 10 % de glicerol y 0,007:0,001% LMNG/CHS con 5 mM y 20 mM de imidazol respectivamente. A continuación, la muestra se eluyó en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, LMNG 0,003% y 250 mM de imidazol. El imidazol se retiró con una columna Sephadex™ G-25 y la muestra diluida se incubó con proteasa 10xHis-TEV pura (proporción molar 1:10, proteasa: D₃R) hasta el día siguiente. A continuación, la muestra se concentró y cargó en una columna Superdex 200 Increase 10/300 (Cytiva) equilibrada en 20 mM HEPES pH 7,5, 25 mM NaCl y 0,003:0,0004% LMNG/CHS. La pureza de la muestra obtenida se verificó mediante electroforesis en gel “stain-free” (sección 2.5.1). La proteína pura se concentró a 1,5 mg/ml y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.4.2 Expresión y purificación de nanoanticuerpos dirigidos a D₃R

La inmunización y posterior cribado de los nanoanticuerpos derivó en la obtención de 22 clones positivos para la unión de D₃R en ensayos ELISA. Para la expresión de los nanoanticuerpos (clonados en el vector pMEsy4) se utilizó el sistema de expresión periplásmica inducida por Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) en cepas WK6 de *Escherichia coli*. Para cada nanoanticuerpo, se inocularon 40 ml de precultivo a 1 L de cultivo LB con 2 % de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 170 rpm 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,7-0,8, donde se indujo con 1 mM de IPTG y se dejó incubar a 170 rpm a 28°C hasta el día siguiente. A continuación, el sedimento celular se recogió, congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso. Las células se solubilizaron por choque osmótico resuspendiendo el sedimento celular con 15 ml de 200 mM Tris, 0,65 mM EDTA y 500 mM de sacarosa. Tras 1 h, se añadieron 30 ml de 50 mM Tris, 0,1625 mM EDTA y 125 mM de sacarosa y se dejó incubar durante 45 minutos a 4°C. La lisis por choque osmótico permite la ruptura de las paredes celulares sin llegar a romper las células consiguiendo así la solubilización exclusiva del contenido periplásmico¹²⁸. La muestra se centrifugó (10.000 g, 30 minutos) para eliminar los

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

restos celulares y se cargó el extracto periplásmico en una columna de níquel (Cytiva) equilibrada en 20 mM Tris pH 7,5 y 150 mM de NaCl. Los nanoanticuerpos proporcionados estaban fusionados en su extremo carboxilo terminal a una etiqueta de histidinas (6xHis) permitiendo la purificación del nanoanticuerpo. La columna se lavó con el mismo tampón de equilibrado suplementado con 5 mM y 20 mM de imidazol (10 VC) y la muestra se eluyó en 20 mM Tris pH 7,5 y 150 mM NaCl. Se verificó la pureza mediante electroforesis “stain-free” (sección 2.5.1) y la proteína pura se concentró y almacenó a -80°C hasta su uso.

2.4.3 Inmunoprecipitación de D₃R: nanoanticuerpo

La validación de la interacción de los nanoanticuerpos con el D₃R se llevó a cabo en el laboratorio mediante ensayos de inmunoprecipitación seguida de inmunodetección por “Western Blot” (sección 2.5.3). Los nanoanticuerpos puros (diluidos a 2 mg/ml) se incubaron con solubilizados de D₃R (HASS-FLAG-eGFP-3C-D₃R WT) durante 1 h a 4°C para permitir la formación del complejo D₃R-nanoanticuerpo y la muestra se cargó en una resina FLAG equilibrada en 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol y 0,007:0,001% de LMNG/CHS. El constructo D₃R presenta en su amino terminal una etiqueta FLAG (DYKDDDDK) que es reconocida por un anticuerpo anti-FLAG anclado a la resina permitiendo la purificación del D₃R (y proteínas asociadas). Tras la elución con 1X de péptido FLAG (que compite por la unión al anticuerpo de la resina), las eluciones se cargaron en un gel de electroforesis “stain-free” (sección 2.5.1) y se realizó una inmunodetección por “Western Blot” (sección 2.5.3).

2.5 Análisis bioquímico de proteínas

2.5.1 Electroforesis SDS-PAGE

En la electroforesis desnaturizante con dodecilsulfato sódico (SDS) SDS-PAGE las proteínas se separan en función de su peso molecular, lo que permite analizar su pureza

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

y concentración¹²⁹. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (0,3 M Tris-HCl, 0,6 M DTT, 12 % SDS, 50 % de glicerol) suplementado con azul de bromofenol y se cargaron en geles de poliacrilamida al 12 % con tecnología “stain-free” (Biorad). Los geles “stain-free” llevan incorporados 2,2,2-tricloroetanol (TCE) que modifica los residuos de triptófano de la proteína generando una señal de fluorescencia visible en el Chemidoc, no siendo necesaria la tinción del gel. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 250-300 voltios. Pasados 30 minutos, la señal se visualizó mediante excitación ultravioleta en un Chemidoc.

2.5.2 Electroforesis en gel nativo

La electroforesis en gel nativo es una técnica que permite separar proteínas en función de su carga y tamaño nativos, sin alterar su estructura y estequiometría en solución¹³⁰. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (0,3 M Tris-HCl, 50% de glicerol) suplementado con azul de bromofenol y se cargaron en geles de poliacrilamida al 8 %. Para conseguir geles “stain-free” se añadió a la solución de poliacrilamida 0,5 % de TCE (v/v). La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 100 voltios a 4°C. Pasadas 3 h, la señal se visualizó mediante excitación ultravioleta en un Chemidoc.

2.5.3 Inmunodetección por “Western-Blot”

Para la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida hasta una membrana de nitrocelulosa, se utilizó el kit comercial Transblot turbo RTA Mini Nitrocellulose® siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se bloqueó la membrana con el reactivo de bloqueo EveryBlot (Biorad) durante 5 minutos para evitar uniones inespecíficas y se incubó con un anticuerpo primario Anti-His conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:1000) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar por triplicado la membrana con 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween®20 (p/v) se reveló la señal por quimioluminiscencia utilizando los reactivos de revelado Clarity™ Western ECL en un Chemidoc.

2.6 Crio-microscopía electrónica

La crio-microscopía electrónica es una técnica de biología estructural que se basa en la utilización de temperaturas criogénicas y electrones como fuente de radiación para la obtención de estructuras macromoleculares a alta resolución^{131,132}. Comprende 1) la vitrificación (congelación rápida) en etano a -180°C, 2) la adquisición de datos en un microscopio electrónico y 3) el procesado computacional de las imágenes (Figura II.16).

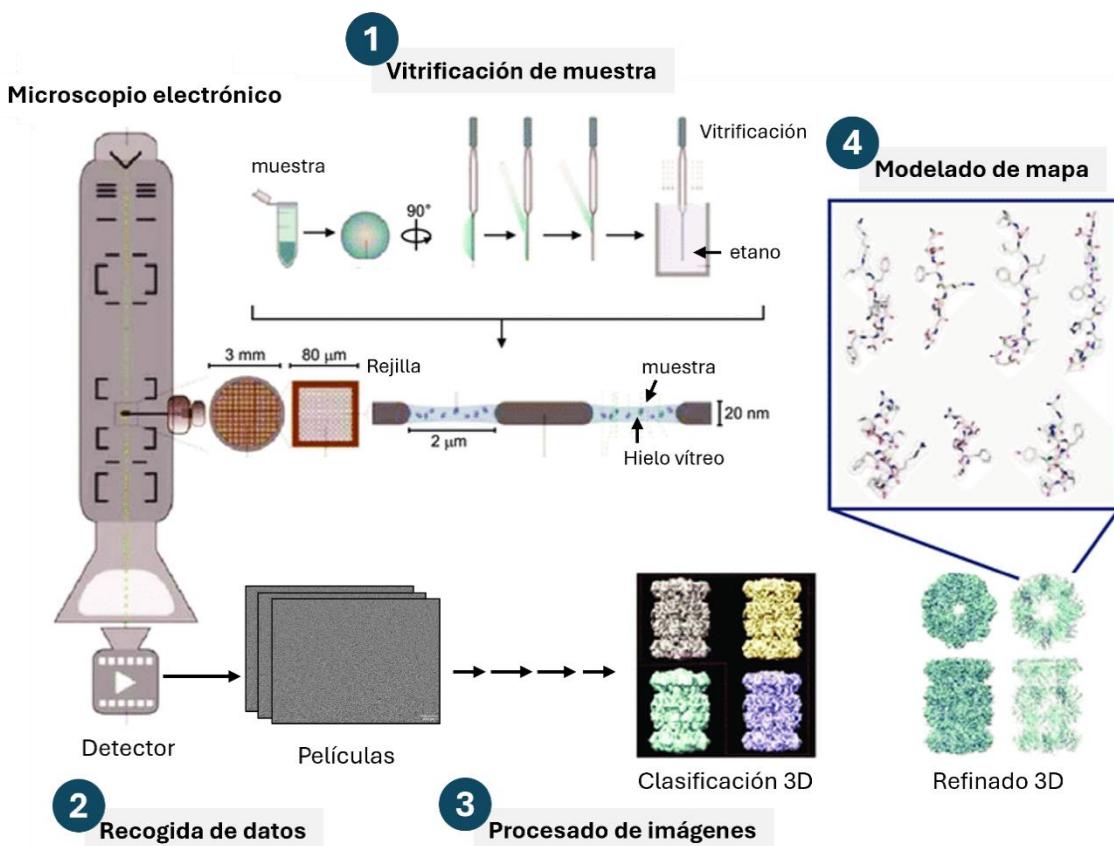


Figura II. 16. Técnica de crio-microscopía electrónica. Imagen modificada de¹³³

En el microscopio, los electrones son acelerados desde una pistola de emisión de campo y dirigidos hacia la muestra en condiciones de alto vacío. Al interactuar con ella, los electrones pueden atravesarla sin cambios, perder energía (dispersión inelástica) o cambiar su trayectoria (dispersión elástica). Los electrones dispersados inelásticamente introducen ruido de fondo y dañan la muestra (daño por radiación)¹³⁴.

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

La incorporación de filtros de energía permite el paso selectivo de electrones con una pérdida de energía específica (normalmente de 10-20 eV), con el objetivo de que sólo los electrones dispersados elásticamente y los no dispersados intervengan en la formación de la imagen¹³⁵. Tras atravesar la muestra, los electrones alcanzan el detector del microscopio. La incorporación de los detectores directos de electrones a la rutina de la crio-microscopía electrónica ha supuesto un enorme avance para la obtención de estructuras a alta resolución debido a su alta sensibilidad, siendo capaces de registrar eventos individuales de electrones, y a la alta eficiencia cuántica (DQE) que presentan¹³⁶. La DQE cuantifica la capacidad de un detector de convertir la señal incidente en una señal eléctrica detectable, dándose en los detectores directos de electrones la detección y la lectura en una sola capa, permitiendo la adquisición continua y rápida de secuencias de imágenes (películas) donde la dosis se puede fraccionar en múltiples fotogramas. Además, los detectores directos de electrones ofrecen la posibilidad de operar en modo de super resolución, donde el detector puede leer la señal de cada electrón en un cuadrante del píxel, permitiendo reducir el tamaño del píxel a la mitad¹³⁶. Finalmente, estas películas son procesadas computacionalmente, lo que deriva en la obtención de un mapa 3D de la muestra biológica de interés sobre el que se puede modelar una estructura atómica.

En este trabajo se han utilizado dos técnicas principales de la crio-microscopía electrónica: la crio-microscopía electrónica de partícula única (crio-ME) y la crio-tomografía electrónica (crio-TE).

2.6.1 Crio-microscopía electrónica de partícula única (crio-ME)

En crio-ME, las imágenes de la muestra vitrificada muestran múltiples copias de la proteína de interés dispuestas uniformemente a lo largo del hielo vítreo sin solaparse, formando una única capa y en diferentes orientaciones. La recogida y posterior procesado de las imágenes con multitud de copias de la proteína en diferentes orientaciones permiten la reconstrucción en 3D del mapa de crio-ME¹³⁴ (Figura II.17).

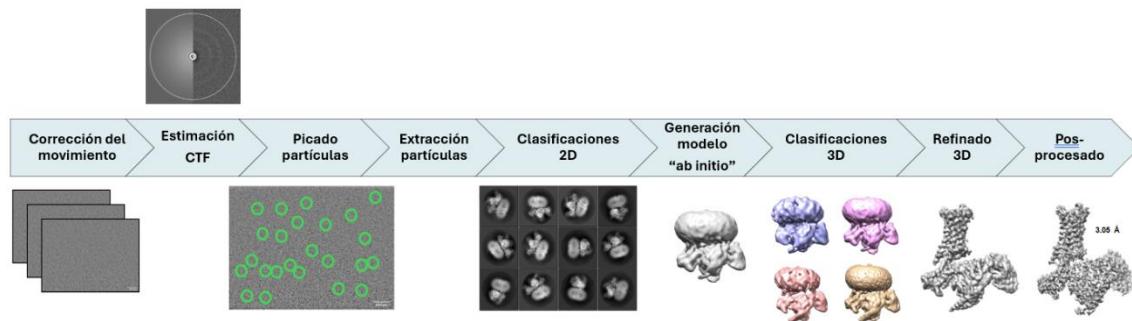
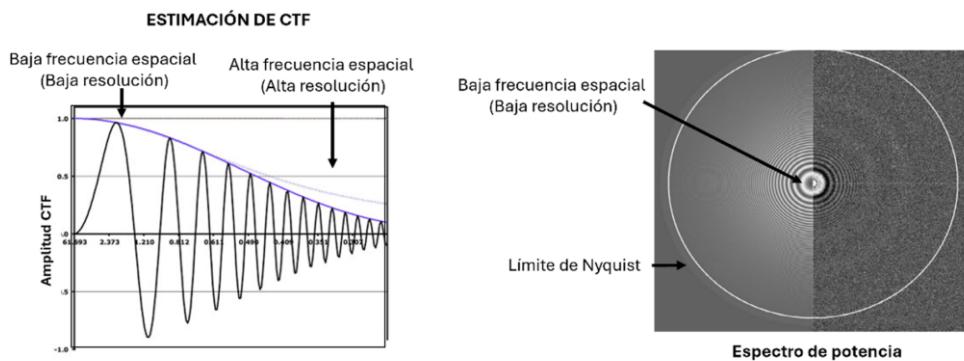


Figura II.17. Protocolo general para el procesado de datos derivados de crio-ME. Las películas se convierten a micrografías, se estima y corrige la Función de Transferencia de Contraste (CTF) y se pican las partículas. Las partículas identificadas son extraídas y sometidas a clasificación 2D, agrupándose en clases permitiendo discriminar el ruido y eliminar partículas de baja calidad. A partir de las clases 2D, se genera un modelo “ab initio” a baja resolución en 3D y se clasifican las partículas en 3D. Finalmente, las partículas son refinadas en el espacio tridimensional de Fourier, obteniendo un mapa 3D (FSC=0,143 como umbral de resolución).

El primer paso en el procesado es la corrección del movimiento de las partículas derivado tanto del movimiento de la rejilla en el microscopio como de la exposición al haz de electrones. Para ello, cada imagen de una película se alinea computacionalmente con las del resto de su secuencia, corrigiéndose los desplazamientos de las partículas entre una imagen y la siguiente. Generalmente, para la alineación cada imagen se divide a su vez en pequeños parches y se calcula el movimiento de cada uno de ellos. Una vez alineados, se suman para obtener una única imagen o micrografía¹³⁷. Paralelamente, se realiza una ponderación de la dosis, esto es, se fracciona la dosis para cada una de las imágenes que conforman la película otorgando un mayor peso a las primeras imágenes de la secuencia, menos expuestas al haz de electrones (y con menos daño por radiación), reteniendo la información a alta resolución¹³⁸.

A continuación, se procede a la estimación y corrección de la función de transferencia de contraste (CTF)¹³⁹. Idealmente, las micrografías deberían representar proyecciones reales de la muestra. Sin embargo, la longitud de onda del electrón (determinada por el

voltaje de aceleración del microscopio) y aberraciones presentes en el microscopio distorsionan la imagen generada obteniendo una micrografía corrompida. Algunas de ellas son inherentes al microscopio, como la aberración esférica del microscopio, mientras que otras, como el desenfoque, son introducidas durante la recogida de datos¹⁴⁰. La CTF es una herramienta matemática que permite la estimación y corrección de dichas aberraciones en el espacio recíproco de Fourier. Mediante la transformada de Fourier, una imagen puede ser descompuesta en una suma de funciones sinusoidales de diferentes frecuencias espaciales, donde las altas frecuencias espaciales (funciones de longitud de onda corta) corresponden a detalles finos y cambios bruscos en la intensidad, mientras que las bajas frecuencias espaciales (funciones con una longitud de onda más larga) representan información de menor resolución, asociadas a cambios graduales¹⁴⁰.



$$CTF(f) = -\cos \left(\pi \Delta z \lambda_e f^2 - \frac{\pi}{2} C_s \lambda_e^3 f^4 + \phi \right)$$

Figura II.18. Estimación de la CTF (panel izquierdo) y espectro de potencia (panel derecho).

En el panel izquierdo se muestra la fórmula de la CTF, donde Δz es el desenfoque, λ_e es la longitud de onda de los electrones incidentes, C_s es la aberración esférica y f es la frecuencia espacial. ϕ representa un factor de desplazamiento de fase. El origen del espectro de potencia (panel derecho) representa regiones de bajas frecuencias espaciales. El borde del espectro de potencia representa la frecuencia espacial máxima definida por el límite de Nyquist. Imágenes modificadas de: <https://www.lbem.ch/oldlbem/research/methods/programa/ctf-simulation> y https://myscope.training/CRYO_Contrast_transfer_function.

En el microscopio electrónico, el desenfoque permite aumentar el contraste en las imágenes. Sin embargo, ello provoca desplazamientos de fase en la onda del electrón causando interferencias que alteran el contraste de la imagen, atenuando o amplificando ciertas frecuencias espaciales con respecto a la imagen original. Este fenómeno se puede modelar matemáticamente con la CTF, observándose una onda sinusoidal cerca de cero a bajas frecuencias espaciales (asociada a información de baja resolución, no tan afectada por las aberraciones del microscopio) y que oscila entre máximos positivos y negativos (asociados a transferencia de contraste positiva y con el signo invertido, respectivamente) y donde los cruces en el eje horizontal son indicativos de frecuencias que no contienen información (Figura II.18, panel izquierdo). Sin embargo, esta limitación puede ser superada al combinar información de múltiples imágenes adquiridas con diferentes desenfoques, de manera que la información ausente en algunas imágenes estará presente en otras^{139,140}. Una manera sencilla de visualizar estas oscilaciones de la CTF es a través del espectro de potencia (resultante de elevar al cuadrado todos los valores de la transformada de Fourier), donde las oscilaciones de la CTF se muestran como anillos concéntricos (anillos de Thorn) (Figura II.18, panel derecho). Para obtener imágenes de alta resolución, es esencial corregir los efectos de la CTF, ya que las altas frecuencias espaciales son más sensibles a las aberraciones del microscopio. Dado que la longitud de onda de los electrones y la aberración esférica son constantes en el microscopio, la tarea más importante en la estimación de la CTF es determinar el desenfoque real de cada imagen¹³⁹. Conociendo todos los parámetros, el efecto de la CTF puede calcularse y eliminarse de la imagen permitiendo la recuperación de la imagen original¹³⁹.

Tras la corrección de la CTF se procede al picado y extracción de las partículas contenidas en la micrografía. Se han desarrollado diferentes estrategias para el picado de partículas que comprenden desde el picado manual, métodos basados en referencias u otros que emplean algoritmos de aprendizaje profundo como Topaz¹⁴¹, entrenados para el picado de partículas. Una vez identificadas, cada una de las partículas se extrae en una caja (definida en píxeles) para su posterior clasificación en 2D. Durante esta etapa se pretende la eliminación de ruido y partículas de mala calidad.

Para ello, se agrupan todas las imágenes similares de partículas en clases, atendiendo a diferentes orientaciones o a su estequiometría. Las imágenes de cada clase se promedian iterativamente para obtener una única imagen representativa con una buena relación señal-ruido¹⁴².

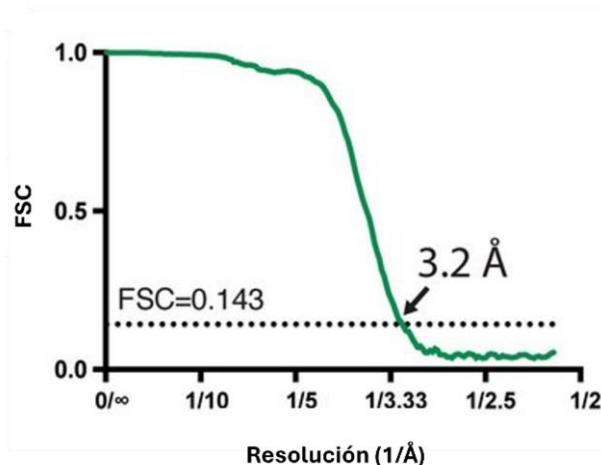


Figura II.19. Correlación de Fourier (FSC). Curva FSC de un mapa 3D. La resolución global viene marcada por el umbral de resolución FSC=0,143.

Para la clasificación 3D se requiere de la generación previa de un modelo inicial 3D a baja resolución que puede ser generado “ab initio” y que será utilizado como modelo de referencia. En esta fase se clasifican las partículas en función de su alineamiento con la referencia, pudiendo desechar partículas de mala calidad, observar diferencias entre partículas que resultan imperceptibles en las clasificaciones 2D o identificar problemas de orientación preferencial¹⁴⁰. Finalmente, las partículas se dividen en dos mitades y se refinan cada una de ellas de forma independiente para obtener dos reconstrucciones. Estos dos mapas se comparan en el espacio tridimensional de Fourier y se establece una correlación de Fourier (FSC) (Figura II.19). Una correlación de 1 equivale a una correlación perfecta sin ruido, mientras que 0 representa la ausencia de correlación. La comunidad de crio-ME ha aceptado el valor de 0,143 como umbral de resolución¹⁴³.

2.6.1.1 Impacto de la crio-ME en el estudio de GPCRs

La primera estructura de un GPCR a alta resolución conseguida fue la del receptor de la rodopsina bovina en estado inactivo en el año 2000 por cristalografía de rayos X⁵. Avances en la crio-ME (incorporación de filtros de energía, detectores directos de electrones) permitieron la determinación estructural a alta resolución del receptor de calcitonina acoplado a una proteína G heterotrimérica en 2017 por crio-ME¹⁴⁵ y desde entonces más estructuras de complejos de GPCRs se han ido resolviendo, contando actualmente con 1.253 mapas de complejos de GPCRs en la base de datos de microscopía electrónica (EMDB). Además de permitir el estudio del estado activo de los GPCRs acoplados a proteínas G heterotriméricas (un reto para la cristalización y posterior determinación estructural por cristalografía de rayos X), la crio-ME presenta ventajas añadidas a la cristalografía de rayos X al no requerir la formación de cristales y grandes cantidades de muestra, así como permitir la determinación estructural de múltiples conformaciones a partir de una única muestra¹⁴⁶. Ello junto con el desarrollo de microscopios más estables, nuevos programas informáticos y una mayor automatización del procesado ha dado lugar a lo que se conoce como revolución de la resolución o revolución estructural¹⁴⁷. Además, se han desarrollado durante los últimos años herramientas que permiten aumentar la estabilidad y tamaño de los receptores y complejos, siendo actualmente la crio-ME la técnica de referencia para el estudio estructural de los GPCRs. Estos comprenden desde el desarrollo de scFvs y nanoanticuerpos que mejoran la estabilidad de GPCRs en estados inactivos y aumentan su tamaño (Nb6¹⁴⁸) o activos de GPCR con la proteína G heterotrimérica (Nb35¹⁴⁴, scFv16¹¹³) hasta proteínas G modificadas (mini proteínas G¹⁴⁹ o proteínas G dominantes negativas¹¹²) que mejoran la estabilidad del complejo GPCR. Sin embargo, el proceso de vitrificación sigue constituyendo uno de los principales cuellos de botella para la determinación estructural de GPCRs por crio-ME ya que durante la vitrificación las macromoléculas tienden a adsorberse en la interfase aire-agua, lo que puede disociar los complejos de GPCRs, promover una distribución desigual o una orientación preferencial¹⁵⁰. No obstante, se han desarrollado diversas estrategias para mitigar estos problemas que comprenden desde la adición de detergentes que formen una capa protectora evitando el contacto de los receptores con la interfaz hasta la vitrificación en

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

capas finas de películas de soporte continuas para adsorber macromoléculas (por ejemplo, grafeno). Además, estas se pueden funcionalizar con ligandos de afinidad, anclando específicamente los receptores¹⁵⁰. Otra manera de mitigar este problema es a través de la vitrificación rápida, donde la muestra se vitrifica en una escala de tiempo de milisegundos (ms) o menos reduciendo así el tiempo de contacto con la interfase aire-agua, para lo que se están desarrollando dispositivos de vitrificación rápida¹⁵¹.

2.6.1.2 Análisis por crio-ME del complejo D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a ligando bitópico FOB02-04A

Vitrificación y colección de datos

Se añadieron 3 µl del complejo D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a FOB02-04A a 2,8 mg/ml a rejillas Quantifoil 0,6/1 Au previamente cargadas con un recubridor al vacío Leica EM Ace200 a 15 mA durante 60 s y se vitrificaron con etano utilizando un Vitrobot Mark IV (FEI Company). La recogida de datos se llevó a cabo en un Titan Krios a 300 kV con un detector K3 en Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón (ESRF) (Grenoble, Francia). Se recogieron un total de 22.655 películas a un aumento de 0,84 Å/píxel con una dosis de 17,6 e⁻/píxel/s y un rango de desenfoque entre -1 y -3 µm utilizando el programa Smart EPU (ThermoFisher Scientific). Las películas se dividieron en 50 fotogramas y se expusieron a una dosis total de 50 e⁻/Å² utilizando un tiempo de exposición total de 2 s.

Procesado de datos y modelado de mapa

Para el procesado de los datos se utilizó RELION-4.0¹⁵² a menos que se especifique lo contrario. La corrección del movimiento de las partículas (parches de 5 × 6) se realizó con MotionCor2¹³⁷ junto con una ponderación de la dosis teórica¹³⁸. La estimación de la CTF y la determinación del rango de desenfoque se realizaron con CTFFIND-4.1¹³⁹. El picado de partículas se realizó automáticamente con Topaz (programa basado en aprendizaje profundo). Tras 2 rondas de clasificaciones 2D y 3D (utilizando un modelo “ab initio”), 429.908 partículas se clasificaron en 3D con una máscara alrededor del

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

receptor para centrar la clasificación en esta región. El refinado de este conjunto de partículas dio como resultado un modelo a 3,16 Å, pero con una densidad pobre en el sitio de unión a ligando. Para mejorar la calidad del mapa en esta área, se siguieron dos vías de procesamiento paralelo: 1) un recentrado de las partículas en el sitio de unión del ligando seguido de una clasificación 3D (dando como resultado 360.038 partículas), y 2) clasificaciones 3D con una máscara en la mitad extracelular del receptor seguida de un recentrado de las partículas en el sitio de unión del ligando que se clasificaron de nuevo en 3D (dando como resultado 176.315 partículas). Los dos conjuntos de partículas se fusionaron y se eliminaron los duplicados, obteniéndose 275.383 partículas que se refinaron en 3D utilizando para la última iteración una máscara que excluía el dominio helicoidal $\text{G}\alpha_0$ y la micela. El post-procesado dio como resultado un mapa crio-ME de 3,05 Å.

Durante el procesado, se descubrió una segunda conformación (Conformación B) que se obtuvo realizando una clasificación 3D en el conjunto inicial de 429.908 partículas con una máscara en la mitad extracelular del receptor y un posterior recentrado en el sitio de unión del ligando seguido de más clasificaciones 3D. 201.219 partículas se sometieron a un refinado heterogéneo y 159.184 partículas se refinaron mediante un refinado no uniforme en CryoSPARC¹⁵³. Esto dio como resultado un mapa crio-ME a 3,09 Å. La resolución local se calculó utilizando CryoSPARC para ambos modelos.

El modelado de los mapas y refinado de los modelos se llevaron a cabo utilizando el programa CCP-EM¹⁵⁴ y Phenix¹⁵⁵. Las coordenadas de partida utilizadas para modelar D₃R, G β_1 , G γ_2 y scFv16 se tomaron de la estructura de D₃R acoplada a G α_i (PDB 7CMV)¹⁰⁷. Las coordenadas de partida de G α_0 se tomaron de la estructura del receptor adrenérgico $\alpha_{2\beta}$ acoplado a G α_0 (PDB 6K41)¹⁵⁶. El D₃R se modeló desde el residuo H29^{1.32} hasta I223^{5.73} y desde R323^{6.29} hasta C400 en la Conformación A (la Conformación B comienza en Y32^{1.35}). G α_0 se modeló de T4 a K54, de T182 a V234 y de N242 a Y354. El refinado “Jelly-body” se realizó en REFMAC5¹⁵⁷ seguido de modificación manual y refinado con restricciones en Coot¹⁵⁸ y Phenix. Se creó un diccionario describiendo el ligando FOB02-04A y sus coordenadas utilizando AceDRG¹⁵⁹ y se refinó con Coot y Phenix. Los factores B se reajustaron a 40 Å² antes del

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

refinado. Los modelos finales consiguieron una buena geometría (Anexo I) siendo el modelo validado con Coot, EMRinger¹⁶⁰ y Molprobity¹⁶¹. El ajuste de los modelos a los mapas se evaluó utilizando Phenix.

2.6.1.3 Análisis por crio-ME del complejo D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a ligando bitópico AB04-88

Vitrificación y colección de datos

Se añadieron 3 µl de D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a AB04-88 (2,3 mg/ml) a rejillas Quantifoil 0,6/1 previamente cargadas con un recubridor de vacío Leica EM Ace200 a 15 mA durante 60 s y vitrificadas con etano utilizando un Vitrobot Mark IV (FEI Company). La recogida de datos se llevó a cabo en un Titan Krios a 300 kV utilizando un detector K3 en el Instituto de Biología Estructural y Química (Universidad de Leicester, Reino Unido). Se recogieron 18.941 películas con un aumento de 0,8354 Å/píxel y un rango de desenfoque de -1 a -3 µm utilizando el programa Smart EPU (ThermoFisher Scientific). Las películas se dividieron en 50 fotogramas cada una y se expusieron a una dosis total de 55 e⁻/Å² utilizando un tiempo total de exposición de 2 s.

Procesado de datos y modelado de mapa

El procesado se realizó con RELION-4.0. La corrección del movimiento (5 x 6 parches) se realizó con MotionCor2 junto con la ponderación de la dosis y se utilizó CTFFIND-4.1 para la estimación de la CTF y la determinación del rango de desenfoque. Las partículas se picaron automáticamente con Topaz y utilizando referencias 2D (obtenidas a partir de clases 2D de partículas derivadas de la recogida con Topaz). Se realizaron cinco rondas de clasificación 2D para cada conjunto de partículas antes de realizar las clasificaciones 3D, en las que se utilizó un modelo “ab initio” como referencia. Tras cuatro rondas de clasificación 3D, se agruparon 112.617 partículas (Topaz) y 95.828 partículas (referencias 2D) y se clasificaron en 3D tras eliminar los duplicados. Se

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

seleccionaron 80.881 partículas y se sometieron a un refinado 3D (Conjunto 1). Paralelamente, tras la última clasificación 2D se agruparon ambos conjuntos de partículas, se eliminaron duplicados y se clasificaron en 3D durante tres rondas. En la cuarta ronda de clasificación 3D, se aplicó una máscara sobre el receptor. 62.998 partículas fueron seleccionadas y refinadas en 3D (Conjunto 2). Ambos conjuntos de partículas se mezclaron y se eliminaron los duplicados antes de seguir con el procesado. Tras el refinado 3D se recentraron las partículas en el sitio de unión a ligando para mejorar la resolución en esta zona. Tras dos rondas de clasificación 3D con máscara sobre el receptor, 93.700 partículas se sometieron a dos ciclos de refinado heterogéneo seguidos de refinado no uniforme utilizando CryoSPARC. Esto dio como resultado un mapa crio-ME a 3,4 Å. La resolución local se calculó utilizando CryoSPARC.

El modelado del mapa y el refinado del modelo se llevaron a cabo utilizando el programa CCP-EM y Phenix. Las coordenadas de partida utilizadas para D₃R, Gα₀ Gβ₁, Gγ₂ y scFv16 se tomaron de la estructura de D₃R acoplada a Gα₀ unida a ligando bitópico FOB02-04A (PDB 9F33) (capítulo 3). El D₃R se modeló desde el residuo Y32¹⁻³⁵ hasta I223⁵⁻⁷³ y desde R323⁶⁻²⁹ hasta L398⁸⁻⁵⁸. El refinado “Jelly-body” se realizó en REFMAC5 seguido de modificación manual y refinado con restricciones en Coot y Phenix. Se creó un diccionario describiendo el ligando AB04-88A y sus coordenadas utilizando AceDRG, siendo refinado por última vez con Coot y Phenix. Los factores B se reajustaron a 40 Å² antes del refinado. El modelo final consiguió una buena geometría (Anexo II) siendo el modelo validado con Coot, EMRinger y Molprobity. El ajuste del modelo al mapa se evaluó utilizando Phenix.

2.6.1.4 Análisis por crio-ME del complejo D₃R:Gαβγ:scFv16 unido al ligando SK-609

Vitrificación y colección de datos

Se aplicaron 3 µl de D₃R unido a ligando SK-609 (2,3 mg/ml) a rejillas Quantifoil 0,6/1 Au cargadas previamente con un recubridor de vacío Leica EM Ace200 a 15 mA durante 60

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

s. Se vitrificaron con etano utilizando un Vitrobot Mark IV (FEI Company). La recogida de datos se llevó a cabo en un Titan Krios a 300 kV utilizando un detector K3 en el centro de microscopía vasca (BREM, España). Se recogieron 1.863 películas con un aumento de 0,8238 Å/píxel y un rango de desenfoque de -1 a -3 µm utilizando el programa Smart EPU (ThermoFisher Scientific). Las películas se dividieron en 50 fotogramas cada una y se expusieron a una dosis total de 50 e⁻/Å² utilizando un tiempo total de exposición de 2 s.

Procesado de datos

Todo el procesado de datos se realizó con RELION-4.0. La corrección del movimiento (5 x 5 parches) se realizó con MotionCor2 y a continuación se estimó y determinó la CTF y el rango de desenfoque utilizando CTFFIND-4.1. Las partículas se picaron con Topaz (1.458.680 partículas) y se realizaron cinco rondas de clasificación 2D. Sin embargo, la calidad de las clases 2D impidió la obtención de un buen modelo “ab initio”, observándose complejos de baja calidad y un alto grado de desensamble, requiriendo una optimización de la muestra.

2.6.1.5 Análisis por crio-ME de dímeros de D₃R unidos a ligando bivalente C13

Vitrificación y colección de datos

Se aplicaron 3 µl de D₃R unido a ligando bivalente C13 (1,13 mg/ml) a rejillas Quantifoil 0,6/1 Au cargadas previamente con un recubridor de vacío Leica EM Ace200 a 15 mA durante 60 s. Se vitrificaron con etano utilizando un Vitrobot Mark IV (FEI Company). La recogida de datos se llevó a cabo en un Titan Krios a 300 kV utilizando un detector K3 en el Centro Holandés de Nanoscopia Electrónica (NeCEN, Holanda). Se recogieron 601 películas con un aumento de 0,836 Å/píxel y un rango de desenfoque de -1 a -3 µm utilizando el programa Smart EPU (ThermoFisher Scientific). Las películas se dividieron en 50 fotogramas cada una y se expusieron a una dosis total de 50 e⁻/Å² utilizando un tiempo total de exposición de 2 s.

Procesado de datos

Todo el procesado de datos se llevó a cabo con RELION-4. El movimiento de las partículas se corrigió con MotionCor2 y se ponderó la dosis. La estimación de la CTF y la determinación del rango de desenfoque se realizaron con CTFFIND-4.1. Las partículas extraídas tras ser picadas con Topaz se sometieron a seis rondas de clasificación 2D. Se generó un modelo “ab initio” y 9.989 partículas se clasificaron en 3D. Finalmente, 3.632 partículas se sometieron a refinado 3D obteniendo un mapa final a 18 Å según el umbral FSC (FSC=0.143).

2.6.2 Crio-tomografía electrónica (crio-TE)

En crio-ME la proteína de interés es previamente purificada del resto de proteínas presentes en el entorno celular a fin de conseguir una rejilla con múltiples partículas idénticas¹³⁴. Aplicado a proteínas de membrana, la purificación de éstas requiere de su extracción con el uso de detergentes, los cuales pueden resultar demasiado agresivos afectando su estructura e interacción con otros elementos presentes en el contexto nativo.

La crio-TE permite determinar la estructura de la proteína *in situ*, manteniendo su entorno natural¹⁶². El esquema de recogida de datos más común distribuye simétricamente la dosis, comenzando la recogida a 0° e inclinándose la muestra gradualmente en grados positivos y negativos alternativamente. La principal ventaja de iniciar la recogida de datos en ángulos bajos, donde el recorrido de los electrones a través de la muestra es más corto, es la conservación de información a alta resolución antes de que se produzcan daños por radiación. Debido a límites físicos y el grosor de la muestra, el rango de inclinación durante la recogida de datos se limita a ±60° o ±70°, lo que ocasiona una pérdida de información conocida como efecto de “cuña perdida”, que se refleja en una distorsión del mapa 3D^{162,163}. Así, la muestra vitrificada (<500 nm), se inclina gradualmente en torno a un eje de inclinación y se toman una serie de imágenes en 2D que posteriormente se pueden combinar computacionalmente para producir una

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

reconstrucción tridimensional (tomograma). Idealmente, un tomograma contiene múltiples copias de la proteína de interés en diversas orientaciones lo que permite el promediado y la determinación de su estructura a alta resolución (Figura II.20).

Sin embargo, la mayoría de las muestras biológicas tienen un grosor superior a 500 nm, siendo esta la principal limitación para la observación directa de células en el microscopio¹⁶⁴. Para obtener secciones ultrafinas y preservar su estado vítreo, se han desarrollado técnicas como el seccionamiento criogénico con cuchilla de diamante, lo que genera artefactos y arrugas en la muestra y el fresado criogénico con haz de iones focalizado (“FIB-milling”), donde se elimina todo el material por encima y por debajo de una sección de la célula, dejando una fina lámina de material celular (50-300 nm de grosor), denominada lamela, con menos artefactos pero observándose una alta contaminación por hielo¹⁶⁴.

En este trabajo se ha recurrido a la generación de GMPVs derivados de HEK293T y proteoliposomas (ambos extruidos con un filtro de 200 nm) con D₃R para su observación en el microscopio electrónico, no siendo así el grosor de la muestra limitante para el análisis por crio-TE.

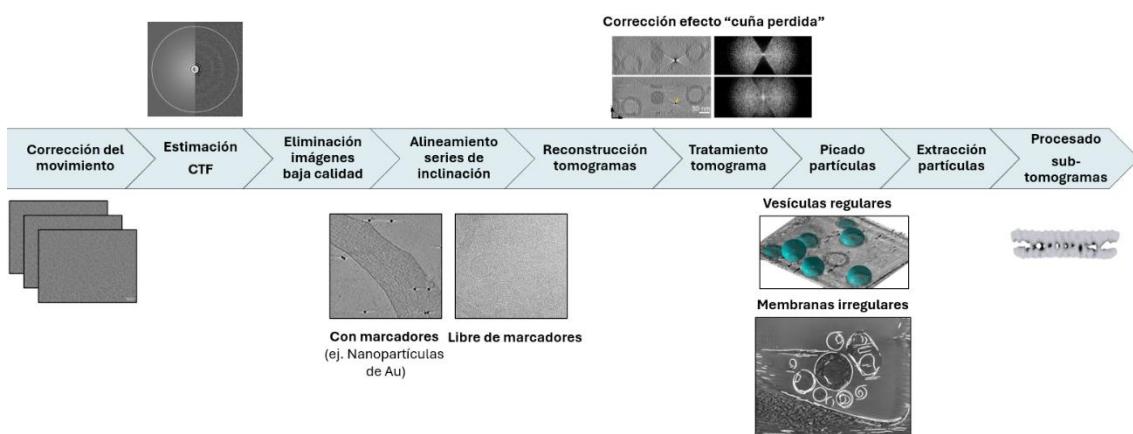


Figura II.20. Protocolo general para el procesado de datos derivados de crio-TE. Las series de inclinación se someten a un pre-procesado que comprende la corrección del movimiento y estimación y corrección de la CTF. A continuación, las diferentes proyecciones de la muestra son alineadas y combinadas computacionalmente para generar el tomograma. En el caso de

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

proteínas de membrana, existen complementos que permiten el picado automático de partículas en vesículas regulares y uniformes si bien en la mayoría de los casos se presentan membranas irregulares. En ese caso, las membranas se pueden segmentar y aislar del resto de componentes del tomograma. Tras el picado, las partículas pueden ser extraídas en cajas 2D y sometidas a los métodos de clasificación y refinado ya descritos en la sección de crio-ME.

La recogida de datos en crio-TE implica la adquisición de múltiples fotogramas que componen cada imagen de cada serie de inclinación. Al igual que en crio-ME, las películas recogidas requieren un procesado previo en el que se corrige el movimiento y la CTF. Para los datos de crio-TE generalmente no se aplica una corrección del movimiento basada en un alineamiento por parches porque la dosis para cada fotograma de la imagen de la serie de inclinación es demasiado pequeña. Además, si bien en crio-ME deben tomarse varias imágenes a diferentes defocos, esto no es estrictamente necesario para las imágenes de muestras inclinadas que se caracterizan por presentar un gradiente de defoco¹⁶⁵. En este caso, es necesario determinar la forma de la CTF para cada imagen que contribuye a la reconstrucción (se estiman los parámetros CTF para cada imagen con el movimiento corregido de las series de inclinación). Además, se han desarrollado algoritmos que consideran el efecto de la inclinación para conseguir una estimación de la CTF más precisa¹⁶⁶.

A continuación, se eliminan aquellas imágenes de las series de inclinación no aptas para el alineamiento ya que las diferentes proyecciones de la muestra deben estar perfectamente alineadas para poder ser posteriormente combinadas y reconstruir el tomograma. Se han descrito diferentes métodos y programas para el alineamiento de las series de inclinación que comprenden desde el uso de partículas de oro como marcadores de referencia para guiar el alineamiento¹⁶⁷ a otros independientes de marcadores basados en la maximización de la correlación cruzada existente entre las imágenes¹⁶⁸. Las proyecciones alineadas se pueden combinar computacionalmente para generar un tomograma mediante retroproyección ponderada donde las imágenes se superponen en la estructura 3D con un peso o a través de la reconstrucción iterativa simultánea donde se reconstruye el tomograma iterativamente hasta que se alcanza la convergencia¹⁶⁹. Estos tomogramas pueden a continuación ser sometidos a un filtro

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

para aumentar la relación señal-ruido (programa cryoCARE¹⁷⁰) y aplicar programas como IsoNet¹⁷¹ basados en el empleo de algoritmos de aprendizaje profundo para eliminar el efecto de “cuña perdida” presente en las imágenes como consecuencia de la recogida incompleta de datos.

Al igual que en crio-ME, se han descrito diferentes aproximaciones para identificar la proteína de interés en los tomogramas reconstruidos. En el caso de proteínas de membrana, existen complementos que permiten el picado automático en vesículas regulares y uniformes¹⁷² si bien en la mayoría de los casos se presentan membranas irregulares. En este caso, existen programas que mediante algoritmos de aprendizaje profundo han sido entrenados para segmentar las membranas y aislarlas del resto de componentes del tomograma, mejorando el rendimiento del picado al eliminar la identificación de falsos positivos localizados fuera de las membranas¹⁷³. Tras el picado, se combinan las coordenadas de las partículas con la información del alineamiento, recortándose y almacenándose esas partículas individuales como cajas 2D. Finalmente, las partículas extraídas se someten a los métodos de clasificación y refinado 3D previamente descritos para crio-ME. Idealmente, un tomograma contiene múltiples copias de la proteína de interés en diversas orientaciones lo que permite el promediado y la determinación de su estructura.

2.6.2.1 Análisis por crio-TE del D₃R en liposomas

Vitrificación y colección de datos

Se añadieron 3 µl de liposomas con D₃R a películas de carbono Lacey sobre rejillas de cobre (Agar Scientific) y se vitrificaron con un Leica-GP2 (Leica Microsystems). La recogida de datos se llevó a cabo en un Talos a 200 kV en el Instituto Francis Crick (Reino Unido). Las series de inclinación se tomaron siguiendo el esquema de distribución simétrica de la dosis sobre una exposición total de 140 e⁻/Å² con ángulos de inclinación que oscilaban entre ± 60° con un incremento de 3,5°. Se recogieron 35

tomogramas con un aumento de 2,02 Å/píxel y un rango de desenfoque de -3 a -5 µm utilizando el programa Tomography 5 (ThermoFisher Scientific).

Procesado de datos

Para el procesado de datos se utilizó RELION-5.0¹⁷² a menos que se especifique lo contrario. El movimiento en los fotogramas de cada serie de inclinación se corrigió con MotionCor2 y la estimación de la CTF se llevó a cabo utilizando CTFFIND-4.1. Se eliminaron manualmente las series de inclinación de mala calidad utilizando el visualizador Napari y seguidamente fueron alineadas automáticamente utilizando la implementación de RELION de AreTomo 1.3¹⁶⁹. Los tomogramas se reconstruyeron con un tamaño de píxel de 10 Å y se sometieron a una eliminación de ruido utilizando la implementación de RELION de CryoCARE¹⁷⁰. Para el picado de partículas, se segmentaron las membranas de los tomogramas con MemBrain-seg¹⁷³ y con el complemento “Segger” de Chimera¹⁷⁴ se identificaron cada una de las vesículas como objetos. A continuación, se utilizó una secuencia de comandos (https://github.com/EuanPyle/Membrane_Associated_Picking) para definir las coordenadas de las partículas sobre la superficie de las vesículas, y se visualizaron con el complemento ArtiaX de ChimeraX^{175,176}. Como resultado, se obtuvieron tablas (formato Dynamo) con las coordenadas y orientaciones relativas a la superficie de la membrana. Las tablas se convirtieron a archivos con formato .star (<https://github.com/EuanPyle/dynamo2relion>) y se agruparon para obtener un único archivo con todas las coordenadas. A continuación, las partículas se importaron a RELION 5.0 y se extrajeron como pseudo-subtomogramas con un tamaño de píxel de 8,08 Å/píxel en cajas de 64 vóxeles. Se reconstruyó una referencia en la misma caja y tamaño de vóxel y se refinaron las partículas (sin máscara). A continuación, se re-extrajeron las partículas con un tamaño de píxel de 4,04 Å/píxel y se realizó una clasificación 3D. Finalmente, los duplicados fueron eliminados y 32.044 partículas se refinaron, obteniendo un mapa final a baja resolución.

2.6.2.2 Análisis por crio-TE del D₃R en GMPVs

Vitrificación y colección de datos

Se añadieron 3 µl de vesículas con D₃R derivadas de células HEK293T a películas de carbono Lacey sobre rejillas de cobre (Agar Scientific) y se vitrificaron con un Leica-GP2 (Leica Microsystems). La recogida de datos se llevó a cabo en un Talos a 200 kV en el Instituto Francis Crick (Reino Unido). Las series de inclinación se tomaron siguiendo el esquema de distribución simétrica de la dosis sobre una exposición total de 140 e⁻/Å² con ángulos de inclinación que oscilaban entre ± 60° con un incremento de 3,5°. Se recogieron 66 tomogramas con un aumento de 2,02 Å/píxel y un rango de desenfoque de -3 a -5 µm utilizando el programa Tomography 5 (ThermoFisher Scientific).

Procesado de datos

Para el procesado de datos se utilizó RELION-5.0 a menos que se especifique lo contrario. El movimiento en los fotogramas de cada serie de inclinación se corrigió con MotionCor2 y la estimación de la CTF se llevó a cabo utilizando CTFFIND-4.1. Se eliminaron manualmente las series de inclinación de mala calidad utilizando el visualizador Napari y seguidamente fueron alineadas automáticamente utilizando la implementación de RELION de AreTomo 1.3.

2.7. Ensayos celulares

Se utilizaron células HEK293T (sección 2.3.1) para todos los ensayos celulares descritos en esta sección.

2.7.1 Ensayo de activación de GPCRs

Existen diferentes ensayos y sistemas desarrollados para el estudio de la señalización de GPCRs que permiten medir su activación a diferentes niveles de la cascada de señalización, desde que el agonista se une al receptor hasta cambios en la transcripción de genes (Figura II.21). Históricamente, el estudio de la activación de los GPCRs se ha basado en la medición de cambios en la concentración intracelular de segundos mensajeros (AMPc, inositol-3-fosfato y Ca^{2+}) que dependen de la activación de $\text{G}\alpha$ y sus efectores, lo que resulta en una amplificación de la señal, fácil de detectar⁷³. Sin embargo, la relación entre la activación del receptor y el efecto observado no está directamente acoplada a la unión del agonista, al entrar en juego otros factores cinéticos e interacciones con otras proteínas del entorno celular, siendo la medida más indirecta cuanto más alejada del evento de transducción inicial se encuentre.

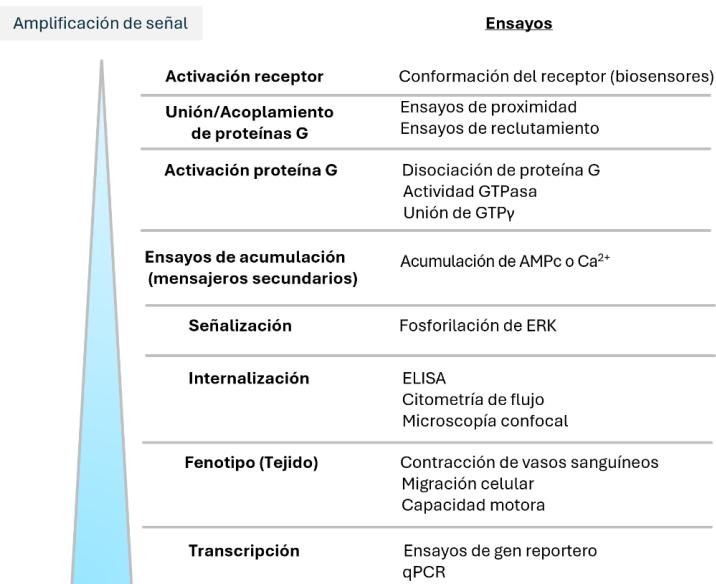


Figura II.21. Ensayos disponibles para el estudio de la señalización mediada por GPCRs.

Por su parte, se han desarrollado ensayos que permiten una evaluación más directa de la actividad del GPCR, relacionados con la medición de la tasa de intercambio de GDP a GTP (ensayo de actividad GTPasa¹⁷⁷), unión de GTPy¹⁷⁸, la disociación del heterotrímero $\text{G}\alpha\beta\gamma$ ¹⁷⁹ o reclutamiento de β -arrestina¹⁸⁰ a expensas de una menor señal. La mayoría de

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

estos ensayos se apoyan en métodos de luminiscencia basados en la interacción proteína-proteína habiéndose desarrollado en los últimos años múltiples sistemas que comprenden el uso de biosensores en proteínas transductoras (proteína G, β -arrestinas), receptores o nanoanticuerpos que reconocen el estado activo del receptor¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

En este trabajo la señalización de GPCRs a través de proteínas G se ha estudiado utilizando la plataforma TRUPATH, desarrollada por el laboratorio de Bryan Roth¹⁷⁹. Este ensayo permite medir la disociación de prácticamente cualquier proteína G heterotrimérica mediante la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia 2 (BRET2), presentando una amplificación mínima. La subunidad $G\alpha$ está fusionada a la luciferasa Renilla (RLuc8) y la $G\gamma$ a una GFP2 actuando como agente donor y acceptor respectivamente (la $G\beta$ no está modificada). En ausencia de agonista, la proteína G se encuentra formando un heterotrímero, permitiendo la transferencia de energía del agente donor ($G\alpha$ -RLuc8) al acceptor ($G\gamma$ -GFP2), produciendo una señal BRET2 tras la adición de colenterazina400a (sustrato de RLuc8). La activación del receptor desemboca en la separación de la $G\alpha$ del receptor y de $G\beta\gamma$ y, en consecuencia, se observa una pérdida de la señal BRET2 (Figura II.22). Basado en este principio, se puede establecer un rango de concentraciones de ligando y medir las señales BRET2 obteniendo una curva concentración-respuesta de la que se pueden estimar los parámetros de eficacia y potencia del agonista.

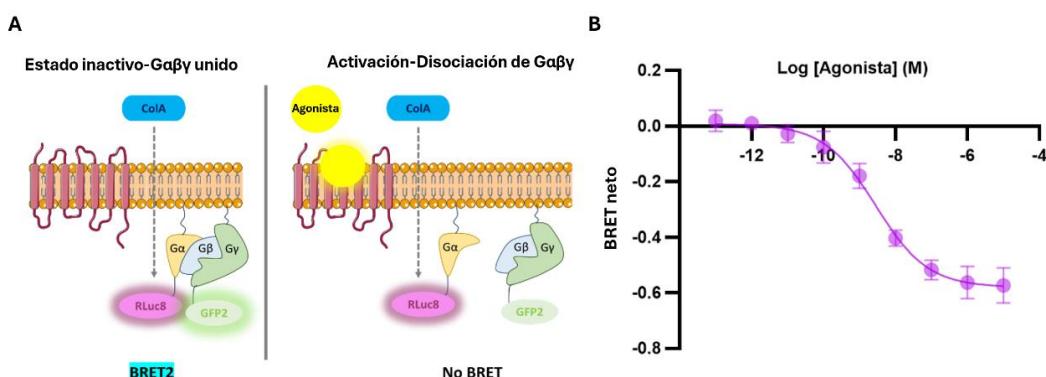


Figura II.22. Ensayo TRUPATH. A) Fundamento teórico del ensayo TRUPATH. **B)** Curva concentración-respuesta de la que se pueden inferir potencia y eficacia.

Para ello, se sembraron células HEK293T (50.000 células/pocillo) en placas blancas de 96 pocillos polilisinadas. Tras 24 h, se realizó la transfección de D₃R:Gα_{OA}-RLuc8:Gβ₃:Gγ₉-GFP2 en una proporción de 2:1:1:1 (7:1:1:1 para D₃R-Y373^{7,43}A ,D₃R-ΔG94^{ECL1}) utilizando TransIT® y se incubaron las células durante 48 h. Posteriormente, se sustituyó el medio de cada pocillo por 90 µl de 1X de solución salina equilibrada de Hanks suplementada con 20 mM HEPES pH 7,4 y 7,5 µM de coelenterazina 400a y se añadieron 10µl de agonista, previamente titulado con todas las concentraciones deseadas. La señal se midió con un CLARIOstar (BMG Labtech) con filtros de emisión de 400 nm (RLuc8-coelenterazina) y 498,5 nm (GFP2) a tiempos de integración de 1,85 s. El BRET neto se calculó dividiendo la señal de GFP2 entre la señal de Rluc8. Se utilizó GraphPad Prism 8.0.1 para el análisis de datos. Los datos se normalizaron y se ajustó una curva logística de cuatro parámetros a los datos. Los datos se presentan como media ± desviación estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado técnico. Para el análisis de datos se utilizó GraphPad Prism 8.0.1.

2.7.2 Ensayo de cuantificación de receptor en superficie

Para confirmar que las diferencias observadas en los ensayos funcionales se deben al efecto del ligando con la variante del receptor y no a diferencias de expresión en este trabajo se realiza una cuantificación de la expresión en superficie del D₃R en células HEK293T. El ensayo de expresión en superficie se basa en la detección específica de una etiqueta FLAG, que está presente en el extremo amino terminal del D₃R. Para ello, se sembraron 50.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos previamente tratadas con polilisina y se transfecaron al día siguiente con PEI MAX® en una proporción 2:1 (PEI:ADN). Tras 48 h, las células se lavaron con 1X PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS durante 5 minutos, las células se trataron con 100 µl de 1X PBS con 5 % de albúmina de suero bovino (BSA) (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con 1X PBS-5 % BSA con un conjugado HRP

Capítulo II. METODOLOGÍA. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y PROTOCOLOS

anti-FLAG (1:10.000) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al no poder atravesar la membrana plasmática, el anticuerpo solo se une a aquellos receptores presentes en la superficie celular. Tras dos rondas de lavado con PBS se añadieron 50 µl/pocillo de sustrato HRP (Clarity Max™ Western ECL Substrate) y se incubaron durante 5 minutos. Posteriormente, la placa se sometió a detección por quimioluminiscencia utilizando un CLARIOstar (BMG Labtech). Para el análisis de datos se utilizó GraphPad Prism 8.0.1. Se llevó a cabo la normalización de los valores de quimioluminiscencia respecto a D₃R WT. Los datos se presentan como media ± SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado técnico.

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

3.1 Selectividad D₃R vs D₂R. Problema de fármacos actuales

Los GPCRs se han establecido como relevantes dianas terapéuticas para multitud de enfermedades, siendo dianas terapéuticas para más de un tercio de los fármacos aprobados actualmente⁵⁶. Sin embargo, la alta homología estructural y de secuencia que presentan algunos grupos de receptores, como los receptores aminérgicos, dificulta el desarrollo de fármacos selectivos favoreciendo la unión promiscua y aparición de efectos secundarios^{1,64}. Los receptores aminérgicos incluyen 42 receptores (de dopamina, serotonina, (nor)adrenalina, histamina, acetilcolina y aminas intermedias) que se caracterizan por presentar una gran similitud de secuencia, existiendo entre los subtipos de receptores aminérgicos más estrechamente relacionados una identidad de secuencia superior al 80 % en los residuos del OBS⁶⁴. Un caso extremo es el de D₂R y D₃R, que comparten un 100 % de identidad en el OBS, siendo difícil la distinción farmacológica entre ambos receptores. En consecuencia, ambos actúan como dianas terapéuticas de fármacos antagonistas en el tratamiento de esquizofrenia y fármacos agonistas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson¹⁰³⁻¹⁰⁶(Figura III.23). Sin embargo, a pesar de compartir OBS, D₂R y D₃R difieren en sus niveles de expresión, localización y en sus propiedades de señalización⁹⁹, lo que indica el desempeño de roles funcionales únicos en el cerebro. En concreto, ensayos con modelos celulares y animales han demostrado en los últimos años un potencial papel en neuroprotección del D₃R¹⁸²⁻¹⁸⁴. Ello unido a una distribución tisular más restringida⁹⁹ ha elevado al D₃R como una interesante diana terapéutica, con la que se pueden disminuir los efectos secundarios manteniendo el efecto terapéutico.

Tradicionalmente, el desarrollo de fármacos selectivos para GPCRs aminérgicos se ha respaldado en el cribado de grandes bibliotecas de compuestos, sin mucho éxito⁶⁴. La principal limitación radica en la alta similitud en el OBS (idéntico para D₂R y D₃R) , que constituye el sitio de unión de la mayoría de los fármacos utilizados actualmente en la clínica^{107,185-187}. También se han desarrollado moduladores alostéricos, permitiendo la selección de distintas conformaciones de un GPCR sin interferir con la unión de moléculas ortostéricas¹⁸⁸. Sin embargo, su efecto depende de la presencia del ligando

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

ortostérico, lo que limita potencialmente su uso en enfermedades como la enfermedad de Parkinson donde hay un déficit de dopamina (el ligando endógeno).

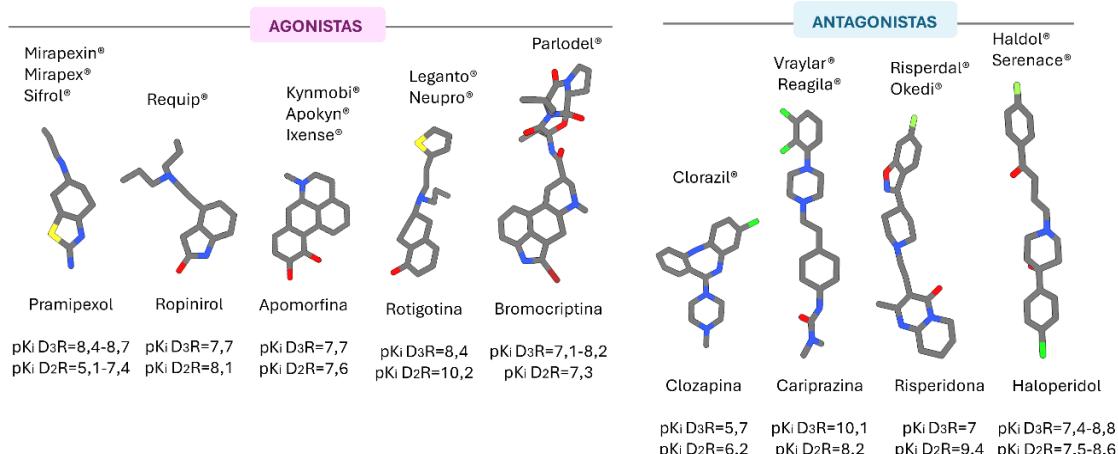


Figura III.23. Ejemplos de fármacos utilizados actualmente en la clínica para el tratamiento de esquizofrenia (antagonistas) y enfermedad de Parkinson (agonistas). Los valores de pKi han sido obtenidos de la base de la base de datos de IUPHAR.

Una estrategia alternativa surge con la síntesis de compuestos que se unen concomitantemente al OBS y a un sitio alostérico o secundario (SBP). Estos ligandos, denominados ligandos bitópicos, están constituidos por un farmacóforo primario que se une al OBS y un farmacóforo secundario que interacciona con otra región del receptor, menos conservada entre los diferentes subtipos de receptores. Ambos farmacóforos se conectan a través de un enlazador, pudiendo la combinación óptima de los tres componentes lograr mejoras en la afinidad (debido a la utilización de más de un sitio de unión) y la selectividad (debido a la unión del farmacóforo secundario a un sitio alostérico menos conservado) y todo utilizando una única molécula (Figura III.24)¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Sin embargo, la ausencia de información estructural sobre la unión del ligando al receptor impide conocer las bases de su selectividad y la mejora racional de fármacos, desconociéndose el sitio, modo de unión y el mecanismo de acción subyacente de estos compuestos. La información estructural junto con la mutagénesis de los residuos que conforman el OBS y SBP del receptor al que se une el ligando bitópico pueden ayudar a descifrar los efectos predominantemente ortostéricos o alostéricos del ligando bitópico en el receptor.

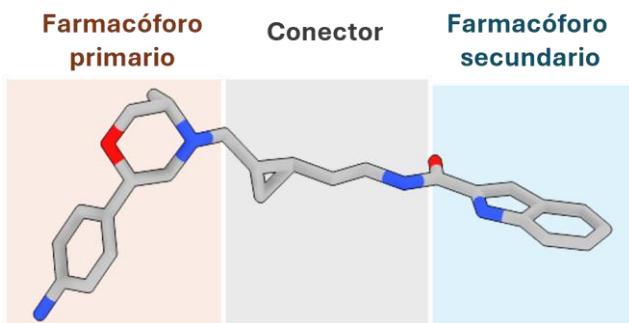


Figura III.24. Estructura química de un ligando bitópico. Como ejemplo se muestra la estructura del ligando bitópico FOB02-04A, utilizado en este trabajo¹⁹².

En este capítulo se presenta la estructura por crio-ME del D₃R humano unido a un agonista bitópico (FOB02-04A) con cierta selectividad para D₃R y acoplado a un heterotrímero G_αβγ. FOB02-04A es una molécula bitópica compuesta por un farmacóforo primario no catecol basado en el compuesto PF592,379 (un potencial fármaco agonista en D₃R desarrollado por Pfizer para el tratamiento de la disfunción sexual femenina y la disfunción eréctil masculina) y un farmacóforo secundario con un grupo indol-amida, ambos conectados por un enlazador ciclopropilo, cuya quiralidad se optimizó para la unión y selectividad del ligando (Figura III.24)¹⁹².

Junto con ensayos funcionales, mutagénesis, estudios computacionales de acoplamiento molecular y simulaciones de MD, en este capítulo se determina el modo de unión y las bases de la selectividad hacia D₃R de este compuesto, así como el mecanismo de la selectividad del D₃R a señalizar por G_α. El ligando FOB02-04A fue sintetizado y proporcionado por Alessandro Bonifazi (miembro del grupo liderado por Amy Newman-Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos). Las simulaciones de MD y de acoplamiento molecular fueron realizadas por Antonina Nazarova y Vsevolod Katritch (Universidad del Sur de California, Estados Unidos).

3.2 Determinación estructural del complejo D₃R:Gα₀βγ:scFv16 unido a FOB02-04A por crio-ME

El complejo D₃R:Gα₀βγ:scFv16 unido a FOB02-04A se produjo co-expresando el D₃R humano con la mutación termoestabilizadora L^{3.41}W, la subunidad Gα₀A dominante negativa, Gβ₁ y Gγ₂ (C68S) en células de insecto Tni. Para validar la utilización del constructo D₃R L^{3.41}W se realizaron ensayos TRUPATH, confirmando una activación equivalente a la del D₃R WT (Figura III.25B). El scFv16 (producido y purificado por Ángela Carrión Antolí, miembro del grupo de investigación) se incubó previamente con el complejo D₃R:Gα₀βγ unido a FOB02-04A antes de la cromatografía de exclusión molecular (Figura III.25A). El complejo puro se vitrificó en rejillas crio-ME y se recogieron datos en un Titan Krios a 300 kV (ESRF, Grenoble).

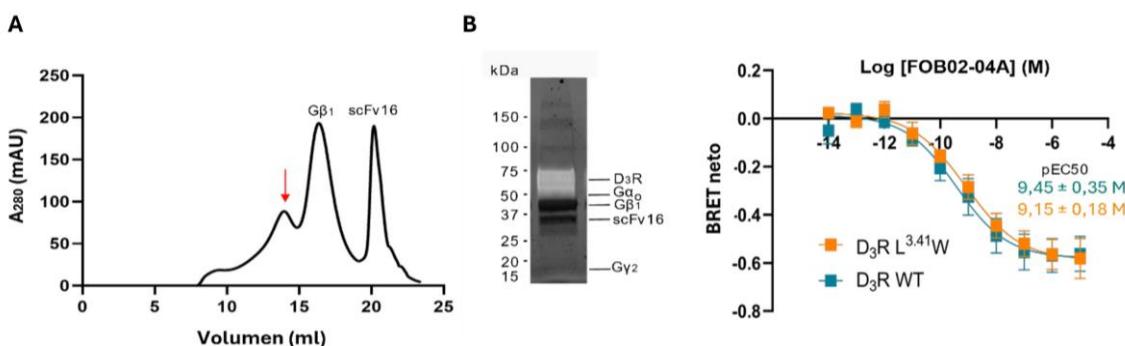


Figura III.25. Purificación del complejo D₃R:Gα₀βγ:scFv16 unido a FOB02-04A y validación de la mutación L^{3.41}W. **A)** Cromatografía de exclusión molecular del complejo D₃R:Gα₀βγ:scFv16 unido a FOB02-04A (panel izquierdo) y el gel SDS-PAGE “stain-free” con fluorescencia superpuesta para D₃R (acoplado a eGFP en su extremo amino terminal) (panel derecho). **B)** Curvas concentración-respuesta de D₃R WT (azul) y D₃R L^{3.41}W (naranja) obtenidas tras la activación con FOB02-04A en ensayo TRUPATH (mostradas como BRET netos). Los datos representan las medias ± SEM de cinco (n=5) y seis (n=6) experimentos independientes realizados en triplicado técnico para D₃R WT y D₃R L^{3.41}W respectivamente.

Se recogieron 22.655 películas y tras corregir el movimiento y CTF, se identificaron las partículas y se extrajeron para la realización de múltiples clasificaciones 2D y 3D,

utilizando en las rondas finales una máscara alrededor del receptor para distinguir clases atendiendo a heterogeneidades del receptor, con lo que se consiguió un mapa crio-ME con una resolución global de 3,16 Å. Sin embargo, la densidad del receptor y el sitio de unión a ligando no eran óptimos, siendo esto un problema común en las estructuras de GPCRs, donde la interfaz con la proteína G suele estar mejor definida¹⁹³. Para mejorar la densidad en el sitio de unión a ligando se recentró el mapa en el OBS (Figura III.26) y se realizaron clasificaciones 3D con máscara en el receptor o en el OBS seguido de un refinado 3D de las partículas seleccionadas.

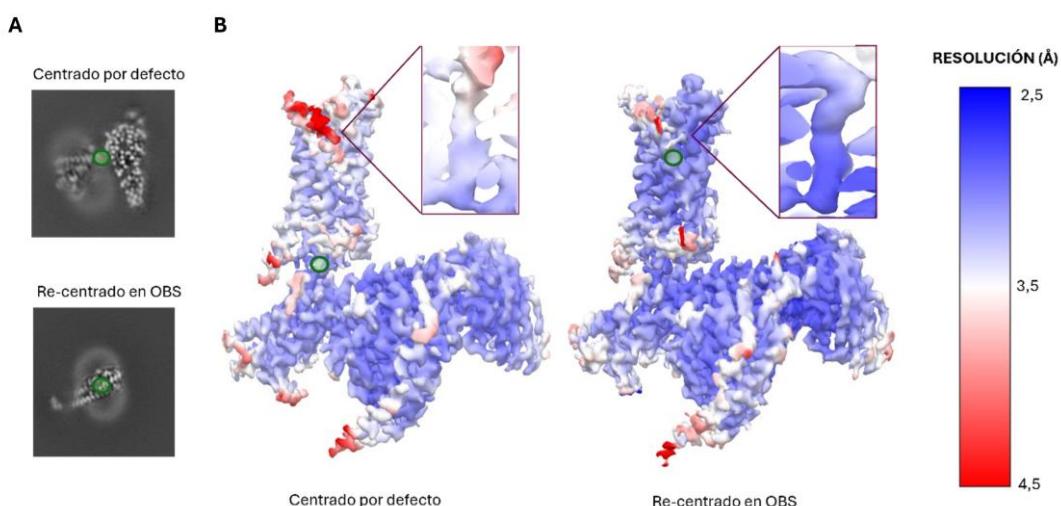


Figura III.26. Efecto del centrado del sitio de unión del ligando en la caja de crio-ME. A) Cortes en 2D del mapa crio-ME tras refinar antes y después de recentrar las partículas en el OBS. B) Resolución local de los mapas de crio-ME (calculados con CryoSPARC) con una ampliación en el sitio de unión del ligando antes y después del recentrado en el OBS. El centro está marcado con un punto verde en los cortes 2D y en los mapas 3D.

Esta estrategia nos permitió mejorar la densidad del sitio de unión del ligando (Figura III.26) y discriminar dos conformaciones para FOB02-04A, que diferían principalmente en la posición del farmacóforo secundario y los residuos circundantes. Se obtuvieron dos mapas de crio-ME, denominados como Conformación A y Conformación B, a una resolución global de 3,05 Å y 3,09 Å respectivamente (FSC=0,143) (Figura III.27 y III.28).

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

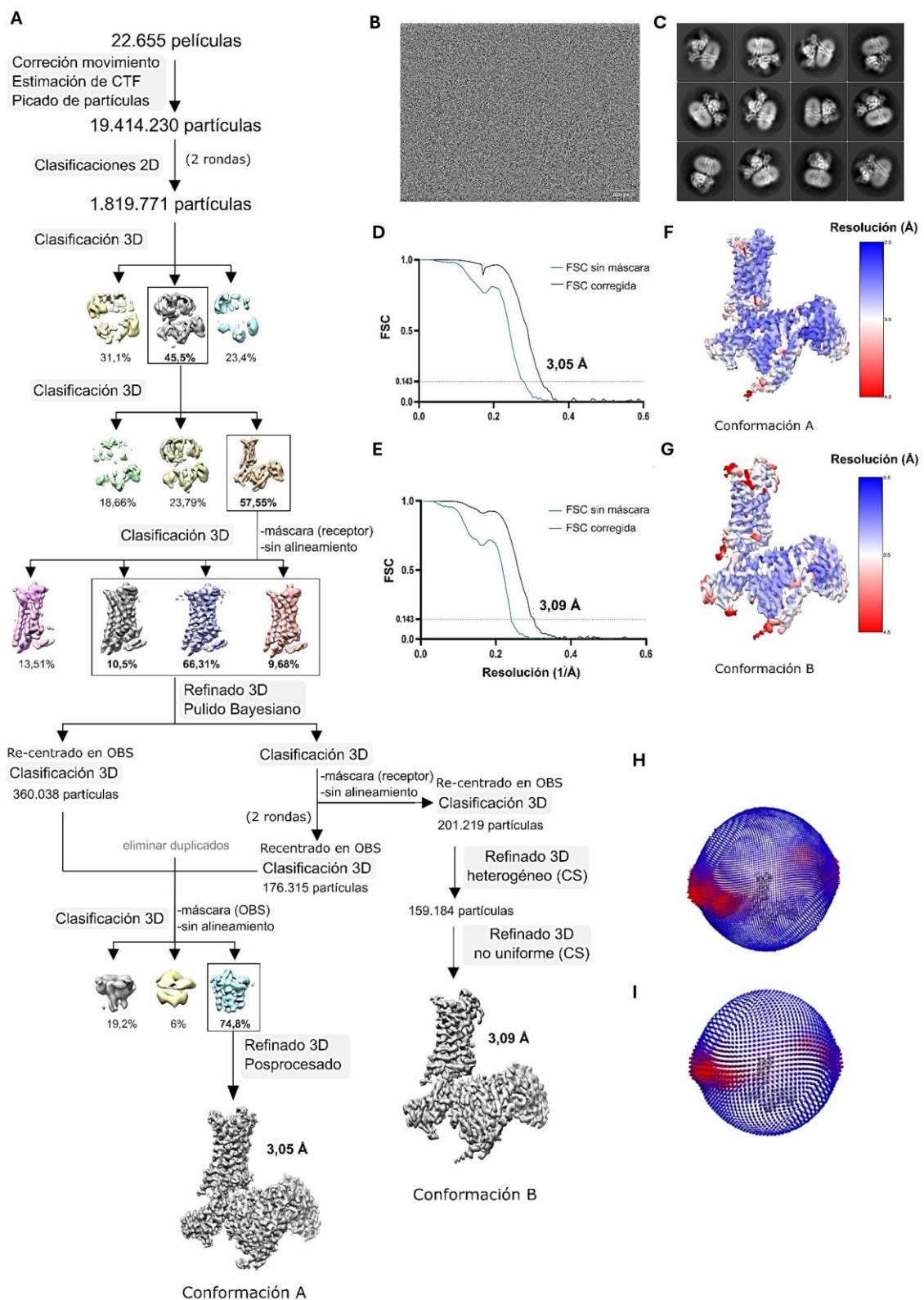


Figura III.27. Crio-ME para la obtención del mapa del complejo D₃R:G_{OA} unido a FOB02-04A.

A) Diagrama de flujo del procesado de datos. **B)** Micrografía representativa (0,84 Å/píxel) del conjunto de datos recogidos. **C)** Promedios de clases 2D representativos del complejo D₃R:G_{OA}

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

:FOB02-04A. Tamaño de caja: 220 píxeles. **D y E)** Curva FSC de la reconstrucción final que muestra una resolución global de 3,05 Å para la conformación A (**D**) y 3,09 Å para la conformación B (**E**). **F y G)** Estimación de la resolución local del complejo de D₃R:G_{OA} unido a FOB02-04A calculada por CryoSPARC para la Conformación A (**F**) y Conformación B (**G**). **H e I)** Distribución angular de todas las partículas utilizadas en la reconstrucción final para la Conformación A (**H**) y Conformación B (**I**).

Los dos mapas de crio-ME finales tenían una calidad suficiente para modelar el D₃R, las proteínas Gα β γ , el scFv16, y el ligando FOB02-04A (Figura III.28 y Anexo I). Para ambos mapas el D₃R se modeló desde el residuo H29^{1,32} (Conformación A) o Y32^{1,35} (Conformación B) hasta el residuo C400 a excepción del ICL3 (residuos I223^{5,73} a R323^{6,29}).

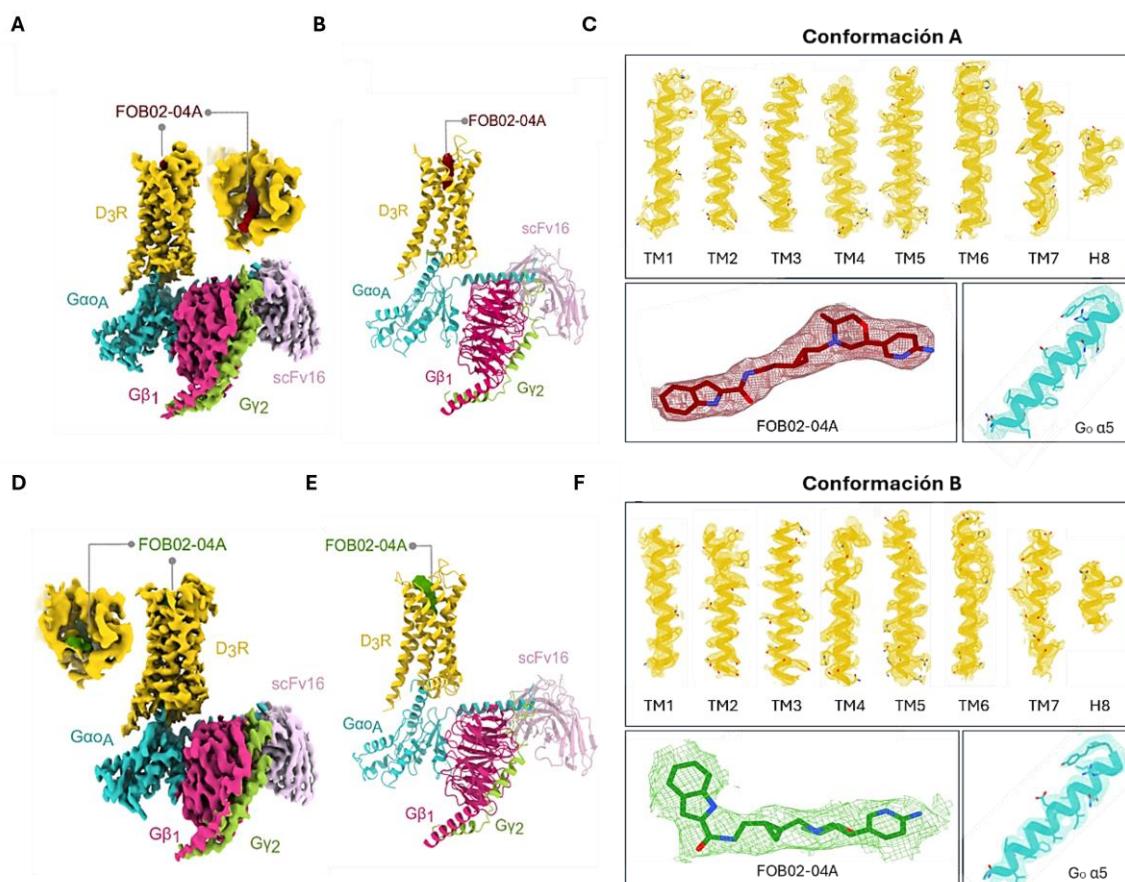


Figura III.28. Calidad del mapa de crio-ME y ajuste del modelo de los complejos D₃R:G_{OA} unidos a FOB02-04A. A) Mapa de crio-ME del complejo D₃R:G_{OA} unido a FOB02-04A (Conformación A) con ampliación en el sitio de unión del ligando (vista desde arriba). **B y C)**

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

Coordenadas de la Conformación A (**B**) y ajuste del modelado de las hélices transmembrana de D₃R (amarillo), la hélice α5 de G_{OA} (azul) y FOB02-04A (rojo) (**C**). **D**) Mapa de crio-ME del complejo D₃R:G_{OA} unido a FOB02-04A (Conformación B) con ampliación en el sitio de unión del ligando (vista desde arriba). **B y C)** Coordenadas de la Conformación B y ajuste del modelado de las hélices transmembrana de D₃R (amarillo), la hélice α5 de G_{OA} (azul) y FOB02-04A (verde) (**C**). Las densidades de crio-ME están coloreadas según la subunidad, con el ligando bitópico coloreado en rojo (Conformación A) y verde (Conformación B).

Además, no se encontraron moléculas de colesterol (o de CHS) o lípidos alrededor de la parte transmembrana del receptor, lo que concuerda con las estructuras previamente reportadas para D₂R y D₃R, difiriendo de las estructuras de receptores de dopamina D₁R, D₄R y D₅R.

A continuación, se decidió explorar las bases de la activación de FOB02-04A en D₃R. Debido a que ensayos funcionales posteriores mostraron la Conformación B como una conformación no productiva, se ha descrito una sección específica para esta conformación alternativa (sección 3.6).

3.3 Activación de D₃R inducida por FOB02-04A

El complejo de D₃R:Gα₀βγ unido a FOB02-04A muestra la estructura característica de un complejo de GPCR acoplado a una proteína Gαβγ, observándose en el D₃R los cambios conformacionales canónicos de la activación de GPCRs de clase A⁹. Entre estos cambios destaca el desplazamiento del residuo W342^{6.48} (“toggle switch”) y un cambio conformacional de los motivos PIF (I118^{3.40}, F338^{6.44}), DRY (D127^{3.49}, R128^{3.50}, Y129^{3.51}) y NPxxY (N379^{7.49}, P380^{7.50}, Y383^{7.53}), que terminan con una oscilación de ~ 9 Å hacia fuera del extremo citoplasmático de la TM6 y un movimiento hacia el núcleo del receptor de la TM7 (Figura III.29).

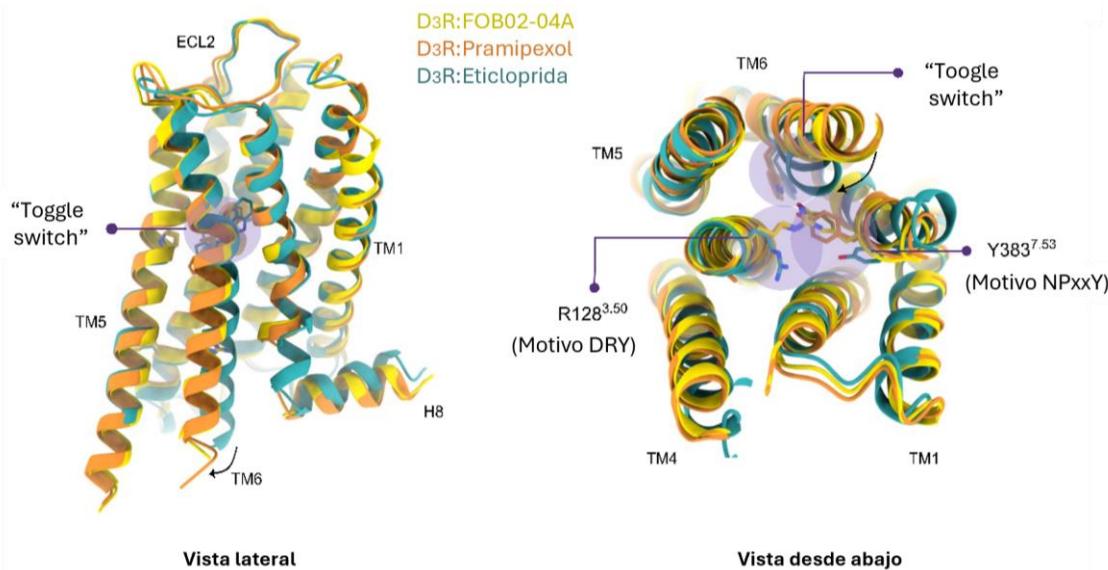


Figura III. 29. Activación de D₃R inducida por FOB02-04A. Se muestran dos perspectivas de las estructuras en estado activo de D₃R unido a FOB02-04A (amarillo) y pramipexol (naranja, PDB 7CMU) junto con la estructura en estado inactivo de D₃R unido a eticloprida (azul, PDB 3PBL). Los motivos conservados están resaltados en morado.

A continuación, para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la activación inducida por FOB02-04A, se estudió tanto el sitio de unión del ligando FOB02-04A como la interfaz establecida por el receptor con la proteína G.

3.3.1 Interfaz D₃R: G_{α_O}βγ. Estudio de las bases de la selectividad G_O/G_i

La estructura determinada en este capítulo es la primera estructura de D₃R unida a G_O reportada. En conjunto, el complejo es similar a estructuras previamente resueltas para el D₃R acoplado al heterotrímero G_i en presencia de pramipexol (PDB 7CMU), PD128907 (PDB 7CMV) y rotigotina (PDB 8IRT)^{107,185}, observándose una raíz del error cuadrático medio (RMSD) de 1,036 Å para 1.022 Ca en la estructura de D₃R unida a pramipexol.

Estudios previos han demostrado que, aunque el D₃R puede acoplar proteínas G_{O/i}, el receptor se acopla preferentemente a G_O¹⁰⁰. En efecto, ensayos TRUPATH con D₃R en

presencia de G_o o G_i en células HEK293T confirmaron el acople preferencial a G_o, observándose una diferencia de potencia de ~ 135 veces entre G_o y G_i (Figura III.30B). La determinación estructural del complejo de D₃R:G_o nos permitió realizar una comparación con otras estructuras de D₃R acoplado a G_i resueltas a fin de encontrar diferencias estructurales que explicasen esta preferencia funcional. En general, ambas estructuras presentan un área de interfaz similar, observándose en el complejo D₃R:G_o una interfaz de contacto ligeramente menor que en D₃R:G_i (959,4 Å² y 1051,8 Å² para el D₃R acoplado a G_o y G_i, respectivamente). Sin embargo, en los acoplamientos G_o frente a G_i normalmente se observa un área de interfaz menor independientemente de la selectividad^{194,195}. Además, ambas estructuras presentan en la TM6 una oscilación hacia fuera similar independientemente del acoplamiento a G_o o G_i, lo que coincide con estudios previos donde el mismo receptor acoplado a diferentes proteínas Gα mantiene una oscilación similar de la TM6^{19,196}.

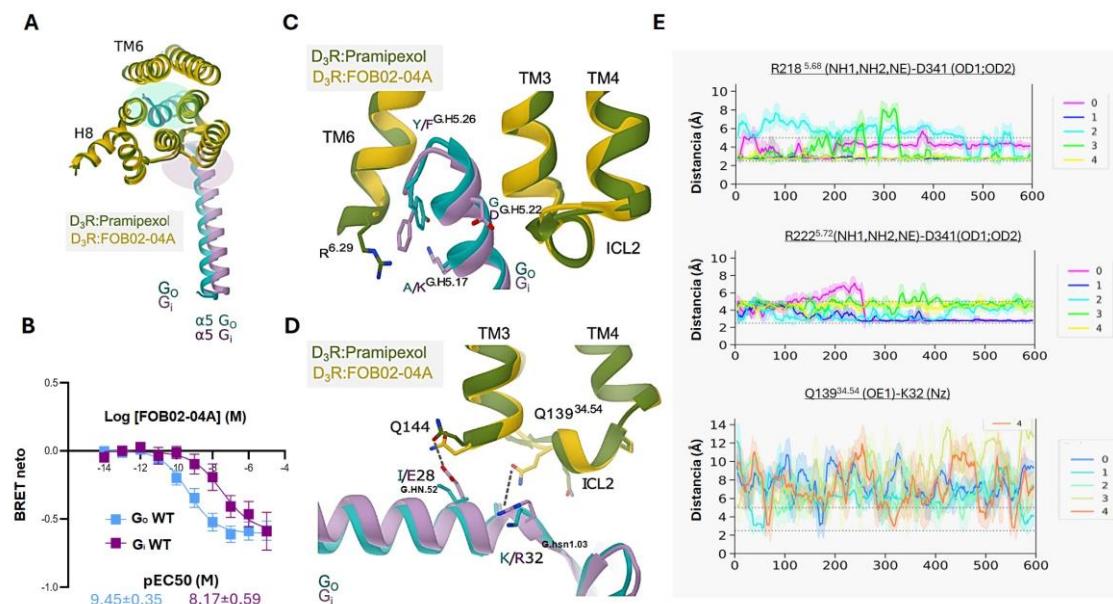


Figura III.30. Acoplamiento de G_o y G_i a D₃R. **A)** Comparación de las estructuras de D₃R unido a pramipexol (PDB 7CMU) y FOB02-04A (vista desde arriba). **B)** Curvas concentración-respuesta de D₃R en respuesta a la activación de G_o y G_i por FOB02-04A utilizando el ensayo TRUPATH (mostradas como BRET netos). Los datos representan las medias ± SEM de cinco experimentos independientes realizados por triplicado técnico. **C)** Comparación de la interacción carboxilo terminal de la hélice α5 de G_i (PDB 7CMU) y G_o (D₃R:G_o unido a FOB02-04A). **D)** Detalles de la interacción carboxilo terminal. **E)** Análisis dinámico de la distancia entre residuos R218 y R222 en Q139-K32 (Nz).

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

interacción del amino terminal de G_o (turquesa) y G_i (violeta) con el ICL2 de D₃R. E) Simulaciones de MD mostrando la interacción de puente salino entre el grupo carboxilo del residuo D341^{G,H5,13} del extremo carboxilo de la hélice a5 de G_o y el grupo guanidinio del residuo R218^{5,68} (panel superior) y R222^{5,72} (panel intermedio) en el complejo D₃R:G_{OA} unido a FOB02-04A. En el tercer panel se muestra la distancia observada más cercana entre Q139^{34,54} en D₃R y la amina terciaria terminal de K32^{G,hns1,03} de la hélice Gα_o en el extremo amino terminal.

Sin embargo, existen diferencias estructurales en las interacciones establecidas por la hélice a5 carboxilo terminal de G_o o G_i con D₃R (Figura III.30C). Para facilitar la comparación de residuos entre G_o y G_i se utilizará en este capítulo el sistema de numeración común de proteínas Gα¹⁹⁷, el cual permite asociar a cada residuo una posición relativa al dominio, el elemento de estructura secundaria y su posición específica en la proteína Gα. En el caso de G_o, el último residuo (Y354^{G,H5,26}) apunta hacia la TM5 del receptor, mientras que su equivalente en G_i (F354^{G,H5,26}), se encuentra intercalado entre el residuo R323^{6,29} y K345^{G,H5,17} (este residuo es específico de G_i, el equivalente en G_o es una alanina) (Figura III.30C). Además, simulaciones de MD de cinco réplicas independientes de 0,6 μs del D₃R unido a FOB02-04A y acoplado a Gα_oβγ mostraron interacciones alternantes de puente salino entre el residuo de D341^{G,H5,13} del extremo carboxilo terminal de la hélice a5 de G_o con los grupos de guanidinio de R218^{5,68} y R222^{5,72} en D₃R (Figura III.30E).

Además, la comparación estructural también reveló diferencias en las interacciones del ICL2 con G_o y G_i, existiendo estudios previos que reportan los contactos de los ICLs como determinantes para lograr la selectividad de G_o en D₃R^{100,198}. En concreto, cuando el receptor está acoplado a G_o, Q139^{34,54} se aleja de la hélice a5 para interaccionar con K32^{G,hns1,03} en la región amino terminal (Figura III.30D). Dicha interacción se confirmó en simulaciones de MD permaneciendo la distancia de interacción entre ambos residuos constante a lo largo de las cinco réplicas (Figura III.30E). Además, la interacción entre Q144^{ICL2} y E28^{G,HN,52} en la región amino terminal de G_i se pierde cuando se acopla a G_o debido a la sustitución del residuo E28^{G,HN,52} por una isoleucina, así como a la ligera diferencia en el posicionamiento de G_o con respecto al receptor (Figura III.30D).

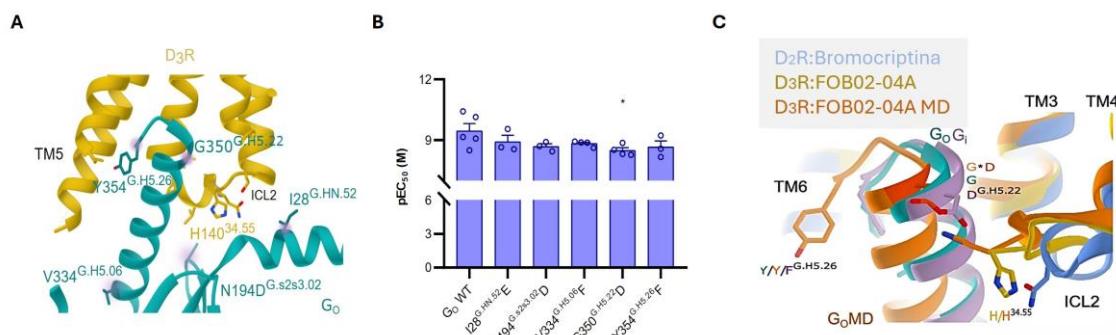


Figura III.31. Comparación de la interacción G_o vs G_i en D₃R. A) Vista general de las mutaciones seleccionadas de G_o a residuos equivalentes de G_i (resaltados en violeta). **B)** Valores pEC₅₀ para D₃R en respuesta a la activación de mutantes G_{OA} por FOB02-04A utilizando el ensayo TRUPATH. Los datos se presentan como medias ± SEM de tres (G_{OA} I28^{G.HN.52}E, N194^{G.s2s3.02}D, Y354^{G.H5.26}F), cuatro (G_{OA}-V334^{G.H5.06}F, G350^{G.H5.22}D,) y cinco (G_{OA} WT) experimentos independientes realizados por triplicado técnico. *p < 0,05 (ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Dunnett) para G350^{G.H5.22}D (p = 0,048). **C)** Detalles de la interacción α5 de G_o (turquesa, crio-ME; naranja, simulaciones de MD) y G_i (violeta, PDB 7JVR) con el ICL2 de D₃R (amarillo, estructura de crio-ME; naranja, simulación de MD) y D₂R (azul, PDB 7JVR). La mutación en el residuo G350^{G.H5.22}a D en G_o-MD se resalta en naranja oscuro y se muestra con un asterisco.

Para entender los residuos responsables de la selectividad de D₃R por G_o se modificaron los residuos G_o presentes en la interfaz de D₃R y G_o y que diferían en la proteína G_i (I28E^{G.HN.52}, N194L^{G.s2s3.02}, V334F^{G.H5.06}, G350D^{G.H5.22}, e Y354F^{G.H5.26}), sustituyéndolos uno a uno por sus equivalentes en G_i (experimentos realizados por Angela Carrión Antolí, miembro del grupo de investigación) (Figura III.31A). Ensayos TRUPATH mostraron que sólo la mutación del residuo G350^{G.H5.22}, situado en el extremo carboxilo de la hélice α5 de G_o (D350^{G.H5.22} en G_i) presentaba un impacto significativo sobre la potencia, definiendo por tanto este residuo como determinante para la selectividad del D₃R a G_o (Figura III.31B y Anexo III). El residuo G350^{G.H5.22} de G_o interacciona con el ICL2, pudiendo la presencia de un aminoácido más voluminoso (como el aspartato en G_i) presentar impedimentos estéricos, dificultando el acoplamiento. De hecho, simulaciones de MD sugieren la existencia de un segundo rotámero de H140^{34.55} en el ICL2 que ocupa el hueco dejado por G350^{G.H5.22}. Dicho

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

rotámero tendría impedimentos estéricos con la sustitución G350D^{G,H5,22} presente en G_i (Figura III.31C). En el caso de D₂R (un receptor sin selectividad G_{i/o}), el ICL2 se encuentra posicionado más hacia fuera del núcleo del receptor, dando lugar a una cavidad más amplia y sin restricciones estéricas para el acoplamiento de G_o o G_i en esta posición (Figura III.31C). Por tanto, el ICL2 parece desempeñar un papel relevante en la determinación de la selectividad G_{i/o} en el D₃R.

3.3.2 Interacción de FOB02-04A en D₃R

La comparación estructural del D₃R con otras estructuras unidas a pramipexol (PDB 7CMU), PD128907 (PDB 7CMV) o rotigotina (PDB 8IRT) no mostraron cambios conformacionales significativos en el D₃R, observándose una RMSD de 0,535 Å sobre 253 Ca con respecto a la unida a pramipexol. En cuanto al ligando, al contrario que el pramipexol que sólo ocupa un 23 % del bolsillo ortostérico, FOB02-04A se extiende más allá del OBS y recorre un estrecho canal hacia el sitio alostérico, localizado en el vestíbulo extracelular, estableciendo interacciones principalmente con residuos de la TM1-3 y la TM5-7, donde cada componente de la molécula bitópica interacciona con una región diferente dentro del bolsillo de D₃R (Figura III.32A-D).

Para correlacionar la información estructural con la actividad funcional, la mayoría de los residuos implicados en la unión del ligando se mutaron a alanina (excepto G94^{ECL1}, que se eliminó), y se midió la activación inducida por ligando mediante ensayos TRUPATH en células HEK293T (Figura III.32E y Anexo III). Asimismo, se cuantificó la expresión en superficie de cada mutante para garantizar que las diferencias funcionales observadas no se debían a cambios en la expresión de las variantes (Figura III.32I).

A continuación, se describe el modo de unión del ligando bitópico y la contribución de cada componente a la unión, estudiando las interacciones establecidas por cada componente del ligando (farmacóforo primario, conector y farmacóforo secundario) en el D₃R.

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

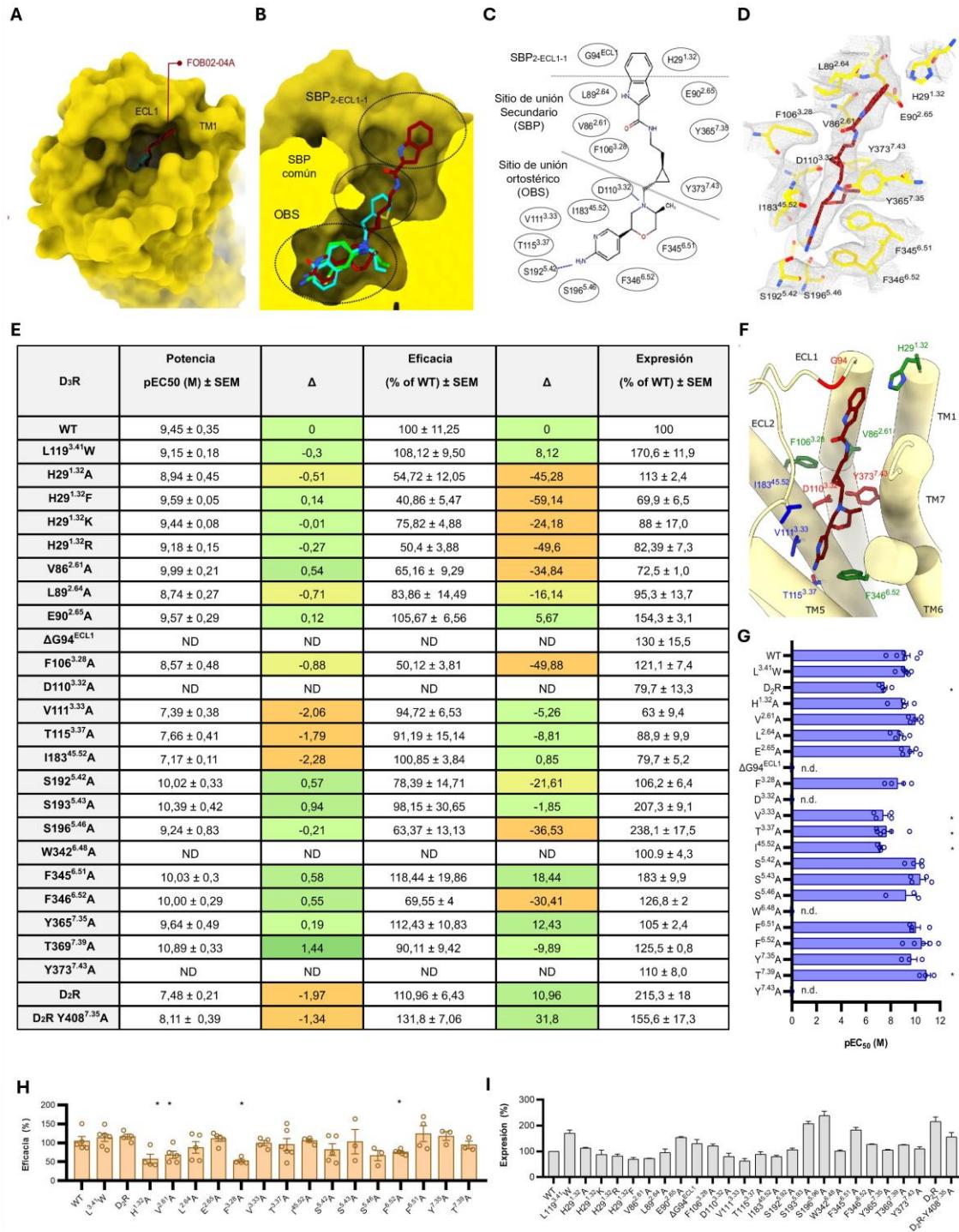


Figura III.32. Interacción de FOB02-04A en D₃R. **A)** Unión del farmacóforo secundario de FOB02-04A (rojo) a un bolsillo con forma de surco en el D₃R (amarillo, representación de superficie) formado por ECL1 y TM1. **B)** Comparación de la unión de FOB02-04A (rojo), pramipexol (verde) y rotigotina (cian) en el bolsillo de D₃R (amarillo, representación de superficie). Los círculos discontinuos indican el OBS, el SBP común en receptores aminérgicos y

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

el sitio SBP_{2-ECL1-1}. **C)** Esquema de la unión de FOB02-04A en el bolsillo de unión del ligando D₃R. **D)** Detalles de la unión de FOB02-04A (rojo) en el D₃R (amarillo) con densidad de crio-ME en gris. **E)** Tabla resumen de los valores de pEC₅₀, E_{max} y expresión obtenidos para los constructos utilizados. **F)** Detalles de la unión de FOB02-04A (rojo) en el D₃R (amarillo) con residuos en el bolsillo de unión del ligando coloreados por efecto funcional cuando se muta a alanina: eficacia disminuida - verde, potencia disminuida - azul y unión no detectable - rojo. **G)** Valores pEC₅₀ para la mutación de alanina de los residuos en el sitio de unión del ligando en respuesta a la activación de G_{OA} por FOB02-04A utilizando el ensayo TRUPATH. *p < 0,05 (ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Dunnett) para D₂R (p = 0,0081), V111^{3.33}A (p = 0,0049), T115^{3.37}A (p = 0,0074) e I183^{45.82}A (p = 0,0013) y nd - no detectable. **H)** Valores de E_{max} para la mutación de alanina de los residuos en el sitio de unión del ligando en respuesta a la activación de G_{OA} por FOB02-04A utilizando el ensayo TRUPATH. Los valores de E_{max} se han normalizado a D₃R WT. *p < 0,05 (valor p de dos colas de pruebas de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) para H29^{1.32}A (p = 0,016), V86^{2.61}A (p = 0,026), F106^{3.28}A (p = 0,003), F346^{6.52}A (p = 0,019). **I)** Valores de expresión en superficie obtenidos para los constructos D₃R mutados en el sitio de unión a ligando (normalizados a la expresión de D₃R WT). Todos los datos de pEC₅₀ y E_{max} presentados en la figura son medias ± SEM de cuatro experimentos independientes (n = 4) realizados en triplicados técnicos excepto para D110^{3.32}A, S196^{5.46}A, Y365^{7.35}A, T369^{7.39}A, W342^{6.48}A y Y373^{7.43}A (n=3), WT, V86^{2.61}A, L89^{2.64}A, E90^{2.65}A, ΔG94^{ECL1}, F346^{6.52}A (n=5) y L119^{3.41}W, T115^{3.37}A (n= 6).

La unión del farmacóforo primario en el OBS se caracteriza por la interacción con el residuo D110^{3.32} (puente salino) y una cavidad formada por S192^{5.42}, con el que establece un puente de hidrógeno, S196^{5.46}, F345^{6.51}, F346^{6.52}, W342^{6.48}, V111^{3.33}, T115^{3.37} e I183^{45.52} (Figura III.32C y D). Los ensayos funcionales revelaron la presencia en el OBS de residuos críticos como D110^{3.32} y W342^{6.48}, no observándose actividad detectable cuando se mutaban a alanina (Figura III.32E y F). El residuo D110^{3.32} forma una interacción de puente salino con casi todos los agonistas en receptores aminérgicos y W342^{6.48} es el residuo conservado “toggle switch”, esencial para la activación del receptor. Además, I183^{45.52} (en el ECL2), V111^{3.33}y T115^{3.37} tuvieron un impacto significativo en la potencia del agonista cuando se mutaron a alanina (Figura III.32G). En concreto, el residuo V111^{3.33}es específicamente relevante para la activación mediada por FOB02-04A ya que su mutación no tiene un impacto en la activación del

D₃R inducida por pramipexol, rotigotina, y PD128907^{107,185}. A su vez, T115^{3.37} es relevante para la activación inducida por FOB02-04A, algo que también ocurre en presencia de pramipexol pero no con PD128907 y rotigotina^{107,185}. Por otro lado, la interacción funcional del ligando bitópico con S192^{5.42} parece tener una importancia reducida para la unión de FOB02-04A (Figura III.32E), lo que contrasta con la mayoría de agonistas de receptores dopaminérgicos, donde la mutación del residuo S192^{5.42} a alanina tiene un gran impacto funcional. Sin embargo, se ha descrito que los agonistas no catecolícos (como FOB02-04A) no dependen en gran medida del residuo S192^{5.42} para la unión y la activación, siendo así S192^{5.42} importante para la unión de dopamine, pero no por ejemplo para el pramipexol¹⁰⁷. Por otro lado, en el bolsillo de D₃R se localiza una región hidrofóbica conservada entre T369^{7.39} y F345^{6.51} que está ocupada por el grupo propilamina de rotigotina, pramipexol y PD128907, mientras que apenas está ocupada por un grupo metilo de FOB02-04A (Figura III.33). Esto puede explicar la falta de efecto de F345^{6.51}A sobre la activación por FOB02-04A. Posiblemente, la incorporación de un grupo hidrofóbico mayor en esta posición podría mejorar su unión al bolsillo.

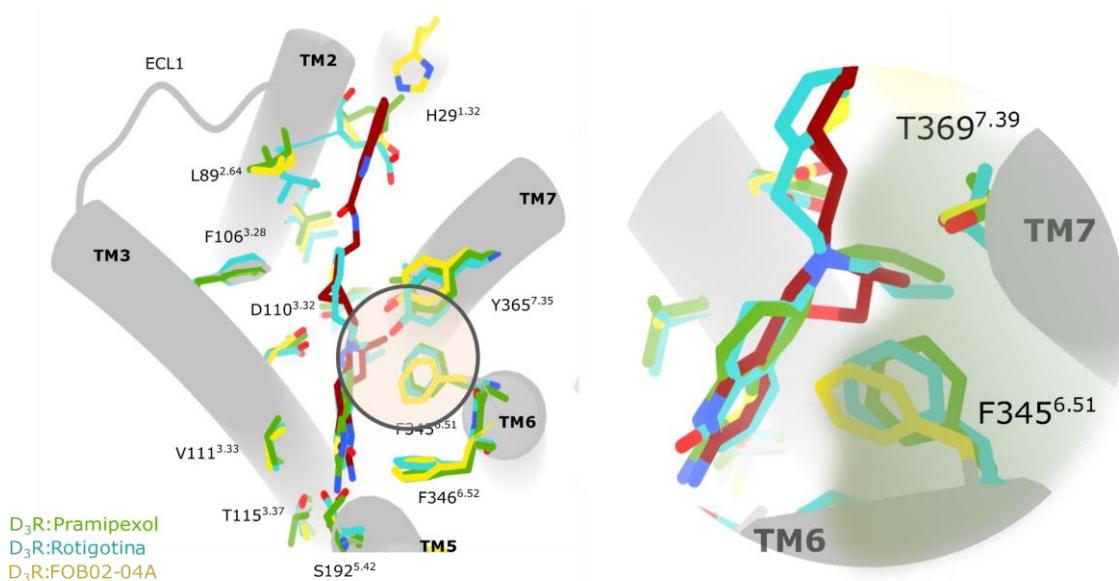


Figura III.33. Comparación del sitio de unión en D₃R para FOB02-04A (rojo), rotigotina (azul) y pramipexol (verde). La ampliación muestra el sitio hidrofóbico conformado por F345^{6.51} y T369^{7.39}.

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

Además, se evaluó con simulaciones de MD la interacción de puente salino entre el grupo amina trans-ciclopropilo de FOB02-04A o el grupo amino del pramipexol y el grupo carboxilo de D110^{3,32} en D₃R, sugiriendo una interacción más robusta de FOB02-04A con D₃R que pramipexol. Con pramipexol, tres de las cinco trayectorias MD mostraron desviaciones sustanciales en la interacción equivalente al puente salino, así como en la distancia de interacción entre S196^{5,46} en D₃R y el grupo amino de pramipexol (Anexo IV). Dado que el pramipexol y el FOB02-04A tienen afinidades de unión similares, la propensión del pramipexol hacia la disociación observada durante las simulaciones de MD sugiere tasas de asociación y disociación más rápidas. Esto concuerda con el tamaño de los agonistas, siendo el FOB02-04A más grande y por ende requiriendo tiempos más largos para la asociación y la disociación.

Por su parte, el conector de FOB02-04A, que enlaza ambos farmacóforos, interactúa con residuos del bolsillo secundario común en receptores aminérgicos, una región no explotada por pramipexol y PD128907, pero ocupada por el grupo propiltiofeno en rotigotina (Figura III.32B). Este bolsillo está formado por los residuos V86^{2,61}, F106^{3,28}, T369^{7,39}, e Y373^{7,43} y se ha propuesto que tiene diferente plasticidad conformacional entre los receptores de dopamina¹⁸⁵, lo que podría explicar la selectividad de los distintos ligandos. En el caso de FOB02-04A, tres residuos mostraron una reducción significativa de la actividad cuando se mutaron a alanina: Y373^{7,43}, F106^{3,28} y V86^{2,61}. La variante Y373^{7,43}A mostró una actividad no detectable en presencia de FOB02-04A y, aunque se sabe que este residuo es relevante para mantener la geometría del residuo D110^{3,32}, esencial para la unión de agonistas a través de un puente salino, su mutación no tiene un efecto tan pronunciado en la activación mediada por el pramipexol, la dopamina o el PD128907 como en la activación mediada por la rotigotina o FOB02-04A. Esto sugiere un papel de este residuo en la unión y/o función de la molécula bitópica al receptor. Además, las mutaciones a alanina de F106^{3,28} y V86^{2,61} mostraron una eficacia reducida (Figura III.32H). Es probable que este efecto sea específico para FOB02-04A, ya que la variante V86^{2,61}A no redujo la eficacia del pramipexol¹⁰⁷. Por tanto, el enlazador que conecta ambos farmacóforos no actúa como mero conector, sino que presenta un papel activo en la unión del FOB02-04A a D₃R. De hecho, se ha reportado recientemente una importante contribución del conector a la unión de moléculas

bitópicas, observándose efectos específicos sobre los farmacóforos primarios, los receptores, la cinética de activación del transductor y el sesgo que dependen exclusivamente de las interacciones establecidas por el conector¹⁹⁹.

Por último, el farmacóforo secundario del ligando FOB02-04A interacciona con una región en forma de surco en la parte extracelular del receptor (denominada de ahora en adelante como SBP_{2-ECL1-1}), que está formada por las regiones extracelulares de la TM1, TM2 y ECL1 (Figura III.32A y III.34A). A diferencia de las estructuras anteriormente reportadas del D₃R tanto en estado activo como inactivo, en esta estructura (Conformación A), los residuos extracelulares más externos de la TM1 sufren una reorganización que posiciona el grupo imidazol del residuo H29^{1,32} hacia el grupo indol del farmacóforo secundario del bitópico (Figura III.34A).

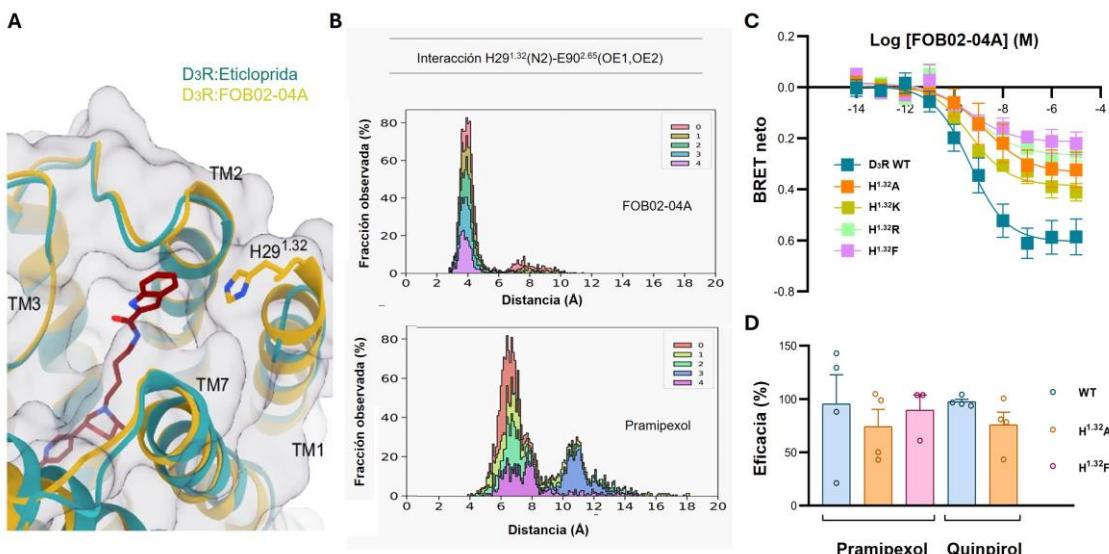


Figura III.34. Contribución de H29^{1,32} a la activación de D₃R inducida por FOB02-04A. A) Modo de unión general de la molécula bitópica al D₃R y ordenamiento de TM1 tras la unión bitópica. FOB02-04A (rojo) se muestra en estructuras superpuestas de D₃R unido a eticloprida (cian, PDB 3PBL) y FOB02-04A (amarillo). B y C) Frecuencia de interacciones entre el grupo carboxilo de E90^{2,65} y el N(ε) protonado de H29^{1,32} con FOB02-04A (B) y pramipexol (C). D) Curvas de concentración-respuesta de D₃R H29^{1,32}A (naranja), H29^{1,32}F (rosa), H29^{1,32}K (amarillo) y H29^{1,32}R (verde) tras la activación de G_{OA} por FOB02-04A (mostradas como BRET netos). Todos los datos son medias ± SEM derivadas de tres experimentos independientes (n =

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

3), cada uno realizado por triplicado técnico, excepto para H29^{1,32}A (n = 4). **E)** Valores de E_{max} para D₃R H29^{1,32}A y H29^{1,32}F tras la activación de G_{OA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de pramipexol o quinpirol. Los valores de E_{max} se han normalizado a la actividad de D₃R WT en presencia de FOB02-04A y derivan de cuatro experimentos independientes realizados en triplicados técnicos (n = 4) excepto para H29^{1,32}F (n = 3) (valor p de dos colas de pruebas de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Dada la ausencia del residuo H29^{1,32} en las estructuras de crio-ME o cristalinas precedentes de D₃R, se confirmó la orientación del grupo imidazol de H29^{1,32} con simulaciones de MD. El análisis de cinco simulaciones paralelas de 0,6 μs reveló una localización más consistente de H29^{1,32} entre TM2 y TM7 cuando el D₃R está unido a FOB02-04A en relación con pramipexol. En esta conformación, la cadena lateral H29^{1,32} se dirige hacia el SBP_{2-ECL1-1}, interaccionando con el farmacóforo secundario del ligando bitópico FOB02-04A. Por otro lado, aunque el nitrógeno del imidazol en H29^{1,32} y el grupo carboxilo del residuo E90^{2,65} están demasiado lejos para establecer fuertes interacciones polares o iónicas, el complejo D₃R con el ligando bitópico FOB02-04A mostró una distribución de distancias más estrecha que en el complejo con pramipexol (Figura III.34B). Además, en presencia de FOB02-04A, el nitrógeno del imidazol de H29^{1,32} interactúa de forma consistente con el oxígeno del esqueleto peptídico de E90^{2,65} (Anexo IV). Por el contrario, cuando se forma un complejo con pramipexol, tres de las cinco trayectorias muestran que esta distancia supera sistemáticamente los 10 Å.

En conjunto, se muestra que mientras que en el complejo de D₃R unido a FOB02-04A la cadena lateral de H29^{1,32} está predominantemente posicionada en el SBP_{2-ECL1-1} (estabilizada por el ligando), en el complejo unido a pramipexol la cadena lateral de H29^{1,32} apunta hacia fuera, probablemente debido a la ausencia del farmacóforo secundario en pramipexol.

Por su parte, la mutación de H29^{1,32} por alanina supuso solo una ligera reducción en la potencia (~ 3 veces en EC₅₀) pero una disminución significativa en la eficacia de FOB02-04A (Figura III.34C). Para comprender el papel de H29^{1,32} en la unión del ligando, se mutó a residuos con diferentes propiedades fisicoquímicas y tamaños (aparte de la

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

alanina), incluyendo H29^{1.32}F, H29^{1.32}K y H29^{1.32}R. Mientras que la variante H29^{1.32}K mostró una eficacia reducida similar a la H29^{1.32}A, tanto la H29^{1.32}F como la H29^{1.32}R mostraron una mayor reducción de la eficacia, probablemente debido a posibles choques estéricos con el farmacóforo secundario del agonista bitópico (Figura III.34C).

Como control, la activación mediada por pramipexol en la variante H29^{1.32}F fue similar a la observada para el WT, mientras que en presencia de FOB02-04A se observó una eficacia reducida, demostrando un rol adicional de H29^{1.32} para la activación mediada por FOB02-04A. Sin embargo, ensayos con la variante H29^{1.32}A en presencia de pramipexol y quinpirol (agonista clásico de D₂R y D₃R que no interacciona con el SBP) también mostraron una eficacia reducida (Figura III.34D). Por tanto, este sitio podría ser estructuralmente importante para la activación del receptor, pudiendo su mutación no sólo alterar la interacción con FOB02-04A si no también distorsionar el bolsillo de unión del D₃R. De hecho, tanto en la estructura de crio-ME como en simulaciones de MD se observó que el H29^{1.32} forma una red de enlaces de hidrógeno con el E90^{2.65}, existiendo estudios previos que reportan cómo residuos en los sitios más extracelulares pueden tener un impacto en la función intrínseca del receptor²⁰⁰. Por lo tanto, no se puede descartar que los efectos funcionales de las variantes H29^{1.32} sobre la activación del receptor puedan contener contribuciones no relacionadas con la unión del ligando.

Además de la mutación en H29^{1.32}, los ensayos funcionales muestran como varios residuos en el SBP modulan la eficacia de FOB02-04A (Figura III.32H), siendo probablemente el enlazador y la conformación del farmacóforo secundario óptimos para posicionar el farmacóforo primario, consiguiendo una eficacia máxima en el OBS y pudiendo las mutaciones alrededor del SBP restringir las conformaciones del farmacóforo primario de FOB02-04A a alternativas menos eficaces. De hecho, estudios previos han descrito cómo ligeras variaciones en la posición del farmacóforo primario en el OBS del D₃R podrían modular la eficacia del compuesto²⁰¹. Así, los ensayos funcionales muestran una marcada segregación de los papeles funcionales de los residuos que interaccionan con cada componente de la molécula bitópica, encontrándose mutaciones que disminuyen significativamente la potencia (>100 veces la EC₅₀) principalmente en el OBS mientras que las mutaciones en el SBP disminuyen

principalmente la eficacia de FOB02-04A. Esto sugiere que el farmacóforo secundario influye en el posicionamiento óptimo del farmacóforo primario para la actividad. En concreto, la delección de G94^{ECL1}, que impide que el ECL1 alcance el farmacóforo secundario, es esencial para la actividad de FOB02-04A, no observando actividad detectable en ensayo TRUPATH (Figura III.35). Un estudio previo reportó que G94^{ECL1} era esencial para la unión de una molécula bitópica similar, sin embargo, sólo se observó una reducción de la afinidad (utilizando ligandos radiactivos y fluorescencia) mientras que en nuestros ensayos la actividad es nula. Esto sugiere que FOB02-04A podría potencialmente seguir uniéndose a la variante ΔG94^{ECL1} (aunque con menor afinidad) pero no desencadenar ninguna activación detectable, por lo que es probable que G94^{ECL1} determine la afinidad y la eficacia del ligando. Para garantizar que la variante ΔG94^{ECL1} era funcional, se probó la activación de ΔG94^{ECL1} con quinpirol observándose respuesta en ensayo TRUPATH y resaltando así el efecto específico de la mutación sobre la función del ligando bitópico FOB02-04A (Figura III.35).

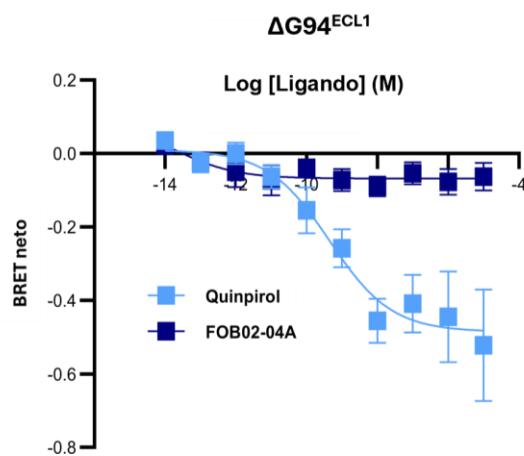


Figura III.35. Activación de la variante ΔG94^{ECL1} inducida por FOB02-04A (azul oscuro) y quinpirol (azul claro). Curvas de concentración-respuesta para D₃R ΔG94^{ECL1} tras la activación de G_{OA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de FOB02-04A y quinpirol. Todos los datos son medias ± SEM derivadas de cinco (n=5) y cuatro (n=4) experimentos independientes para D₃R ΔG94^{ECL1} en presencia de FOB02-04A y quinpirol respectivamente.

Por tanto, el agonista bitópico FOB02-04A utiliza los tres componentes para interaccionar con el receptor, donde cada componente contribuye con una interacción

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

esencial que, si se altera, puede eliminar la activación inducida por el ligando en su conjunto, mostrando que la interacción del ligando bitópico es una interacción coordinada y en bloque, donde los tres componentes son interdependientes para la unión a D₃R.

3.4 Bases de la selectividad de FOB02-04A en D₃R/D₂R

Adhikari y colaboradores reportaron en células HEK293T una selectividad de unión 50 veces superior de FOB02-04A en D₃R con respecto a D₂R¹⁹². Dado que la cuantificación de la selectividad hacia los receptores depende del ensayo y de las condiciones, se midió la selectividad hacia D₃R y D₂R de FOB02-04A utilizando ensayos TRUPATH, confirmando la selectividad 50 veces mayor del FOB02-04A en D₃R (Figura III.36B). En concreto, los residuos G94^{ECL1} y H29^{1,32} dentro del SBP_{2-ECL1-1} forman una región estructural y secuencialmente diversa entre D₃R y D₂R (Figura III.36A). El ECL1 del D₃R alberga un residuo extra de glicina que está ausente en el D₂R (93GGV95 en el D₃R frente a 98GE99 en el D₂R), lo que permite que esta región interactúe con el farmacóforo secundario en el D₃R y no en el D₂R. De hecho, la supresión de la glicina extra G94^{ECL1} en D₃R anula la activación inducida por el ligando FOB02-04A.

Además, en paralelo al desarrollo de FOB02-04A, Adhikari y colaboradores generaron otros compuestos con el fin de ganar en selectividad D₃R/D₂R. Entre ellos se encontró el ligando bitópico AB04-88, de estructura química muy similar y, sin embargo, con menor selectividad (Figura III.36C)¹⁹². Dado que el AB04-88 se origina a partir de los esfuerzos por desarrollar agonistas selectivos de D₃R/D₂R, se puede obtener información adicional sobre la selectividad bitópica comparando los modos de unión de los ligandos FOB02-04A y AB04-88. Para ello se resolvió la estructura por crio-ME del complejo D₃R unido a AB04-88 (presentado en capítulo 4) y se confirmó una selectividad D₃R/D₂R de tan solo 12 veces utilizando ensayos TRUPATH. La comparación estructural revela que la selectividad mejorada de FOB02-04A se origina a partir de las interacciones del farmacóforo secundario con la región extracelular más externa que involucra a G94^{ECL1} (que está ausente en D₂R) y H29^{1,32} en TM1, una región que se ordena en una

conformación helicoidal en presencia del ligando bitópico FOB02-04A para apilarse sobre el grupo indol del farmacóforo secundario (Figura III.36D). En la estructura del complejo D₃R unido a AB04-88 (capítulo 4), el grupo indol del farmacóforo secundario está posicionado en una orientación ligeramente diferente, y se encuentra más perpendicular a G94^{ECL1} en comparación con FOB02-04A, generando menos interacciones con el residuo G94^{ECL1} (Figura III.36D). De hecho, la eliminación de G94^{ECL1} solo conduce a una menor eficacia en ensayos TRUPATH, mientras que dicha interacción es crítica y esencial para la activación inducida por FOB02-04A (Figura III.36E). Además, la TM1 se desplaza hacia afuera del núcleo del receptor, debido a la torsión de la TM7 o al posicionamiento más bajo del grupo indol de AB04-88. Esta reorganización aleja a la TM1 del núcleo del receptor y probablemente coloca a H29^{1.32} demasiado lejos para ordenarla y establecer interacción con el ligando AB04-88.

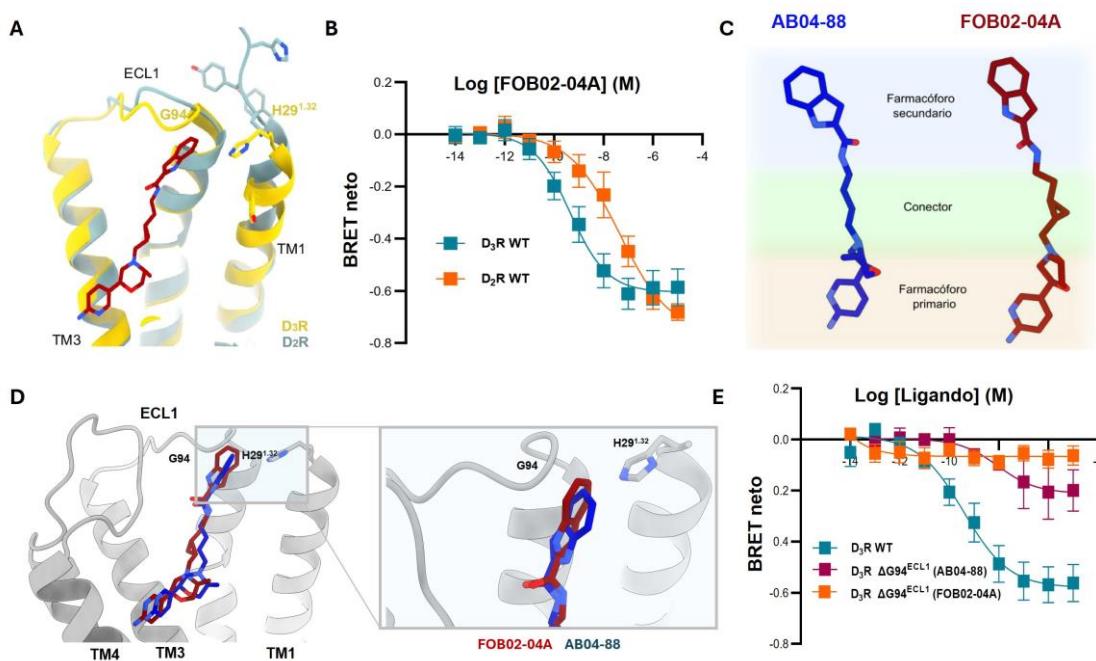


Figura III.36. Contribución de G94^{ECL1} a la selectividad D₃R/D₂R. A) Comparación de las regiones TM2-ECL1 y TM1 en D₃R (amarillo) y D₂R (azul) dentro del alcance de FOB02-04A (rojo). **B)** Curvas de concentración-respuesta para D₃R y D₂R tras la activación de G_{OA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de FOB02-04A. Todos los datos son medias ± SEM derivadas de tres ($n = 3$) y cinco ($n=5$) experimentos independientes para D₂R y D₃R respectivamente. **C)** Comparación de las estructuras químicas de FOB02-04A (rojo) y AB04-88 (azul). Ambos comparten farmacóforos y difieren en el conector, de tipo ciclopropilo en FOB02-04A y butilo

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

para AB04-88. **D)** Comparación del modo de unión de FOB02-04A (rojo) y AB04-88 (azul) en D₃R (rosa). **E)** Curvas de concentración-respuesta para D₃R ΔG94^{ECL1} tras la activación de G_{OA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de FOB02-04A y AB04-88 (mostrados como BRET neto). Todos los datos son medias ± SEM derivadas de cinco experimentos independientes (n = 5) excepto para D₃R ΔG94^{ECL1} con AB04-88 (n=3).

Por tanto, la falta de contactos con el residuo H29^{1,32} y los contactos más débiles con G94^{ECL1} probablemente expliquen la menor selectividad de AB04-88 en comparación con FOB02-04A, posicionando a G94^{ECL1} como el residuo más crítico para la selectividad entre D₃R y D₂R.

3.5 Diversidad del SBP_{2-ECL1-1} en otros receptores aminérgicos

Existen 9 grupos de subtipos de receptores aminérgicos (clínicamente relevantes) estrechamente relacionados (receptores muscarínicos M₁₋₅, receptores adrenérgicos α_{1A-1D}, α_{2A-2C}, β₁₋₃, receptores de dopamina D₁ y D₅, D₂-D₄, receptores de histamina H₃ y H₄ y receptores de serotonina 5-HT_{1A-1F}, 5-HT_{2A-2C}) para los que la similitud de secuencia plantea problemas a la hora de desarrollar ligandos selectivos⁶⁴. La selectividad puede surgir de la diversidad de secuencias, la divergencia estructural y las diferencias en la plasticidad estructural. A través del alineamiento de secuencias y considerando la creciente disponibilidad de estructuras de GPCRs, se evaluó si el sitio SBP_{2-ECL1-1} constituye un nuevo punto de alta diversidad, con potencial para el desarrollo de fármacos selectivos en otros GPCRs aminérgicos. Primero se comparó el complejo de D₃R unido a FOB02-04A con estructuras de otros receptores aminérgicos unidos a ligandos bitópicos (Figura III.37A). Algunos ejemplos incluyen el D₂R unido a espiperona (PDB 7DFP), risperidona (PDB 6CM4) o haloperidol (6LUQ) y el receptor de serotonina 5HT_{1A} unida a aripiprazol (7E2Z), IHCH-7179 (8JT6), Vilazodona (8FYL) o buspirona (8FYX). Una superposición estructural de estos complejos muestra que ningún otro ligando interacciona con los residuos equivalentes a G94^{ECL1} o H29^{1,32} en el D₂R o en el receptor de serotonina 5-HT_{1A}. El modo de unión más cercano sería el de la vilazodona en el receptor de serotonina 5HT_{1A}, donde el grupo amida terminal de la vilazodona está

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

cercano a N100^{ECL1} (el equivalente de G94), aunque queda fuera de la distancia de interacción.

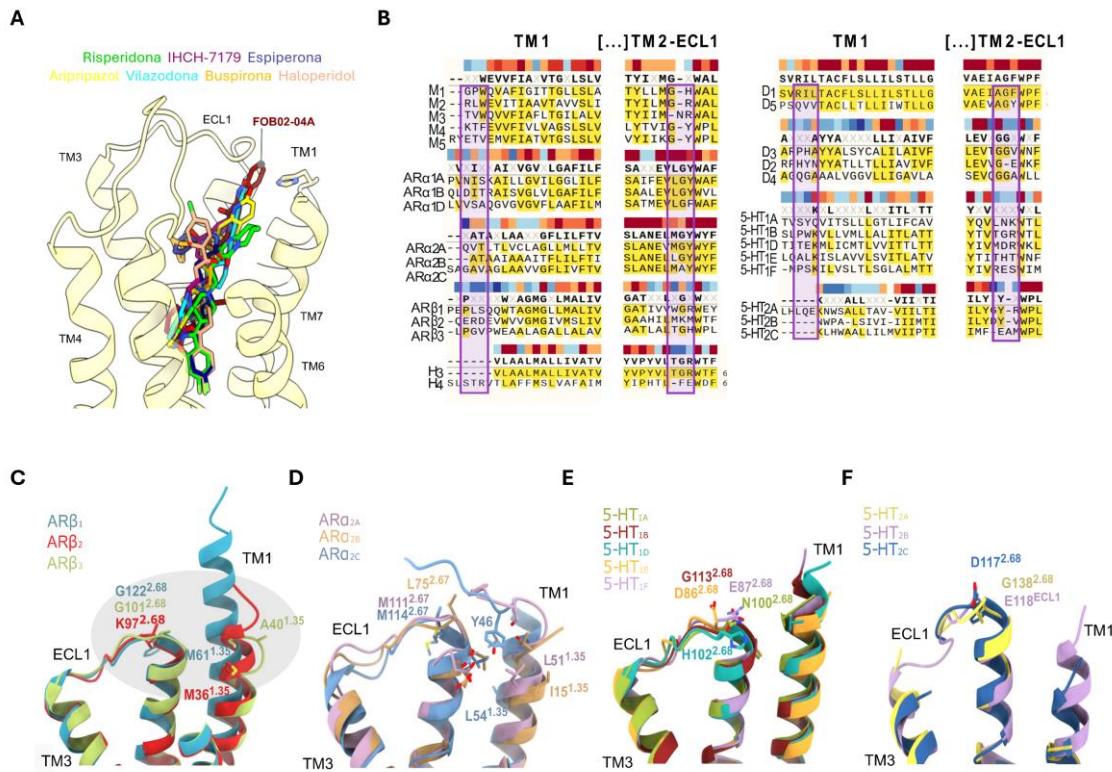


Figura III.37. Diversidad del SBP_{2-ECL1-1} en receptores aminérgicos. **A)** Comparación de las regiones TM2-ECL1 y TM1 en D₃R (amarillo) y D₂R (azul) dentro del alcance de FOB02-04A (rojo). **B)** Sitios de unión relativos de otros ligandos bitópicos unidos a D₂R (haloperidol (PDB 6LUQ), espiperona (PDB 7DFP), risperidona (PDB 6CM4) y al receptor de serotonina 5-HT_{1A} (aripiprazol (PDB 7E2Z), IHCH-7179 (PDB 8JT6), vilazodona (PDB 8FYL) y buspirona (PDB 8FYX)), mostrados en la estructura de crio-ME de FOB02-04A:D₃R. **C)** Alineamiento de secuencias de las regiones TM1 y TM2-ECL1 en GPCRs aminérgicos con residuos alrededor del SBP_{2-ECL1-1} señalados con un recuadro morado. La conservación de la secuencia está codificada por colores (gradiente de rojo oscuro a azul oscuro, mostrando residuos altamente conservados y no conservados respectivamente). **D-G)** Diferencias estructurales en el sitio SBP_{2-ECL1-1} entre receptores adrenérgicos estrechamente relacionados (**D, E**) y receptores de serotonina (**F, G**).

El análisis del SBP_{2-ECL1-1} en otros receptores aminérgicos mostró que esta región es variable ya sea en secuencia, estructura o ambas dentro de la mayoría de los subtipos

de receptores aminérgicos (Figura III.37). El grado de diversidad en el SBP_{2-ECL1-1} varía dentro de cada subfamilia, siendo los receptores muscarínicos los menos variables, encontrándose la TM1 demasiado separada en todas las estructuras para contribuir mientras que la posición equivalente a G94^{ECL1} solo es diferente en el receptor muscarínico M₃ (N131^{ECL1}), al contrario que en los receptores muscarínicos M₁, M₂, M₄ y M₅ donde el residuo es una glicina. Sin embargo, existen marcadas diferencias en otros subgrupos. Por ejemplo, los grupos de receptores de serotonina 5-HT₁ y 5-HT₂ muestran una secuencia o estructura variable en la posición equivalente a G94^{ECL1} mientras que la TM1 está demasiado alejada (Figura III.37E y F). Además, un estudio reciente reportó la estructura de los cinco receptores de dopamina (D₁R-D₅R) unidos a rotigotina identificando esta región del SBP_{2-ECL1-1} como la más variable entre ellos. Por otro lado, los receptores adrenérgicos α_{2A-2C} presentan diferencias en la posición equivalente a G94^{ECL1}, lo que podría contribuir potencialmente a la interacción específica en cada receptor con potenciales ligandos. Así, mientras que la TM1 en el receptor adrenérgico α_{2B} está muy separada, en el receptor adrenérgico α_{2A} es más larga, pudiendo potencialmente contribuir con interacciones a través de la cadena principal de Y43, mientras que en el receptor α_{2C}, el extremo amino terminal se pliega sobre el sitio TM2-ECL1 proporcionando residuos específicos adicionales (Figura III.37D). Por su parte, en los receptores adrenérgicos β₁₋₃, la región de TM2-ECL1 también presenta divergencias estructurales y de secuencia que podrían utilizarse para diseñar moléculas bitópicas altamente selectivas para cada subtipo (Figura III.37C).

Por tanto, el sitio SBP_{2-ECL1-1} se define como una región de selectividad importante, que puede ser utilizada para el desarrollo de fármacos selectivos para cada subtipo, permitiendo explotar nuevas áreas de selectividad.

3.6 Conformación alternativa de FOB02-04A

En paralelo al procesado de los datos recogidos del complejo de D₃R:G_oαβγ:scFv16 unido a FOB02-04A, simulaciones de acoplamiento molecular revelaron dos posibles conformaciones para el ligando bitópico que luego fueron confirmadas por crio-ME

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

(Figura III.38 y Anexo V). En la conformación alternativa, denominada Conformación B, se observa que el grupo indol del farmacóforo secundario interactúa con un bolsillo menos hidrófobo definido por las cadenas laterales polares de los residuos S182^{41,51}, Y365^{7,35}, así como de los residuos V360^{ECL3} y P362^{7,32}, denominados en adelante SBP_{ECL2-ECL3}. En particular, las interacciones de apilamiento π-π entre la parte indol de FOB02-04A e Y365^{7,35} estabilizan la Conformación B (Figura III.38). Simulaciones de MD confirmaron que el indol del farmacóforo secundario de FOB02-04A oscila entre el SBP_{2-ECL1-1} (Conformación A) y el SBP_{ECL2-ECL3} (Conformación B), no siendo esta nueva conformación tan selectiva como la Conformación A ya que todos los residuos que forman el sitio de unión se conservan entre D₂R y D₃R (Anexo V). En concreto, el análisis de simulaciones de MD basadas en la proximidad entre el farmacóforo secundario y el residuo E90^{2,65} y el residuo Y365^{7,35} mostraron que la Conformación A, que interactúa con SBP_{2-ECL1-1}, es predominante con una prevalencia estimada del 90 %, en contraste con el 10 % observado para la Conformación B, que se dirige a la región SBP_{ECL2-ECL3} (Figura III.38D). Con estos resultados, se intentó identificar la Conformación B dentro del conjunto de datos de crio-ME, obteniendo un modelo con una resolución de 3,09 Å en el que el ligando se presentaba en una conformación alternativa. En este modelo, la densidad de crio-ME respalda la segunda conformación para el farmacóforo secundario de FOB02-04A, observándose interacciones de apilamiento π-π con el residuo Y365^{7,35} de una manera similar a la encontrada en las simulaciones de acoplamiento molecular y de MD (Anexo V). Además, en este mapa de crio-ME los residuos extracelulares de TM1 (incluida la H29^{1,32}) no están resueltos, lo que concuerda con las estructuras previamente reportadas de D₃R unidas a pramipexol, rotigotina y PD128907, sugiriendo que la unión del farmacóforo secundario al SBP_{2-ECL1-1} estabiliza la conformación de la TM1 descrita anteriormente. Además, como se observó en simulaciones de MD, en crio-ME también se identificó un predominio de la Conformación A sobre la B (~ 60 % vs 40 %).

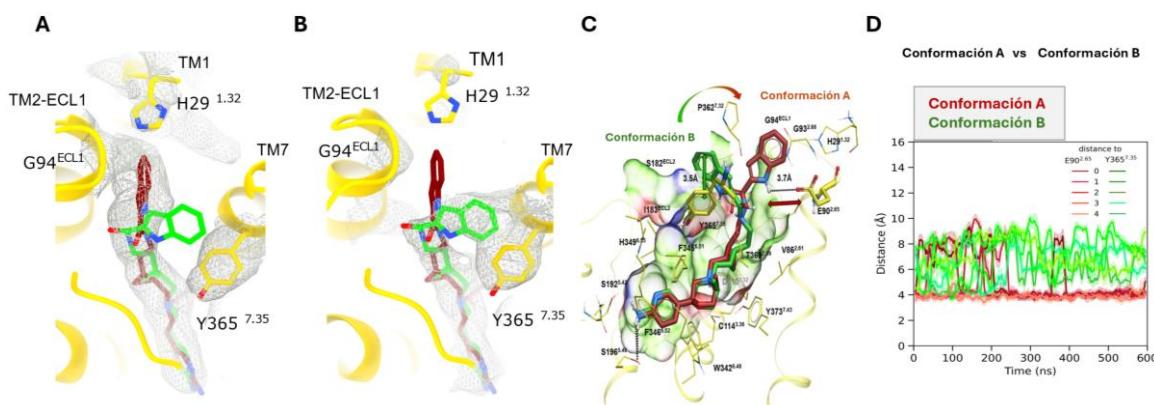


Figura III.38. Conformación A vs Conformación B. **A y B)** La densidad de crio-ME se muestra como una malla gris para la Conformación A (**A**) y la Conformación B (**B**) con ambas conformaciones FOB02-04A superpuestas. **C)** Poses de unión predichas para FOB02-04A en D₃R obtenidas por simulaciones de MD que muestran la Conformación A y la Conformación B con interacciones intramoleculares mostradas como líneas discontinuas negras. **D)** La dinámica de interacción entre E90^{2.65} y el farmacóforo secundario de FOB02-04A comparada con la distancia de proximidad entre D₃R Y365^{7.35} y el farmacóforo secundario de FOB02-04A sugiere que FOB02-04A adopta predominantemente la Conformación A sobre la B. Se muestran datos de cinco simulaciones independientes del complejo D₃R:Gα_oβγ, que abarcan 0,6 μs.

Para comprender el papel de la Conformación B en la función de FOB02-04A, se realizaron ensayos TRUPATH con la variante Y365^{7.35}A, que afecta exclusivamente a la Conformación B, obteniendo una respuesta similar a la observada con D₃R WT (Figura III.32E y Anexo III). Sin embargo, la variante ΔG94^{ECL1} (que sólo afecta a la conformación A) eliminó por completo la disociación de Gα_oβγ. Estos resultados sugieren que el ligando bitópico puede comportarse como un antagonista/agonista parcial débil cuando está en la Conformación B. Esto correlacionaría con la observación previa de que la posición del farmacóforo secundario es altamente relevante para el posicionamiento óptimo y la eficacia del farmacóforo primario. De hecho, en la Conformación B se observa un giro menor del farmacóforo primario en el OBS con respecto a la Conformación A, y se ha demostrado que modificaciones menores en la posición del ligando en el OBS del D₃R regulan la eficacia del ligando²⁰¹. Sin embargo, no se puede descartar que sea una consecuencia de la baja resolución del mapa. Otra posibilidad es que la Conformación B sea un agonista, pero que se trate de una conformación muy

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

poco poblada (del 10 % según las simulaciones de MD) y con una afinidad demasiado baja para ser detectada en ensayos funcionales.

Además, se evaluó si la Conformación B podría estar ocurriendo en D₂R (donde no existe el residuo G94^{ECL1} de D₃R ni un equivalente a H29^{1,32}). Sin embargo, la variante Y408^{7,35}A en D₂R (la tirosina equivalente a Y365 en D₃R) no resultó en una pérdida de señalización (Figura III.32E), lo que sugiere que existen modos de unión alternativos en D₂R además de los presentados como Conformación A y B. Ello concuerda con la naturaleza plástica descrita para D₂R, siendo el modo de unión de esta molécula bitópica a D₂R difícil de predecir y requiriendo por tanto de la determinación estructural.

En cualquier caso, la determinación de una segunda conformación antagonista/no selectiva de la molécula bitópica FOB02-04A sugiere que la posición del farmacóforo primario en el OBS parece alterarse fácilmente (al menos para el D₃R en el caso de FOB02-04A), lo que disminuye la eficacia del agonista. Esto debe de ser considerado en el desarrollo de moléculas bitópicas selectivas de subtipo, ya que las moléculas bitópicas tienden a ser grandes y flexibles, pudiendo las conformaciones alternativas no productivas ocultar conformaciones altamente específicas y potentes en ensayos funcionales. Así, la determinación estructural de receptores unidos a ligandos bitópicos podría arrojar información estructural adicional permitiendo mejorar el desarrollo de estos fármacos.

3.7 Diseño racional de fármacos selectivos a D₃R basados en la estructura del complejo D₃R:Gαβγ:scFv16 unido a FOB02-04A

La identificación del nuevo SBP_{2-ECL1-1}, que confiere a FOB02-04A selectividad por el D₃R especialmente a través de la interacción con los residuos H29^{1,32} y G94^{ECL1}, ha guiado el diseño racional basado en la estructura para la síntesis de nuevos compuestos con mayor selectividad. Alessandro Bonifazi y colaboradores han sintetizado moléculas a partir del ligando FOB02-04A intentando fortalecer la interacción con el SBP_{2-ECL1-1}, especialmente con H29^{1,32}. En concreto, todos los nuevos compuestos generados

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

presentan una alteración del farmacóforo secundario, sin embargo, estas modificaciones no se muestran explícitamente en esta tesis por motivos de protección intelectual, ya que solo se han obtenido datos preliminares de ellos. Alessandro Bonifazi y colaboradores en el NIH han realizado ensayos de unión por radioactividad de estos ligandos, observando que estas modificaciones incrementan la afinidad de los nuevos ligandos por el D₃R y la empeoran para D₂R, observándose un incremento global en la selectividad de unión con respecto a la que se observó inicialmente con FOB02-04A (Figura III.39).

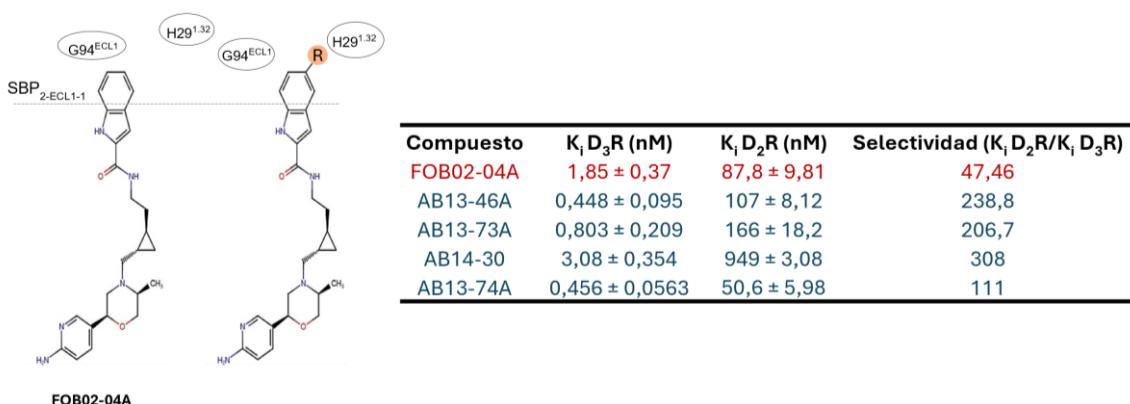


Figura III.39. Estructuras químicas y afinidades de compuestos diseñados tomando como molécula de origen FOB02-04A.

Para confirmar la selectividad y evaluar la eficacia de las nuevas moléculas se realizaron ensayos TRUPATH para D₃R y D₂R en presencia de los nuevos compuestos. Resultados preliminares sugieren una selectividad aumentada por D₃R para todos los compuestos probados (AB13-46A, AB13-73A y AB13-74A), observándose un aumento en la potencia tras activación de D₃R (Figura III.40). Además, también disminuye la potencia de todos los compuestos para D₂R, observándose una selectividad D₃R/D₂R de hasta más de 100.000 veces.

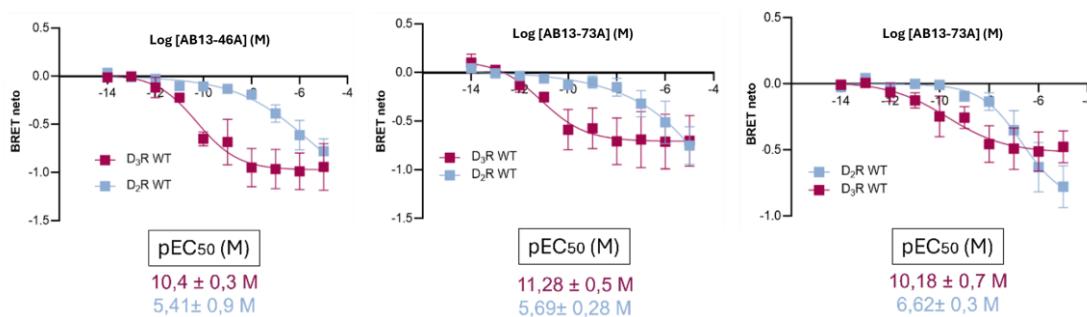


Figura III.40. Curvas de concentración-respuesta para D₃R WT tras la activación de G_oA mediante ensayos TRUPATH en presencia de AB13-46A, AB13-73A y AB13-74A. Todos los datos son medias ± SEM derivadas de tres experimentos independientes (n = 3).

Estos resultados preliminares sugieren que los nuevos agonistas podrían ser los primeros compuestos capaces de distinguir farmacológicamente con alta selectividad a D₃R y D₂R y que el SBP_{2-1-ECL1} puede ser explotado para el desarrollo de fármacos selectivos. La confirmación estructural a través de crio-ME con los nuevos compuestos unidos a D₃R demostraría esta hipótesis.

3.8 Discusión

Los receptores aminérgicos son dianas farmacológicas de gran relevancia, pero la gran similitud de secuencia y estructura dentro de la familia plantea un gran desafío para el desarrollo de fármacos selectivos para los subtipos de receptores⁶⁴. En concreto, la falta de ligandos con alta selectividad para D₃R hace que la evaluación del papel biológico (y terapéutico) del receptor sea un desafío, siendo la expresión del D₂R en cerebro mucho más abundante⁹⁹.

En este trabajo se ha reportado la estructura de crio-ME del D₃R humano en complejo con el agonista bitópico selectivo de D₃R, FOB02-04A, y acoplado a un heterotímero G_o. FOB02-04A se une al D₃R con los tres componentes (farmacóforo primario, conector y farmacóforo secundario) de manera coordinada interaccionando más allá del OBS y estableciendo interacción con un nuevo SBP_{2-ECL1-1} que confiere a FOB02-04A

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

selectividad por el D₃R. Además, este SBP_{2-ECL1-1} es una fuente de selectividad también en los receptores aminérgicos, al ser una región extracelular de alta variabilidad de secuencia y estructural pudiendo utilizarse potencialmente para desarrollar ligandos selectivos de otros subtipos de receptores. Especialmente interesante es la contribución de la TM1 a la unión del ligando, ya que es la región transmembrana con mayor diversidad de secuencias en GPCR, que rara vez contribuye a la unión del ligando y que podría utilizarse para el desarrollo de fármacos selectivos.

Las principales limitaciones que surgen en el desarrollo de estas moléculas residen en su tamaño, lo cual puede comprometer su farmacocinética para su aplicación terapéutica, más allá de su utilidad en ensayos *in vitro* y en la necesidad de una interacción coordinada entre sus componentes que permita la interacción óptima del farmacóforo primario con el OBS, evitando una pérdida de eficacia. Por ejemplo, en este trabajo se ha identificado una conformación alternativa donde el farmacóforo secundario interactúa con el SBP_{ECL2-ECL3} perdiéndose las interacciones con el SBP_{2-ECL1-1} y apareciendo una conformación no productiva. Además, ensayos TRUPATH muestran una marcada segregación en los roles funcionales de los residuos en el sitio de unión a FOB02-04A donde las mutaciones que afectan la potencia se localizan principalmente en el OBS mientras que las mutaciones que afectan la eficacia se encuentran en el SBP. Por tanto, el farmacóforo primario, el conector y el farmacóforo secundario no deben tratarse como entidades separadas cuando se desarrollan moléculas bitópicas específicas, sino que deben considerarse como un único ente, requiriendo el diseño racional de estas moléculas bitópicas de un equilibrio entre tamaño, eficacia y selectividad, siendo la determinación estructural de complejos con ligandos bitópicos una importante herramienta para el desarrollo de este tipo de moléculas. Ello se demuestra en este capítulo, donde se diseña a partir de la estructura conseguida por crio-ME nuevos ligandos bitópicos, mostrando resultados preliminares mejores perfiles en la selectividad D₃R/D₂R de unión y a nivel funcional.

Además de la región SBP_{2-ECL1-1} identificada en este trabajo, un estudio reciente que describe las estructuras de los cinco receptores de dopamina (D₁R-D₅R) apunta hacia el residuo H^{6.55} como clave para la selectividad, ya que este residuo cambia la

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

conformación entre receptores tipo D₂ de una manera dependiente del agonista¹⁸⁵. En este caso, el residuo H^{6.55} se encuentra demasiado distante para establecer interacción con FOB02-04A, sin embargo, las moléculas con interacciones combinadas en H^{6.55} y el SBP_{2-ECL1-1} tienen el potencial de producir moléculas altamente selectivas dentro de los receptores tipo D₂. Dichas moléculas podrían ayudar a mejorar los tratamientos actuales dirigidos al D₃R, un objetivo actual para la enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos, incluidos los trastornos por consumo de sustancias.

3.9 Conclusiones

En base a lo presentado en este capítulo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- i) Se identifica un sitio de selectividad en D₃R (SBP_{2-ECL1-1}) que requiere de una reorganización de la parte extracelular de la TM1, no considerada hasta ahora en el desarrollo de fármacos y que es divergente en secuencia y/o estructura para otros receptores aminérgicos pudiendo ser potencialmente explotada para el desarrollo de fármacos más selectivos.
- ii) Se presenta la primera estructura de D₃R acoplada a G_o, permitiendo el estudio de las bases estructurales que rigen el acoplamiento diferencial de G_o y G_i en D₃R. Análisis estructurales y funcionales muestran la relevancia de las interacciones establecidas por la hélice a5 de la proteína G y los ICLs en la selectividad entre diferentes proteínas G.
- iii) Existe una segregación funcional en el sitio de unión a ligando en D₃R donde residuos ubicados en el OBS influyen en la potencia y residuos del SBP en la eficacia, lo que ha de tenerse en cuenta para el desarrollo de moléculas bitópicas con perfiles farmacológicos específicos.

Capítulo III. MEJORA DE LA SELECTIVIDAD HACIA D₃R CON LIGANDOS BITÓPICOS

- iv) La unión del ligando bitópico FOB02-04A debe ser considerada como una unión coordinada y en bloque, donde el conector no actúa como mero enlazador, si no que influye en la orientación del ligando y su función, siendo esta información relevante para el desarrollo de otras moléculas bitópicas.
- v) La existencia de conformaciones alternativas en moléculas bitópicas puede modular la potencia y eficacia observadas, sirviendo la determinación estructural para la identificación y optimización del diseño de este tipo de ligandos.
- vi) Se presentan datos preliminares para nuevos compuestos diseñados racionalmente con alta selectividad entre D₃R y D₂R, mostrando la determinación de esta estructura (donde se observa un reordenamiento de la TM1) una alta relevancia para el diseño de mejores moléculas selectivas.

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

4.1 Sesgo en la señalización de D₃R

Los GPCRs señalan principalmente a través de proteínas G o β-arrestinas, pudiendo la unión de ligandos en el receptor estabilizar conformaciones específicas que favorezcan la interacción con un transductor con respecto a otro, modulando así la respuesta celular³³. La identificación de ligandos capaces de modular selectivamente ciertas vías de señalización dependientes de receptor, así como el estudio del mecanismo de acción de estos ligandos, son necesarios para diseccionar las respuestas celulares que subyacen a la activación de proteínas G o β-arrestinas. Además, al modular de manera selectiva las diferentes rutas de señalización activadas por el receptor, estos ligandos presentan un enorme potencial terapéutico permitiendo separar los efectos terapéuticos de los efectos secundarios, actuando sólo a través de la ruta que confiera los efectos terapéuticos²⁰².

Para el D₃R se han descrito ligandos con sesgo a β-arrestina y proteína G, observándose perfiles de señalización diferentes. Por ejemplo, algunos antipsicóticos de segunda generación actualmente utilizados en la clínica (quetiapina, roxindol, aripiprazol) se han reportado recientemente como agonistas de D₃R con sesgo a arrestina, promoviendo los fármacos la activación de ERK a través del reclutamiento de β-arrestina 2 en células HEK293 y la modulación de la actividad de los canales de calcio CaV3.2 en neuronas del córtex prefrontal de ratón²⁰³. Por otro lado, se ha demostrado que ligandos con sesgo a proteína G en D₃R son capaces de mejorar el rendimiento en tareas cognitivas en modelos de rata y primate no humano de la enfermedad de Parkinson y de reducir la discinesia inducida por levodopa en ratas hemiparkinsonianas^{204,205}. Sin embargo, las bases de los mecanismos que rigen el sesgo hacia la activación de proteína G o β-arrestina en D₃R se desconocen, lo que dificulta el diseño racional de este tipo de fármacos con selectividad funcional.

La determinación estructural de receptores unidos a ligandos con sesgo funcional permitirá establecer las bases para el diseño racional de fármacos con mejores perfiles terapéuticos, así como herramientas que permitan el estudio funcional de las diferentes

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

vías de señalización activadas por el receptor. En este capítulo se describe la determinación estructural por crio-ME de un complejo de D₃R acoplado a trímero Gα₀βγ y scFv16 unido a un agonista con sesgo a proteína G (AB04-88) en D₃R en células HEK293¹⁹². Junto con ensayos TRUPATH y simulaciones de MD se determina el modo de unión del ligando AB04-88 y se establecen las bases estructurales y funcionales del sesgo observado. El ligando AB04-88 fue sintetizado y proporcionado por Alessandro Bonifazi (miembro del grupo liderado por Amy Newman-Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos). Los ensayos de reclutamiento de β-arrestina están en curso (colaboración con Hideaki Yano-Universidad Noreste de Baltimore, Estados Unidos). Los ensayos de MD están siendo realizados por Tomek Stepniewski (miembro del grupo liderado por Jana Selent-Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Biomédicas, España).

4.2 Determinación estructural del complejo D₃R:Gα₀βγ:scFv16 unido a AB04-88 por crio-ME

Adhikari y colaboradores mostraron que el ligando bitópico AB04-88 favorece una señalización mediada por proteína G en D₃R principalmente debido a una disminución en la capacidad para reclutar β-arrestina con respecto a lo observado para quinpirol (ligando de referencia) en células HEK293 (Figura IV.41)¹⁹².

	Activación proteína G	Reclutamiento β-Arrestina
Ligandos	pEC ₅₀ ± SEM (M)	pEC ₅₀ ± SEM (M)
Quinpirol	8,53 ± 0,08	8,36 ± 0,09
AB04-88	9,34 ± 0,09	7,03 ± 0,1

Figura IV.41. Señalización sesgada a proteína G mediada por AB04-88. Tomando como ligando de referencia el quinpirol, AB04-88 presenta una potencia 6,5 veces mayor para la activación de la proteína G₀ (2,95 nM y 0,5 nM para quinpirol y AB04-88 respectivamente) y 21 veces menor para el reclutamiento de β-Arrestina (4,4 nM y 93,3 nM para quinpirol y AB04-88 respectivamente)¹⁹².

Para comprender las bases estructurales del sesgo observado en el ligando AB04-88 se determinó por crio-ME la estructura del complejo D₃R:G₀αβγ:scFv16 unido a AB04-88. Para ello, se co-expresó el D₃R WT, la subunidad G₀α dominante negativa, Gβ₁, Gγ₂ y scFv16 en células de insecto y se purificó en presencia del ligando bitópico AB04-88 para su determinación estructural por crio-ME (Figura IV.42). Se recogieron 18.941 películas en un Titan Krios a 300 kV obteniendo tras el procesado de los datos un mapa del complejo a una resolución global de 3,4 Å (FSC=0,143) (Figura IV.42 y IV.43).

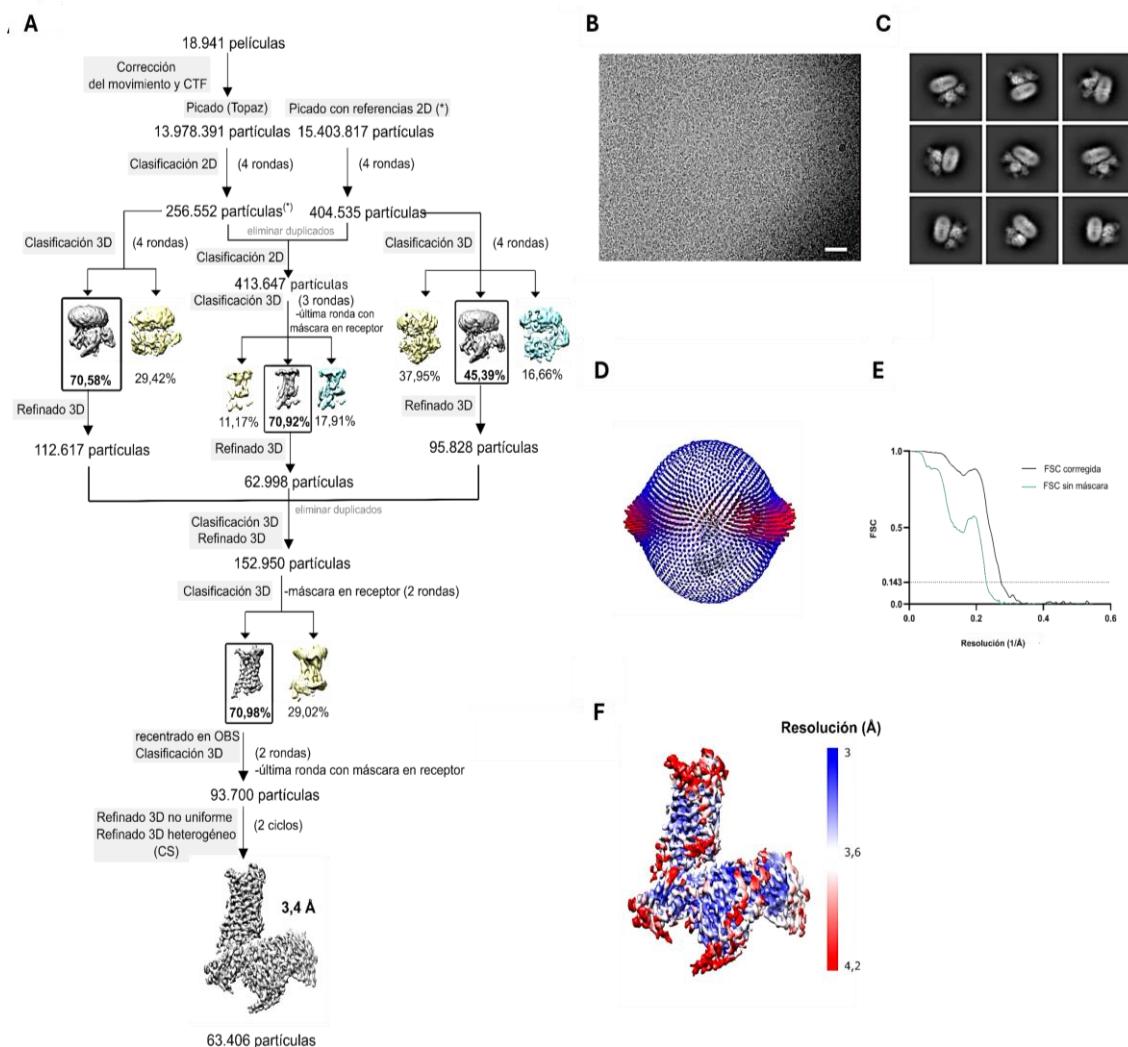


Figura IV.42. Crio-ME para la obtención del mapa del complejo D₃R:G₀α unido a AB04-88. A) Diagrama de flujo del procesamiento de datos. **B)** Micrografía representativa (0,84 Å/píxel) del conjunto de datos AB04-88:D₃R:G₀α recogidos utilizando un Titan Krios con un detector K3. Escala: 0,05 μm **C)** Promedios de clases 2D representativos de los datos recogidos para

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

D₃R:G₀:AB04-88. Tamaño de caja: 220 píxeles. **D)** Distribución angular de todas las partículas utilizadas en la reconstrucción final. **E)** Curva FSC de la reconstrucción final que muestra una resolución global de 3,4 Å. **F)** Estimación de la resolución local del complejo D₃R:G_{0A} unido a AB04-88 calculada por CryoSPARC.

Durante el procesado, se observó una alta heterogeneidad en la densidad del receptor, especialmente en la TM7. Para mejorar la calidad del mapa en el sitio de unión al ligando se repitió la estrategia empleada en el capítulo 3, realizando un recentrado del mapa en el OBS y una posterior clasificación y refinado 3D consiguiendo una mejora de la densidad en esa zona. Finalmente, se modeló el mapa más homogéneo, con una resolución global de 3,4 Å (Figura IV.43).

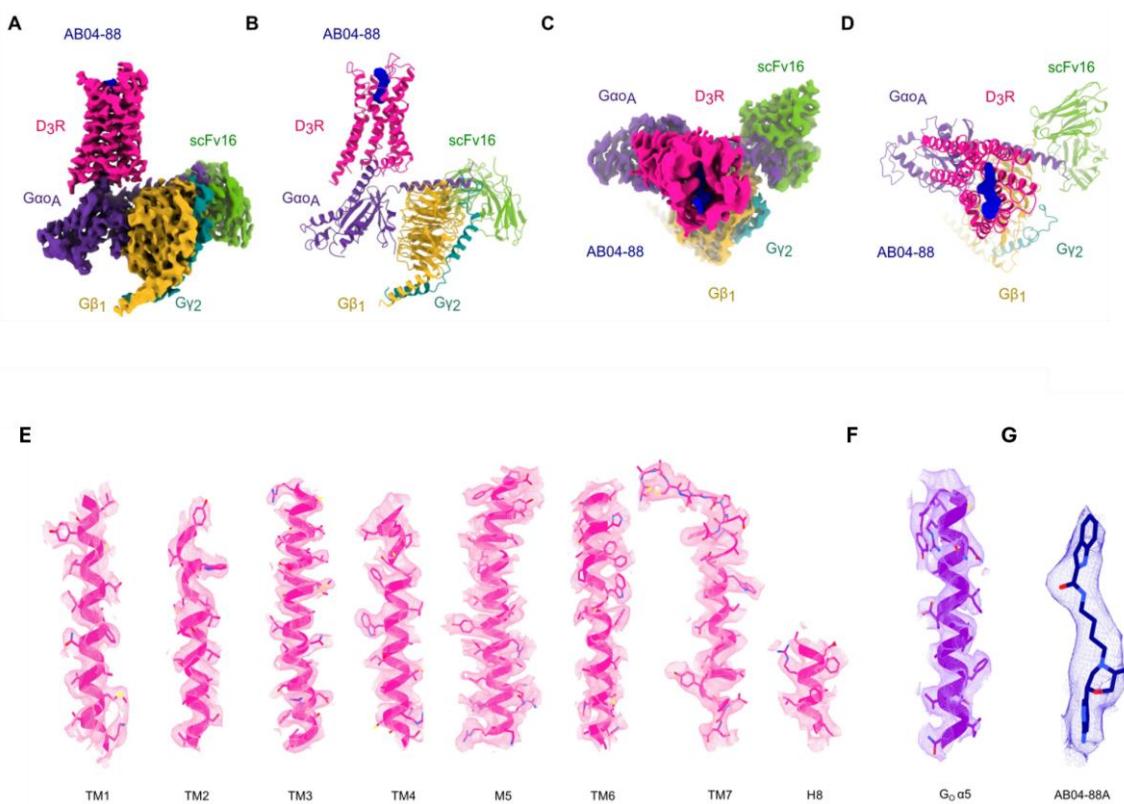


Figura IV.43. Complejo de crio-ME de AB04-88 unido a D₃R:G₀αβγ:scFv16. A) Mapa de crio-ME del complejo D₃R:G₀αβγ:scFv16 unido a AB04-88. **B)** Estructura modelada de D₃R:G₀αβγ:scFv16 unida a AB04-88. **C y D)** Vista desde arriba del mapa crio-ME de AB04-88 unido a D₃R:G₀αβγ:scFv16 (**C**) y de la estructura modelada (**D**). **E-F)** Densidad y modelado de

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

los dominios transmembrana de D₃R (**D**), la hélice α5 de G_{OA} (**E**) y el ligando bitópico AB04-88 (**F**).

La densidad de crio-ME permitió el modelado de todos los componentes del complejo, en el D₃R desde el residuo Y32^{1,35} hasta el residuo L398^{8,58} a excepción del ICL3 (residuos I223^{5,73} a R323^{6,29}) (Anexo II). En este caso, tampoco se encontraron moléculas de colesterol (o CHS) o lípidos alrededor de la parte transmembrana del receptor.

4.3 Activación inducida de AB04-88 en el D₃R

El alineamiento estructural del complejo D₃R:Gα₀βγ unido a AB04-88 con la estructura en estado inactivo de D₃R (PDB 3PBL) muestra una activación típica de los GPCRs, observándose el característico desplazamiento hacia el exterior de la TM6 (9,564 Å desde el Ca de R323^{6,29}) y hacia el núcleo del receptor de la TM7. Ensayos TRUPATH mostraron que AB04-88 actúa como agonista total para el D₃R, con una pEC₅₀ de 8,73 ± 0,23 M (Figura IV.44D). Para determinar qué residuos del sitio de unión son importantes para la activación del D₃R mediada por AB04-88 se mutaron todos los residuos circundantes por alanina (a excepción del G94, que se eliminó) y se evaluó la capacidad de cada mutante para activar el receptor mediante ensayos TRUPATH (Figura IV.44E y Anexo VI). Ensayos de expresión en superficie (presentados en el capítulo 3) confirmaron una expresión equilibrada de los mutantes.

AB04-88 establece interacciones principalmente con residuos de las TM2-3 y TM5-7, extendiéndose más allá del sitio ortostérico (Figura IV.44A-C). El AB04-88 posee dos farmacóforos conectados por un enlazador en el que cada uno de los componentes interactúa con diferentes regiones del receptor. El farmacóforo primario de AB04-88 se une al sitio ortostérico, formado por S192^{5,42}, S193^{5,43}, S196^{5,46}, F345^{6,51}, F346^{6,52}, W342^{6,48} (“toggle switch”), V111^{3,33}, T115^{3,37}, I183^{ECL2} y D110^{3,32} con quien establece un puente salino a través del grupo amino. La mutación a alanina del residuo D110^{3,32}, altamente conservado en otros receptores aminérgicos, eliminó la capacidad del D₃R de

ser activado por AB04-88, confirmando la importancia de esta interacción conservada para ligandos de receptores de dopamina. La mutación a alanina de W342^{6,48} ("toggle switch") también resultó en una pérdida casi total de la actividad de D₃R, demostrando el papel esencial del "toggle switch" en la activación del receptor, un mecanismo conservado en otros GPCRs de clase A⁹. Además, la variante T115^{3,37}A resultó en una reducción significativa de la potencia del ligando (Figura IV.44E).

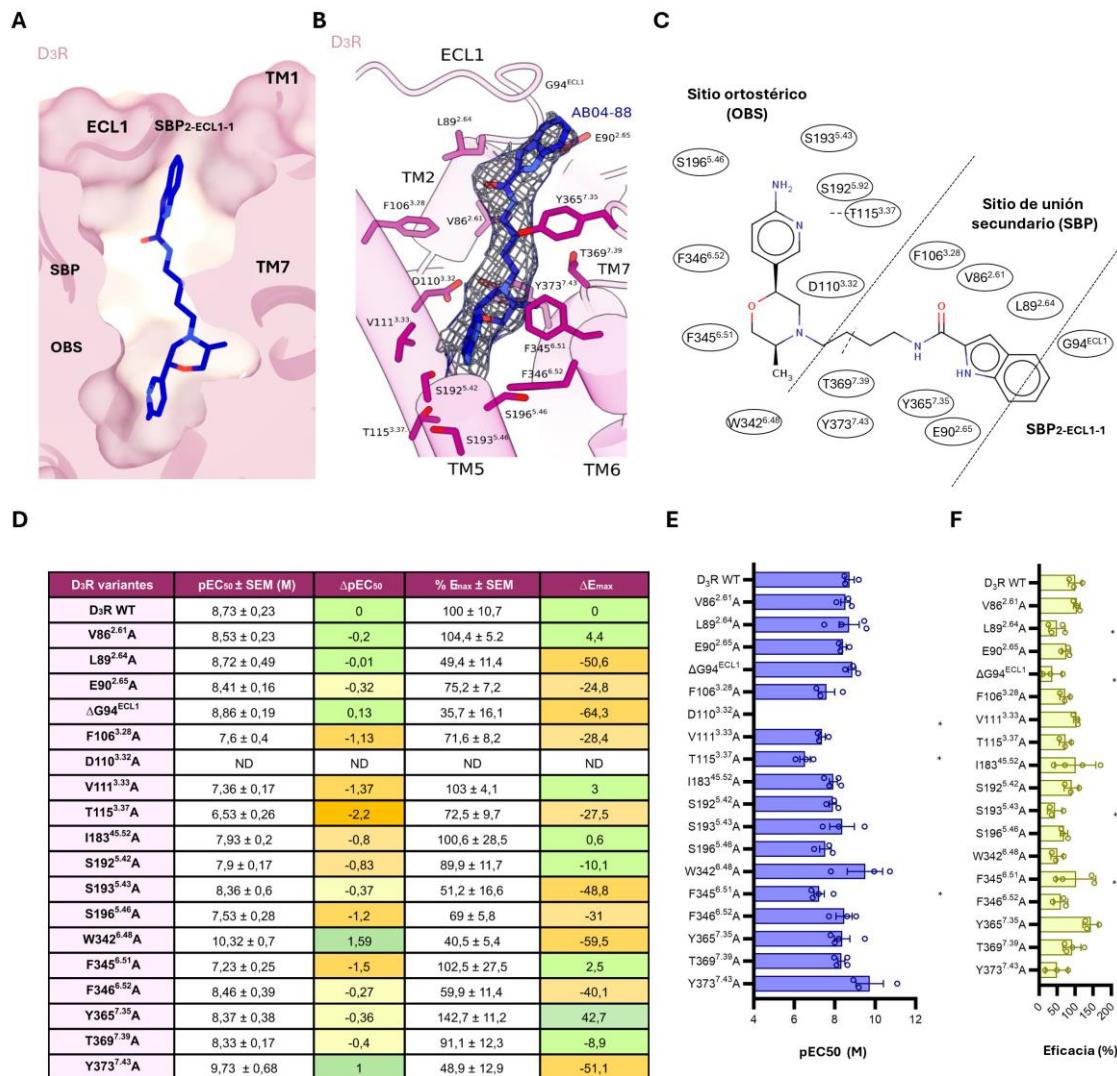


Figura IV.44. Sitio de unión de AB04-88 en D₃R. **A)** Unión de AB04-88 (azul) en el bolsillo de D₃R (rosa, representación de superficie). **B)** Detalles de la unión de AB04-88 (azul) en el D₃R (rosa). La malla gris representa la densidad del mapa de crio-ME observada para el ligando AB04-88. **C)** Esquema de la unión de AB04-88 en el bolsillo de unión del ligando D₃R. **D)** Tabla resumen de los valores de pEC₅₀ y E_{max} obtenidos para los constructos utilizados. Los colores se

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

basan en los efectos de las mutaciones sobre la actividad del receptor: naranja para la actividad reducida y verde para la actividad aumentada. Definiciones: ND-no detectable; Δ-diferencia calculada entre el mutante y el WT. **E)** Valores pEC₅₀ obtenidos para los constructos de D₃R mutados en el sitio de unión a ligando en respuesta a la activación de G_{OA} por AB04-88 utilizando el ensayo TRUPATH. *p < 0,05 (ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Dunnett) para D110^{3.32}A (p < 0,0001) T115^{3.37}A (p = 0,0139) con nd=no detectable. **F)** Valores E_{max} obtenidos para los constructos de D₃R mutados en el sitio de unión a ligando en respuesta a la activación de G_{OA} por AB04-88 utilizando el ensayo TRUPATH. *p < 0,05 (pruebas de comparaciones múltiples de Holm-Sidak con valor p de dos colas) para L89^{2.65}A (p = 0,026), ΔG94^{ECL1}(p = 0,029), S193^{5.43}A(p = 0,025), W342^{6.48}A (p = 0,025). Todos los datos de pEC₅₀ y E_{max} presentados en la figura son medias ± SEM de tres experimentos independientes (n = 3) realizados en triplicados técnicos excepto para L89^{2.64}A, I183^{45.52}A, F345^{6.51}A, Y365^{7.35}A y T369^{7.39}A (n=4).

Por su parte, el conector butilo de AB04-88 interacciona con regiones de TM2, TM3 y TM7 estableciendo interacciones con los residuos V86^{2.61}, F106^{3.28}, Y365^{7.35}, T369^{7.39} e Y373^{7.43}. La mutación a alanina del residuo Y373^{7.43} redujo a más de la mitad la eficacia de AB04-88 en D₃R, lo que contrasta con lo observado en D₃R en presencia de pramipexol y PD128907, donde se describe una pérdida significativa de potencia o incluso una pérdida total de actividad con FOB02-04A y rotigotina, siendo el residuo Y373^{7.43} determinante por su interacción con el D110^{3.32}.

Por último, el farmacóforo secundario de AB04-88 interactúa principalmente con la parte extracelular de TM2 y ECL1, incluyendo L89^{2.64}, E90^{2.65}y G94^{ECL1} (Figura IV.44B y C). Para todas ellas se observó una disminución en la eficacia de AB04-88, siendo esto especialmente evidente para las variantes L89^{2.64}A y ΔG94^{ECL1}.

En conjunto, se observa que las mutaciones en residuos del sitio ortostérico suponen una pérdida en la potencia de AB04-88 mientras que mutaciones en las regiones extracelulares dan lugar a una pérdida de eficacia (Figura IV.44E). Esta segregación funcional ya fue observada en presencia del ligando bitópico FOB02-04A (capítulo 3), confirmando que las interacciones mediadas por los farmacóforos y el conector en

ligandos bitópicos no son independientes, sino que contribuyen a un modo de unión único.

4.4 Bases del sesgo a proteínas G en D₃R mediado por AB04-88

Además del típico desplazamiento de la TM6 asociado a la activación del receptor, se ha descrito que los GPCRs son proteínas altamente dinámicas existiendo un equilibrio entre múltiples estados conformacionales, algunos de los cuales se asocian a un acoplamiento preferencial a proteínas G^{69,74,206–209}. Para determinar el origen del sesgo mediado por AB04-88 en D₃R se realizaron ensayos TRUPATH utilizando como agonista de referencia el quinpirol, mostrando los resultados una activación de proteína G equivalente para ambos ligandos. Por su parte, Hideaki y colaboradores han confirmado una disminución en el reclutamiento de β-arrestina mediado por D₃R unido a AB04-88 con respecto al quinpirol, lo que sugiere que este fenómeno es el principal responsable del sesgo, coincidiendo con lo reportado¹⁹².

Debido a que la estructura de D₃R con pramipexol ya está reportada, se escogió como ligando de referencia el pramipexol, a fin de poder realizar un análisis estructural, presentando el pramipexol una respuesta equivalente a la del quinpirol para las dos vías de señalización, actuando como un ligando equilibrado (sin sesgo)^{210,211}. El alineamiento estructural revela que mientras que el pramipexol se localiza en el OBS, AB04-88 se extiende más allá del sitio ortostérico estableciendo una interacción directa con la región superior de la TM7, lo que también se observó en simulaciones de MD (Figura IV.45E). En concreto, mientras que con pramipexol se observa que el residuo Y365^{7,35} establece una interacción inter-hélice con el residuo H^{6,55}, en presencia de AB04-88, Y365^{7,35} se desplaza para interaccionar con el ligando, alejándose de H^{6,55} (Figura IV.45B). Esto concuerda con un estudio reciente donde la unión en el D₁R del ligando PW064, capaz de inducir la activación a proteína G (medición de AMPc) pero no de β-arrestina, presentaba fuertes interacciones hidrófobas del ligando con el residuo F^{7,35}²¹². Además, otros estudios han demostrado que los residuos en TM6 y TM7 son importantes para la activación preferente de la proteína G en el receptor de serotonina

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

5HT_{2B}²¹³, el receptor μ opioide²¹⁴, el receptor de esfingosina-1-fosfato²¹⁵ y el receptor 1 de quimiocinas²⁰⁸, sugiriendo un importante papel de la interacción entre la TM6 y TM7 en la activación sesgada. Por su parte, interacciones del ligando con H^{6,55} se han definido como determinantes para la eficacia de ligandos, pudiendo la modificación de estas interacciones modular la activación de una vía de señalización u otra²¹⁶. Para dilucidar si estas diferencias son relevantes en el estudio de posibles mecanismos responsables del sesgo en D₃R se están realizando ensayos de reclutamiento de β-arrestina en D₃R que permitan la comparación y cuantificación del sesgo para las dos vías (en colaboración con Hideaki Yano).

Además de diferencias en el receptor, también se exploró si la unión de AB04-88 podría conducir a un acoplamiento diferencial de la proteína G. El alineamiento estructural del complejo de D₃R:G_{OA} unido a AB04-88 con D₃R:G_{i1} unido a pramipexol (PDB 7CMU) mostró una disposición similar, observándose ligeras diferencias en la orientación de la proteína G y en los contactos establecidos por el amino terminal y la hélice α5 de la proteína G con el receptor. Sin embargo, no se puede descartar que las diferencias observadas sean una consecuencia de la utilización de dos proteínas G diferentes y, por tanto, su implicación en el sesgo debe ser explorada.

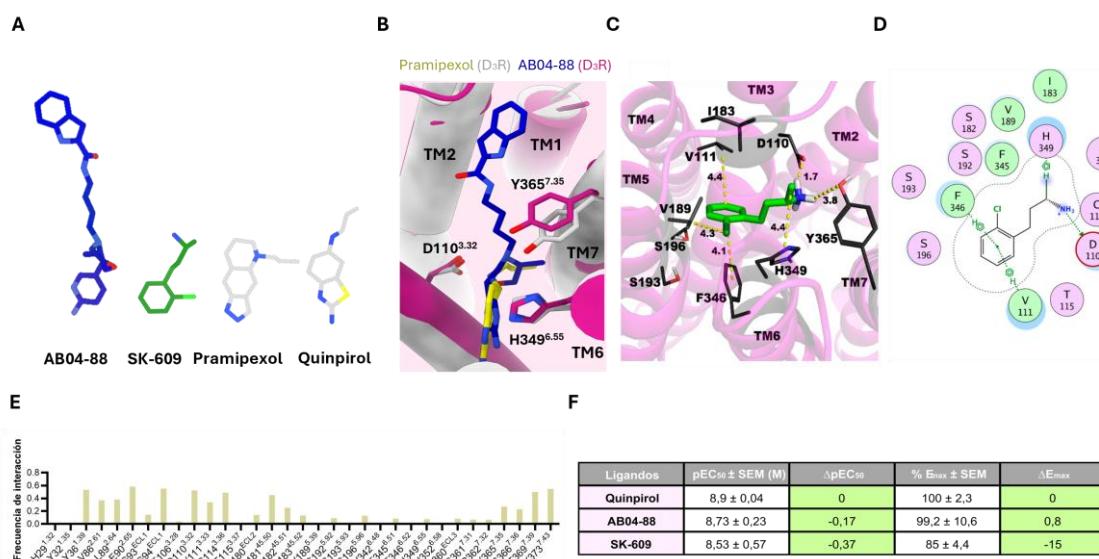


Figura IV.45. Modo de unión de ligandos sin sesgo (pramipexol) y ligandos con sesgo a proteína G (AB04-88 y SK-609) en D₃R. **A)** Comparación de las estructuras químicas de AB04-88 (azul), SK-609 (verde) y los ligandos sin sesgo pramipexol y quinpirol (gris). **B)** Unión de AB04-88 (azul) y pramipexol (amarillo) en D₃R. **C)** Predicción de las interacciones establecidas por SK-609 en D₃R según simulaciones de MD de 1μs. **D)** Esquema de unión de SK-609 en el bolsillo de unión del ligando D₃R. C y D son imágenes derivadas de²¹⁷. **E)** Frecuencias de interacción derivadas de simulaciones de MD del complejo D₃R:G_{OA} en presencia de AB04-88 según simulaciones de MD de 1μs. **F)** Tabla resumen con valores de pEC₅₀ y E_{max} obtenidos en ensayos TRUPATH para D₃R en presencia de quinpirol, AB04-88 y SK-609.

A continuación, para determinar si en el D₃R se podría definir más de un mecanismo de sesgo o si existe un patrón común, se intentó la determinación estructural del complejo D₃R acoplado a proteína Gα_{βγ} y scFv16 unido a otro compuesto estructuralmente diferente a AB04-88 pero también reportado con sesgo a proteína G (SK-609) (Figura IV.45A). En concreto, se ha descrito que SK-609 presenta una señalización sesgada a proteína G debido a un menor reclutamiento de β-arrestina^{204,205}. En el laboratorio se confirmó que la activación de proteínas G mediada por la unión de SK-609 a D₃R era equivalente a la observada con el quinpirol o pramipexol (Figura IV.45F). Sin embargo, la obtención de un modelo 3D a alta resolución del complejo no fue posible, observándose clases 2D de complejos de baja calidad y un alto grado de disociación de trímero, pudiendo la cinética de disociación del ligando o el proceso de vitrificación haber afectado a la determinación estructural. Según los ensayos funcionales, SK-609 presenta una E_{max} algo menor (~80%), lo que también pudo afectar a la formación del complejo con el trímero, habiéndose reportado previamente una relación entre la eficacia de los agonistas y la estabilidad de los complejos para su resolución estructural por crio-ME²¹⁸. A pesar de no ser capaces de determinar la estructura del complejo, un estudio reciente ha demostrado a través de simulaciones de MD que SK-609 ocupa el bolsillo ortostérico del D₃R y que el grupo amina del ligando interactúa con el residuo Y365^{7,35} a través de un puente de hidrógeno, algo que no se observa en presencia de pramipexol (Figura IV.45C y D)²¹⁷.

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

En conjunto, estos resultados sugieren que una interacción en el bolsillo extracelular con residuos de la TM7 podría inducir un cambio en la parte intracelular del receptor que derive en un menor reclutamiento de β-arrestina (Figura IV.46A). Para confirmar esta hipótesis se realizó un alineamiento estructural del receptor unido a AB04-88 con una estructura en estado inactivo (PDB 3PBL) y otra unida a pramipexol (PDB 7CMU), observándose en efecto diferencias estructurales en la región intracelular de la TM7-H8, indicando una conformación activa diferente para el complejo D₃R unido al ligando bitópico AB04-88 con respecto al D₃R unido a pramipexol (Figura IV.46B). En esta región se localiza el motivo NPxxY, uno de los motivos más conservados en GPCRs, descrito como esencial para la activación⁹. En concreto, tras la activación del receptor, la tirosina Y^{7.53} del motivo NPxxY cambia su conformación de rotámero y se dirige hacia la TM3 mejorando el empaquetamiento de TM3 y TM7 y promoviendo el movimiento hacia el núcleo del receptor de la TM7. Por otro lado, la asparagina N^{7.49} se transloca hacia el residuo D^{2.50} favoreciendo el colapso del sitio de unión a sodio (presente en estado inactivo), lo que origina la salida del catión que actúa como modulador alostérico negativo⁹. Sin embargo, la unión de AB04-88 en D₃R muestra una activación atípica del D₃R donde se observa una disposición diferente para el residuo N^{7.49}, más orientado hacia TM2 mientras que la prolina P380^{7.50} del motivo NPxxY permanece en una conformación similar a la presente en la estructura inactiva (Figura IV.46A y B).

Además, simulaciones de MD muestran una mayor dinámica en la región intracelular de la TM7 en presencia de AB04-88, alternando entre dos conformaciones (~25 % y ~24 %), con la segunda presentando una disposición de la prolina P380^{7.50} similar a la presente en la estructura en estado inactivo (Figura IV.46G). La alta movilidad de la TM7 también se observó durante el procesado de datos de crio-ME, al presentarse una mezcla de conformaciones del dominio transmembrana en diferentes mapas. Esto coincide con un estudio previo en el receptor adrenérgico β₂ donde la isoetarina (un agonista con sesgo a β-arrestina) prolonga el tiempo de permanencia de TM7 en la conformación activa, mostrando la relevancia de la interacción de la TM7 con β-arrestina, y no siendo esencial para el acoplamiento de proteína G²¹⁹.

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

Por otro lado, la densidad de crio-ME para la región de la H8 presentó un alto nivel de ruido, lo que sugiere una mayor dinámica de esta región pudiendo esto influir en el reclutamiento de la β-arrestina. De hecho, aunque los sitios de unión de la proteína G y las β-arrestina se solapan en gran medida, sólo la β-arrestina interactúa con ICL1-H8²²⁰. De hecho, un estudio reciente ha asociado un cierre de la hendidura entre H8 e ICL1 con una inhibición de la señalización de β-arrestina en el receptor μ opioide, relacionando así esta región como crítica para el reclutamiento de β-arrestina²²¹. Adicionalmente, otro estudio reportó a través de simulaciones de MD un papel regulador de la H8 en el reclutamiento de β-arrestina y cómo cambios en su dinámica influyen en el reclutamiento de la proteína transductora²²².

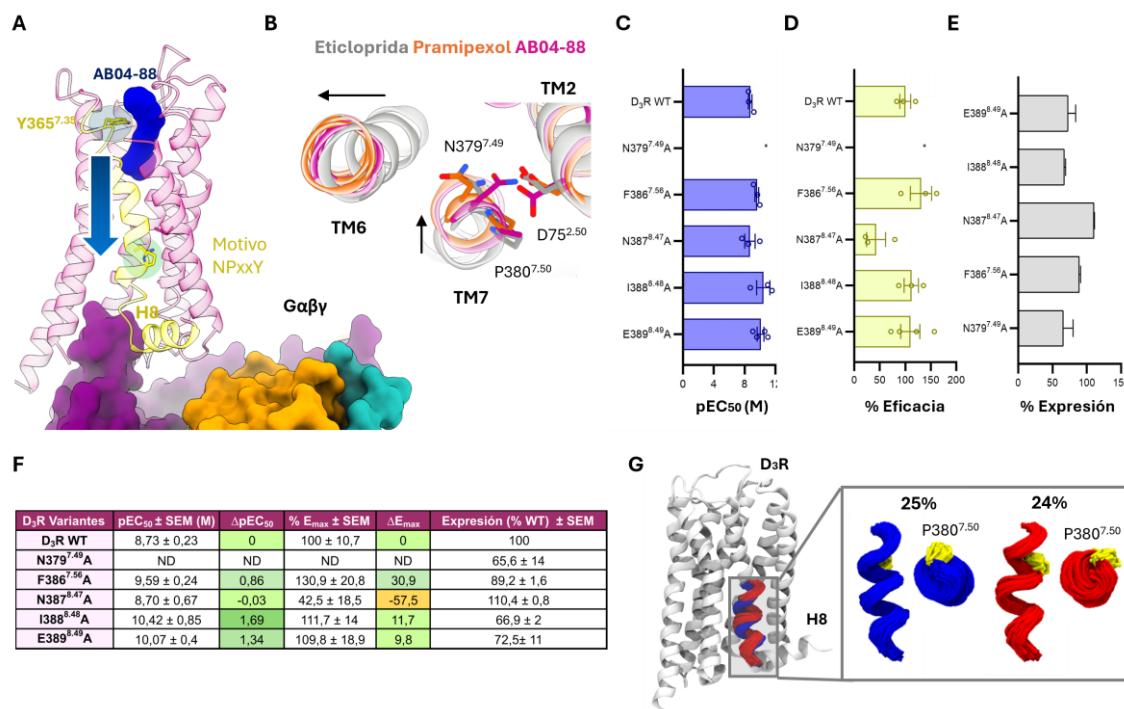


Figura IV.46. Análisis de la región intracelular de la TM7-H8 en D₃R unido a AB04-88. **A)** D₃R (rosa) unido a AB04-88 (azul) y con la TM7 y H8 resaltadas en amarillo. La flecha azul indica la transmisión del cambio conformacional hacia la región intracelular de la TM7-H8. En verde, se señala el motivo NPxxY. **B)** Análisis estructural del motivo NPxxY en el complejo de D₃R:Gα_Oβγ unido a AB04-88 (rosa), pramipexol (PDB 7CMU, naranja) y eticloprida (PDB 3PBL, gris). Las flechas negras hacen referencia a los movimientos asociados a la activación del receptor. **C y D)** Valores pEC₅₀ (**C**) y de E_{max} (**D**) obtenidos para los constructos de D₃R mutados en la región intracelular de TM7-H8 en respuesta a la activación del G_OA por AB04-88A utilizando el ensayo

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

TRUPATH. *p < 0,05 (para valores pEC₅₀ ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Dunnett y para E_{max} pruebas de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, valor p de dos colas) para N379⁴⁹A. **E)** Expresión normalizada con respecto al D₃R WT de los constructos D₃R mutados en la región intracelular de la TM7-H8. **F)** Tabla resumen de los valores pEC₅₀, E_{max} y expresión obtenidos para los constructos de D₃R mutados en la región intracelular de la TM7-H8. Los colores se basan en los efectos de las mutaciones sobre la actividad del receptor: naranja para la actividad reducida y verde para la actividad aumentada. Definiciones: ND-no detectable; Δ-diferencia calculada entre el mutante y el WT. Todos los datos presentados en la figura son medias ± SEM de tres experimentos independientes (n = 3) realizados por triplicado técnico excepto para E389^{8,49}(n=4). **G)** Simulaciones de MD mostrando las principales conformaciones exploradas para la región intracelular de la TM7. Las conformaciones se obtuvieron agrupando la posición de los residuos 377^{7,47} a 387^{8,47}, con un límite de RMSD = 1 Å. Se muestran vistas desde el lateral y desde arriba. Como referencia, se muestra la posición de P380^{7,50} (amarillo).

Para dilucidar el rol que presentan los residuos de la región intracelular de la TM7 y H8 en el acoplamiento de proteínas G, se llevaron a cabo ensayos TRUPATH donde los residuos N379^{7,49} (NPxxY), F386^{7,56}, N387^{8,47}, I388^{8,48} y E389^{8,49} se mutaron a alanina. La mutación por alanina del residuo N379^{7,49} resultó en una pérdida casi total de la actividad del D₃R, demostrando que es esencial para la señalización por proteínas G (Figura IV.46F). La activación de N387^{8,47}A por AB04-88 también supone una pérdida considerable de eficacia, lo que concuerda con lo observado para otros GPCRs, como los receptores de serotonina 5-HT_{2B} y angiotensina 1 acoplados a G_q y G_q y G_i respectivamente^{223,224}. En concreto, ensayos de reclutamiento de β-arrestina en el receptor de serotonina 5-HT_{2B} muestran que la variante N387^{8,47}A aumenta el reclutamiento de β-arrestina al introducir interacciones hidrofóbicas²²³. Los demás residuos mutados no mostraron un impacto en la señalización por proteínas G. Para comprender la relevancia de estos residuos en sesgo es necesario estudiar el impacto de estas mutaciones en la señalización mediada por β-arrestina en D₃R, encontrándose los experimentos en curso (colaboración con Hideaki Yano).

Además de cambios en la región intracelular de la TM7-H8 el análisis de los mapas de crio-ME reveló una densidad cercana al residuo R128^{3,50} (motivo DRY) de la estructura

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

unida a AB04-88 pero no en otras estructuras activas de D₃R, que sugiere la presencia de una molécula de agua (Figura IV.47). El motivo DRY se localiza en la TM3 y constituye un motivo crítico para la activación de GPCRs donde se da el clásico bloqueo iónico en el estado inactivo entre D/E^{3.49} y R^{3.50}, que se rompe tras la unión del agonista facilitando el acoplamiento de la proteína G⁹.

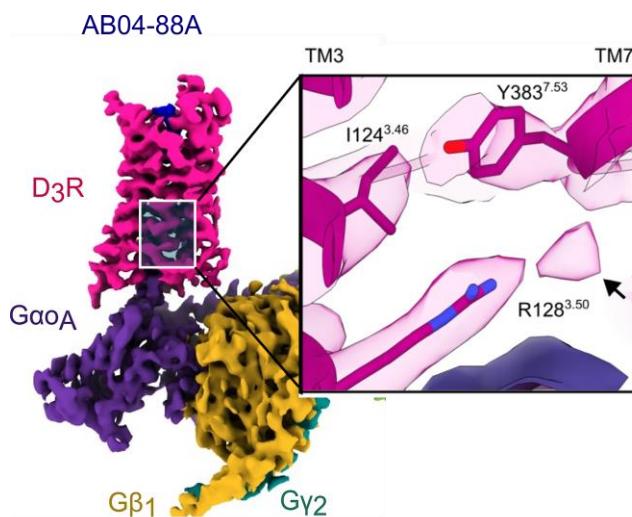


Figura IV.47. Interacción TM3-TM7 en complejo de AB04-88 unido a D₃R:G_αβ_γ:scFv16. La densidad sin modelar aparece marcada con una flecha.

Estudios previos han descrito que la activación de GPCRs promueve la formación de un canal de moléculas de agua interno continuo y que estos movimientos podrían conectar la parte citoplasmática del GPCR con la región extracelular a nivel de sitio de unión del ligando^{225,226}. Sin embargo, la importancia funcional de esta molécula de agua y su contribución al sesgo observado para AB04-88 están por determinar, habiéndose reportado en el receptor de angiotensina 1 que ligandos con selectividad funcional favorecen diferentes conformaciones del residuo R^{3.50}, y que estas conformaciones están acopladas alostéricamente a la región que rodea D^{2.50} y N^{7.49}²²⁷.

4.5 Discusión

La literatura recoge que los GPCRs interactúan con la proteína G principalmente a través de TM5 y TM6 y los bucles ICL2 e ICL3, siendo la región TM7-H8-ICL1 menos relevante para el acoplamiento de proteína G, pero importante en la señalización dependiente de β-arrestina. Hasta la fecha, se han reportado 9 estructuras de GPCRs de clase A acopladas a β-arrestinas ^{215,223,228–233} donde la arrestina se encuentra unida al núcleo del receptor. Sin embargo, se observa para las diferentes estructuras un acoplamiento diferencial de la β-arrestina, con el “finger-loop” insertado en la cavidad citoplasmática del receptor y siendo interacciones específicas con los ICLs las que determinan la orientación de la β-arrestina, lo que se sugiere que está relacionado con la función que desempeña aguas abajo.

En este capítulo se propone la interacción con la TM7 como clave para el sesgo observado en AB04-88. En concreto, AB04-88 establece una interacción directa con Y365^{7,35}, mostrando el análisis estructural y funcional junto con simulaciones de MD la estabilización de una conformación activa de D₃R diferente, con la región intracelular de TM7-H8 siendo conformacionalmente inestable y observándose en la estructura una conformación atípica del motivo NPxxY. Así, interacciones del ligando con la región extracelular en la TM7 (residuos Y365^{7,35}, T369^{7,39} e Y373^{7,43}) podrían transmitir un cambio a la región más intracelular, habiéndose descrito que agonistas sesgados a β-arrestina activarían motivos esenciales para la señalización hacia arrestina (como NPxxY), mientras que la activación de los motivos DRY o PIF no es necesaria para la señalización por β-arrestina, pero sí para la activación de proteínas G y viceversa²³⁴. De hecho, un estudio reciente ha reportado la estabilización de una conformación activa del receptor k opioide con nalfurafina, un ligando con sesgo a proteína G, observando por crio-ME una conformación específica de la TM7 que podría explicar el sesgo a proteína G⁷⁴.

Cabe mencionar que el estudio original que reporta el sesgo para AB04-88 también analiza el perfil de señalización de FOB02-04A (capítulo 3), de estructura química muy

similar, donde también observan una disminución en la capacidad para reclutar β-arrestina con respecto al quinpirol¹⁹², lo que podría atribuirse a una interacción con la TM7 (capítulo 3). Se eligió el ligando AB04-88 para el estudio de sesgo ya que en un principio éste presentaba un sesgo de señalización superior al observado con FOB02-04A. Sin embargo, el análisis estructural del D₃R unido a FOB02-04A reveló que el motivo NPxxY adopta una conformación similar a la observada con pramipexol y que la región intracelular de TM7-H8 muestra una menor diversidad conformacional, con una conformación predominante (~60 %) según simulaciones de MD, sugiriendo un mecanismo de sesgo potencialmente diferente.

La literatura también recoge un papel crítico de los ICLs en la mediación del acoplamiento de una proteína transductora u otra. Cabe mencionar que la densidad del mapa crio-ME del complejo de D₃R:G_o unido a AB04-88 correspondiente al ICL2 del receptor, que establece interacción con el extremo amino-terminal de la proteína G, presentó un alto nivel de ruido, dificultando el modelado estructural. Esta observación podría indicar una mayor flexibilidad o dinámica de esta región en presencia del AB04-88, lo que ha sido reportado como elemento de sesgo previamente²³⁵⁻²³⁷. Dada la importancia del ICL2 en la regulación de la señalización a través de proteínas G y β-arrestina, cambios conformacionales en esta región podrían ser determinantes para la selectividad funcional de los ligandos. Simulaciones de MD para analizar la dinámica del ICL2 en D₃R unido a AB04-88 y pramipexol podrían dilucidar si en efecto existe una mayor dinámica del ICL2 en presencia de AB04-88 así como ensayos funcionales de activación de proteínas G y reclutamiento de β-arrestina con variantes mutadas en esta región del receptor. Además, el ICL3 también emerge como una región crítica en la determinación del sesgo de señalización, especialmente en receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos 5-HT₁, que carecen o presentan extremos carboxilos terminales demasiado cortos, postulando que los ICL3s pueden actuar como interfaces alternativas para el reclutamiento de β-arrestinas presentando múltiples sitios de fosforilación²²³. Sin embargo, la flexibilidad intrínseca del ICL3 y las dificultades en la expresión de receptores WT han limitado su observación en estudios de crio-ME, limitándose los estudios a ensayos funcionales.

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

Además de los mencionados, estudios previos han reportado otros elementos de sesgo. Por ejemplo, diferencias en la estabilidad y cinética de unión podrían afectar a los tiempos de permanencia del ligando, provocar cambios en la conformación del receptor y finalmente determinar el acoplamiento de la proteína transductora. Concretamente, se ha descrito que la interacción con el ECL2 ocluye la entrada al bolsillo de unión, aumentando el tiempo de residencia del ligando y favoreciendo el reclutamiento de β arrestina²³⁸. Sería interesante determinar cómo afecta la mutación a alanina del residuo I183^{45,52} al reclutamiento de β-arrestina en presencia de ambos ligandos (AB04-88 y pramipexol), así como la determinación estructural del D₃R unido a AB04-88 y acoplado a β-arrestina para observar si existen diferencias estructurales importantes a nivel del ECL2. Diferencias en el bolsillo extracelular para el mismo ligando cuando el receptor está acoplado a β-arrestina o proteína G se han reportado para el receptor adrenérgico β₁, donde Lee y colaboradores describieron un desplazamiento del ECL2 cuando el receptor se encontraba acoplado a β-arrestina 1 con respecto al receptor acoplado con el nanoanticuerpo Nb80 (que mimetiza la proteína G_S) en presencia de formoterol (ligando con sesgo a β-arrestina)²³⁰. Además, simulaciones de MD en las que se analice la cinética de asociación-disociación de los ligandos en el D₃R y la contribución del ECL2 permitirían observar si existe una correlación entre el sesgo funcional y el tiempo de residencia observado para los ligandos en el sitio de unión con interacciones específicas en el ECL2.

Además, otros estudios sugieren un rol importante de las serinas ortostéricas, observándose una contribución de S192^{5,42} y S193^{5,43} en la activación del D₃R mediada por AB04-88 (Figura IV.44). Las interacciones con los residuos de la TM5 se han asociado clásicamente a la activación de proteína G, promoviendo un movimiento citoplasmático hacia adentro de TM5 que a su vez mueve las regiones del ICL2 y TM6, involucradas en la activación de la proteína G²¹³. Además, Teng y colaboradores reportaron que interacciones entre la TM5 y el agonista son importantes para la señalización sesgada a proteínas G en D₁R²³⁹, mientras que el acoplamiento de β-arrestina no depende de la interacción con TM5 y TM6²³⁰.

Capítulo IV. MODULACIÓN SELECTIVA DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN D₃R

Por otro lado, en este capítulo sólo se describe la estructura del receptor activo unido a AB04-88 y acoplado al complejo G $\alpha\beta\gamma$, pudiendo la proteína transductora alterar la conformación del receptor. Estructuras o, en su defecto, simulaciones de MD sin la proteína G y en presencia de β -arrestina permitirían dilucidar cómo la unión del ligando AB04-88 influye en la dinámica conformacional de la TM7-H8 y los ICLs (ICL1 e ICL2). Además, se desconoce si la disminución en el reclutamiento de β -arrestina se debe a una inhibición directa en el acoplamiento de la β -arrestina al receptor o a un fenómeno más indirecto, por ejemplo, impidiendo la fosforilación de los motivos y/o acople de GRKs. Hasta la fecha, se han determinado sólo las estructuras del receptor de rodopsina y neurotensina 1 acoplados a GRK1 y GRK2 respectivamente^{240,241}. Ello, junto con ensayos de reclutamiento de β -arrestina, pueden ayudar a desentrañar los mecanismos de unión de GRKs y β -arrestinas para conocer el origen molecular del sesgo observado en D₃R.

4.6 Conclusiones

En base a lo presentado en este capítulo, se establecen las siguientes conclusiones:

- i) Se determina la estructura por crio-ME del complejo D₃R:G $\alpha\beta\gamma$:scFv16 unido al ligando bitópico AB04-88 y junto con ensayos de función y computación se identifica su modo de unión describiéndose una conformación activa de D₃R, diferente a las observadas en otras estructuras activas.
- ii) La interacción de AB04-88 con residuos en la región extracelular de la TM7 podrían modular la conformación intracelular de la hélice presentando el motivo NPxxY una conformación atípica y subóptima para el reclutamiento de β -arrestinas, que podría explicar el sesgo observado.
- iii) La activación del D₃R mediada por AB04-88 requiere de la contribución de residuos localizados en el sitio ortostérico y regiones más extracelulares del receptor, sugiriendo que la unión coordinada es una característica general de ligandos bitópicos.

iv) El análisis del mapa de crio-ME del complejo D₃R:G_{OA} unido a AB04-88 sugiere una mayor flexibilidad del ICL2 del D₃R, mostrando un potencial papel de los ICLs en la modulación selectiva de las vías de señalización en D₃R hacia proteína G o β-arrestina.

**Capítulo V. Desarrollo y caracterización de nanoanticuerpos
para D₃R**

5.1 Nanoanticuerpos. Definición y aplicaciones

Tanto la estructura de GPCRs como su señalización presentan una naturaleza dinámica, existiendo multitud de conformaciones activas e inactivas del receptor, así como múltiples cascadas de señalización que pueden ser activadas a través de GPCRs⁸. Los nanoanticuerpos han surgido recientemente como una potente herramienta para el estudio estructural y funcional de los GPCRs. Estos son proteínas monoméricas que constan de un solo dominio VHH (o dominio de unión a inmunoglobulina) que les permite reconocer específicamente a un antígeno^{242,243} (Figura V.48). Se producen de forma natural en los camélidos, y presentan ciertas ventajas con respecto al uso de anticuerpos convencionales u otros derivados (scFv, Fab) al ser más pequeños (10-20 kDa), más estables y fáciles de producir^{128,243}.

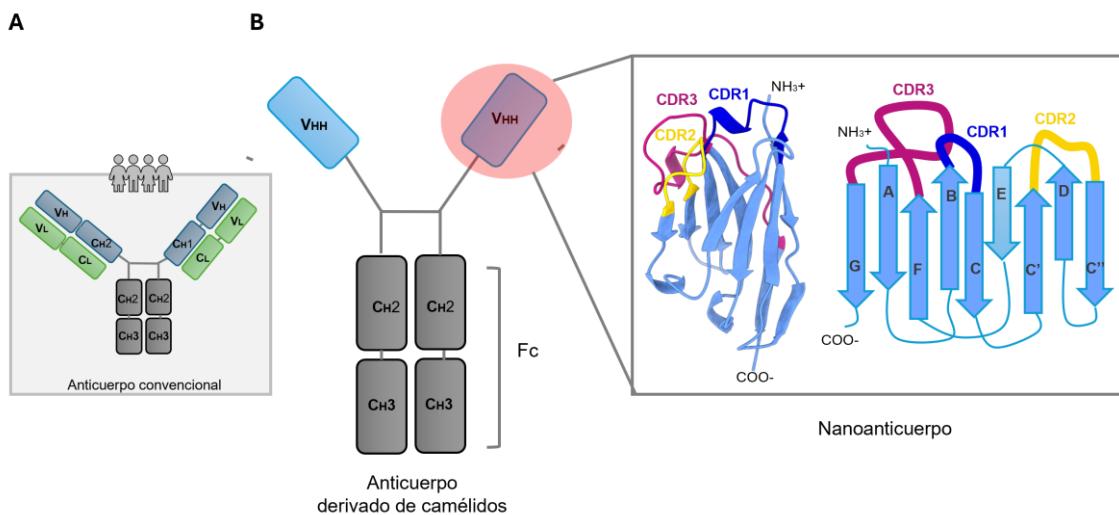


Figura V.48. Estructura de anticuerpos convencionales y nanoanticuerpos. A y B)

Comparación de anticuerpos convencionales con anticuerpos generados por un camélido. Los anticuerpos generados por los camélidos son de cadena única y sólo contienen un dominio VHH, que reconoce específicamente al antígeno. El dominio VHH es lo que se considera un nanoanticuerpo. La ampliación muestra la estructura secundaria de un nanoanticuerpo. En un VHH (o nanoanticuerpo) la región de unión al antígeno consta de tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que permiten el reconocimiento y unión a antígenos específicos.

Por ejemplo, existen nanoanticuerpos que estabilizan conformaciones específicas de los receptores tanto en estado activo como en inactivo, favoreciendo la determinación estructural²⁴². Además, la resolución estructural de dichas conformaciones específicas puede ayudar al desarrollo de fármacos dirigidos hacia estas conformaciones selectivas. En concreto, la determinación estructural de GPCRs en estado inactivo ha constituido clásicamente un desafío para la crio-ME debido a su pequeño tamaño. Recientemente, se ha desarrollado un nanoanticuerpo (Nb6) que se une al ICL3 del receptor κ opioide, permitiendo la obtención de una estructura a alta resolución del receptor en estado inactivo¹⁸¹. La conjugación de nanoanticuerpos que puedan reconocer a la proteína de interés con otras proteínas formando megacuerpos también se ha planteado como una estrategia para aumentar aún más su tamaño, facilitando su determinación estructural mediante crio-ME²⁴⁴. Por otro lado, también se han desarrollado nanoanticuerpos que estabilizan conformaciones activas específicas de receptores. Por ejemplo, Nb39⁷⁴, Nb9-8¹⁸⁸ y Nb80²⁴⁵ se unen a conformaciones activas específicas de los receptores κ y μ opioides, receptores muscarínicos y el receptor adrenérgico β₂, respectivamente. Estos nanoanticuerpos se unen a la parte intracelular del receptor y actúan además como moduladores alostéricos positivos, aumentando la afinidad de estos receptores por agonistas específicos.

Además de su utilidad en determinación estructural, la estabilización de conformaciones específicas también puede ser aprovechada para el uso de los nanoanticuerpos como biosensores, por ejemplo detectando cambios conformacionales en los receptores en respuesta a la unión de ligandos en ensayos celulares^{181,242,246–248}.

Por otro lado, además de nanonanticuerpos dirigidos a GPCRs, se han desarrollado nanoanticuerpos que se unen a proteínas transductoras. Un ejemplo destacado es el nanoanticuerpo Nb35, que se une al complejo formado por un receptor y la proteína G heterotrimérica de tipo G_s, impidiendo su disociación y utilizándose para estabilizar el complejo del receptor acoplado a proteína G en su estado activo²⁴⁹. Otro nanoanticuerpo de interés es el Nb5, que se dirige específicamente a la subunidad β de la proteína G heterotrimérica inhibiendo la señalización mediada por el dímero Gβγ, sin

afectar las vías de señalización que dependen de la subunidad G α activada²⁵⁰. Por su parte, también se ha desarrollado un nanoanticuerpo dirigido a β -arrestina 1 en su forma activa, estabilizando esta conformación y facilitando la determinación estructural de complejos de GPCR unidos a β -arrestina 1²⁵¹.

En este trabajo se han desarrollado nanoanticuerpos dirigidos a D₃R con el objetivo de encontrar moléculas selectivas, con nuevos tipos de modulación, que sirvan de herramienta para el estudio general del D₃R.

5.2 Generación de nanoanticuerpos dirigidos a D₃R

Para generar los nanoanticuerpos se utilizó como antígeno un constructo del D₃R acoplado a una eGFP en su extremo carboxilo y sin el ICL3 (D₃R- Δ ICL3), debido a que en ese momento era la única variante disponible, no habiendo conseguido hasta entonces la inserción del ICL3 para la generación del receptor natural. Sin embargo, el ICL3 es una región altamente flexible, que no se visualiza en crio-ME y que por ello se suele eliminar para la determinación estructural de estos receptores, siendo beneficiosa su eliminación del constructo para la generación de nanoanticuerpos.

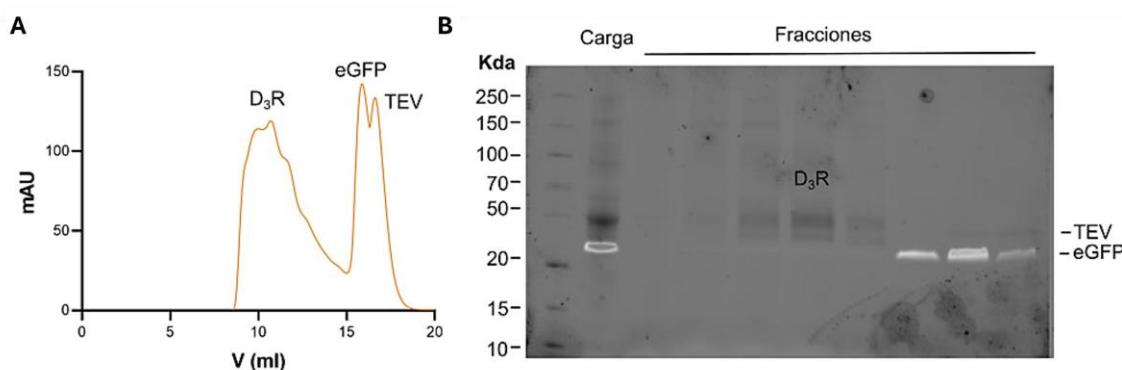


Figura V.49. Purificación del constructo D₃R- Δ ICL3. A) Cromatograma de exclusión molecular. B) Gel de SDS-PAGE de la cromatografía de exclusión molecular con fluorescencia superpuesta en gel para la eGFP.

Para garantizar que los nanoanticuerpos generados estuvieran exclusivamente dirigidos al D₃R, se eliminó durante la purificación la eGFP evitando así respuestas inmunitarias cruzadas que dieran lugar a la generación de nanoanticuerpos frente a la proteína fluorescente (Figura V.49). Además, el receptor se purificó en ausencia de ligando para no favorecer la generación de nanoanticuerpos hacia un estado conformacional concreto (activo o inactivo) del receptor.

La inmunización de la llama y el cribado de los nanoanticuerpos fueron realizados por Alison Lundqvist en el centro de Biología Estructural VIV-VUB (INSTRUCT-ERIC, Bélgica). Como resultado, se obtuvieron 22 clones que se agruparon en 16 familias según su secuencia CDR3, siendo ésta la región más variable del nanoanticuerpo y la responsable de la interacción específica (junto con CDR1 y CDR2) con el antígeno (Figura V.50).

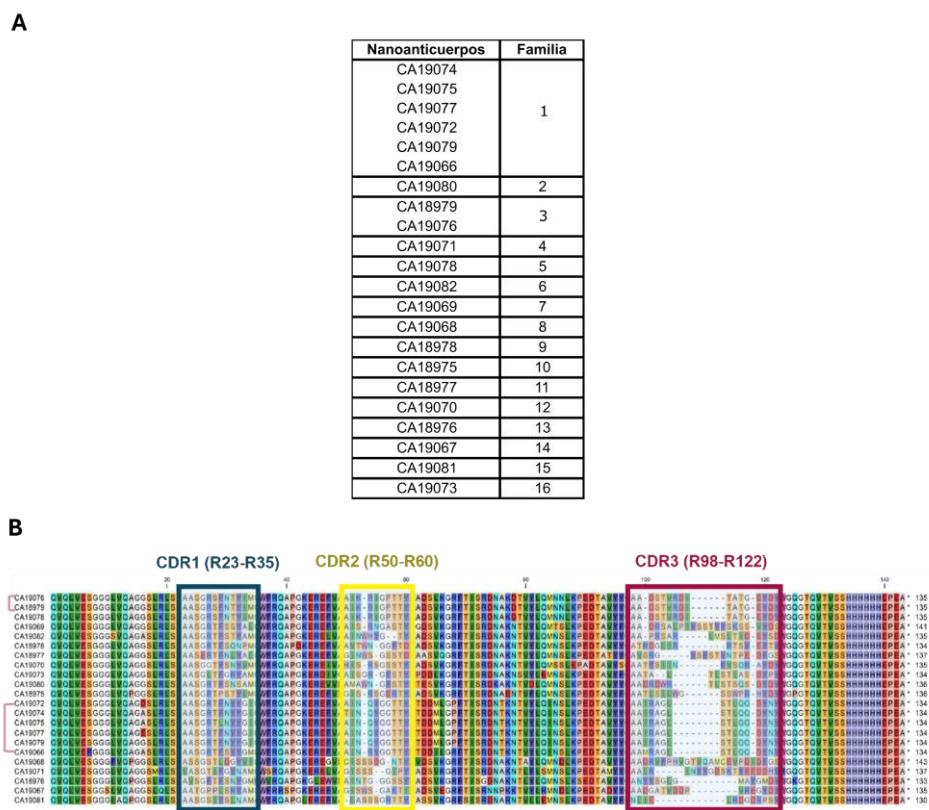


Figura V.50. Descripción de los clones de nanoanticuerpos generados. A) Tabla resumen de los nanoanticuerpos generados frente a D₃R, agrupados en familias según su secuencia CDR3.

B) Alineamiento de secuencias de los nanoanticuerpos generados. La coloración de los residuos en las secuencias sigue un código de colores preestablecido de acuerdo con sus propiedades químicas. Los nanoanticuerpos se agruparon en familias atendiendo a su secuencia CDR3. Los nanoanticuerpos que pertenecen a una misma familia están agrupados a la izquierda (marca rosa). Para la identificación de las regiones CDR se utilizó la aplicación NanoBodyBuilder2 (SAbPred). R=Residuo.

5.3 Validación de la unión al D₃R

Para confirmar la unión a D₃R WT, se indujo la expresión en *Escherichia coli* de 16 nanoanticuerpos (1 por familia) y se purificaron según lo descrito en la sección de métodos (Anexo VII). A continuación, se incubaron los nanoanticuerpos con solubilizados de D₃R WT (HASS-FLAG-eGFP-3C-D₃R WT) en detergente LMNG y se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con resina FLAG seguido de una inmunodetección de los nanoanticuerpos mediante “western blot” (Figura V.51). Los nanoanticuerpos se incubaron tras la solubilización del D₃R para permitir la unión a zonas intracelulares y extracelulares del receptor.



Figura V.51. “Western blot” con el anticuerpo conjugado anti-His para el reconocimiento de los nanoanticuerpos eluidos en complejo con el D₃R.

De los 16 nanoanticuerpos evaluados (1 nanoanticuerpo por familia), 3 mostraron interacción con el D₃R WT (CA18977, CA19073 y CA19081) (Figura V.51). El resto probablemente respondan a falsos positivos en los ensayos ELISA, sin embargo, no se puede descartar que existan falsos negativos en este ensayo pudiendo la presencia de la eGFP en el constructo dificultar el acceso a determinados epítopos. Además,

tampoco se puede descartar la posibilidad de interacciones entre los nanoanticuerpos y la eGFP, aunque esta posibilidad es menos probable debido al alto grado de corte obtenido durante la purificación.

5.4 Caracterización de los nanoanticuerpos para D₃R

5.4.1 Activación de proteínas G

Tras confirmar la unión al D₃R de tres nanoanticuerpos (CA18977, CA19073 y CA19081), se decidió evaluar su capacidad para activar el D₃R mediante ensayos TRUPATH en células HEK293T. Además, la adición de los nanoanticuerpos al medio extracelular permitiría inferir si la unión del nanoanticuerpo al receptor ocurre a nivel extracelular ya que los nanoanticuerpos no pueden atravesar la membrana plasmática.

Los ensayos celulares revelaron que el nanoanticuerpo CA18977 induce la activación del D₃R por la vía de las proteínas G de una manera similar a la observada con el ligando bitópico FOB02-04A (Figura V.52) y, además se une a una región extracelular del D₃R.

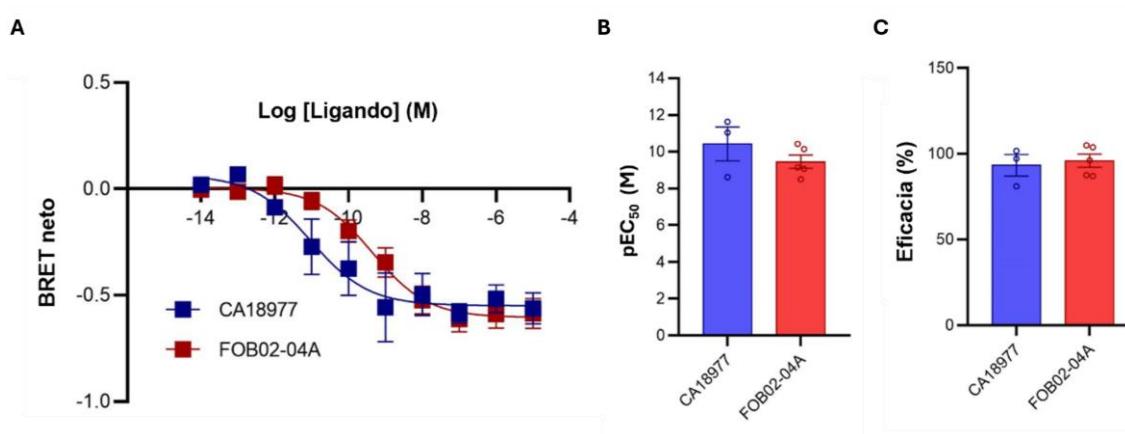


Figura V.52. Activación de proteína G mediada por CA18977 en D₃R. A) Curva concentración-respuesta de D₃R WT tras la activación de G_{OA} por CA18977 (azul, n = 3) y FOB02-04A (rojo, n = 5) (mostrado como BRET neto). B y C) Valores de pEC₅₀ (B) y E_{max} (C) en respuesta a la activación de G_{OA} por CA18977 (azul, n = 3) y FOB02-04A (rojo, n = 5) utilizando el ensayo

TRUPATH. Los valores E_{max} se han normalizado tomando como referencia la activación de D₃R WT mediada por FOB02-04A. Todos los datos son medias ± SEM de las réplicas biológicas señaladas, cada una realizada por triplicado técnico.

Sin embargo, los nanoanticuerpos CA19081 y CA19073 no indujeron activación del receptor. Esto puede deberse a varias razones. Una posibilidad es que estos nanoanticuerpos reconozcan un epítopo intracelular, inaccesible en el ensayo TRUPATH donde el nanoanticuerpo se suministra con el medio. Otra posibilidad es que presenten una unión extracelular pero que no modulen la función del receptor. Finalmente, tampoco se puede descartar la posibilidad de una unión en modo antagonista o agonista inverso, bloqueando o inhibiendo la actividad del receptor respectivamente.

5.4.2 Predicción estructural con modelos de AlphaFold

Para complementar la información derivada de los ensayos funcionales, se utilizó Alphafold 3.0²⁵² para la predicción de las estructuras de D₃R unidas a los nanoanticuerpos CA18977, CA19073 y CA19081 (Figura V.53).

Según la predicción de AlphaFold, los tres nanoanticuerpos se unen a la superficie extracelular del D₃R presentando su sitio de unión en la superficie del receptor, alejado del típico sitio ortostérico (Figura V.53). En concreto, los nanoanticuerpos CA18977 (azul) y CA19073 (amarillo) establecerían interacciones principalmente con los bucles ECL2 y ECL3, así como con las TM5 y TM6, con unas interfaces de contacto de 1017,1 Å² y 952,6 Å², respectivamente (Figura V.53B y C). Por su parte, CA19081 (rosa) presentaría un modo de unión diferente, con un área de interfaz más pequeña (611,1 Å²) estableciendo contactos principalmente con el ECL1 y la TM7 (Figura V.53D).

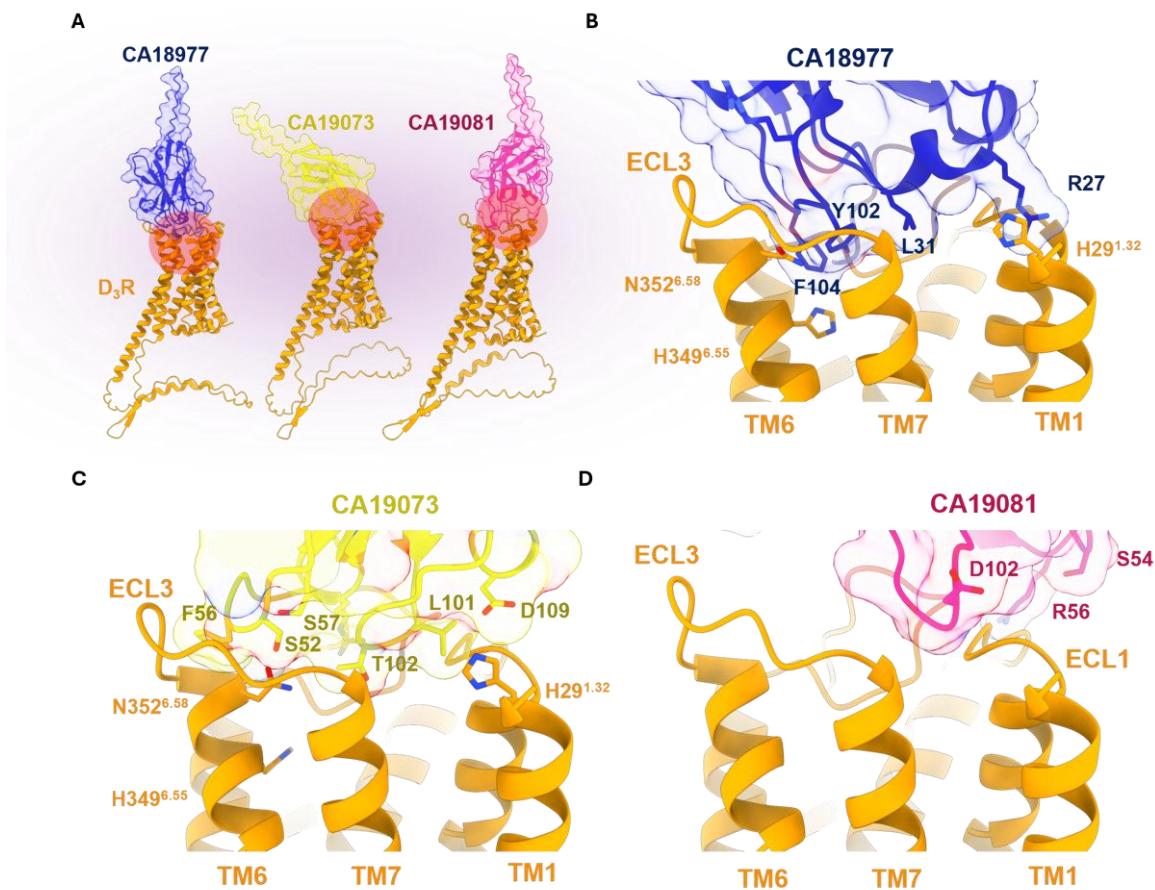


Figura V.53. Predicción estructural de AlphaFold para las estructuras de D₃R unidas a los nanoanticuerpos CA18977, CA19073 y CA19081. A) Estructuras de D₃R (naranja) unidas a los nanoanticuerpos CA19080 (azul), CA19073 (amarillo) y CA19081 (rosa) según modelos de Alphafold. En un círculo rojo se resalta la interfaz entre ambas proteínas. **B-D)** Interfaces de interacción entre D₃R y los nanoanticuerpos CA18977 (**B**), CA19073 (**C**) y CA19081 (**D**).

Sin embargo, a pesar de que CA18977 y CA19073 presentan un sitio de unión bastante similar, solo CA18977 es capaz de activar al D₃R en ensayo funcional. El análisis de ambos modelos revela que la unión de CA18977 provoca el desplazamiento de los residuos N358^{6.52} y H349^{6.55} en la TM6 del D₃R por la Y102 y F104 del nanoanticuerpo respectivamente, lo que deriva en una apertura hacia el exterior de la región superior de la TM6, mientras que los residuos del nanoanticuerpo CA19073 que interactúan con el D₃R son menos voluminosos (S52 y T102), adentrándose el nanoanticuerpo menos en el bolsillo (Figura V.54).

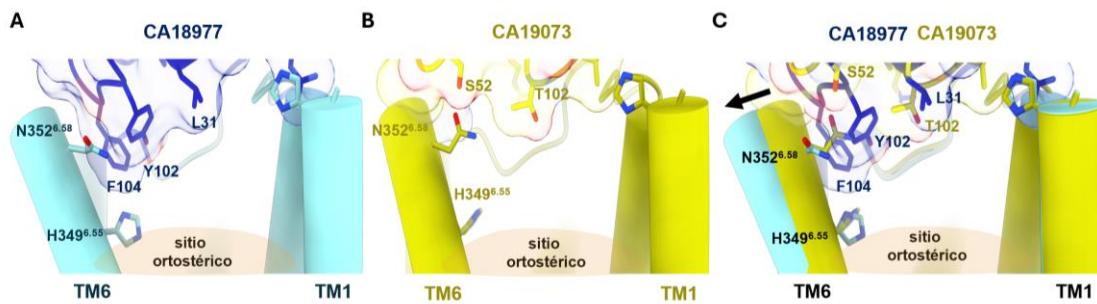


Figura V.54.Comparación estructural del modo de unión de CA18977 y CA19073 en D₃R (según modelos de AlphaFold). **A)** Interacción de CA18977 (azul) en D₃R. **B)** Interacción de CA19073 (amarillo) en D₃R. **C)** Superposición de las estructuras del D₃R unido a CA18977 (azul) y CA19073 (amarillo).

Este desplazamiento hacia el exterior de la TM6 antes del pliegue de la prolina observada para la estructura con CA18977, pero no para CA19073 o CA19081 también se presenta en otras estructuras en estado activo del D₃R unidas a ligando bitópico FOB02-04A (Figura V.55), pramipexol (PDB 7CMU) y PD128907 (PDB 7CMV), aunque no con rotigotina (PDB 8IRT).

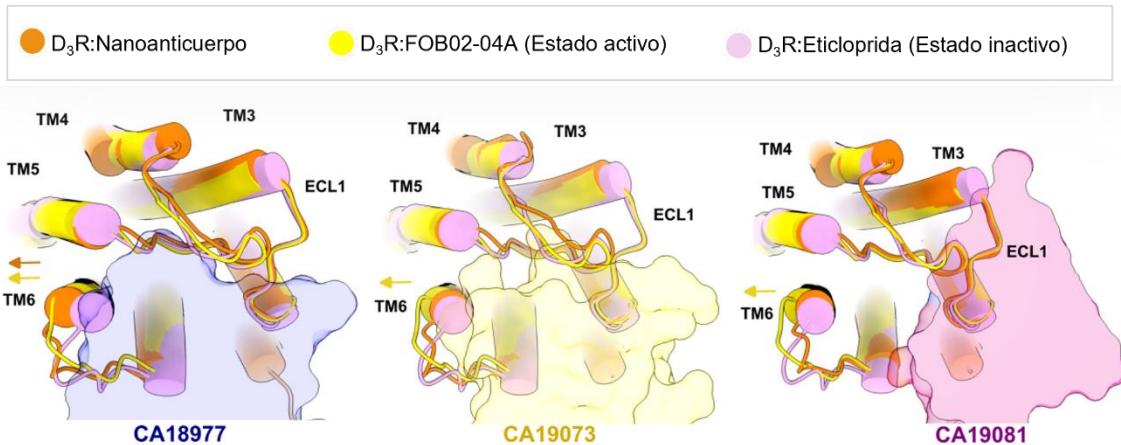


Figura V.55. Vista desde arriba del sitio de unión de los nanoanticuerpos en la estructura del D₃R y su unión relativa a las estructuras en estado activo (unida a FOB02-04A, PDB 9F33, en amarillo) e inactivo (unida a eticloprida, PDB 3PBL, en rosa).

El movimiento hacia afuera de la región intracelular de la TM6 es una característica universal de la activación de GPCRs, permitiendo la apertura el acoplamiento de la proteína G⁹. Sin embargo, el extremo extracelular de TM6 también se desplaza hacia afuera en los GPCRs en el estado activo, con una media de 2,0 Å para GPCRs de clase A². Según el modelo predicho por AlphaFold, CA18977 no sólo induce un movimiento hacia afuera de la región extracelular de la TM6, también una activación de la parte intracelular del D₃R, apoyado por los resultados de ensayos TRUPATH donde se observa activación de proteínas G. La activación de un receptor por un agonista cuyo sitio de unión se localiza cerca de la superficie celular se ha reportado para receptores activados por péptidos, como el receptor de neurotensina 1 unido al fragmento activo de la neurotensina NT₍₈₋₁₃₎, donde el contacto del péptido agonista con residuos del ECL2, ECL3, y la región superior de la TM6 parecen ser suficientes para la activación total del receptor²⁵³. Además, mutaciones en residuos cercanos a la región extracelular de la TM6 y el ECL3 por residuos voluminosos o básicos en receptores muscarínicos han demostrado aumentar la actividad constitutiva del receptor y su afinidad por el agonista²⁵⁴, sugiriendo que esta apertura de la región extracelular de la TM6 es importante para la activación general de los receptores. Sin embargo, la activación de un receptor de molécula pequeña como el D₃R (con dopamina como ligando endógeno) por una proteína que se une fuera del sitio ortostérico es un fenómeno novedoso, siendo interesante su caracterización estructural a través de la crio-ME.

5.4.3 Estudio de la selectividad D₃R/D₂R del nanoanticuerpo CA18977

El reconocimiento de un epítopo extracelular y su señalización a través del D₃R hizo pensar en la posibilidad de que el nanoanticuerpo CA18977 pudiese mostrar selectividad para D₃R, ya que D₃R y D₂R presentan mayor divergencia en sus regiones extracelulares. Los ensayos TRUPATH con D₂R revelaron que el nanoanticuerpo no es selectivo en potencia, presentando una pEC₅₀ parecida para ambos receptores ($10,4 \pm 0,9$ M para D₃R y $11,1 \pm 0,6$ M para D₂R). Sin embargo, se observa una disminución en la capacidad para activar el receptor, viéndose reducida la eficacia más de la mitad para el

D₂R en presencia del nanoanticuerpo ($43,2\% \pm 9,56$) con respecto a la activación en D₃R (Figura V.56).

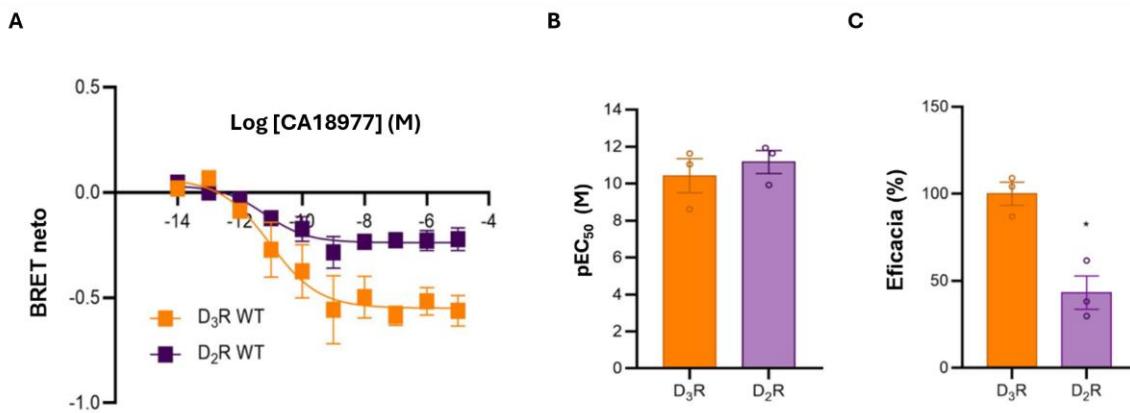


Figura V.56. Activación de CA18977 en D₃R y D₂R. A) Curva concentración-respuesta de D₃R WT (naranja, n = 3) y D₂R WT (morado, n = 3) tras la activación de G_{OA} por CA18977 (mostrado como BRET neto). B y C) Valores de pEC₅₀ (B) y E_{max} (C) en respuesta a la activación de G_{OA} por CA18977 en D₃R WT (naranja, n = 3) y D₂R WT (morado, n = 3) utilizando el ensayo TRUPATH. Los valores E_{max} se han normalizado tomando como referencia la activación de D₃R WT mediada por CA18977. *p < 0,05 (pruebas de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, valor p de dos colas) para D₂R WT (p = 0,008). Todos los datos son medias ± SEM de las réplicas biológicas señaladas, cada una realizada por triplicado técnico.

Según la predicción de AlphaFold, CA18977 establece en el D₃R interacciones con la H29^{1,32} y el ECL1, regiones identificadas previamente en este trabajo como relevantes para la selectividad del D₃R frente a D₂R (capítulo 3). Sin embargo, la EC₅₀ observada para el nanoanticuerpo es bastante similar para D₂R y D₃R, no observándose una preferencia por la unión al D₃R. Esto puede deberse a que, al existir una interfaz tan grande, el bolsillo de TM1-TM2-ECL1 no sea tan relevante para la unión. Por otro lado, AlphaFold predice para el D₂R una unión de CA18977 con una interfaz muy similar a la observada para el D₃R, con un área de interfaz de 887,5 Å² estableciendo contactos con las regiones de ECL1, ECL2 y ECL3 junto con TM5 y TM6, pero no con TM1 (Figura V.57).

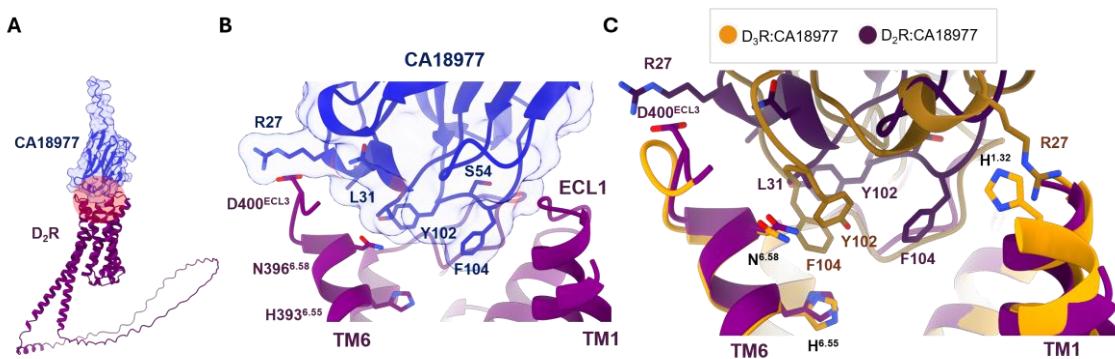


Figura V.57. Modo de unión del nanoanticuerpo CA18977 en D₂R. **A)** Vista lateral del sitio de unión de CA18977 (azul) en D₂R (morado) según AlphaFold. **B)** Vista desde arriba del sitio de unión de CA18977 en la estructura del D₂R (modelo AlphaFold) y su unión relativa a las estructuras en estado activo (unida a rotigotina, PDB 8IRS, en amarillo) e inactivo (unido a risperidona, PDB 6CM4, en turquesa).

En este caso, según el modelo propuesto por AlphaFold, el nanoanticuerpo presenta una orientación diferente, con la R27 (que en D₃R interaccionaba con H29^{1,32}) orientada hacia TM6-ECL3. Esta reorientación del anticuerpo haría que en el bolsillo entre TM5-TM6-ECL3 de D₂R (ocupado por los residuos Y102 y F104 de CA18977 en D₃R) no hubiese residuos tan voluminosos (en D₂R ese espacio es ocupado por una leucina de CA18977), no penetrando en profundidad el nanoanticuerpo en el bolsillo del receptor en D₂R (Figura V.57). Esto podría explicar porque el nanoanticuerpo en D₂R presenta menor eficacia, al adentrarse menos en el bolsillo del receptor.

5.5 Discusión

En este capítulo se ha descrito la generación de nanoanticuerpos dirigidos a D₃R, obteniendo tres nanoanticuerpos capaces de unirse al receptor. Sin embargo, el constructo D₃R utilizado como antígeno para la inmunización y generación de los nanoanticuerpos no tenía eGFP, mientras que los ensayos de unión y función se han hecho con el constructo D₃R WT fusionado a la proteína fluorescente. Para descartar posibles interferencias en la interacción de los nanoanticuerpos con el receptor por la presencia de la eGFP se requieren de ensayos de validación de la unión y función con el

constructo sin la eGFP. Por otro lado, los ensayos TRUPATH revelan que CA18977 es capaz de activar al D₃R por la vía de las proteínas G, mientras que para CA19073 y CA19081 no se observa respuesta. Ensayos de TRUPATH en versión antagonista podrían ayudar a dilucidar el rol funcional que presentan CA19073 y CA19081 en el D₃R.

Atendiendo a los modelos estructurales propuestos por AlphaFold, los tres nanoanticuerpos se unen a la superficie extracelular del receptor, con un sitio de unión alejado del típico sitio ortostérico. La unión de nanoanticuerpos a regiones extracelulares del receptor pueden modular la actividad de los GPCRs y atrapar distintos estados conformacionales que difieren de los típicos ligandos que se unen al sitio ortostérico. Esta modulación de la función GPCR plantea un gran potencial terapéutico de los nanoanticuerpos, existiendo dos nanoanticuerpos de unión extracelular BI 655088 y VUN402 dirigidos a los receptores de quimiocinas CX3CR1 y CXCR4 que actualmente se encuentran en fase de ensayo clínico, estableciéndose como potenciales fármacos para la arterioesclerosis y la infección por VIH respectivamente^{255,256}. Sin embargo, aunque la literatura reporta varios ejemplos de nanoanticuerpos que actúan como moduladores alostéricos positivos y negativos, la mayoría presentan una unión intracelular. De los nanoanticuerpos extracelulares, destacan el DN10 y DN13, que actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor de glutamato metabotrópico 2,²⁵⁷ el Sb51, que se une al estado activo del receptor de orexina 2²⁵⁸ y el Nb29 que se une al receptor α₁ adrenérgico actuando como un modulador alostérico positivo débil o neutro uniéndose selectivamente al estado activo del receptor unido a oximetazolina²⁵⁹. Por otro lado, los nanoanticuerpos JN241 (receptor de apelina),NbE (receptor μ opioide) ,Nb2 (receptor de rodposina), AT118i4 (receptor de angiotensina 1) y VUN701 (receptor atípico de quimiocina 3) actúan como antagonistas, impidiendo la activación de los receptores²⁶⁰⁻²⁶⁴.

En este capítulo se demuestra la capacidad de CA18977 para activar por sí solo al D₃R, sin ocupar el sitio ortostérico, y presentando una unión extracelular, lo que lo plantea como una potencial herramienta terapéutica. Es probable que la adición conjunta del nanoanticuerpo con agonistas que se unan al sitio ortostérico dé lugar a una respuesta potenciada, observándose un efecto sinérgico donde el nanoanticuerpo podría actuar

como modulador alostérico positivo. Ensayos de competición de CA18977 con agonistas de D₃R que se unan al sitio ortostérico confirmarían esta posibilidad. Además, la estabilización de conformaciones activas por parte del nanoanticuerpo podría ser útil en general para la determinación de estructuras de estado activo de D₃R unido a agonistas con baja eficacia.

Por otra parte, en este capítulo solo se ha explorado la señalización del D₃R a través de proteínas G. Sin embargo, estudios previos en el D₂R sugieren que interacciones polares directas o indirectas con el residuo H^{6.55} son un requisito para el acoplamiento eficiente a β-arrestina 2, siendo menos relevantes para la activación de proteínas G²⁶⁵. Considerando que el nanoanticuerpo CA18977 interactúa con el residuo H^{6.55} según el modelo propuesto por AlphaFold sería interesante evaluar si este nanoanticuerpo es capaz de inducir la activación de β-arrestina.

En cuanto al mecanismo de activación, el análisis de las estructuras de D₃R en estado activo e inactivo revelan un movimiento hacia afuera de la región superior de la TM6 como consecuencia de la unión del nanoanticuerpo CA18977, observándose esta apertura de la región extracelular de la TM6 en otras estructuras activas del D₃R. Por ejemplo, Skiba y colaboradores reportaron recientemente que los nanoanticuerpos AT118-H y AT118 estabilizan el receptor de angiotensina 1 en una conformación activa al interactuar con su superficie extracelular, pero no se unen a los interruptores de activación clave ubicados a nivel del sitio ortostérico, dejando la región intracelular en un estado inactivo, existiendo el receptor en una conformación híbrida y mostrando un mecanismo más complejo²⁶⁶. La determinación estructural del complejo D₃R con proteínas G unido a CA18977 permitiría confirmar el modo de unión del nanoanticuerpo, así como observar los cambios conformacionales de la TM6 derivados la unión.

Por otro lado, la generación de nanoanticuerpos modificados, donde se introduzcan por ejemplo mutaciones en la región CDR3 por residuos más voluminosos en el CA19073 (con un sitio de unión bastante similar al CA18977) y la evaluación de su efecto en la activación de D₃R mediante ensayos TRUPATH permitiría confirmar la relevancia de la región extracelular de la TM6 en la activación del receptor. La determinación estructural

Capítulo V. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOANTICUERPOS PARA D₃R

del D₃R con los otros dos nanoanticuerpos también resultaría interesante para confirmar su modo de unión, pudiendo ser potencialmente utilizados como estabilizadores para la determinación de estructuras en estado inactivo.

Por último, se revela que aunque CA18977 puede unirse a D₂R y D₃R con la misma potencia, la capacidad para activar la señalización en D₃R es mucho mayor, sugiriendo un potencial papel de la H29^{1,32} para el correcto posicionamiento del nanoanticuerpo. La mutación en D₃R del residuo H29^{1,32} por alanina o ensayos de competición con FOB02-04A, que se extiende más allá del sitio ortostérico interaccionando con H29^{1,32} y G94^{ECL1} (capítulo 3) podrían disminuir significativamente la señalización inducida por CA18977 en el D₃R. Ello demostraría este residuo como esencial para garantizar una correcta orientación del nanoanticuerpo que permita la activación y podría explicar por qué en D₂R no se observa esa señalización, al no existir tal interacción con la TM1.

5.6 Conclusiones

En base a lo presentado en este capítulo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- i) Se desarrollan nanoanticuerpos que reconocen específicamente el D₃R, siendo fundamental la validación de su unión para descartar falsos positivos y negativos.
- ii) Se identifican 3 nanoanticuerpos (CA18977, CA19073, CA19081) que se unen al D₃R pudiendo estos presentar múltiples aplicaciones para el estudio general del D₃R, que incluyen la determinación estructural como agentes estabilizadores, el desarrollo de biosensores o su uso como herramienta terapéutica.
- iii) Se caracteriza un nanoanticuerpo (CA18977) que se une de manera extracelular al D₃R actuando como un potente agonista. Esta interacción facilita su potencial uso como herramienta terapéutica, permitiendo la modulación farmacológica (debido a su unión

extracelular) y la exploración de su potencial como modulador alostérico en ensayos celulares.

iv) El nanoanticuerpo CA18977, además de unirse al D₃R, también interactúa con el D₂R con una potencia similar. Sin embargo, la respuesta celular inducida por este nanoanticuerpo es diferente para cada receptor, revelando una interacción selectiva para D₂R y D₃R que puede ser aprovechada para el estudio general de ambos receptores.

Capítulo VI. Oligomerización en D₃R

6.1 Existencia y caracterización de oligómeros de D₃R

La capacidad de oligomerizar del D₃R se reportó por primera vez en 1997 donde ensayos de co-inmunoprecipitación e inmunodetección revelaron la presencia de homo-oligómeros de D₃R en extractos de cerebro²⁶⁷. Además, se ha sugerido que el D₃R puede formar heterodímeros con otros receptores de dopamina, como el D₁R y el D₂R²⁶⁸⁻²⁷⁰. De hecho, para el heterodímero D₂R-D₃R se ha reportado recientemente un modulador alostérico negativo, SB269652, que se une a un protómero y modula negativamente a través del dímero la unión de la dopamina al otro protómero, identificando así la primera pequeña molécula alostérica que actúa sobre estas importantes dianas terapéuticas^{271,272}. Por otro lado, el heterodímero D₁R-D₃R es uno de los más interesantes a nivel terapéutico, habiéndose descrito su relevancia en la regulación de la discinesia inducida por levodopa en pacientes con la enfermedad de Parkinson^{268,273}, observándose interacción de ambos receptores tanto en células HEK293 transfectadas como en membranas estriatales de rata a través de ensayos BRET y co-inmunoprecipitación. Como resultado de la dimerización, aumenta la afinidad y potencia de la dopamina por el D₁R, estimulando la vía de activación de la enzima adenilato ciclase y cambiando el D₃R sus mecanismos de tráfico a los del D₁R^{268,274}. Además, también se ha reportado a través de experimentos de co-inmunolocalización en células HEK293 y co-inmunoprecipitación en células GH3 y cerebro de rata la heterodimerización del D₃R con su isoforma D3nf la cual modula negativamente su función disminuyendo la unión a dopamina al favorecer su endocitosis y retirada del receptor en superficie^{93,94,267}.

Además de con receptores de dopamina, se ha sugerido la formación de complejos con otros GPCRs. Por ejemplo, la interacción con el receptor de adenosina A_{2A} modula antagónicamente tanto la afinidad como la señalización del D₃R en células HeLa²⁷⁵. Por otro lado, el D₃R puede interaccionar con la subunidad β₂ de los receptores nicotínicos de acetilcolina promoviendo el crecimiento y supervivencia neuronal tanto *in vitro* como *in vivo*, en secciones de cerebro mesencefálico de ratón^{276,277}. Además, también se ha descrito una interacción con el receptor huérfano GPR143, demostrando que el

receptor huérfano y el D₃R co-localizan e interactúan en las membranas intracelulares de células CHO, modulando negativamente la actividad del D₃R a través de una alteración de la afinidad por la dopamina o posponiendo la entrega del D₃R a la membrana plasmática²⁷⁸. También se ha descrito una modulación negativa del D₃R por el receptor de neurotensina 1, habiéndose observado una menor afinidad de unión de los agonistas del D₃R en las zonas límbicas del cerebro de la rata, donde colocaliza con el receptor de neurotensina 1. Además, se ha reportado que en células HEK293 el heterodímero cambia el tráfico del D₃R a una endocitosis dependiente de β-arrestina²⁷⁹. Sin embargo, todas las evidencias de oligomerización se han basado en ensayos de co-inmunoprecipitación y/o estudios de proximidad no demostrándose una interacción física entre los receptores y no habiéndose definido las interfaces que participan de la oligomerización. Estudios posteriores, combinando modelización molecular, mutagénesis dirigida y técnicas de RET han definido dos interfaces potenciales: la primera comprende residuos de la TM1-2 junto con los de la TM7 y H8 y una segunda que implica a TM5 y TM6 permitiendo el ensamblaje de hasta cuatro protómeros organizados en una disposición rómbica²⁸⁰⁻²⁸². Sin embargo, la organización de los oligómeros, la relevancia funcional o los residuos que constituyen la interfaz de la homo- o hetero-oligomerización del D₃R aún no están establecidos.

En este trabajo se plantean diferentes aproximaciones experimentales con el objetivo de poder estudiar sin ambigüedad la oligomerización de estos receptores, a fin de conseguir la determinación estructural de estas especies oligoméricas.

6.2 Determinación estructural de dímeros de D₃R en LMNG por crio-ME

6.2.1 Obtención de dímeros en solución

En primer lugar, se desarrolló una estrategia para poder obtener dímeros en solución que permitieran su posterior determinación estructural por crio-ME. Una de las estrategias que recoge la literatura para favorecer la dimerización es el uso de ligandos bivalentes. Estos compuestos están formados por dos farmacóforos capaces de unirse

simultáneamente a los sitios ortostéricos de dos receptores, favoreciendo la formación de homo- o heterodímeros según los farmacóforos utilizados (Figura VI.58). En 2018, Pulido y colaboradores reportaron un ligando bivalente que presentaba una alta afinidad ($K_D = 21 \text{ pM}$) por el homodímero D₂R, uniéndose al estado inactivo de ambos protómeros y presentando una afinidad significativamente mayor que la de los farmacóforos solos indicando una unión cooperativa a ambos receptores (Ligando C13, Figura VI.58A)²⁸³. Dada la similitud estructural entre el D₂R y el D₃R, que comparten sitio ortostérico, el ligando bivalente C13 también se une a D₃R con alta afinidad, por lo que se utilizó para favorecer la dimerización del D₃R.

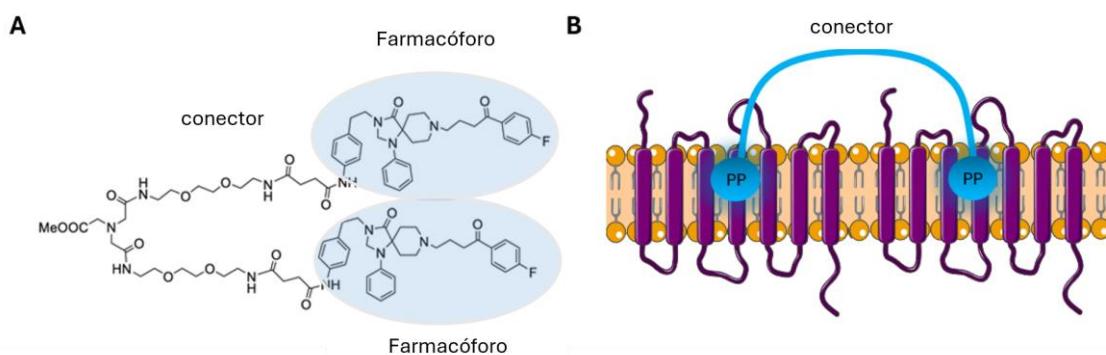


Figura VI.58. Estructura y unión de ligandos bivalentes. **A)** Estructura química del ligando bivalente C13, formado por dos farmacóforos idénticos enlazados a través de un conector. **B)** Modo de unión de un ligando bivalente a dos receptores, favoreciendo la dimerización. PP hace referencia al farmacóforo.

Se purificó a gran escala el D₃R unido al ligando C13 en detergente LMNG para su estudio por crio-ME, según lo descrito en métodos. Para garantizar la presencia de dímeros en solución, se realizó un gel nativo con la fracción concentrada recogida de la filtración en gel. Además, se aplicó a las muestras un gradiente de SDS con el objetivo de observar una disociación progresiva de los dímeros de D₃R hacia la especie monomérica (Figura VI.59).

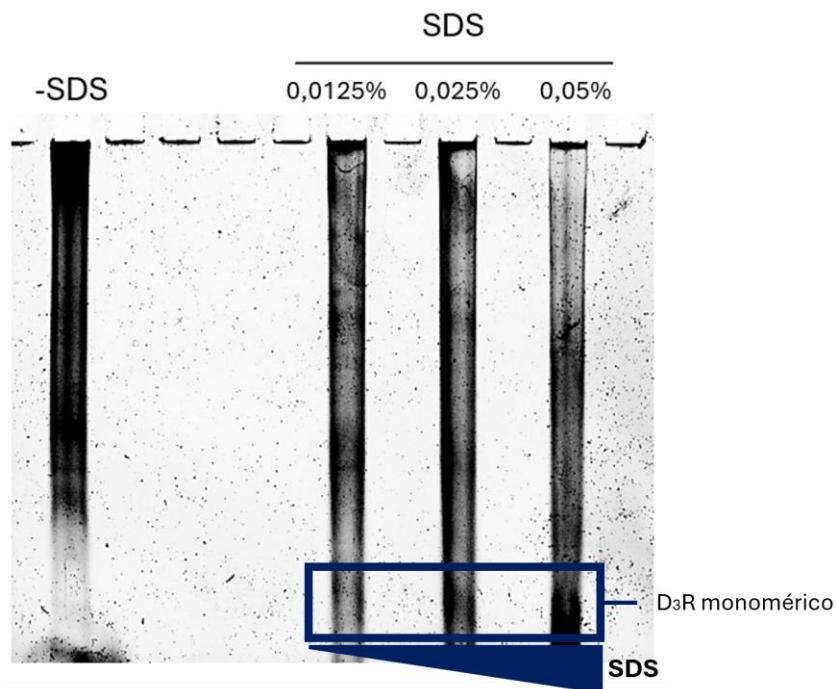


Figura VI.59. Gel nativo “stain-free” de muestra pura de D₃R unido a ligando C13.

La muestra no tratada con SDS reveló la presencia de más de una especie, evidenciando la existencia no sólo de potenciales dímeros, también de especies de mayor orden y existiendo también proteína monomérica. La adición gradual de SDS incrementó la concentración de lo que podría ser la proteína monomérica (Figura VI.59). Sin embargo, la ausencia de un marcador de peso molecular limita la interpretación de estos resultados.

6.2.2 Análisis de C13:D₃R por crio-ME

Con los potenciales dímeros en solución, se hicieron rejillas de crio-ME y se estableció una recogida inicial de 601 películas en un Titan Krios a 300 kV (NeCEN, Holanda). Sin embargo, el procesado de datos reveló una muestra bastante heterogénea, mostrando las clasificaciones 2D un alto porcentaje de proteína monomérica. Probablemente, parte de los potenciales dímeros observados en el gel nativo correspondiesen a dímeros artefactuales o se perdieron durante la vitrificación debido a la naturaleza lábil de estos complejos y al contacto con la interfase aire-agua.

Tras 6 rondas de clasificación 2D, se seleccionaron 9.989 partículas para su clasificación en 3D. La baja calidad de las clases 2D junto con el bajo número de partículas diméricas impidió la obtención de un buen modelo tridimensional (Figura VI.60), obteniendo tras el refinado un mapa final a 18 Å (3.632 partículas), indicando la necesidad de optimización de la muestra.

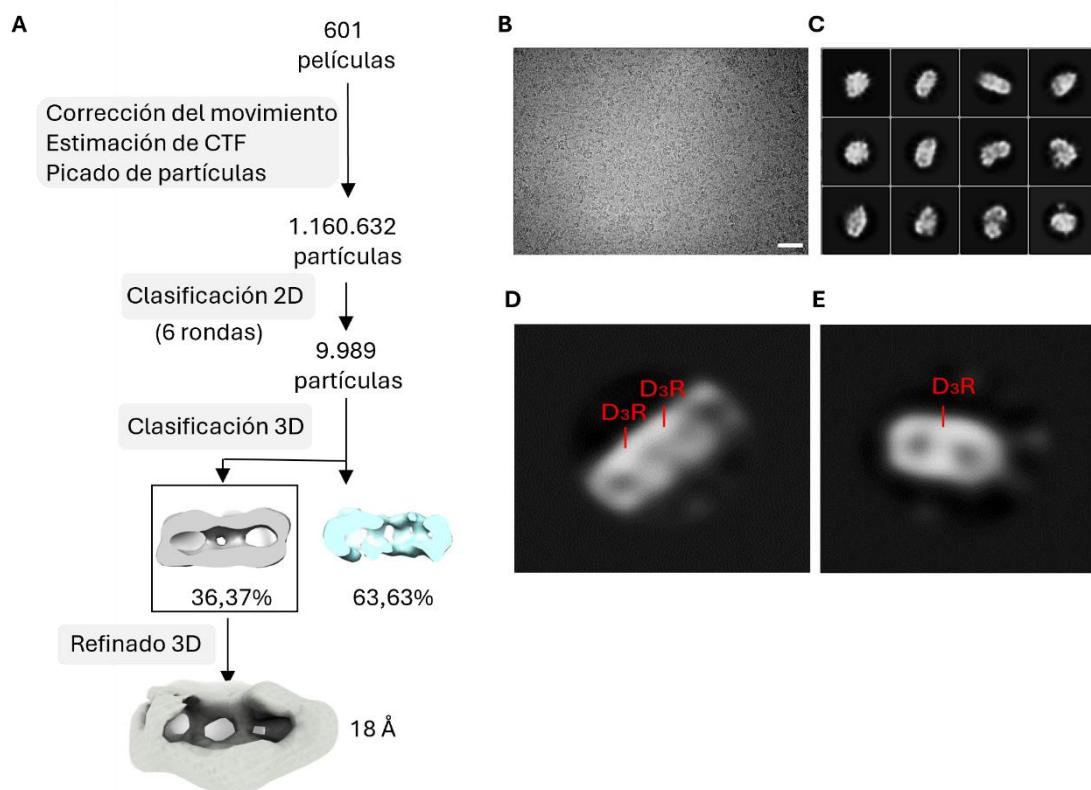


Figura VI.60. Procesado de datos de crio-ME para la muestra de D₃R unida al ligando bivalente C13. A) Esquema de flujo seguido para el procesado de datos recogidos de la muestra C13:D₃R. **B)** Micrografía representativa de la muestra C13:D₃R. Escala: 0,05μm. **C)** Clases 2D representativas de la muestra C13:D₃R. Tamaño de caja: 50 píxeles. **D** y **E)** Clases 2D representativas de la especie dimérica de D₃R (**D**) y de la especie monomérica de D₃R (**E**). Durante todo el procesado se empleó un tamaño de píxel de 3,6784 Å/píxel.

6.3 Determinación estructural de dímeros de D₃R en membrana por crio-TE

Tradicionalmente los dímeros de GPCRs se han descrito como lábiles y transitorios^{49,284}, no siendo lo suficientemente estables para su determinación estructural por crio-ME. Así, si bien el ligando bivalente C13 puede favorecer la formación de dímeros D₂R o D₃R en la membrana celular²⁸³, la solubilización con detergente resultaría demasiado agresiva para la extracción de estos complejos, siendo por tanto el entorno nativo fundamental para mantener estas interacciones. Por ello se decidió analizar directamente estos complejos en membranas celulares nativas a través de la crio-TE, para lo que se utilizaron vesículas derivadas de células HEK293T y proteoliposomas generados *in vitro*.

Para aprender a recoger y procesar datos de crio-TE que nos permitieran utilizar esta técnica para identificar y caracterizar sin ambigüedades las interacciones de proteínas intra-membrana del D₃R se realizó una estancia de 3 meses en el Instituto Francis Crick (Londres, Reino Unido) bajo la supervisión de Giulia Zanetti, experta en el uso de la crio-TE para el análisis de proteínas de membrana.

6.3.1 Estudio de oligomerización de receptores en membranas celulares nativas

Los receptores se expresaron de manera transitoria en células HEK293T y se generaron GPMVs (Figura VI.61B). Estas vesículas retienen casi todos los componentes de la membrana de la célula original, incluida la composición lipídica, las proteínas transmembrana y los canales de membrana¹²³. Los constructos de D₃R expresados se encontraban fusionados a una MTH, que es una metaloproteína que acepta entre 20 y 30 átomos de oro proporcionando una señal de alto contraste en crio-ME, facilitando la identificación del receptor en las membranas celulares (Figura VI.61A).

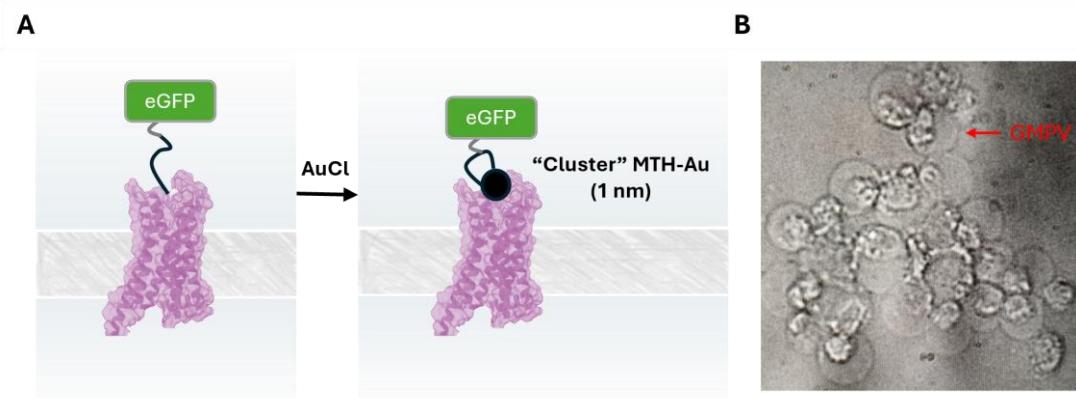


Figura VI.61. Marcaje de D₃R y formación de GPMVs. A) Marcaje de MTH-D₃R con AuCl. **B)** Visualización de GPMVs en microscopio óptico. Escala: 5 μ m.

Las vesículas se vitrificaron en rejillas de crio-microscopía y se recogieron datos en 2 ocasiones (116 tomogramas en total) en un microscopio 200 kV TALOS (Instituto Francis Crick, Londres). En la primera recogida se observó tras un procesado inicial un alineamiento de las series de inclinación subóptimo debido a la contaminación por hielo que presentaba la rejilla, requiriendo una optimización de la muestra. Además, se observó un número bajo de vesículas por rejilla, requiriendo un aumento en la concentración (Figura VI.62A). Una nueva colección de datos (66 tomogramas) mostró una rejilla mejorada, con gran cantidad de vesículas (Figura VI.62B), permitiendo un mejor alineamiento de las series de inclinación.

Sin embargo, tras un análisis inicial, no se evidencia la densidad electrónica esperada asociada al marcaje de la MTH. Aunque los GPMVs se trataron con exceso de AuCl una posibilidad es que exista un marcaje ineficiente, aunque es poco probable. Otra posibilidad es que una sola MTH sea insuficiente, siendo necesario avanzar en el procesado para saber si el etiquetado de una única MTH permite el picado de D₃R en membrana plasmática de estas vesículas (donde hay otras proteínas). Además, se han generado más rejillas bajo las mismas condiciones experimentales para su análisis en el microscopio electrónico si se requiere la recogida de tomogramas adicionales.

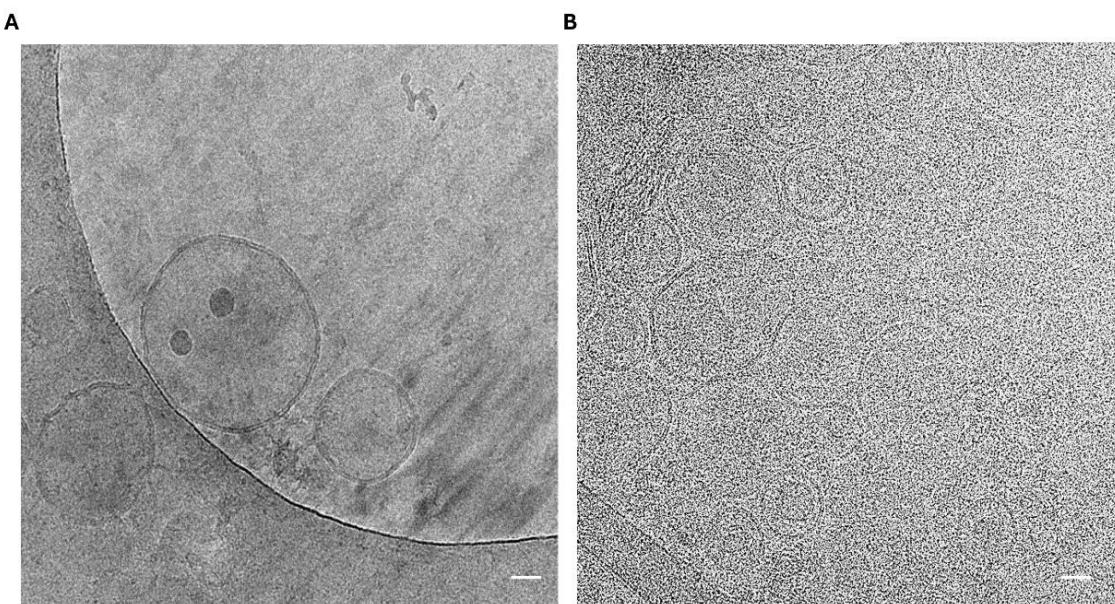


Figura VI.62. Comparación de GPMVs observados en las recogidas de datos. A y B)
Tomogramas de la muestra de GPMVs transfectados con D₃R-MTH en la primera recogida de datos (**A**) y la segunda recogida de datos (**B**). Escala: 0,05 μm.

6.3.2 Estudio de oligomerización en proteoliposomas reconstituidos

Además de en membranas celulares nativas, también se planteó la reconstitución de oligómeros de D₃R *in vitro*, donde se controla la composición proteica y lipídica, permitiendo estudiar sus propiedades funcionales. Así, se podría determinar si se puede reconstituir *in vitro* todos los componentes necesarios para que ocurra la oligomerización de receptores. Además, debido a ser técnicamente más simples de procesar y reconstruir computacionalmente, podrían permitir la obtención de información estructural de mayor resolución.

Para ello se purificó el D₃R WT y se reconstituyó en liposomas de 200 nm de lípidos DOPC que posteriormente fueron purificados para aislar los proteoliposomas de los liposomas vacíos. Se recogieron datos en 3 ocasiones (100 tomogramas en total) en un microscopio 200 kV (TALOS y Glacios, Instituto Francis Crick, Londres). Una recogida inicial de datos mostró que la mayoría de los liposomas eran multilamelares, y que

estos eran más susceptibles a la radiación de electrones (Figura VI.63A). Además, la presencia de varias membranas en los liposomas dificultó considerablemente la segmentación de membranas, realizada con el programa Membrain-Seg, obteniendo segmentaciones subóptimas donde las membranas no se separaban correctamente afectando a la precisión en el picado de partículas posterior. Por ello, se mejoró la muestra para fomentar su unilameridad añadiendo un paso de extrusión tras la adición de detergente y antes de incorporar el D₃R. Con la muestra mejorada, se volvieron a recoger datos en dos ocasiones (65 tomogramas en total), observándose liposomas unilamelares, homogéneos y menos sensibles a la radiación (Figura VI.63B).

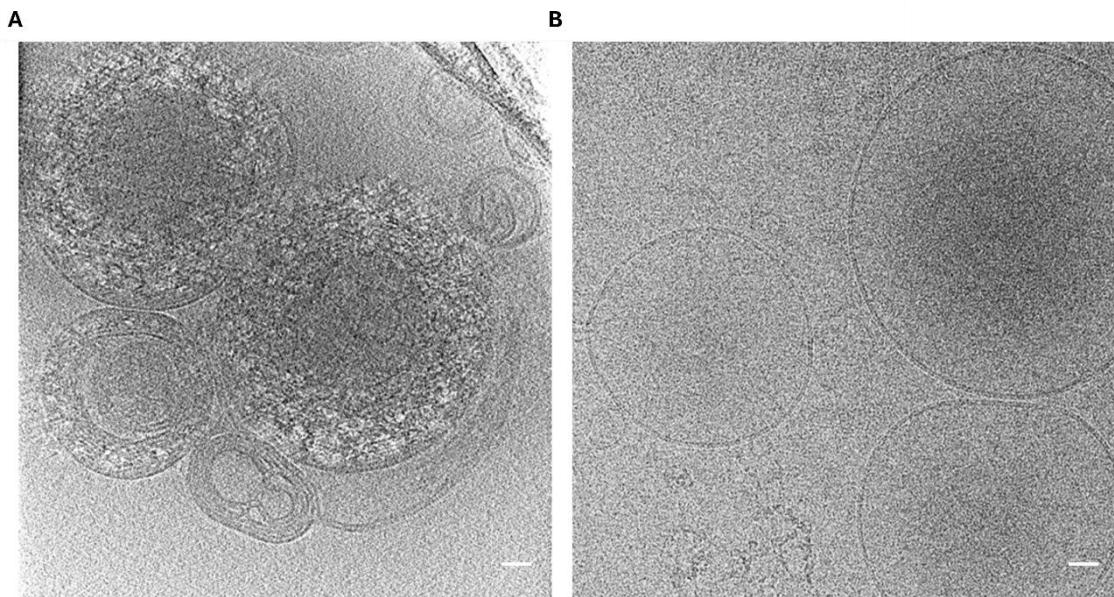


Figura VI.63. Comparación de liposomas multilamelares y unilamelares en crio-TE. A) Tomograma de liposomas multilamelares con D₃R. **B)** Tomograma de liposomas unilamelares con D₃R. Ambos presentan la misma exposición de electrones (tasa de dosis por imagen: 3,57 e⁻/Å²) y mismas condiciones de recogida. Escala:0,05 μm.

Un procesado inicial tras la primera colección de datos desveló un potencial patrón en la membrana de los proteoliposomas que podría asociarse a la presencia de proteína (Figura VI.64). Para descartar que fuese algo artefactual, se realizó una pequeña colección de datos de liposomas sin proteína, confirmando la ausencia de dicho patrón en estos liposomas. Para mejorar la visualización, se eliminó el ruido en los

Capítulo VI. OLIGOMERIZACIÓN EN D₃R

tomogramas con proteoliposomas con el programa CryoCARE¹⁷⁰ (Figura VI.64B, parte inferior derecha).

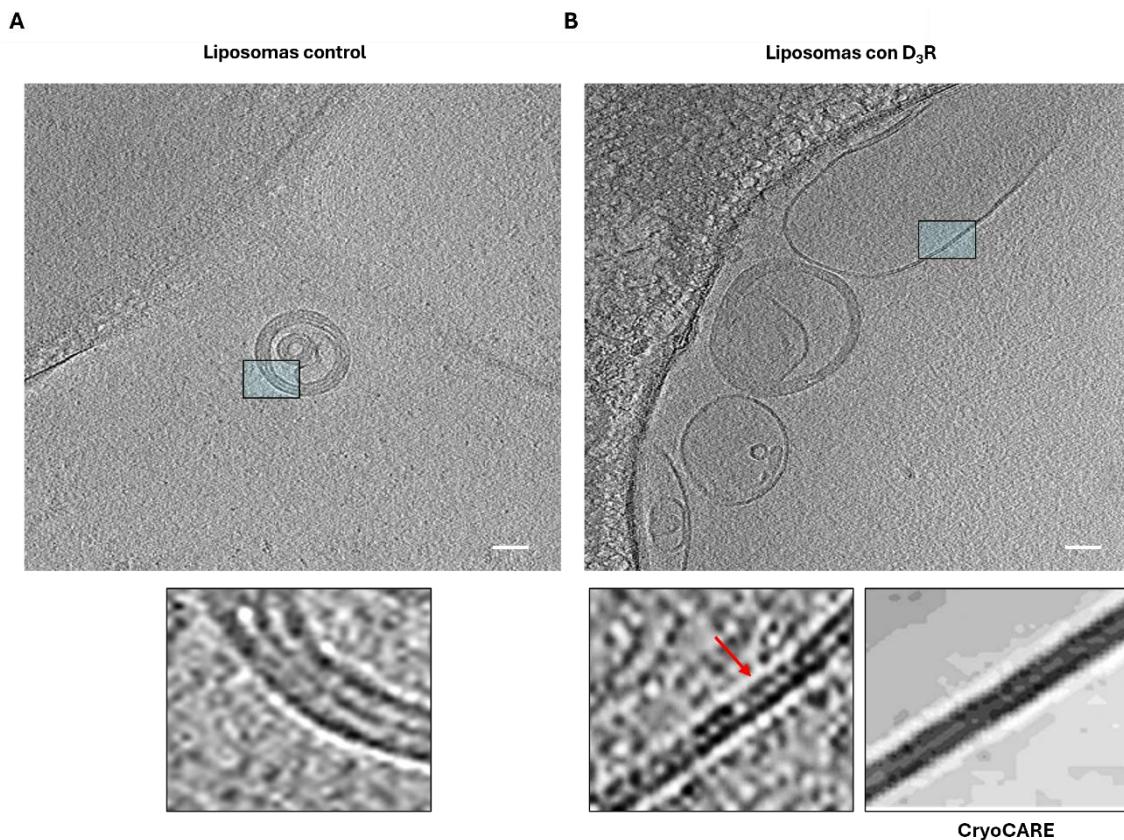


Figura VI.64. Comparación de liposomas control y liposomas con D₃R incorporado. A) Liposomas DOPC. En azul se muestra una ampliación del liposoma (parte inferior). B) Proteoliposomas de D₃R. En azul se muestra una ampliación del proteoliposoma (parte inferior). El análisis por CryoCARE (parte inferior derecha) mejora la visualización del patrón identificado en membrana. Escala: 0,05 μm.

Tras la reconstrucción de los tomogramas, se intentó aplicar IsoNet para corregir el efecto de 'cuña perdida'. Sin embargo, no se observaron cambios importantes en las imágenes. Según los propios autores, IsoNet funciona mejor en tomogramas con alto contraste, pudiendo un aumento de este mejorar la predicción¹⁷¹. A continuación, se procedió a la segmentación de membranas con MemBrain-seg, basado en la utilización de un modelo pre-entrenado para la identificación de membranas. Se probaron 3 modelos proporcionados por los propios autores y de ellos se escogió el que presentó

los mejores resultados para la segmentación de las membranas, tal y como se describe en los métodos. A continuación, se realizó un picado cubriendo la superficie entera de cada proteoliposoma. Tras la extracción de las partículas se realizó una reconstrucción 3D con todas las partículas y, utilizando el modelo reconstruido como modelo de referencia, se refinaron y volvieron a someterse a clasificación y refinado 3D, obteniendo un mapa final a baja resolución de 32.044 partículas (Figura VI.65).

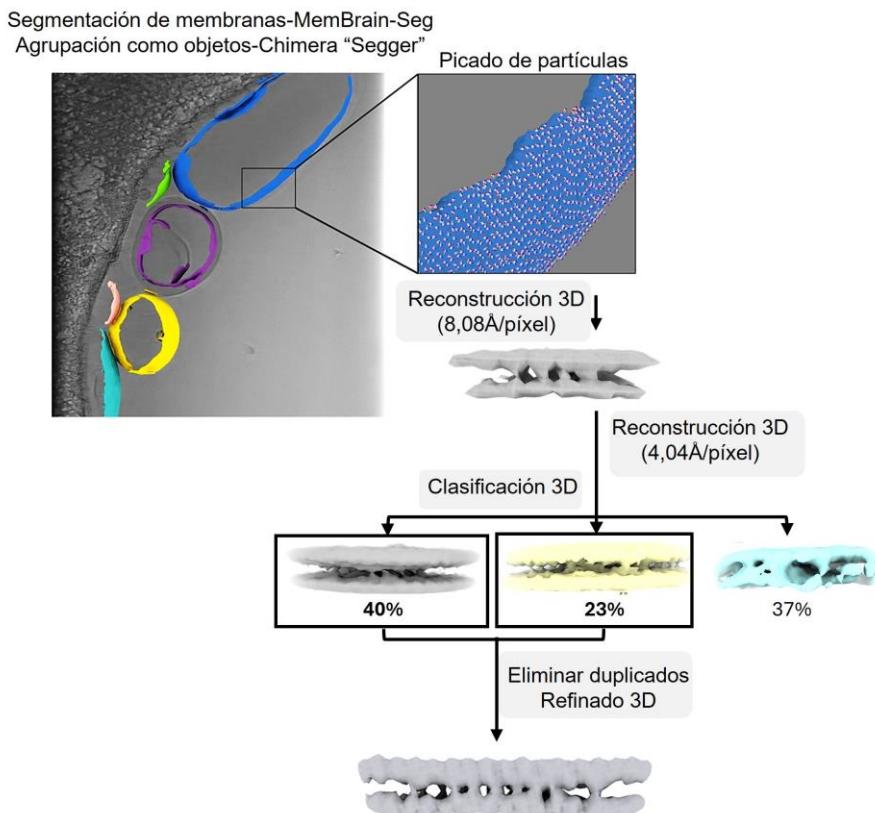


Figura VI.65. Esquema del proceso de picado, extracción y procesado de los pseudo-subtomogramas. Se muestran las membranas segmentadas en 3D superpuestas en un tomograma representativo. La ampliación muestra el picado aleatorio de partículas en membrana, visualizado con el complemento Axiart de ChimeraX. El procesado de los sub-tomogramas se realizó en RELION 5.0. Escala: 0,05 µm.

Aunque la reconstrucción 3D es ruidosa, la existencia de un cierto alineamiento en la membrana sugiere de la presencia del D₃R. Sin embargo, se necesita avanzar en el procesado, realizando más pasos de limpieza, así como obtener más partículas para poder conseguir un buen modelo, aunque sea a baja resolución.

La estancia ha permitido aprender a recoger y procesar datos de crio-TE con el uso de diferentes programas, pudiendo continuar ahora con los nuevos datos el procesado, así como la colección de más tomogramas con el fin de mejorar las reconstrucciones en nuestro laboratorio.

6.4 Discusión

Los dímeros de clase A se caracterizan por su naturaleza dinámica y transitoria, lo que dificulta considerablemente su estudio estructural. Una de las estrategias para inducir la dimerización comprende el uso de ligandos bivalentes, existiendo varios casos en los que se observa inducción de la dimerización de GPCRs a través de diferentes ensayos celulares^{279,283,285,286}. En este trabajo se ha utilizado el antagonista C13 para favorecer la dimerización de D₃R. Los resultados obtenidos en el gel de poliacrilamida nativo revelaron la potencial presencia de más de una especie de D₃R con diferente peso molecular. Sin embargo, para establecer de forma concluyente que la dimerización es dependiente de la presencia del ligando C13, sería necesario incluir un experimento control sin el ligando. Además, aunque el ligando bivalente facilita la dimerización en la membrana de los receptores parece que el entorno natural de la proteína es clave para la estabilidad de los complejos. La crio-TE emerge como una técnica prometedora para abordar esta cuestión, ya que permite visualizar directamente complejos proteicos en el entorno nativo.

En este trabajo se han empleado dos aproximaciones experimentales para la visualización de dímeros de D₃R en membrana, una en liposomas, con un entorno lipídico controlado y otra en membranas nativas de células HEK293T. En 2020, Prasanna y colaboradores describieron que el colesterol de membrana modula la población relativa de varias conformaciones de heterodímeros co-existentes del receptor de adenosina A_{2A} y D₃R siendo importante tanto la interacción directa receptor-colesterol como los efectos indirectos ocasionados en la membrana²⁸⁷. Una comparación entre las dos aproximaciones experimentales (liposomas y vesículas

Capítulo VI. OLIGOMERIZACIÓN EN D₃R

derivadas de HEK293T) podría ayudar a comprender si se puede replicar *in vitro* lo observado en las membranas plasmáticas nativas.

En este caso, los tomogramas recogidos tanto de liposomas como de GPMVs indican la necesidad de adquirir más datos y de mejorar el procesado. La literatura reciente reporta la adición de marcadores de oro coloidales como una estrategia eficaz para mejorar el alineamiento de las series de inclinación, consiguiendo una mejor resolución comparado con aquellas muestras donde no se han utilizado^{167,288}. Si bien su adición resulta tóxica para las células, su incorporación en las muestras de liposomas y GPMVs es factible, pudiendo esto mejorar el alineamiento y con ello las reconstrucciones 3D.

Otra de las grandes limitaciones que presenta la aplicación de la crio-TE en este trabajo es el pequeño tamaño del D₃R. Actualmente, el límite de tamaño de muestra para crio-TE se sitúa entre 200 y 400 kDa. Así, si bien con complejos grandes como el complejo I de la proteína COAT²⁸⁹, el complejo de poro nuclear^{290,291} o ribosomas²⁹²⁻²⁹⁴ se han alcanzado altas resoluciones, la resolución estructural de pequeñas proteínas aún constituye un desafío. En el caso de los GPMVs, se utilizó un D₃R marcado con MTH con el fin de poder identificar al receptor de entre todo el contenido de la membrana plasmática. Sin embargo, los cúmulos generados fueron demasiado pequeños. Se espera que una MTH sea capaz de generar cúmulos de 1 nm de tamaño, lo que resulta demasiado pequeño para su clara visualización. Si bien se podría realizar un picado aleatorio y “limpiar” las clases hasta observar el D₃R (sobre-expresado en membrana) también se han generado alternativamente en el laboratorio otros constructos D₂R y D₃R con dos etiquetas de MTH, con el fin de aumentar el contraste y mejorar su identificación. La recogida de datos con estas nuevas muestras podría indicar si los cúmulos alcanzan el suficiente tamaño. En este caso, estas podrían además utilizarse para su inserción en liposomas, evitando así picar toda la membrana, eliminando con ello el ruido asociado. Por otra parte, una estrategia para aumentar el tamaño del complejo podría consistir en co-expresar el D₃R con proteínas de mayor tamaño con las que se hayan definido la existencia de heterómeros a fin de facilitar la obtención de estructuras, aunque sea a baja resolución, para comprender mejor la arquitectura de estos dímeros, ver qué especies oligoméricas están disponibles en la membrana o

Capítulo VI. OLIGOMERIZACIÓN EN D₃R

cómo es la organización de los oligómeros de orden superior (organización lineal versus cíclica). Por ejemplo, para el D₂R se ha descrito la interacción con los receptores NMDA (110 kDa), más grandes y voluminosos que un GPCR^{295,296}. Otra alternativa sería la adición de los nanoanticuerpos generados frente al D₃R (capítulo 5) o la adición de proteínas Gaβγ, si bien se desconoce cómo puede afectar la unión de los nanoanticuerpos o el complejo heterotrimérico a la dimerización de los receptores.

Por otro lado, en crio-TE aplicada a células se suele hacer uso de la fluorescencia correlacionada. En este método, la proteína de interés se marca con una sonda fluorescente y la muestra vitrificada se carga en un microscopio fluorescente donde se localiza la señal de fluorescencia y seguidamente la muestra se transfiere bajo nitrógeno líquido al microscopio electrónico, guiando los datos de fluorescencia la recogida de datos²⁹⁷. Si bien esto es muy común para las muestras de lamelas obtenidas por “FIB-milling”, también podría utilizarse para los GPMVs o liposomas, donde no se espera una distribución homogénea del D₃R.

Por último, no hay que olvidar que la sobre-expresión de los receptores en sistemas heterólogos, aunque útil para estudios iniciales, puede conducir a artefactos. Así, una vez optimizada la muestra y procesado en crio-TE se requeriría de la transfección a niveles equiparables a los endógenos a fin de demostrar la existencia y relevancia funcional de los dímeros en un contexto fisiológico, eliminando las controversias en el campo. Además, sería interesante evaluar como la adición de agonistas y antagonistas modula la oligomerización y/o determinar como la oligomerización modula la eficacia y potencia de los ligandos.

6.5 Conclusiones

En base a lo presentado en este capítulo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Capítulo VI. OLIGOMERIZACIÓN EN D₃R

- i) La determinación estructural de dímeros de GPCR resulta esencial para comprender su estequiometría y función. Sin embargo, las técnicas de solubilización basadas en detergentes pueden afectar la estabilidad y la conformación nativa de estos complejos, debido a su naturaleza lábil y transitoria siendo difícil la obtención de información a alta resolución.
- ii) Se abordan nuevas estrategias para estudiar la oligomerización de D₃R empleando la crio-TE para visualizar estos complejos directamente en membrana, constando ahora de las herramientas y el conocimiento necesarios para continuar el procesado y adquisición de más tomogramas, pudiendo el grupo de investigación iniciarse en el estudio de complejos de señalización en un entorno nativo.
- iii) Se visualiza la presencia de D₃R en liposomas a través de crio-TE, obteniendo un modelo a baja resolución que revela la necesidad de optimizar el alineamiento de los tomogramas y procesado de datos para mejorar su resolución estructural.
- iv) Se necesita optimizar la preparación de GPMVs para conseguir identificar y aislar los receptores del resto del contenido de la membrana plasmática.

Capítulo VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONCLUSIONES GENERALES

Los GPCRs constituyen una relevante diana terapéutica para multitud de enfermedades siendo la principal limitación para el desarrollo de nuevos fármacos el traslado de los resultados obtenidos *in vitro* a la clínica. Ello se debe no solo a las limitaciones inherentes a los modelos animales, también a i) la falta de herramientas selectivas que actúen exclusivamente sobre el receptor y la ruta que se desea explorar⁷⁸, siendo difícil asociar la activación de vías a perfiles fisiológicos (o terapéuticos), ii) el escaso conocimiento de la complejidad celular y iii) la falta de modelos celulares y ensayos representativos.

En esta tesis doctoral se utiliza **la determinación estructural de complejos unidos a fármacos como estrategia para el desarrollo racional de fármacos mejorados**. Se muestra la determinación estructural de dos complejos activos de D₃R unidos a dos ligandos, identificando nuevas regiones clave para la selectividad del receptor (capítulo 3) y las bases del sesgo hacia la activación de proteínas G, en este caso a través de una disminución en el reclutamiento de β-arrestina (capítulo 4). El diseño de nuevos ligandos basados en estas estructuras puede dar lugar a moléculas mejoradas, permitiendo su uso ya sea como fármaco o como herramienta para el estudio funcional del receptor. De hecho, resultados preliminares de este trabajo muestran una mayor selectividad para D₃R de compuestos diseñados racionalmente a partir de la estructura de D₃R unida a una molécula bitópica selectiva (capítulo 3), validando el diseño racional de ligandos selectivos basado en esta estructura. Además, en el caso de ligandos bitópicos, la determinación estructural es especialmente relevante pudiendo existir diversas conformaciones de ligando que pueden contribuir de manera diferencial a la respuesta celular.

Por otra parte, en esta tesis doctoral **se han desarrollado y caracterizado nanoanticuerpos dirigidos a D₃R que pueden ser utilizados para el estudio funcional básico del receptor**. Estos nanoanticuerpos (capítulo 5) pueden ser utilizados como herramientas para el estudio funcional (como biosensores o moduladores de la actividad del receptor en ensayos celulares) y estructural del receptor permitiendo el diseño racional de fármacos antagonistas o agonistas parciales mejorados a través de

Capítulo VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONCLUSIONES GENERALES

la determinación estructural de receptores unidos a este tipo de moléculas al aumentar el tamaño de los receptores. Además, también pueden utilizarse como marcadores, por ejemplo, para el estudio de la oligomerización de D₃R en crio-TE, permitiendo la identificación de oligómeros de D₃R en membrana, actuando como herramientas versátiles que permiten un estudio detallado del receptor.

Sin embargo, a pesar de los avances en la comprensión de la estructura y función de GPCRs, el desarrollo de fármacos con alta eficacia en la clínica sigue siendo un desafío debido a i) la complejidad de la señalización celular y ii) las limitaciones de los diseños experimentales, donde las condiciones del ensayo también influyen en la respuesta observada dificultando la obtención de resultados consistentes y reproducibles entre laboratorios.

i) Complejidad de la señalización celular. Existen otros aspectos como el contexto celular, la cinética de unión del ligando y proteínas transductoras, la distribución subcelular del receptor o la movilidad del receptor dentro de la membrana plasmática que influyen en la respuesta del receptor²¹. El D₃R se expresa principalmente en neuronas, células altamente polarizadas donde la distribución de moléculas señalizadoras difieren entre el axón y las dendritas siendo el D₃R un receptor pre- y post-sináptico, lo que sugiere que puede desempeñar funciones distintas según su localización. Además, es probable que la densidad de receptores en las sinapsis sea diferente a la presente en otras regiones, lo que puede influir por ejemplo en la formación de oligómeros. Además, para el D₃R se describe que el agonista induce a D₃R a sufrir una desensibilización seguida de un secuestro farmacológico, donde se da el secuestro de los receptores de la superficie celular en una fracción más hidrófoba dentro de la membrana plasmática dejando al receptor en un estado inactivo en la membrana²⁰⁵. También se ha descrito que las proteínas G pueden presentar diferentes cinéticas en la liberación de GDP por GTP durante la activación, lo que depende del tipo de proteína G, de su localización y el receptor (que actúa como un factor intercambiador de nucléotidos de guanina), habiéndose reportado un caso extremo de acoplamiento no productivo de proteína G al receptor, no observándose disociación del trímero²⁹⁸.

Capítulo VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONCLUSIONES GENERALES

ii) Limitaciones de modelos celulares y ensayos. Además de la complejidad inherente a la señalización celular, uno de los grandes problemas que subyacen a la falta de transferibilidad de los fármacos obtenidos *in vitro* a la clínica deriva de las limitaciones de los modelos experimentales actuales. Por ejemplo, para el estudio de D₃R se suelen utilizar modelos celulares fáciles de transfectar donde se sobre-expresa el receptor dificultando la abundancia de D₂R en el tejido nativo y la escasez de herramientas selectivas el estudio de D₃R en modelos fisiológicos más complejos. Recientemente se han desarrollado ensayos como la plataforma ONE-GO que permite el estudio de la activación GPCR midiendo el nivel de Ga-GTP en células (como un evento más próximo a la activación del receptor que la disociación de Ga y Gβγ observada en TRUPATH) y con la capacidad de monitorear la actividad GPCR endógena en una amplia gama de sistemas fisiológicamente relevantes (por ejemplo, diferentes tipos de células primarias como neuronas)²⁹⁹.

Por otro lado, el aspecto cinético se subestima generalmente en la investigación de los GPCRs, desarrollándose los experimentos en condiciones de equilibrio cinético. Sin embargo, la tasa de asociación y disociación de un ligando, así como el tiempo de residencia del ligando en el sitio de unión, pueden influir significativamente en la selectividad hacia un receptor y el perfil de señalización de un compuesto. Por ejemplo, un estudio previo reportó que el fármaco tiotropio se disocia más fácilmente del OBS del receptor muscarínico M₂ que del M₃ debido a una mayor movilidad del ECL2 en el receptor muscarínico M₂³⁰⁰, explicando la cinética la selectividad para el receptor M₃ observada para este fármaco, donde la afinidad de unión para ambos receptores en equilibrio es similar. Por otro lado, un estudio en células CHO transfectadas con D₂R ha demostrado que el grado de sesgo de señalización del aripiprazol y el bifeprunox puede variar con el tiempo y que ello está relacionado con diferentes tiempos de residencia de los ligandos en el receptor³⁷.

El diseño experimental también puede ser clave para la detección y caracterización de oligómeros de GPCRs, donde la presencia de la membrana puede ser determinante para la estabilidad de estas especies. Si bien existe en la literatura evidencia experimental de la existencia de algunos dímeros (demostrados por diferentes

Capítulo VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONCLUSIONES GENERALES

técnicas), se desconocen los detalles acerca de su estequiometría, mecanismos alostéricos o su relevancia fisiológica. En esta tesis doctoral **se introduce el uso en el grupo de investigación de la crio-TE como estrategia para identificar inequívocamente la existencia y relevancia fisiológica de oligómeros en GPCRs.** La crio-TE, al permitir la visualización de proteínas en un contexto celular nativo, se presenta como una técnica idónea para determinar sin ambigüedades y de manera inequívoca la estructura de los dímeros de GPCRs. Aunque existen limitaciones actuales en cuanto al tamaño de estos receptores, el continuo desarrollo de la técnica, junto con el empleo de estrategias como la utilización de nanoanticuerpos para aumentar el tamaño de los complejos, permitirán superar estos desafíos y obtener información estructural de alta resolución de oligómeros de GPCRs *in situ*. Recientemente, un estudio empleó la crio-TE para visualizar directamente la arquitectura tridimensional y la organización supramolecular de los componentes post-sinápticos en sinaptosomas de hipocampo de rata revelando la presencia de “clusters” en la densidad post-sináptica^{301,302}. Sin embargo, aunque intentaron procesar los subtomogramas de los sinaptosomas, no fueron capaces de resolver la estructura de los componentes debido a la heterogeneidad de las partículas presentes. La existencia de estos “clusters” muestra un nivel superior de organización por el que los GPCRs pueden formar estructuras compuestas no sólo por homo- o heterodímeros, sino por complejos supramoleculares formados por varios receptores y una variedad de proteínas que modifican la actividad del receptor, redistribuyéndose en la membrana y pudiendo ser regulados por otros receptores del “cluster” u otras moléculas³⁰³. El uso de biomarcadores moleculares específicos (por ejemplo, con nanoanticuerpos o a través del marcaje con varias MTHs) podrían ayudar a caracterizar los “clusters”, permitiendo determinar su composición molecular y su papel en los procesos de señalización sináptica, permitiendo así el estudio de los receptores en su contexto nativo, lo que sin duda facilitará la transferencia de compuestos a la clínica.

En definitiva, la señalización mediada por GPCRs es un proceso dinámico y complejo, modulado por múltiples factores presentando así diferentes niveles de organización y complejidad. Comprender los mecanismos moleculares que subyacen a su activación y cómo factores como el agonismo sesgado y la oligomerización influyen en ella es

Capítulo VII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONCLUSIONES GENERALES

fundamental no solo para comprender la fisiología de esta importante familia de receptores sino también para el desarrollo de nuevas terapias. Para ello se requiere de un enfoque multidisciplinario que combine biología estructural con ensayos funcionales que permitan el estudio de la farmacología de los receptores, incluyendo la evaluación cinética y estableciendo condiciones experimentales que se asemejen lo más posible a las fisiológicas.

Capítulo VIII. REFERENCIAS

Capítulo VIII. REFERENCIAS

1. Alhosaini, K., Azhar, A., Alonazi, A. & Al-Zoghaibi, F. GPCRs: The most promiscuous druggable receptor of the mankind. *Saudi Pharm. J.* **29**, 539–551 (2021).
2. Hauser, A. S. *et al.* GPCR activation mechanisms across classes and macro/microscales. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **28**, 879 (2021).
3. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
4. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **459**, (2009).
5. Palczewski, K. *et al.* Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**, 739–745 (2000).
6. Scheerer, P. *et al.* Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**, 497–502 (2008).
7. Weis, W. I. & Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 897–919 (2018).
8. Zhang, M. *et al.* G protein-coupled receptors (GPCRs): advances in structures, mechanisms and drug discovery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **9**, 88 (2024).
9. Zhou, Q. *et al.* Common activation mechanism of class A GPCRs. *eLife* **8**, e50279 (2019).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

10. Ballesteros, J. A. & Weinstein, H. [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. in *Methods in Neurosciences* vol. 25 366–428 (Elsevier, 1995).
11. Berg, K. A. & Clarke, W. P. Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **21**, 962–977 (2018).
12. Concepts and Principles of Pharmacology: 100 Years of the Handbook of Experimental Pharmacology. vol. 260 (Springer International Publishing, Cham, 2019).
13. Heydenreich, F. M. et al. Molecular determinants of ligand efficacy and potency in GPCR signaling. *Science* **382**, eadh1859 (2023).
14. De Lean, A., Stadel, J. M. & Lefkowitz, R. J. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **255**, 7108–7117 (1980).
15. Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117–127 (1991).
16. Kee, T. R. et al. The multifaceted functions of β-arrestins and their therapeutic potential in neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* **56**, 129–141 (2024).
17. Masuho, I. et al. Rules and mechanisms governing G protein coupling selectivity of GPCRs. *Cell Rep.* **42**, 113173 (2023).
18. Hermans, E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **99**, 25–44 (2003).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

19. Carrión-Antolí, Á., Mallor-Franco, J., Arroyo-Urea, S. & García-Nafría, J. Structural insights into promiscuous GPCR-G protein coupling. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 195 137–152 (Elsevier, 2023).
20. Milligan, G. & Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **147**, (2006).
21. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M. & Sexton, P. M. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 638–653 (2018).
22. Shukla, A. K., Xiao, K. & Lefkowitz, R. J. Emerging paradigms of β-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 457–469 (2011).
23. Ranjan, R., Dwivedi, H., Baidya, M., Kumar, M. & Shukla, A. K. Novel Structural Insights into GPCR–β-Arrestin Interaction and Signaling. *Trends Cell Biol.* **27**, 851–862 (2017).
24. Penela, P., Ribas, C., Sánchez-Madrid, F. & Mayor, F. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a multifunctional signaling hub. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 4423–4446 (2019).
25. Murga, C. et al. G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) as a Potential Therapeutic Target in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front. Pharmacol.* **10**, 112 (2019).
26. Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W. & Kenakin, T. P. The Cubic Ternary Complex Receptor–Occupancy Model I. Model Description. *J. Theor. Biol.* **178**, 151–167 (1996).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

27. Jakubík, J. & El-Fakahany, E. E. Allosteric Modulation of GPCRs of Class A by Cholesterol. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1953 (2021).
28. Mohammad Nezhady, M. A., Rivera, J. C. & Chemtob, S. Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. *iScience* **23**, 101643 (2020).
29. Hay, D. L., Poyner, D. R. & Sexton, P. M. GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol. Ther.* **109**, 173–197 (2006).
30. Piirainen, H. et al. Human Adenosine A2A Receptor Binds Calmodulin with High Affinity in a Calcium-Dependent Manner. *Biophys. J.* **108**, 903–917 (2015).
31. Pandalaneni, S. et al. Neuronal Calcium Sensor-1 Binds the D2 Dopamine Receptor and G-protein-coupled Receptor Kinase 1 (GRK1) Peptides Using Different Modes of Interactions. *J. Biol. Chem.* **290**, 18744–18756 (2015).
32. Ellis, C. The Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants.. The state of GPCR research in 2004. (2004).
33. Kenakin, T. Biased agonism. *F1000 Biol. Rep.* **1**, (2009).
34. Gomes, I. et al. Biased signaling by endogenous opioid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 11820–11828 (2020).
35. Thompson, G. L. et al. Biased Agonism of Endogenous Opioid Peptides at the μ -Opioid Receptor. *Mol. Pharmacol.* **88**, 335–346 (2015).
36. Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L. & Saini, D. K. ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 338 79–109 (Elsevier, 2018).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

37. Klein Herenbrink, C. et al. The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nat. Commun.* **7**, 10842 (2016).
38. Zhang, X. C., Liu, J. & Jiang, D. Why is dimerization essential for class-C GPCR function? New insights from mGluR1 crystal structure analysis. *Protein Cell* **5**, 492–495 (2014).
39. Park, P. S.-H., Filipek, S., Wells, J. W. & Palczewski, K. Oligomerization of G Protein-Coupled Receptors: Past, Present, and Future. *Biochemistry* **43**, 15643–15656 (2004).
40. Ferre, S., Von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B. & Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 7238–7241 (1991).
41. Jarrahian, A., Watts, V. J. & Barker, E. L. D₂ Dopamine Receptors Modulate Ga-Subunit Coupling of the CB₁ Cannabinoid Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 880–886 (2004).
42. Ferrada, C. et al. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D₁ and histamine H₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 64–75 (2009).
43. Liu, J. et al. Biased signaling due to oligomerization of the G protein-coupled platelet-activating factor receptor. *Nat. Commun.* **13**, 6365 (2022).
44. Brock, C., Boudier, L., Maurel, D., Blahos, J. & Pin, J.-P. Assembly-dependent Surface Targeting of the Heterodimeric GABA_B Receptor Is Controlled by COPI but Not 14-3-3. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5572–5578 (2005).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

45. Van Craenenbroeck, K. et al. Dopamine D₄ receptor oligomerization – contribution to receptor biogenesis. *FEBS J.* **278**, 1333–1344 (2011).
46. Hague, C., Uberti, M. A., Chen, Z., Hall, R. A. & Minneman, K. P. Cell Surface Expression of α1D-Adrenergic Receptors Is Controlled by Heterodimerization with α1B-Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 15541–15549 (2004).
47. Parmar, V. K., Grinde, E., Mazurkiewicz, J. E. & Herrick-Davis, K. Beta2-adrenergic receptor homodimers: Role of transmembrane domain 1 and helix 8 in dimerization and cell surface expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1859**, 1445–1455 (2017).
48. Salahpour, A. et al. Homodimerization of the β2-Adrenergic Receptor as a Prerequisite for Cell Surface Targeting. *J. Biol. Chem.* **279**, 33390–33397 (2004).
49. Lambert, N. A. GPCR Dimers Fall Apart. *Sci. Signal.* **3**, (2010).
50. Pin, J.-P. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the Recognition and Nomenclature of G Protein-Coupled Receptor Heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* **59**, 5–13 (2007).
51. Stenkamp, R. E. Identifying G protein-coupled receptor dimers from crystal packings. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **74**, 655–670 (2018).
52. Zhao, D. Y. et al. Cryo-EM structure of the native rhodopsin dimer in nanodiscs. *J. Biol. Chem.* **294**, 14215–14230 (2019).
53. Yue, Y. et al. Structural insight into apelin receptor-G protein stoichiometry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29**, 688–697 (2022).
54. Velazhahan, V. et al. Structure of the class D GPCR Ste2 dimer coupled to two G proteins. *Nature* **589**, 148–153 (2021).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

55. Saotome, K. et al. Structural insights into CXCR4 modulation and oligomerization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2024) doi:10.1038/s41594-024-01397-1.
56. Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 829–842 (2017).
57. Sriram, K. & Insel, P. A. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol. Pharmacol.* **93**, 251–258 (2018).
58. Santos, R. et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 19–34 (2017).
59. Yang, D. et al. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 7 (2021).
60. Cornil, C. A., Balthazart, J., Motte, P., Massotte, L. & Seutin, V. Dopamine Activates Noradrenergic Receptors in the Preoptic Area. *J. Neurosci.* **22**, 9320–9330 (2002).
61. Lanau, F., Zenner, M.-T., Civelli, O. & Hartman, D. S. Epinephrine and Norepinephrine Act as Potent Agonists at the Recombinant Human Dopamine D4 Receptor. *J. Neurochem.* **68**, 804–812 (1997).
62. Myslivecek, J. Dopamine and Dopamine-Related Ligands Can Bind Not Only to Dopamine Receptors. *Life* **12**, 606 (2022).
63. Newman-Tancredi, A., Audinot-Bouchez, V., Gobert, A. & Millan, M. J. Noradrenaline and adrenaline are high affinity agonists at dopamine D4 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **319**, 379–383 (1997).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

64. Michino, M. *et al.* What Can Crystal Structures of Aminergic Receptors Tell Us about Designing Subtype-Selective Ligands? *Pharmacol. Rev.* **67**, 198–213 (2015).
65. Khasawneh, F. T. & Shankar, G. S. Minimizing Cardiovascular Adverse Effects of Atypical Antipsychotic Drugs in Patients with Schizophrenia. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 1–8 (2014).
66. Johnson, C. R., Kangas, B. D., Jutkiewicz, E. M., Bergman, J. & Coop, A. Drug Design Targeting the Muscarinic Receptors and the Implications in Central Nervous System Disorders. *Biomedicines* **10**, 398 (2022).
67. Roth, B. L., Sheffler, D. J. & Kroeze, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 353–359 (2004).
68. Wingler, L. M. *et al.* Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR. *Science* **367**, 888–892 (2020).
69. Yadav, M. K. *et al.* Structure-guided engineering of biased-agonism in the human niacin receptor via single amino acid substitution. *Nat. Commun.* **15**, 1939 (2024).
70. DeWire, S. M. *et al.* A G Protein-Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor Is Potently Analgesic with Reduced Gastrointestinal and Respiratory Dysfunction Compared with Morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344**, 708–717 (2013).
71. Manglik, A. *et al.* Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* **537**, 185–190 (2016).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

72. Gillis, A. et al. Critical Assessment of G Protein-Biased Agonism at the μ -Opioid Receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **41**, 947–959 (2020).
73. Kolb, P. et al. Community guidelines for GPCR ligand bias: IUPHAR review 32. *Br. J. Pharmacol.* **179**, 3651–3674 (2022).
74. El Daibani, A. et al. Molecular mechanism of biased signaling at the kappa opioid receptor. *Nat. Commun.* **14**, 1338 (2023).
75. Wang, M. et al. Schizophrenia, amphetamine-induced sensitized state and acute amphetamine exposure all show a common alteration: increased dopamine D2 receptor dimerization. *Mol. Brain* **3**, 25 (2010).
76. Gomes, I. et al. Identification of a μ - δ opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 12072–12077 (2013).
77. Beaulieu, J.-M., Espinoza, S. & Gainetdinov, R. R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 1–23 (2015).
78. Beaulieu, J.-M. & Gainetdinov, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **63**, 182–217 (2011).
79. Medvedev, I. O. et al. D₁ Dopamine Receptor Coupling to PLC β Regulates Forward Locomotion in Mice. *J. Neurosci.* **33**, 18125–18133 (2013).
80. Kisilevsky, A. E. & Zamponi, G. W. D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels* **2**, 269–277 (2008).
81. Hazelwood, L. A., Free, R. B., Cabrera, D. M., Skinbjerg, M. & Sibley, D. R. Reciprocal Modulation of Function between the D1 and D2 Dopamine Receptors and the Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **283**, 36441–36453 (2008).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

82. Mannoury La Cour, C., Salles, M.-J., Pasteau, V. & Millan, M. J. Signaling Pathways Leading to Phosphorylation of Akt and GSK-3 β by Activation of Cloned Human and Rat Cerebral D₂ and D₃ Receptors. *Mol. Pharmacol.* **79**, 91–105 (2011).
83. Chi, S. S., Vetiska, S. M., Gill, R. S., Hsiung, M. S. & Liu, F. Transactivation of PDGFRb by dopamine D4 receptor does not require PDGFRb dimerization. *Mol. Brain* 3:22 (2010).
84. Iwakura, Y. et al. Dopamine-dependent ectodomain shedding and release of epidermal growth factor in developing striatum: target-derived neurotrophic signaling (Part 2). *J. Neurochem.* **118**, 57–68 (2011).
85. Dopamine receptor signaling in the forebrain. *Neurology* <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.0000000000000719>.
86. Guo, W. et al. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* **27**, 2293–2304 (2008).
87. Perreault, M. L., Hasbi, A., O'Dowd, B. F. & George, S. R. Heteromeric Dopamine Receptor Signaling Complexes: Emerging Neurobiology and Disease Relevance. *Neuropsychopharmacology* **39**, 156–168 (2014).
88. Lee, S. P. et al. Dopamine D1 and D2 Receptor Co-activation Generates a Novel Phospholipase C-mediated Calcium Signal. *J. Biol. Chem.* **279**, 35671–35678 (2004).
89. So, C. H. et al. D1 and D2 Dopamine Receptors Form Heterooligomers and Cointernalize after Selective Activation of Either Receptor. *Mol. Pharmacol.* **68**, 568–578 (2005).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

90. Hasbi, A. et al. Calcium signaling cascade links dopamine D1–D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 21377–21382 (2009).
91. Frederick, A. L. et al. Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Mol. Psychiatry* **20**, 1373–1385 (2015).
92. Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.-P., Bouthenet, M.-L. & Schwartz, J.-C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146–151 (1990).
93. Elmhurst, J. L., Xie, Z., O'Dowd, B. F. & George, S. R. The splice variant D3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization. *Mol. Brain Res.* **80**, 63–74 (2000).
94. Karpa, K. D., Lin, R., Kabbani, N. & Levenson, R. The Dopamine D3 Receptor Interacts with Itself and the Truncated D3 Splice Variant D3nf: D3-D3nf Interaction Causes Mislocalization of D3 Receptors. *Mol. Pharmacol.* **58**, 677–683 (2000).
95. Chien, E. Y. T. et al. Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist. *Science* **330**, 1091–1095 (2010).
96. Prieto, G. A. Abnormalities of Dopamine D3 Receptor Signaling in the Diseased Brain. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* **9**, 1179573517726335 (2017).
97. Moritz, A. E., Free, R. B. & Sibley, D. R. Advances and challenges in the search for D2 and D3 dopamine receptor-selective compounds. *Cell. Signal.* **41**, 75–81 (2018).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

98. Cho, D. I., Zheng, M. & Kim, K.-M. Current perspectives on the selective regulation of dopamine D2 and D3 receptors. *Arch. Pharm. Res.* **33**, 1521–1538 (2010).
99. Gurevich, E. Distribution of Dopamine D3 Receptor Expressing Neurons in the Human Forebrain Comparison with D2 Receptor Expressing Neurons. *Neuropsychopharmacology* **20**, 60–80 (1999).
100. Lane, J. R., Powney, B., Wise, A., Rees, S. & Milligan, G. G Protein Coupling and Ligand Selectivity of the D_{2L} and D₃ Dopamine Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 319–330 (2008).
101. Kim, K.-M. Unveiling the Differences in Signaling and Regulatory Mechanisms between Dopamine D2 and D3 Receptors and Their Impact on Behavioral Sensitization. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6742 (2023).
102. Galaj, E., Newman, A. H. & Xi, Z.-X. Dopamine D3 receptor-based medication development for the treatment of opioid use disorder: Rationale, progress, and challenges. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **114**, 38–52 (2020).
103. Leriche, L. et al. The Dopamine D3 Receptor: A Therapeutic Target for the Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **5**, 25–43 (2006).
104. Yang, P., Perlmutter, J. S., Benzinger, T. L. S., Morris, J. C. & Xu, J. Dopamine D3 receptor: a neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? (2021).
105. Leggio, G. M., Bucolo, C., Platania, C. B. M., Salomone, S. & Drago, F. Current drug treatments targeting dopamine D3 receptor. *Pharmacol. Ther.* **165**, 164–177 (2016).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

106. Bello, F., Giannella, M., Giorgioni, G., Piergentili, A. & Quaglia, W. Receptor Ligands as Helping Hands to L-DOPA in the Treatment of Parkinson's Disease. *Biomolecules* **9**, 142 (2019).
107. Xu, P. et al. Structures of the human dopamine D3 receptor-Gi complexes. *Mol. Cell* **81**, 1147-1159.e4 (2021).
108. García-Nafría, J., Watson, J. F. & Greger, I. H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Sci. Rep.* **6**, 27459 (2016).
109. Watson, J. F. & García-Nafría, J. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. *J. Biol. Chem.* **294**, 15271–15281 (2019).
110. *Handbook of Molecular Biotechnology*. (CRC Press, Boca Raton London New York, 2024).
111. Arroyo-Urea, S., Watson, J. F. & García-Nafría, J. Molecular Cloning Using In Vivo DNA Assembly. in *DNA Manipulation and Analysis* (ed. Scarlett, G.) vol. 2633 33–44 (Springer US, New York, NY, 2023).
112. Liang, Y.-L. et al. Dominant Negative G Proteins Enhance Formation and Purification of Agonist-GPCR-G Protein Complexes for Structure Determination. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **1**, 12–20 (2018).
113. Maeda, S. et al. Development of an antibody fragment that stabilizes GPCR/G-protein complexes. *Nat. Commun.* **9**, 3712 (2018).
114. Muntz, K. H., Sternweis, P. C., Gilman, A. G. & Mumby, S. M. Influence of gamma subunit prenylation on association of guanine nucleotide-binding regulatory proteins with membranes. *Mol. Biol. Cell* **3**, 49–61 (1992).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

115. Bouchet-Marquis, C., Pagratis, M., Kirmse, R. & Hoenger, A. Metallothionein as a clonable high-density marker for cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **177**, 119–127 (2012).
116. Kikkawa, M. & Yanagisawa, H. Identifying proteins in the cell by tagging techniques for cryo-electron microscopy. *Microscopy* **71**, i60–i65 (2022).
117. Fernández De Castro, I., Sanz-Sánchez, L. & Risco, C. Metallothioneins for Correlative Light and Electron Microscopy. in *Methods in Cell Biology* vol. 124 55–70 (Elsevier, 2014).
118. Saarenpää, T., Jaakola, V.-P. & Goldman, A. Baculovirus-mediated expression of GPCRs in insect cells. *Methods Enzymol.* **556**, 185–218 (2015).
119. Rohrmann, G. F. *Baculovirus Molecular Biology*. (National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2019).
120. Talsania, K. et al. Genome Assembly and Annotation of the *Trichoplusia ni* TNi-FNL Insect Cell Line Enabled by Long-Read Technologies. *Genes* **10**, 79 (2019).
121. Ratkeviciute, G., Cooper, B. F. & Knowles, T. J. Methods for the solubilisation of membrane proteins: the micelle-aneous world of membrane protein solubilisation. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 1763–1777 (2021).
122. Zhang, H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. in *Liposomes* (ed. D’Souza, G. G. M.) vol. 1522 17–22 (Springer New York, New York, NY, 2017).
123. Doherty, W., Benson, S., Pepdjonovic, L., Koppes, A. N. & Koppes, R. A. Cell Line and Media Composition Influence the Production of Giant Plasma Membrane Vesicles. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **10**, 1880–1891 (2024).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

124. Levental, K. R. & Levental, I. Giant Plasma Membrane Vesicles: Models for Understanding Membrane Organization. in *Current Topics in Membranes* vol. 75 25–57 (Elsevier, 2015).
125. Sezgin, E. et al. Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles. *Nat. Protoc.* **7**, 1042–1051 (2012).
126. Del Piccolo, N., Placone, J., He, L., Agudelo, S. C. & Hristova, K. Production of plasma membrane vesicles with chloride salts and their utility as a cell membrane mimetic for biophysical characterization of membrane protein interactions. *Anal. Chem.* **84**, 8650–8655 (2012).
127. Risco, C. et al. Specific, sensitive, high-resolution detection of protein molecules in eukaryotic cells using metal-tagging transmission electron microscopy. *Struct. Engng.* **1993** **20**, 759–766 (2012).
128. Pardon, E. et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* **9**, 674–693 (2014).
129. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
130. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J. & Petering, D. H. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metalomics* **6**, 1068–1078 (2014).
131. Dubochet, J., Adrian, M., Lepault, J. & McDowall, A. W. Emerging techniques: Cryo-electron microscopy of vitrified biological specimens. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 143–146 (1985).
132. Henderson, R. et al. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899–929 (1990).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

133. Fernandez-Leiro, R. & Scheres, S. H. W. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature* **537**, 339–346 (2016).
134. Carroni, M. & Saibil, H. R. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods* **95**, 78–85 (2016).
135. Schröder, R. R., Hofmann, W. & Ménétret, J.-F. Zero-loss energy filtering as improved imaging mode in cryoelectronmicroscopy of frozen-hydrated specimens. *J. Struct. Biol.* **105**, 28–34 (1990).
136. McMullan, G., Chen, S., Henderson, R. & Faruqi, A. R. Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy. *Ultramicroscopy* **109**, 1126–1143 (2009).
137. Zheng, S. Q. *et al.* MotionCor2 - anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* **14**, 331–332 (2017).
138. Grant, T. & Grigorieff, N. Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6. *eLife* **4**, e06980 (2015).
139. Rohou, A. & Grigorieff, N. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. (2019).
140. Sigworth, F. J. Principles of cryo-EM single-particle image processing. *Microscopy* **65**, 57–67 (2016).
141. Bepler, T. *et al.* Positive-unlabeled convolutional neural networks for particle picking in cryo-electron micrographs. *Nat. Methods* **16**, 1153–1160 (2019).
142. Fernandez-Leiro, R. & Scheres, S. H. W. A pipeline approach to single-particle processing in RELION. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **73**, 496–502 (2017).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

143. Rosenthal, P. B. & Henderson, R. Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **333**, 721–745 (2003).
144. Rasmussen, S. G. F. et al. Crystal structure of the human β 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007).
145. Liang, Y.-L. et al. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR–G-protein complex. *Nature* **546**, 118–123 (2017).
146. García-Nafría, J. & Tate, C. G. Structure determination of GPCRs: cryo-EM compared with X-ray crystallography. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 2345–2355 (2021).
147. Kühlbrandt, W. The Resolution Revolution. *Science* **343**, 1443–1444 (2014).
148. Robertson, M. J. et al. Structure determination of inactive-state GPCRs with a universal nanobody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29**, 1188–1195 (2022).
149. Nehmé, R. et al. Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation. *PLOS ONE* **12**, e0175642 (2017).
150. Liu, N. & Wang, H.-W. Better Cryo-EM Specimen Preparation: How to Deal with the Air–Water Interface? *J. Mol. Biol.* **435**, 167926 (2023).
151. Naydenova, K. & Russo, C. J. Measuring the effects of particle orientation to improve the efficiency of electron cryomicroscopy. *Nat. Commun.* **8**, 629 (2017).
152. Kimanis, D., Dong, L., Sharov, G., Nakane, T. & Scheres, S. H. W. New tools for automated cryo-EM single-particle analysis in RELION-4.0. *Biochem. J.* **478**, 4169–4185 (2021).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

153. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* **14**, 290–296 (2017).
154. Burnley, T., Palmer, C. M. & Winn, M. Recent developments in the CCP-EM software suite. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **73**, 469–477 (2017).
155. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
156. Yuan, D. et al. Activation of the α 2B adrenoceptor by the sedative sympatholytic dexmedetomidine. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 507–512 (2020).
157. Murshudov, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
158. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
159. Long, F. et al. AceDRG: a stereochemical description generator for ligands. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **73**, 112–122 (2017).
160. Barad, B. A. et al. EMRinger: Side-chain-directed model and map validation for 3D Electron Cryomicroscopy. *Nat. Methods* **12**, 943–946 (2015).
161. Chen, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
162. Hong, Y., Song, Y., Zhang, Z. & Li, S. Cryo-Electron Tomography: The Resolution Revolution and a Surge of In Situ Virological Discoveries. *Annu. Rev. Biophys.* **52**, 339–360 (2023).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

163. Hutchings, J. & Zanetti, G. Fine details in complex environments: the power of cryo-electron tomography. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 807–816 (2018).
164. Berger, C. et al. Cryo-electron tomography on focused ion beam lamellae transforms structural cell biology. *Nat. Methods* **20**, 499–511 (2023).
165. Winkler, H. & Taylor, K. A. Focus gradient correction applied to tilt series image data used in electron tomography. *J. Struct. Biol.* **143**, 24–32 (2003).
166. Zanetti, G., Riches, J. D., Fuller, S. D. & Briggs, J. A. G. Contrast transfer function correction applied to cryo-electron tomography and sub-tomogram averaging. *J. Struct. Biol.* **168**, 305–312 (2009).
167. Amat, F. et al. Markov random field based automatic image alignment for electron tomography. *J. Struct. Biol.* **161**, 260–275 (2008).
168. Liu, Y., Penczek, P. A., McEwen, B. F. & Frank, J. A marker-free alignment method for electron tomography. *Ultramicroscopy* **58**, 393–402 (1995).
169. Zheng, S. et al. AreTomo: An integrated software package for automated marker-free, motion-corrected cryo-electron tomographic alignment and reconstruction. *J. Struct. Biol. X* **6**, 100068 (2022).
170. Buchholz, T.-O. et al. Content-aware image restoration for electron microscopy. in *Methods in Cell Biology* vol. 152 277–289 (Elsevier, 2019).
171. Liu, Y.-T. et al. Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning. *Nat. Commun.* **13**, 6482 (2022).
172. Burt, A. et al. An image processing pipeline for electron cryo-tomography in RELION-5. *FEBS Open Bio* (2024) doi:10.1002/2211-5463.13873.

Capítulo VIII. REFERENCIAS

173. Lamm, L. *et al.* MemBrain: A deep learning-aided pipeline for detection of membrane proteins in Cryo-electron tomograms. *Comput. Methods Programs Biomed.* **224**, 106990 (2022).
174. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
175. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF CHIMERA X : Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* **30**, 70–82 (2021).
176. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* **27**, 14–25 (2018).
177. Mondal, S., Hsiao, K. & Goueli, S. A. A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *Assay Drug Dev. Technol.* **13**, 444–455 (2015).
178. Harrison, C. & Traynor, J. R. The [35S]GTP γ S binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* **74**, 489–508 (2003).
179. Olsen, R. H. J. *et al.* TRUPATH, an open-source biosensor platform for interrogating the GPCR transducerome. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 841–849 (2020).
180. Donthamsetti, P., Quejada, J. R., Javitch, J. A., Gurevich, V. V. & Lambert, N. A. Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) to Characterize Agonist-Induced Arrestin Recruitment to Modified and Unmodified G Protein-Coupled Receptors. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **70**, (2015).
181. Che, T. *et al.* Nanobody-enabled monitoring of kappa opioid receptor states. *Nat. Commun.* **11**, 1145 (2020).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

182. Van Kampen, J. M. & Eckman, C. B. Dopamine D₃ Receptor Agonist Delivery to a Model of Parkinson's Disease Restores the Nigrostriatal Pathway and Improves Locomotor Behavior. *J. Neurosci.* **26**, 7272–7280 (2006).
183. Collo, G., Zanetti, S., Missale, C. & Spano, P. Dopamine D3 receptor-preferring agonists increase dendrite arborization of mesencephalic dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1231–1240 (2008).
184. Du, F., Li, R., Huang, Y., Li, X. & Le, W. Dopamine D3 receptor-preferring agonists induce neurotrophic effects on mesencephalic dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 2422–2430 (2005).
185. Xu, P. et al. Structural genomics of the human dopamine receptor system. *Cell Res.* **33**, 604–616 (2023).
186. Zhuang, Y. et al. Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes. *Cell* **184**, 931-942.e18 (2021).
187. Yin, J. et al. Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane. *Nature* **584**, 125–129 (2020).
188. Kruse, A. C. et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**, 101–106 (2013).
189. Lane, J. R., Sexton, P. M. & Christopoulos, A. Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 59–66 (2013).
190. Kamal, M. & Jockers, R. Bitopic ligands: all-in-one orthosteric and allosteric. *F1000 Biol. Rep.* **1**, (2009).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

191. Fronik, P., Gaiser, B. I. & Sejer Pedersen, D. Bitopic Ligands and Metastable Binding Sites: Opportunities for G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **60**, 4126–4134 (2017).
192. Adhikari, P. et al. Chirality of Novel Bitopic Agonists Determines Unique Pharmacology at the Dopamine D3 Receptor. *Biomolecules* **11**, 570 (2021).
193. García-Nafría, J. & Tate, C. G. Cryo-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal Structures for Drug Receptors and Drug Development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 51–71 (2020).
194. García-Nafría, J. & Tate, C. G. Cryo-EM structures of GPCRs coupled to Gs, Gi and Go. *Mol. Cell. Endocrinol.* **488**, 1–13 (2019).
195. Glukhova, A. et al. Rules of Engagement: GPCRs and G Proteins. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **1**, 73–83 (2018).
196. Gusach, A., García-Nafría, J. & Tate, C. G. New insights into GPCR coupling and dimerisation from cryo-EM structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **80**, 102574 (2023).
197. Flock, T. et al. Universal allosteric mechanism for Ga activation by GPCRs. *Nature* **524**, 173–179 (2015).
198. Inoue, A. et al. Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell* **177**, 1933–1947.e25 (2019).
199. Semeano, A. et al. Linkers in Bitopic Agonists Shape Bias Profile among Transducers for the Dopamine D2 and D3 Receptors. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **7**, 2333–2349 (2024).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

200. Ragnarsson, L., Andersson, Å., Thomas, W. G. & Lewis, R. J. Extracellular Surface Residues of the α_{1B} -Adrenoceptor Critical for G Protein-Coupled Receptor Function. *Mol. Pharmacol.* **87**, 121–129 (2015).
201. Newman, A. H. et al. Molecular Determinants of Selectivity and Efficacy at the Dopamine D3 Receptor. *J. Med. Chem.* **55**, 6689–6699 (2012).
202. Kise, R. & Inoue, A. GPCR signaling bias: an emerging framework for opioid drug development. *J. Biochem. (Tokyo)* **175**, 367–376 (2024).
203. Schamiloglu, S. et al. Arrestin-3 Agonism at Dopamine D3 Receptors Defines a Subclass of Second-Generation Antipsychotics That Promotes Drug Tolerance. *Biol. Psychiatry* **94**, 531–542 (2023).
204. Schneider, J. S. et al. A novel dopamine D3R agonist SK609 with norepinephrine transporter inhibition promotes improvement in cognitive task performance in rodent and non-human primate models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **335**, 113514 (2021).
205. Simms, S. L., Huettner, D. P. & Kortagere, S. In vivo characterization of a novel dopamine D3 receptor agonist to treat motor symptoms of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **100**, 106–115 (2016).
206. Cheng, L. et al. Cryo-EM structure of small-molecule agonist bound delta opioid receptor-Gi complex enables discovery of biased compound. *Nat. Commun.* **15**, 8284 (2024).
207. Fink, E. A. et al. Structure-based discovery of nonopioid analgesics acting through the α_{2A} -adrenergic receptor. *Science* **377**, eabn7065 (2022).
208. Shao, Z. et al. Identification and mechanism of G protein-biased ligands for chemokine receptor CCR1. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 264–271 (2022).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

209. Yadav, M. K. et al. Molecular basis of anaphylatoxin binding, activation, and signaling bias at complement receptors. *Cell* **186**, 4956-4973.e21 (2023).
210. Reiner-Link, D., Madsen, J. S., Gloriam, D. E., Bräuner-Osborne, H. & Hauser, A. S. Differential G protein activation by the long and short isoforms of the dopamine D₂ receptor. *Br. J. Pharmacol.* bph.16388 (2024) doi:10.1111/bph.16388.
211. Klewe, I. V. et al. Recruitment of beta-arrestin2 to the dopamine D2 receptor: insights into anti-psychotic and anti-parkinsonian drug receptor signaling. *Neuropharmacology* **54**, 1215–1222 (2008).
212. Sibley, D. R., Luderman, K. D., Free, R. B. & Shi, L. Novel Cryo-EM structures of the D1 dopamine receptor unlock its therapeutic potential. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 205 (2021).
213. McCory, J. D. et al. Structure-inspired design of β-arrestin-biased ligands for aminergic GPCRs. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 126–134 (2018).
214. Zhuang, Y. et al. Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human μ-opioid receptor. *Cell* **185**, 4361-4375.e19 (2022).
215. Xu, Z. et al. Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 281–288 (2022).
216. Tschammer, N., Bollinger, S., Kenakin, T. & Gmeiner, P. Histidine 6.55 Is a Major Determinant of Ligand-Biased Signaling in Dopamine D_{2L} Receptor. *Mol. Pharmacol.* **79**, 575–585 (2011).
217. Nepal, B., Barnett, J., Bearoff, F. & Kortagere, S. Biased Signaling Agonists Promote Distinct Phosphorylation and Conformational States of the Dopamine D3 Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 10470 (2024).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

218. Su, M. et al. Structures of β 1-adrenergic receptor in complex with Gs and ligands of different efficacies. *Nat. Commun.* **13**, 4095 (2022).
219. Shonberg, J. et al. Biased Agonism at G Protein-Coupled Receptors: The Promise and the Challenges—A Medicinal Chemistry Perspective. *Med. Res. Rev.* **34**, 1286–1330 (2014).
220. Seyedabadi, M., Ghahremani, M. H. & Albert, P. R. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* **200**, 148–178 (2019).
221. Cong, X. et al. Molecular insights into the μ -opioid receptor biased signaling. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436421> (2021).
222. Kirchberg, K. et al. Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 18690–18695 (2011).
223. Cao, C. et al. Signaling snapshots of a serotonin receptor activated by the prototypical psychedelic LSD. *Neuron* **110**, 3154-3167.e7 (2022).
224. Cao, Y. et al. Unraveling allostery within the angiotensin II type 1 receptor for G_{α_q} and β -arrestin coupling. *Sci. Signal.* **16**, eadf2173 (2023).
225. Venkatakrishnan, A. J. et al. Diverse GPCRs exhibit conserved water networks for stabilization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 3288–3293 (2019).
226. Yuan, S., Filipek, S., Palczewski, K. & Vogel, H. Activation of G-protein-coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway. *Nat. Commun.* **5**, 4733 (2014).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

227. Suomivuori, C.-M. *et al.* Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein–coupled receptor. *Science* **367**, 881–887 (2020).
228. Huang, W. *et al.* Structure of the neuropeptid Y receptor 1 in complex with β-arrestin 1. *Nature* **579**, 303–308 (2020).
229. Kang, Y. *et al.* Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* **523**, 561–567 (2015).
230. Lee, Y. *et al.* Molecular basis of β-arrestin coupling to formoterol-bound β1-adrenoceptor. *Nature* **583**, 862–866 (2020).
231. Staus, D. P. *et al.* Structure of the M2 muscarinic receptor–β-arrestin complex in a lipid nanodisc. *Nature* **579**, 297–302 (2020).
232. Wang, Y. *et al.* Cryo-EM structure of cannabinoid receptor CB1-β-arrestin complex. *Protein Cell* **15**, 230–234 (2024).
233. Yin, W. *et al.* A complex structure of arrestin-2 bound to a G protein-coupled receptor. *Cell Res.* **29**, 971–983 (2019).
234. Wacker, D., Stevens, R. C. & Roth, B. L. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **170**, 414–427 (2017).
235. Casiraghi, M. *et al.* Structure and dynamics determine G protein coupling specificity at a class A GPCR. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.03.28.587240> (2024).
236. Perez-Aguilar, J. M., Shan, J., LeVine, M. V., Khelashvili, G. & Weinstein, H. A Functional Selectivity Mechanism at the Serotonin-2A GPCR Involves Ligand-Dependent Conformations of Intracellular Loop 2. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16044–16054 (2014).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

237. Powers, A. S. *et al.* A non-canonical mechanism of GPCR activation. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.08.14.553154> (2023).
238. Sanchez-Soto, M. *et al.* A structural basis for how ligand binding site changes can allosterically regulate GPCR signaling and engender functional selectivity. *Sci. Signal.* **13**, eaaw5885 (2020).
239. Teng, X. *et al.* Ligand recognition and biased agonism of the D1 dopamine receptor. *Nat. Commun.* **13**, 3186 (2022).
240. Chen, Q. *et al.* Structures of rhodopsin in complex with G-protein-coupled receptor kinase 1. *Nature* **595**, 600–605 (2021).
241. Duan, J. *et al.* GPCR activation and GRK2 assembly by a biased intracellular agonist. *Nature* **620**, 676–681 (2023).
242. Uchański, T., Pardon, E. & Steyaert, J. Nanobodies to study protein conformational states. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **60**, 117–123 (2020).
243. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
244. Uchański, T. Megabodies expand the nanobody toolkit for protein structure determination by single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **18**, (2021).
245. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the β2 adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180 (2011).
246. Staus, D. P. *et al.* Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature* **535**, 448–452 (2016).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

247. Comez, D. et al. Fluorescently tagged nanobodies and NanoBRET to study ligand-binding and agonist-induced conformational changes of full-length EGFR expressed in living cells. *Front. Immunol.* **13**, 1006718 (2022).
248. Shi, X. & Zhang, J. Using NanoB2 to gain insights into ligand pharmacology. *Cell Rep. Methods* **3**, 100438 (2023).
249. Rasmussen, S. G. F. et al. Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
250. Gulati, S. et al. Targeting G protein-coupled receptor signaling at the G protein level with a selective nanobody inhibitor. *Nat. Commun.* **9**, 1996 (2018).
251. Cahill, T. J. et al. Distinct conformations of GPCR– β -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 2562–2567 (2017).
252. Abramson, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* **630**, 493–500 (2024).
253. Deluigi, M. et al. Complexes of the neurotensin receptor 1 with small-molecule ligands reveal structural determinants of full, partial, and inverse agonism. *Sci. Adv.* **7**, eabe5504 (2021).
254. Ford, D. J., Essex, A., Spalding, T. A., Burstein, E. S. & Ellis, J. Homologous Mutations Near the Junction of the Sixth Transmembrane Domain and the Third Extracellular Loop Lead to Constitutive Activity and Enhanced Agonist Affinity at all Muscarinic Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 810–817 (2002).
255. Low, S. et al. VHH antibody targeting the chemokine receptor CX3CR1 inhibits progression of atherosclerosis. *mAbs* **12**, 1709322 (2020).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

256. Van Hout, A. *et al.* CXCR4-targeting nanobodies differentially inhibit CXCR4 function and HIV entry. *Biochem. Pharmacol.* **158**, 402–412 (2018).
257. Scholler, P. *et al.* Allosteric nanobodies uncover a role of hippocampal mGlu2 receptor homodimers in contextual fear consolidation. *Nat. Commun.* **8**, 1967 (2017).
258. Hong, C. *et al.* Structures of active-state orexin receptor 2 rationalize peptide and small-molecule agonist recognition and receptor activation. *Nat. Commun.* **12**, 815 (2021).
259. Toyoda, Y. *et al.* Structural basis of α1A-adrenergic receptor activation and recognition by an extracellular nanobody. *Nat. Commun.* **14**, 3655 (2023).
260. Yu, J. *et al.* Structural basis of μ-opioid receptor targeting by a nanobody antagonist. *Nat. Commun.* **15**, 8687 (2024).
261. Wu, A. *et al.* Structural basis for the allosteric modulation of rhodopsin by nanobody binding to its extracellular domain. *Nat. Commun.* **14**, 5209 (2023).
262. Ma, Y. *et al.* Structure-guided discovery of a single-domain antibody agonist against human apelin receptor. *Sci. Adv.* **6**, eaax7379 (2020).
263. McMahon, C. *et al.* Synthetic nanobodies as angiotensin receptor blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 20284–20291 (2020).
264. Schlimgen, R. R. *et al.* Structural basis for selectivity and antagonism in extracellular GPCR-nanobodies. *Nat. Commun.* **15**, 4611 (2024).
265. Stepniewski, T. M. *et al.* Mechanistic insights into dopaminergic and serotonergic neurotransmission – concerted interactions with helices 5 and 6 drive the functional outcome. *Chem. Sci.* **12**, 10990–11003 (2021).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

266. Skiba, M. A. et al. Antibodies expand the scope of angiotensin receptor pharmacology. *Nat. Chem. Biol.* (2024) doi:10.1038/s41589-024-01620-6.
267. Nimchinsky, E. A., Hof, P. R., Janssen, W. G. M., Morrison, J. H. & Schmauss, C. Expression of Dopamine D3 Receptor Dimers and Tetramers in Brain and in Transfected Cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 29229–29237 (1997).
268. Fiorentini, C., Busi, C., Spano, P. & Missale, C. Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 87–92 (2010).
269. Scarselli, M. et al. D2/D3 Dopamine Receptor Heterodimers Exhibit Unique Functional Properties. *J. Biol. Chem.* **276**, 30308–30314 (2001).
270. Tabor, A. et al. Visualization and ligand-induced modulation of dopamine receptor dimerization at the single molecule level. *Sci. Rep.* **6**, 33233 (2016).
271. Rossi, M., Fasciani, I., Marampon, F., Maggio, R. & Scarselli, M. The First Negative Allosteric Modulator for Dopamine D₂ and D₃ Receptors, SB269652 May Lead to a New Generation of Antipsychotic Drugs. *Mol. Pharmacol.* **91**, 586–594 (2017).
272. Lane, J. R. et al. A new mechanism of allostery in a G protein-coupled receptor dimer. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 745–752 (2014).
273. Albarran, S., Rangel-Barajas, C. & Garduo, B. F. Pathophysiology of L-Dopa Induced Dyskinesia — Changes in D1/D3 Receptors and Their Signaling Pathway. in *A Synopsis of Parkinson's Disease* (ed. Rana MdFrcpc Frcp - UK Hon, A. Q.) (InTech, 2014). doi:10.5772/57102.

Capítulo VIII. REFERENCIAS

274. Fiorentini, C. et al. Reciprocal Regulation of Dopamine D1 and D3 Receptor Function and Trafficking by Heterodimerization. *Mol. Pharmacol.* **74**, 59–69 (2008).
275. Fuxe, K. et al. Adenosine A_{2A} and Dopamine D₂ Heteromeric Receptor Complexes and Their Function. *J. Mol. Neurosci.* **26**, 209–220 (2005).
276. Bono, F., Mutti, V., Fiorentini, C. & Missale, C. Dopamine D3 Receptor Heteromerization: Implications for Neuroplasticity and Neuroprotection. (2020).
277. Bono, F. et al. Impaired dopamine D3 and nicotinic acetylcholine receptor membrane localization in iPSCs-derived dopaminergic neurons from two Parkinson's disease patients carrying the LRRK2 G2019S mutation. *Neurobiol. Aging* **99**, 65–78 (2021).
278. Bueschbell, B., Manga, P., Penner, E. & Schiedel, A. C. Evidence for Protein-Protein Interaction between Dopamine Receptors and the G Protein-Coupled Receptor 143. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8328 (2021).
279. Budzinski, J. et al. Bivalent ligands promote endosomal trafficking of the dopamine D3 receptor-neurotensin receptor 1 heterodimer. *Commun. Biol.* **4**, 1062 (2021).
280. Bueschbell, B. The World of GPCR dimers – Mapping dopamine receptor D2 homodimers in different activation states and configuration arrangements. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* (2023).
281. Marsango, S., Caltabiano, G., Pou, C., Liste, M. J. V. & Milligan, G. Analysis of Human Dopamine D3 Receptor Quaternary Structure. *Science* **290**, (2015).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

282. Marsango, S. *et al.* A Molecular Basis for Selective Antagonist Destabilization of Dopamine D3 Receptor Quaternary Organization. *Sci. Rep.* **7**, 2134 (2017).
283. Pulido, D. *et al.* Design of a True Bivalent Ligand with Picomolar Binding Affinity for a G Protein-Coupled Receptor Homodimer. *J. Med. Chem.* **61**, 9335–9346 (2018).
284. Kasai, R. S., Ito, S. V., Awane, R. M., Fujiwara, T. K. & Kusumi, A. The Class-A GPCR Dopamine D2 Receptor Forms Transient Dimers Stabilized by Agonists: Detection by Single-Molecule Tracking. *Cell Biochem. Biophys.* **76**, 29–37 (2018).
285. Busnelli, M. *et al.* Design and Characterization of Superpotent Bivalent Ligands Targeting Oxytocin Receptor Dimers via a Channel-Like Structure. *J. Med Chem* (2016).
286. Romantini, N. *et al.* Exploring the signaling space of a GPCR using bivalent ligands with a rigid oligoproline backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2108776118 (2021).
287. Prasanna, X., Mohole, M., Chattopadhyay, A. & Sengupta, D. Role of cholesterol-mediated effects in GPCR heterodimers. *Chem. Phys. Lipids* **227**, 104852 (2020).
288. Han, R., Wang, L., Liu, Z., Sun, F. & Zhang, F. A novel fully automatic scheme for fiducial marker-based alignment in electron tomography. *J. Struct. Biol.* **192**, 403–417 (2015).
289. Bykov, Y. S. *et al.* The structure of the COPI coat determined within the cell. *eLife* **6**, e32493 (2017).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

290. Mahamid, J. *et al.* Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science* **351**, 969–972 (2016).
291. Zhang, Y. *et al.* Molecular architecture of the luminal ring of the *Xenopus laevis* nuclear pore complex. *Cell Res.* **30**, 532–540 (2020).
292. Erdmann, P. S. *et al.* In situ cryo-electron tomography reveals gradient organization of ribosome biogenesis in intact nucleoli. *Nat. Commun.* **12**, 5364 (2021).
293. Hoffmann, P. C. *et al.* Structures of the eukaryotic ribosome and its translational states in situ. *Nat. Commun.* **13**, 7435 (2022).
294. O'Reilly, F. J. *et al.* In-cell architecture of an actively transcribing-translating expressome. (2021).
295. Bénac, N. *et al.* Non-canonical interplay between glutamatergic NMDA and dopamine receptors shapes synaptogenesis. *Nat. Commun.* **15**, 27 (2024).
296. Borroto-Escuela, D. O. & Fuxe, K. Adenosine heteroreceptor complexes in the basal ganglia are implicated in Parkinson's disease and its treatment. *J. Neural Transm.* **126**, 455–471 (2019).
297. Plitzko, J. M., Rigort, A. & Leis, A. Correlative cryo-light microscopy and cryo-electron tomography: from cellular territories to molecular landscapes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 83–89 (2009).
298. Okashah, N. *et al.* Agonist-induced formation of unproductive receptor-G₁₂ complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 21723–21730 (2020).
299. Janicot, R. *et al.* Direct interrogation of context-dependent GPCR activity with a universal biosensor platform. *Cell* **187**, 1527-1546.e25 (2024).

Capítulo VIII. REFERENCIAS

300. Kruse, A. C. *et al.* Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**, 552–556 (2012).
301. Sun, R. *et al.* Cryo-electron tomography reveals postsynaptic nanoblocks in excitatory synapses. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.05.12.540562> (2023).
302. Matsui, A. *et al.* Cryo-electron tomographic investigation of native hippocampal glutamatergic synapses. Preprint at <https://doi.org/10.7554/eLife.98458.2> (2024).
303. Franco, R. *et al.* Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 238–243 (2003).

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I.

Estadísticas de adquisición, refinado y validación de datos de crio-ME obtenidos para la muestra de D₃R:G_oαβγ:scFv16 unida al ligando bitópico FOB02-04A.

	Conformación A	Conformación B
Adquisición y procesado de datos		
Microscopio	FEI Titan Krios	FEI Titan Krios
Identificación ESRF	10.15151/ESRF-ES-751565769	10.15151/ESRF-ES-751565769
Detector	K3 Summit + GIF	K3 Summit + GIF
Magnificación	105.000x	105.000x
Voltaje (kV)	300	300
Exposición de electrones (e-/Å ²)	49,88662	49,88662
Rango de desenfoque (μm)	-1 to -3	-1 to -3
Tamaño de píxel (Å)	0,84	0,84
Simetría impuesta	C1	C1
Micrografías	22.655	22.655
Imágenes de partículas finales (n.º)	275.383	159.184
Resolución del mapa (Å)	3,05	3,09
Umbral de FSC	0,143	0,143
Refinado		
Modelo inicial utilizado (Código PDB)	7CMV, 6K41	7CMV, 6K41
Resolución del modelo ¹ (Å)	3,1	3,4
Umbral de FSC	0,5	0,5
Factor B de nitidez del mapa (Å ²)	-100	-156,9
Composición del modelo		
Átomos que no son hidrógeno	8.666	8.633
Residuos de proteínas	1.115	1.112
Ligandos		
Factores B (Å ²)		
Proteína	78,52	118,04
Ligando	48,81	106,34
Desviaciones r.m.s		
Longitudes de enlace (Å)	0,003	0,01
Ángulos de enlace (°)	0,51	1,06
Validación		
Puntuación de MolProbity	1,33	1,30
Puntuación del choque	4,89	5,61
Rotámeros pobres (%)	0,21	0,53
Puntuación EMRinger	3,22	2,67
Diagrama de Ramachandran		
Favorecido (%)	95,44	98,35
Permitido (%)	4,47	1,55
No permitido (%)	0,09	0,09

¹ Resolución en la que el FSC entre el mapa y el modelo es 0,5. r.m.s hace referencia a la media cuadrática

ANEXOS

ANEXO II.

Estadísticas de adquisición, refinado y validación de datos de crio-ME obtenidos para la muestra de D₃R:G_oαβγ:scFv16 unida al ligando bitópico AB04-88.

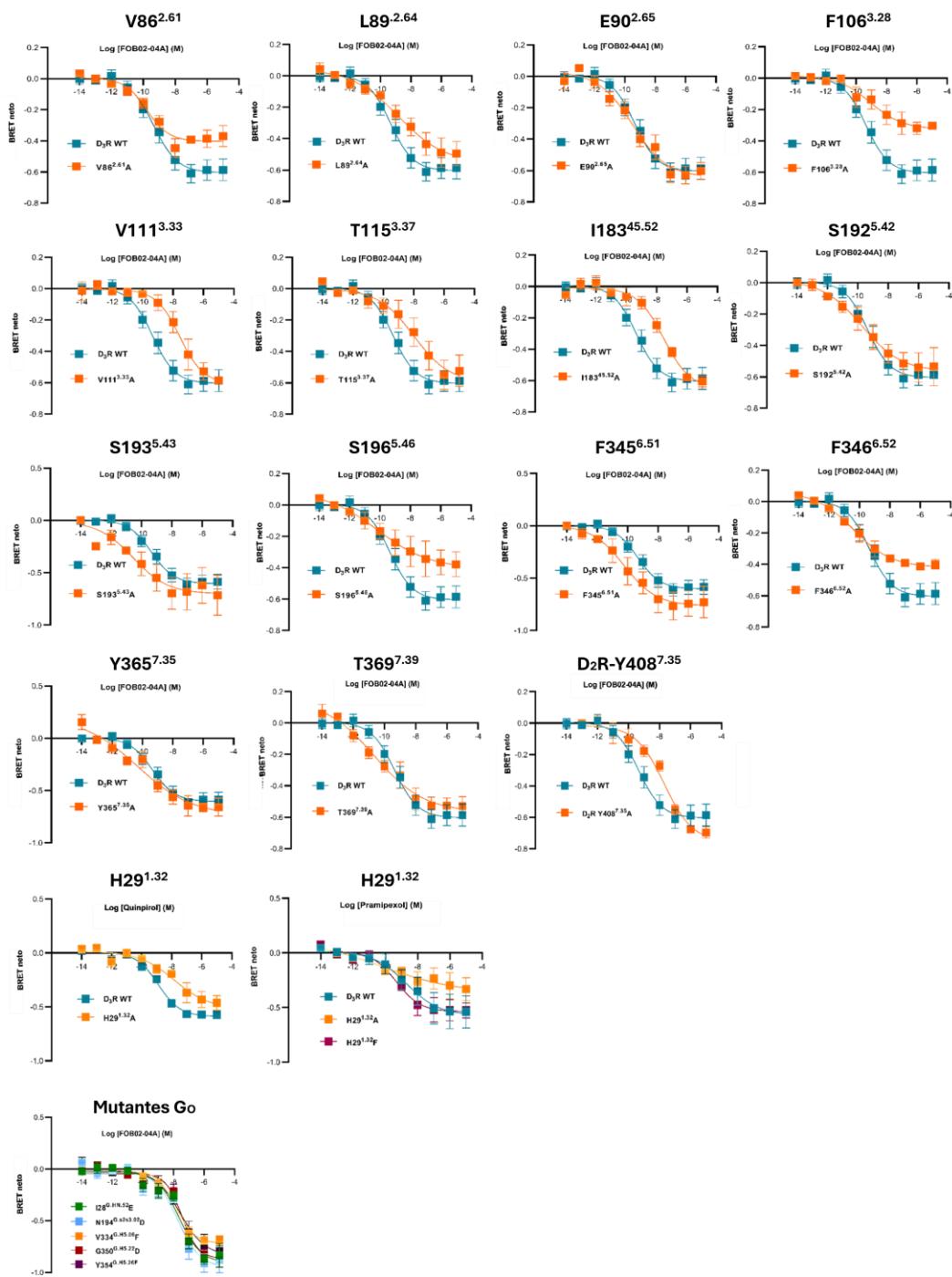
D ₃ R:G _o αβγ:scFv16:AB04-88	
Adquisición y procesado de datos	
Microscopio	FEI Titan Krios
Detector	Cumbre del K3 + GIF
Aumento	105.000x
Voltaje (kV)	300
Exposición de electrones (e-/Å ²)	55
Rango de desenfoque (μm)	-1 a -3
Tamaño de píxel (Å)	0,8354
Simetría impuesta	C1
Micrografías	18.941
Imágenes de partículas finales (n. ^o)	63.406
Resolución del mapa (Å)	3,4
Umbral de FSC	0,143
Refinado	
Modelo inicial utilizado (código PDB)	9F33
Resolución del modelo ¹ (Å)	3,64
Umbral del FSC	0,5
Factor <i>B</i> de nitidez del mapa (Å ²)	-100
Composición del modelo	
Átomos que no son hidrógeno	8.581
Residuos de proteínas	1.110
Ligandos	
Factores <i>B</i> (Å ²)	
Proteína	112,04
Ligando	98,61
Desviaciones r.m.s	
Longitudes de enlace (Å)	0,002
Ángulos de enlace (°)	0,479
Validación	
Puntuación de MolProbity	1,58
Puntuación del choque	6,23
Rotámeros pobres (%)	0,32
Puntuación EMRinger	2,17
Diagrama de Ramachandran	
Favorecido (%)	96,43
Permitido (%)	3,3
No permitido (%)	0,27

¹ Resolución en la que el FSC entre el mapa y el modelo es 0,5. r.m.s hace referencia a la media cuadrática

ANEXOS

ANEXO III.

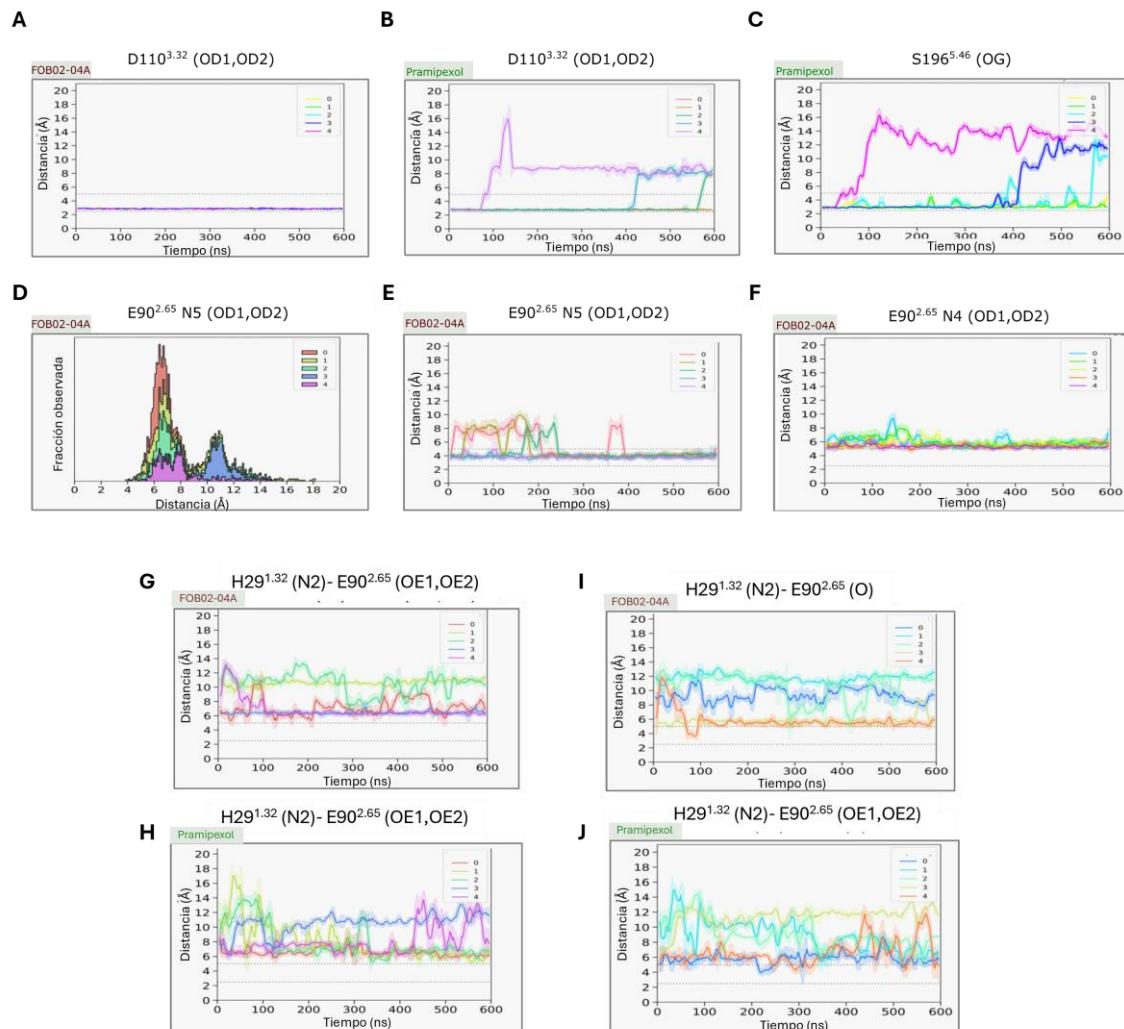
Curvas concentración-respuesta de las variantes de D₃R obtenidas tras la activación de G_{OA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de FOB02-04A. Todos los datos presentados son medias ± SEM de cuatro experimentos independientes ($n = 4$) realizados en triplicados técnicos excepto para H29^{1.32}F con pramipexol, S196^{5.46}A, Y365^{7.35}A, T369^{7.39}A ($n=3$), D₃R WT, V86^{2.61}A, L89^{2.64}A, E90^{2.65}A, F346^{6.52}A ($n=5$), y T115^{3.37}A ($n=6$).



ANEXOS

ANEXO IV.

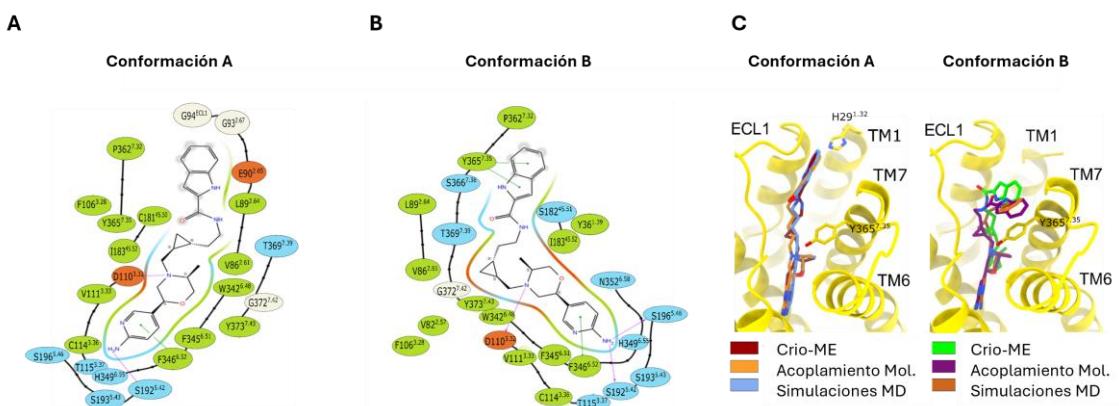
Simulaciones de MD de interacciones establecidas por el complejo D₃R:Gα_oβγ con el ligando bitópico FOB02-04A y el pramipexol. **A y B)** Interacción de puente salino entre el grupo carboxilo de D110^{3.32} en D₃R con el nitrógeno del enlace amina trans-ciclopropilo de FOB02-04A (**A**) y con el átomo N1 del grupo propilamina de pramipexol (**B**). **C)** Interacción de enlace de hidrógeno entre S196^{5.46} en D₃R con FOB0204-A. **D-F)** Frecuencia de interacción y distancias más cercanas entre el grupo carboxilo de E90^{2.65} en D₃R con la región indol (**D y E**) y el grupo amida de FOB02-04A (**F**). **G y H)** Distancias más cercanas entre el grupo carboxilo de E90^{2.65} y el grupo amida protonado N (ε) de H29^{1.32} con FOB02-04A (**G**) y pramipexol (**H**). **I y J)** Distancias más cercanas entre el oxígeno del esqueleto peptídico de E90^{2.65} y el grupo amida protonado N (ε) de H29^{1.32} con FOB02-04A (**I**) y pramipexol (**J**).



ANEXOS

ANEXO V.

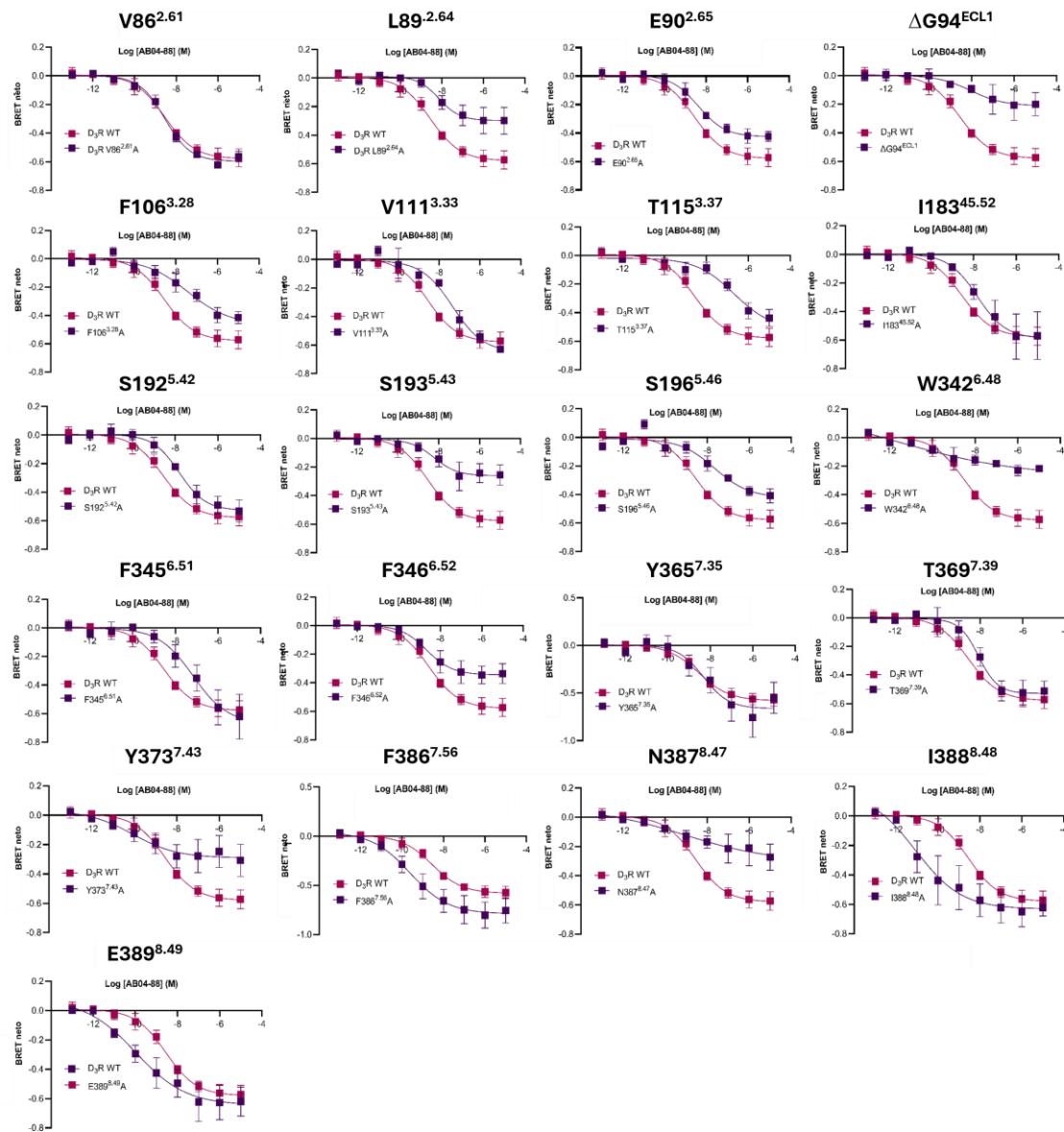
Simulaciones de MD y de acoplamiento molecular de interacciones establecidas por el complejo D₃R:Gα_oβγ con el ligando bitópico FOB02-04A y el pramipexol. A y B) Diagrama de interacción 2D entre D₃R con D₃R:Gα_oβγ y FOB02-04A en Conformación A (**A**) Conformación B (**B**). Código de colores: verde, hidrófobo; azul, polar; rojo, cargado negativamente; gris, glicina. C) Comparación de las poses de FOB02-04A obtenidas a partir de la estructura de crio-ME con las predichas por acoplamiento molecular y simulaciones de MD para la Conformación A (panel izquierdo) y B (panel derecho).



ANEXOS

ANEXO VI.

Curvas concentración-respuesta de las variantes de D₃R obtenidas tras la activación de G_{oA} mediante ensayos TRUPATH en presencia de AB04-88. Todos los datos presentados son medias ± SEM de tres experimentos independientes (n = 3) realizados por triplicado técnico excepto para L89^{2.64}A, I183^{45.52}, F345^{6.51}, Y365^{7.35}, T369^{7.39} y E389^{8.49} (n=4).



ANEXOS

ANEXO VII.

Purificación de nanoanticuerpos. Geles SDS-PAGE con las 16 muestras de nanoanticuerpos purificadas. En azul se subrayan los nanoanticuerpos que resultaron positivos para la unión a D₃R.S: Sobrenadante, Lav=Lavado, E=Elución.

