



Fundació
La Marató de TV3

XVII SIMPOSIUM

Lesiones medulares y cerebrales adquiridas



VALIDACIÓN DE MGLU4 COMO DIANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO MULTIPOTENCIAL DE LAS LESIONES MEDULARES

Jesús Giraldo Arjonilla

Institut de Neurociències UAB

Amadeu Llebaria Soldevila

Institut de Química Avançada de Catalunya CSIC

Cyril Goudet

Institut de Génomique Fonctionnelle, Universitat de Montpellier





1. Resumen del proyecto

Las lesiones medulares conducen a alteraciones neuroquímicas y neuroanatómicas que resultan en hiperexcitabilidad neuronal. Glutamato y otros factores proinflamatorios son liberados en exceso después de la lesión, contribuyendo a la hiperexcitabilidad neuronal, neurotoxicidad y dolor patológico. Los receptores mGlu de la clase C de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y, en particular, el subtipo mGlu4, pueden tener efectos positivos multipotenciales en las lesiones medulares: 1) reduciendo la liberación de glutamato, 2) disminuyendo la muerte celular neuronal debido a isquemia, 3) limitando la neurotoxicidad de la microglía y 4) disminuyendo la sensación exacerbada de dolor (hiperalgesia).

Nuestra hipótesis era que, debido a estos múltiples efectos positivos, mGlu4 podría ser una diana terapéutica de interés para un tratamiento multipotencial de las lesiones medulares. Sin embargo, hay escasez de fármacos selectivos y potentes con afinidad para este receptor. En este proyecto coordinado, propusimos reunir la experiencia complementaria de tres grupos en bioinformática, química y farmacología para comprender el papel de mGlu4 en las lesiones medulares, validar mGlu4 como una diana terapéutica para el tratamiento multipotencial de las lesiones medulares y desarrollar nuevos moduladores alostéricos positivos (PAM) de mGlu4. Durante el curso de nuestras investigaciones, el proyecto original se extendió para incluir también moduladores alostéricos negativos (NAM) de mGlu5. La serendipia asociada a la investigación experimental, así como el interés que la correspondencia funcional opuesta entre los receptores mGlu4 y mGlu5 posee para definir los efectos glutamatérgicos en las lesiones medulares, nos llevó a descubrir nuevos moduladores negativos de mGlu5 cuando buscábamos moduladores positivos de mGlu4.

Nuestros estudios han generado nuevos conocimientos fundamentales sobre las interacciones ligando-receptor y sobre los mecanismos de activación/inhibición de los receptores mGlu4 y mGlu5. Estos resultados tienen potenciales implicaciones clínicas. Debemos destacar que este conocimiento nos ha ayudado en el diseño de nuevos ligandos que pueden devenir en fármacos en un futuro cercano. Podemos citar como relevantes los estudios realizados en ligandos fotoconmutables, ya que representan un concepto farmacológico nuevo con potenciales implicaciones terapéuticas.

2. Resultados

Validación de modelos 3D de los dominios transmembrana y del *docking* de PAMs usando mutagénesis

Basándonos en las estructuras cristalinas disponibles de los GPCR de la clase A, generamos un modelo molecular del dominio transmembrana (TM) de mGlu4 mediante homología. Nuestro objetivo era que los modelos pudieran orientar la síntesis hacia fragmentos activos. Basándonos en las predicciones de nuestro modelo de receptor mGlu4 y usando mutagénesis dirigida, hemos construido receptores con mutaciones en aquellos residuos putativamente implicados en la unión de PAM con el fin de identificar los determinantes moleculares de la unión y función de los PAM. El año 2014 se resolvieron las estructuras cristalinas de los dominios TM de mGlu1 y mGlu5 (Wu *et al.*, Science 2014; Dore *et al.*, Nature 2014), afinándose nuestro modelo del receptor mGlu4. Nuestro estudio sobre el receptor mGlu4 reveló unos centros alostéricos que se solapan entre sí y que determinan tanto el agonismo alostérico como la cooperatividad positiva de los PAM en este receptor. Este trabajo se ha publicado en FASEB J (Rovira *et al.*, FASEB J 2015).

Validación de modelos farmacofóricos de PAM de mGlu4 usando mutagénesis y ensayos celulares y exploración de conformaciones activas de PAM

Investigamos las conformaciones activas de los miembros de la familia VU0155041 de PAM de mGlu4 probando experimentalmente conformaciones cerradas de compuestos con anillos de seis miembros. Las moléculas diseñadas como sondas conformacionales del receptor mGlu4 fueron caracterizadas computacionalmente y probadas en ensayos farmacológicos. Los resultados sugieren una conformación activa para VU0155041, en que la conformación de silla del anillo de ciclohexano tiene el sustituyente amida aromática en posición axial y el carboxilato en posición ecuatorial. Además, el receptor muestra una discriminación enantiomérica de los PAM quirales. El farmacóforo construido define un centro de unión alostérico del receptor mGlu4 constreñido espacialmente, proporcionando un nuevo paso en el diseño de PAM de mGlu4 basado en estructuras. Este trabajo se ha publicado en ChemMedChem (Rovira *et al.*, ChemMedChem 2015).

Diseño, síntesis y caracterización farmacológica de nuevos PAM y NAM

Se sintetizaron y probaron funcionalmente cuatro series de compuestos, lo que mejoró nuestra comprensión de las relaciones estructura-actividad involucradas en la función PAM de mGlu4. Identificamos una relación molecular que convierte un PAM de mGlu4 en un nuevo y potente NAM de mGlu5 (Gómez-Santacana *et al.*, MedChemComm 2015).

Modulación endógena de la actividad mGlu4 por cloruro extracelular

Se sabe que el ión cloruro se une y regula la función de diferentes actores de la actividad neuronal, y varios estudios han apuntado la posible modulación de los receptores de mGlu por Cl^- . Demostramos que el Cl^- se comporta como un PAM de los receptores mGlu. Por ejemplo, la actividad señalizadora de mGlu4 se abolió casi totalmente a concentraciones bajas de Cl^- en ensayos celulares. La potencia de Cl^- fue de ~ 80 mM con Cl^- , mostrando una cooperatividad positiva muy alta (coeficiente de Hill de ~ 6 en mGlu4) e indicando que variaciones muy pequeñas en $[\text{Cl}^-]$ dan lugar a variaciones muy altas en la acción de glutamato. Usando modelización molecular y mutagénesis, identificamos dos centros de unión a Cl^- bien conservados en el dominio extracelular de los receptores mGlu. Además, la modelización de las variaciones de la actividad debido a Cl^- en las sinapsis gabaérgicas sugiere que estas variaciones pueden ser compatibles con una modulación dinámica de los receptores mGlu presentes en estas sinapsis. Se puede especular que la pérdida de la homeostasis de Cl^- observada a nivel de la médula espinal en condiciones de dolor neuropático puede afectar a la capacidad de mGlu4 de regular la liberación de glutamato sináptico. Teniendo en cuenta todos los resultados, nuestros datos revelan un papel necesario de Cl^- en la activación por glutamato de muchos receptores mGlu. La explotación de los centros de unión de Cl^- puede permitir el desarrollo de reguladores innovadores de la actividad Mulu, dando lugar a perspectivas interesantes. Este estudio se publicó en FASEB J (Tora *et al.*, FASEB J 2015).

Desarrollo y optimización de sensores conformacionales basados en FRET para la activación de mGlu4

Durante el primer año del proyecto miniaturizamos el ensayo de cribado mediante un sensor de mGlu2 de 96 a 384 pocillos para mejorar su rapidez y eficiencia y validar su utilidad para el cribado de bibliotecas químicas de >1.000 compuestos. Más adelante adaptamos este sistema de mGlu2 a mGlu4. Generamos distintos receptores con

fluoróforos situados en diferentes posiciones para optimizar la detección de movimientos del receptor y de esta manera la sensibilidad del sensor. Finalmente realizamos con éxito un primer cribado de una biblioteca de 1.800 compuestos usando el sensor de mGlu4 que condujo a la identificación de varios *hits*.

Evaluación de la multipotencialidad de la modulación de mGlu4 *in vivo*

Durante la primera parte del proyecto nos centramos en los síntomas sensoriales asociados a la lesión de nervio. Mostramos que la activación de mGlu4 alivia la hipersensibilidad al dolor que sigue a la lesión de nervio (Vilar *et al.*, J Neurosci 2013). Publicamos un artículo de revisión en Current Opinion in Pharmacology (Acher & Goudet, 2015) sobre este tema. La determinación de los efectos neuroprotectores de los modelos *in vitro* e *in vivo* (animales) sigue adelante y continuará después de la finalización del presente proyecto.

Desarrollo de ligandos activados por luz para mGlu4 y mGlu5

Usando un concepto novedoso para la activación de receptores localizados con ligandos fotoconmutables, nos propusimos desarrollar herramientas moleculares para la activación y desactivación de mGlu4 en médula espinal y otros tejidos de una manera precisa. Para ello, diseñamos y sintetizamos compuestos azobencénicos como potenciales PAM de mGlu4 para controlar la actividad de estos receptores mediante luz. Sin embargo, obtuvimos un resultado inesperado y descubrimos un compuesto (Alloswitch-1) potente y selectivo como el primer NAM fotoconmutable de mGlu5. Este compuesto ha proporcionado una prueba de concepto para el desarrollo de fármacos alostéricos para el control *in vivo* de la actividad de estos receptores. Igualmente, se ha obtenido una herramienta para la definición precisa de nuevas estrategias farmacológicas con un patrón espacio-temporal preciso de la actividad biológica y con un control estricto de la dosis del fármaco aplicada. Alloswitch-1 mostró actividad en células y en *Xenopus tropicalis* usando diferentes condiciones de luz. Este trabajo se ha publicado en Nature Chemical Biology (Pittolo *et al.*, Nat Chem Biol 2014). Además, se ha remitido para su publicación, en el momento de redacción de la presente memoria, un artículo en el que se describe un nuevo ligando fotoconmutable de mGlu4 para controlar con luz la actividad de receptores mGlu4 endógenos *in vivo*, que ha permitido concluir que los síntomas de dolor crónico son inhibidos rápida y reversiblemente actuando sobre este receptor en localizaciones específicas.(Zussy *et al.*, remitido para su publicación).

Análisis estructurales mediante métodos teóricos

Los estudios de *docking* en un modelo del dominio TM de mGlu5 construido por homología permitieron identificar los determinantes moleculares de modulación alostérica positiva y negativa. Los resultados se publicaron en J Chem Inf Model (Dalton *et al.*, J Chem Inf Model 2014). Las características de unión a mGlu5 del compuesto fotoconmutable Alloswitch-1 fueron examinadas mediante simulaciones de dinámica molecular para comprender su mecanismo. Los resultados se publicaron en Curr Neuropharmacol (Dalton *et al.*, Curr Neuropharmacol 2015).

Además de nuestros estudios sobre los receptores mGlu de la clase C de los GPCR, realizamos análisis estructurales sobre estructuras cristalinas de la clase A de estos receptores para elucidar los determinantes moleculares de activación de la superfamilia de los GPCR. Los resultados se publicaron en BMC Bioinformatics (Dalton *et al.*, BMC Bioinformatics 2015) y J Struct Biol (Lans *et al.*, J Struct Biol 2015). Adicionalmente realizamos simulaciones de dinámica molecular en el receptor de opsina bajo varios estados de protonación de residuos seleccionados para identificar los mecanismos de activación dependientes del pH. Los resultados se publicaron en J Phys Chem B (Lans *et al.*, J Phys Chem B 2015). Estos cálculos se realizaron con el ánimo de trasladar las características de estructura-actividad de la clase A de los GPCR a la clase C de estos receptores.

Estudios en ciencia computacional

Se desarrollaron algoritmos de computación evolutiva para establecer un criterio de parada basado en distribuciones estadísticas. Estos estudios son de importancia en los procesos de ajuste incluidos en nuestra modelización matemática de la funcionalidad de Mulu, debido a los muchos parámetros que estos modelos contienen. Los resultados se publicaron en Computational Optimization and Applications (Gil *et al.*, Comput Opt and Appl 2015).

En colaboración con Alfredo Vellido y René Alquézar (UPC), se desarrollaron métodos basados en *machine learning* para la clasificación de GPCR de la clase C. Los resultados se publicaron en J Integr Bioinform, Med Biol Eng Comput y BMC Bioinformatics (König *et al.*, J Integr Bioinform 2014; Cruz-Barbosa *et al.*, Med Biol Eng Comput. 2015; König *et al.*, BMC Bioinformatics 2015). Estos resultados pueden ser útiles en nuestra

aproximación múltiple aunque integrada a la estructura y función de los receptores mGlu.

3. Relevancia y potenciales aplicaciones

Nuestra investigación ha generado conocimientos fundamentales nuevos sobre interacciones ligando-receptor y sobre mecanismos de activación/inhibición de los receptores mGlu4 y mGlu5. Estos resultados tienen potenciales implicaciones clínicas. Este conocimiento nos ha ayudado en el diseño de nuevos ligandos que pueden convertirse en fármacos en el futuro.

Durante los tres años del proyecto financiado por la Fundació La Marató de TV3, hemos generado modelos 3D del centro de unión de mGlu4 a PAM y un farmacóforo de estos ligandos. Es de esperar que esta mejora en el conocimiento de la estructura y modo de acción de los PAM de mGlu4 facilite la predicción del perfil farmacológico de los PAM e identifique los PAM de mGlu4 con los mejores perfiles analgésicos y neuroprotectores. Además, hemos identificado nuevos centros de unión alostérica que pueden producir reguladores innovadores de la actividad de los receptores mGlu. Adicionalmente, hemos mostrado que la activación de mGlu4 alivia la hipersensibilidad al dolor que sigue a las lesiones nerviosas. Estamos actualmente trabajando en el estudio de las propiedades neuroprotectoras de los PAM de mGlu4. Este trabajo seguirá una vez finalizado el presente proyecto, con el fin de identificar la mejor adecuación entre el perfil de señalización y el efecto protector de las moléculas. Sin embargo, gracias a nuestro trabajo sobre mGlu4 y su efecto sobre el dolor derivado de lesiones nerviosas en el marco de este proyecto, junto al efecto neuroprotector de la activación de mGlu4 descrito en la bibliografía científica, podemos manifestar que mGlu4 representa ya una diana interesante para el estudio de analgésicos y agentes neuroprotectores de nueva generación.

La determinación de una nueva clase de ligandos fotoconmutables de los receptores mGlu constituye una prueba de concepto de nuevas herramientas farmacológicas en el desarrollo de fármacos y tiene potencial para futuras aplicaciones en terapias que requieran una localización precisa del fármaco, así como un método para controlar de forma dinámica su actividad *in vivo*. Estos compuestos se emplearán en el futuro para determinar el papel biológico de mGlu4 en dolor y lesiones nerviosas y para estudiar

fármacos analgésicos y agentes neuroprotectores con mecanismos de acción radicalmente nuevos. Este trabajo pionero en el campo emergente de la optofarmacología continuará, una vez concluido el presente proyecto, en colaboración con los laboratorios involucrados en el mismo y con otros laboratorios externos.

4. Publicaciones

Acher F, Goudet C

Therapeutic potential of group III metabotropic glutamate receptor ligands in pain.
Curr Opin Pharmacol. 2015;20:64-72

Dalton JA, Gómez-Santacana X, Llebaria A, Giraldo J

Computational analysis of negative and positive allosteric modulator binding and function in metabotropic glutamate receptor 5 (in)activation
J Chem Inf Model. 2014;54(5):1476-87

Dalton JA, Lans I, Rovira X, Malhaire F, Santacana XG, Pittolo S, Gorostiza P, Llebaria A, Goudet C, Pin JP, Giraldo J

Shining Light On An mGlu5 Photoswitchable NAM: A Theoretical Perspective
Curr Neuropharmacol. 2015; DOI:10.2174/1570159X13666150407231417

Dalton JA, Lans I, Giraldo J

Quantifying conformational changes in GPCRs: glimpse of a common functional mechanism
BMC Bioinformatics. 2015;16:124. doi: 10.1186/s12859-015-0567-3

Gil D, Roche D , Borràs A, Giraldo J

Terminating evolutionary algorithms at their steady state
Computational Optimization and Applications 2015;61(2), 489-515

Gómez-Santacana X, Rovira X, Dalton JA, Goudet C, Pin JP, Gorostiza P, Giraldo J, Llebaria A

A double effect molecular switch leads to a novel potent negative allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 5 MedChemComm 2014;5 (10):1548-1554

Lans I, Dalton JA, Giraldo J

Helix 3 acts as a conformational hinge in Class A GPCR activation: An analysis of interhelical interaction energies in crystal structures

J Struct Biol. 2015;192(3):545-53

Lans I, Dalton JA, Giraldo J

Selective Protonation of Acidic Residues Triggers Opsin Activation

J Phys Chem B. 2015;119(30):9510-9

Pittolo S, Gómez-Santacana X, Eckelt K, Rovira X, Dalton J, Goudet C, Pin JP, Llobet A, Giraldo J, Llebaria A, Gorostiza P

An allosteric modulator to control endogenous G protein-coupled receptors with light

Nat Chem Biol. 2014;10(10):813-5

Rovira X, Malhaire F, Scholler P, Rodrigo J, Gonzalez-Bulnes P, Llebaria A, Pin JP, Giraldo J, Goudet C

Overlapping binding sites drive allosteric agonism and positive cooperativity in type 4 metabotropic glutamate receptors

FASEB J. 2015;29(1):116-30

Rovira X, Harrak Y, Trapero A, González-Bulnes P, Malhaire F, Pin JP, Goudet C, Giraldo J, Llebaria A

Exploring the active conformation of cyclohexane carboxylate positive allosteric modulators of the type 4 metabotropic glutamate receptor

ChemMedChem. 2014;9(12):2685-98

Tora AS, Rovira X, Dione I, Bertrand HO, Brabet I, De Koninck Y, Doyon N, Pin JP, Acher F, Goudet C

Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors by chloride ions

FASEB J. 2015;29(10):4174-88

Vilar B, Busserolles J, Ling B, Laffray S, Ulmann L, Malhaire F, Chapuy E, Aissouni Y, Etienne M, Bourinet E, Acher F, Pin JP, Eschalier A, Goudet C

Alleviating pain hypersensitivity through activation of type 4 metabotropic glutamate receptor J Neurosci. 2013;33(48):18951-65

König C, Alquézar R, Vellido A, Giraldo J

Reducing the n-gram feature space of class C GPCRs to subtype-discriminating patterns

J Integr Bioinform. 2014;11(3):254. doi: 10.2390/biecoll-jib-2014-254

Cruz-Barbosa R, Vellido A, Giraldo J

The influence of alignment-free sequence representations on the semi-supervised classification of class C G protein-coupled receptors: semi-supervised classification of class C GPCRs

Med Biol Eng Comput. 2015;53(2):137-49

König C, Cárdenas MI, Giraldo J, Alquézar R, Vellido A

Label noise in subtype discrimination of class C G protein-coupled receptors: A systematic approach to the analysis of classification errors

BMC Bioinformatics. 2015;16:314. doi: 10.1186/s12859-015-0731-9

Zussy C, Gómez-Santacana X, Rovira X, De Bundel D, Ferrazzo S, Bosch D, Asede D, Malhaire F, Acher F, Giraldo J, Valjent E, Ehrlich I, Ferraguti F, Pin JP, Llebaria A, Goudet C

Dynamic modulation of chronic pain related behaviors by amygdala metabotropic glutamate receptor 4

Presentado para revisión