

TRABAJO FIN DE GRADO

Estudios sobre la activación de los
receptores de dopamina.

Research on the activation of
dopamine receptors.

Autora:

Sofía Gabriela Nadal Delgado

Directores:

Javier García Nafría
Sandra Arroyo Urea

Instituto Universitario de Investigación Biocomputación y Física de
Sistemas Complejos, Universidad de Zaragoza.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Curso 2020-2021 – Grado en Biotecnología

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ADC	L-aminoácido aromático descarboxilasa, o DOPA descarboxilasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
APS	Persulfato amónico
β-OG	β-octilglucósido
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CHS	Hemisuccinato de colesterol
DDM	n-dodecil β-D-maltósido
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
IF	Intensidad de fluorescencia
IVA	<i>In vivo</i> Assembly
L-DOPA	Levodopa
LID	Discinesia inducida por L-DOPA
LMNG + CHS	Lauril maltosa neopentil glicol + hemisuccinato de colesterol
O/N	Toda la noche.
PKA	Proteín kinasa A
PLC- β	Fosfolipasa C-β
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
ssDNA	DNA de cadena simple
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TH	Tirosina hidroxilasa
T_m	Temperatura media de desnaturalización
T_{opt}	Temperatura óptima
WT	Proteína nativa o silvestre

Índice

1. Resumen.....	1
1. Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Dopamina. Sistema dopaminérgico.	2
2.2. Receptores de dopamina.....	3
2.3. Enfermedad de Parkinson. Tratamientos.....	4
2.4. Receptor D ₃ R, variante S9G.....	5
2.5. Receptor D ₄ R.	6
3. Objetivos.	6
4. Materiales y métodos.	6
4.1. Clonajes.....	6
4.1.1. Diseño de las construcciones de DNA.	6
4.1.2. Clonaje mediante IVA.	7
4.1.3. Mutagénesis.....	7
4.1.4. Extracción de DNA plasmídico mediante protocolos Miniprep.....	7
4.2. Cultivos celulares.....	8
4.2.1. Líneas celulares.	8
4.2.2. Transfección transitoria de células de insecto.	8
4.2.3. Transducción de células de insecto.	8
4.3. Análisis de proteínas.	9
4.3.1. Solubilización de receptores de membrana.....	9
4.3.2. Termoestabilidad basada en GFP (GFP-TS).....	9
4.3.3. Optimización de la medida de afinidad de fármacos anti-Parkinson por el receptor D ₃ R.	9
4.3.4. Medida de afinidad de fármacos anti-Parkinson por el receptor D ₃ R.	10
4.3.5. Electroforesis de proteínas.	10
4.3.6. Electrotransferencia e inmunodetección por Western-blot.....	10
4.3.7. Purificación con resinas TALON ®.....	11
4.3.8. Software y bibliografía.....	11
5. Resultados.....	11
5.1. Puesta a punto de una técnica para medir la afinidad de fármacos por los receptores de dopamina.....	11
5.1.1. Búsqueda de las condiciones óptimas para realizar las titulaciones.....	11
5.1.2. Estimaciones de afinidad de fármacos al receptor D ₃ R.	13
5.1.3. Obtención de receptor D ₃ R mutante S9G.	15
5.2. Obtención de receptor D ₄ R funcional.....	15
5.2.1. Obtención de células que expresaban receptor D ₄ R.....	15

5.2.2.	Obtención de receptor D ₄ R estable en solución.....	15
5.2.3.	Estudio de la funcionalidad del receptor D ₄ R.....	18
5.2.4.	Búsqueda del estado más estable del receptor D ₄ R.....	19
5.2.5.	Obtención del receptor D ₄ R mutante F124W.....	21
6.	Discusión.....	21
7.	Conclusiones y perspectivas futuras.....	22
7.	Conclusions.....	23
8.	Bibliografía.....	23

1. Resumen.

Debido a la gran homología de secuencia en el sitio ortostérico de los receptores de dopamina, los fármacos anti-Parkinson no son muy específicos entre los receptores, lo que produce efectos secundarios. Por este motivo, se ha intentado medir la afinidad de fármacos por los receptores, para estudiar los más específicos y desarrollar fármacos más efectivos. Sin embargo, diferentes laboratorios han reportado diferentes afinidades y no se ha llegado a un consenso.

En este trabajo se pretende poner a punto una técnica para medir la afinidad de fármacos anti-Parkinson por los receptores de dopamina de manera directa (para sobrepasar los problemas con las técnicas actuales) y utilizarla para comprobar si la mutación S9G del receptor D₃R modifica la afinidad de los fármacos, así como obtener el receptor D₄R funcional *in vitro* para futuros estudios estructurales.

Aunque la técnica utilizada ha mostrado ser fiable para medir la termoestabilidad de los receptores de dopamina, en el estado actual no es adecuada para ser utilizada en la medida de la afinidad de fármacos anti-Parkinson por receptores, pues es poco reproducible. Por otra parte, no se ha podido estudiar el mutante D₃R S9G por problemas de contaminaciones en los cultivos de células que expresaban el receptor, que han impedido su obtención en solución.

Con respecto al D₄R, se han ensayado diferentes condiciones de solubilización del receptor y se ha encontrado que las condiciones en las que el receptor es más estable en detergente LMNG + CHS sin proteínas G, y que además los fármacos no modifican su estabilidad.

1. Abstract.

Due to the high sequence homology displayed by the dopamine receptors binding pockets, anti-Parkinson drugs are not very specific for any given receptor, which causes side effects. For this reason, it has been attempted to measure different drug affinities to the receptors in order to study the most specific ones and develop more effective drugs. However, different laboratories have reported different affinity values and no consensus has been reached.

In this project we attempted to setup a technique for measuring anti-Parkinson drug affinities directly to dopamine receptors, and use it to verify if the D₃R receptor S9G mutation modifies drug affinities. Additionally, it is aimed to obtain the functional *in vitro* D₄R receptor for future structural studies.

Although the technique employed has proven to be reliable for measuring dopamine receptor thermostability, in its current state it is not suitable to measure anti-Parkinson drug affinities to the receptors, as it is difficult to reproduce. In addition, D₃R S9G mutant could not be studied due to contamination problems in receptor-expressing cell cultures, which hindered experiment progress.

Regarding D₄R receptor, different receptor solubilization conditions have been tested, and the receptor has been found to be more stable in LMNG + CHS without G proteins. Also it has been observed that drugs do not modify its stability.

2. Introducción.

2.1. Dopamina. Sistema dopaminérgico.

La comunicación entre las neuronas está mediada por una serie de mensajeros químicos conocidos como neurotransmisores. El proceso por el que una neurona transmite información a otra neurona se llama transmisión sináptica. Hay dos tipos de sinapsis, eléctricas y químicas (95% de las sinapsis). En las sinapsis químicas la neurona presináptica (la neurona que transmite información a la neurona postsináptica) libera un neurotransmisor que será reconocido por la neurona postsináptica, en la que pondrá en marcha un proceso celular determinado.

Según su naturaleza química se pueden clasificar los neurotransmisores en 5 grupos: moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, monoaminas, nucleótidos y aminoácidos. Las monoaminas se caracterizan por ser moléculas orgánicas cargadas de pequeño tamaño que se sintetizan a partir de aminoácidos. Un subtipo de monoaminas son las catecolaminas, que se sintetizan a partir de la tirosina. En este subtipo se encuentran neurotransmisores que cumplen funciones vitales en el sistema nervioso central (SNC), como la dopamina, o 3-hidroxitiramina (1,2).

Al tratarse de una catecolamina, la dopamina se sintetiza a partir de la tirosina (*Figura 2.1*). La síntesis de este neurotransmisor ocurre en el citosol de las neuronas dopaminérgicas, donde la tirosina es sustrato de la tirosina hidroxilasa (TH), que genera L-3,4-dihidroxifenilalanina, también llamada levodopa (L-DOPA). A continuación, la L-DOPA es transformada a dopamina por acción de la DOPA descarboxilasa, o L-aminoácido aromático descarboxilasa (ADC) (1,3).

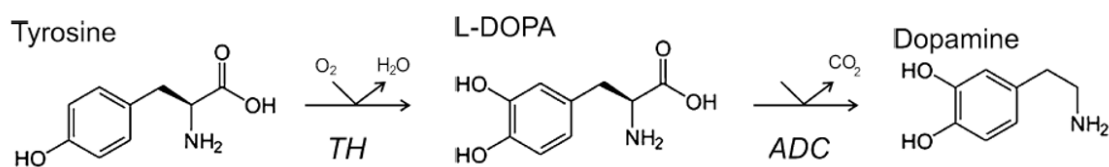


Figura 2.1: síntesis de dopamina a partir del aminoácido tirosina. Primero la tirosina hidroxilasa convierte la tirosina en L-DOPA y después la DOPA descarboxilasa, o L-aminoácido aromático descarboxilasa, convierte la L-DOPA en dopamina (4).

Una vez sintetizada, la dopamina es secuestrada en el interior de vesículas sinápticas en el citosol, y será liberada por exocitosis a la hendidura sináptica cuando llegue un impulso eléctrico al terminal presináptico.

La dopamina cumple funciones de gran importancia, tanto en el SNC como en tejidos periféricos. En el cerebro, las neuronas dopaminérgicas conforman varias vías que comunican distintas regiones cerebrales y que son responsables de diferentes funciones. Una de ellas es la vía nigroestriada, que conecta la sustancia negra *pars compacta* con los ganglios basales y que es importante en el movimiento. Las otras vías (mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular) median: la emoción, los sistemas de recompensa, el placer, la cognición, el comportamiento emocional, la memoria, la atención y la secreción de prolactina. En otros tejidos periféricos, como el sistema gastrointestinal, cardiovascular, inmune o renal, la dopamina también participa en las actividades de regulación. (1–3,5).

2.2. Receptores de dopamina.

Para desencadenar sus efectos, la dopamina actúa a través de los receptores específicos de dopamina, que se encuentran situados en la membrana plasmática de las células diana. Los receptores de dopamina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Esta familia de receptores contiene más de 800 genes que codifican proteínas de diversas funciones, y cuya estructura característica consiste en 7 hélices- α transmembrana unidas por bucles intra y extracelulares (1,6).

Existen 5 tipos de receptores de dopamina (D_1R , D_2R , D_3R , D_4R y D_5R), que pueden dividirse en dos grupos: receptores de clase D1 (D_1R y D_5R) y receptores de clase D2 (D_2R , D_3R y D_4R). Los dos tipos de receptores se diferencian en varios aspectos. Por una parte, la estructura genética de los receptores es distinta. Los receptores de clase D1 no tienen intrones, mientras que los de clase D2 sí, y por ello pueden generar variantes de *splicing*. Por otro lado, los receptores de clase D2 presentan de 10 a 100 veces más afinidad por la dopamina que los receptores de clase D1 (1,2). Además, los receptores comparten una gran homología en su secuencia de aminoácidos, especialmente aquellos de una misma clase. Así, el receptor D_2R y el D_3R tienen un 78% de homología en su dominio transmembrana, y los receptores D_2R y D_4R un 53% (4,7,8).

Los receptores de dopamina se expresan ampliamente en el SNC y en tejidos periféricos, como los vasos sanguíneos, el corazón o la retina. En el cerebro los receptores más expresados son el D_1R y el D_2R . En este tejido los receptores D_3R y D_4R se expresan mayoritariamente en las áreas límbicas, es decir, aquellas que conforman el sistema límbico, encargado de las emociones, la conducta, la supervivencia y el aprendizaje (1–3).

Todos los receptores de dopamina cuentan con 7 hélices transmembrana unidas por 3 bucles intracelulares (ICL) y 3 bucles extracelulares (ECL). Además, tienen un extremo C-terminal intracelular y un extremo N-terminal extracelular. Los receptores de clase D1 se caracterizan por tener el bucle intracelular 3 (ICL3) corto y el extremo C-terminal largo, mientras que los receptores de clase D2 tienen el ICL3 largo y el extremo C-terminal corto (*Figura 2.2*). Tanto el extremo C-terminal como el ICL3 actúan como puntos de interacción entre los receptores y distintas proteínas intracelulares, como las proteínas G (4,8–11).

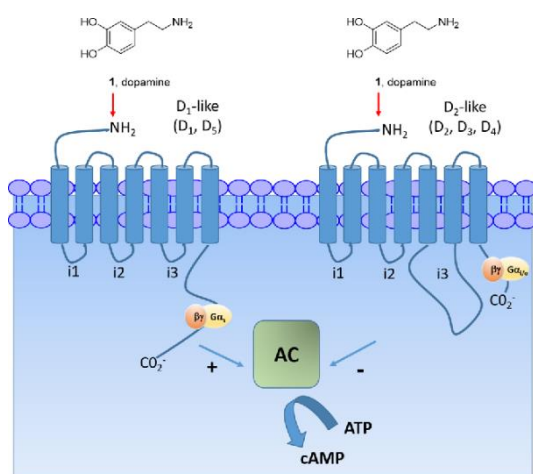


Figura 2.2 (17): estructura general de los receptores de clase D1 y D2. Se observan las 7 hélices transmembrana, el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular, además de los 3 bucles intracelulares (ICL) y los 3 extracelulares (ECL). Se puede apreciar que el ICL3 es más largo en los receptores de clase D2, y el C-terminal es más pequeño que los de clase D1.

Al formar parte de la superfamilia de GPCR, los receptores de dopamina se asocian a distintas proteínas G heterotriméricas para desencadenar procesos de señalización intracelulares. Las

proteínas G heterotriméricas cuentan con 3 subunidades: G_α , G_β y G_γ . Cuando el ligando, en este caso la dopamina, se une a su receptor, la subunidad G_α se activa, intercambiando el GDP por GTP, y se separa de las otras dos subunidades, lo que inicia distintos eventos de señalización. Existen 4 tipos de subunidad G_α : G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$. Las proteínas G_s activan a la adenilato ciclasa (AC), las $G_{i/o}$ inhiben a la AC, las $G_{q/11}$ activan a la fosfolipasa C- β (PLC- β) y las $G_{12/13}$ participan en la activación de Rho, que es un tipo de proteína GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) que media el intercambio de GDP por GTP cuando se activa la proteína (2,6).

Los receptores de clase D1 se acoplan a proteínas G_s , por lo que la unión de la dopamina a estos receptores resulta en la activación de la adenilato ciclasa, que genera AMPc. En cambio, los receptores de clase D2 se acoplan a proteínas $G_{i/o}$, por lo que su activación produce una disminución de los niveles de AMPc intracelulares. La modulación de la síntesis de AMPc por parte de los receptores de dopamina implica la regulación de la actividad de distintas enzimas cuya actividad es dependiente de este metabolito y que inician distintas cascadas de señalización, como la proteína quinasa A (PKA) (5).

2.3. Enfermedad de Parkinson. Tratamientos.

La enfermedad de Parkinson es el segundo desorden neurodegenerativo más frecuente, por detrás de la enfermedad de Alzheimer. Afecta al ~0,3% de la población general, y a alrededor del 1% de la población mayor de 60 años (9). Esta enfermedad se caracteriza por la muerte celular de neuronas en la sustancia negra *pars compacta* del cerebro y por la acumulación de agregados tóxicos de α -sinucleína en estas neuronas conocidos como cuerpos de Lewis. Asimismo, hay una serie de síntomas motores y no motores característicos de esta afección. Los síntomas motores son: temblor en reposo, bradiquinesia, rigidez muscular e inestabilidad postural; mientras que los síntomas no motores incluyen: depresión, ansiedad, desórdenes del sueño, disfunción autonómica o fatiga (9,12).

Actualmente, los tratamientos para el Parkinson tienen como objetivo aliviar los síntomas, ya que no existe un tratamiento que pueda frenar la progresión de la enfermedad. El tratamiento estándar consiste en la administración de L-DOPA, la molécula precursora de la dopamina (*Figura 2.1*). Este profármaco viaja desde el intestino al cerebro, atraviesa la barrera hematoencefálica y se convierte a dopamina en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas (9). Sin embargo, la administración a largo plazo de L-DOPA está relacionada con la aparición de efectos secundarios, siendo el más grave la discinesia inducida por levodopa (LID). Las discinesias son fenómenos motores complejos que consisten en la ejecución involuntaria de un movimiento en respuesta a la administración crónica del fármaco (7,9,12).

Otro tratamiento posible para el Parkinson es la administración de fármacos agonistas de los receptores de dopamina, que actúan sobre los receptores en la membrana de las neuronas y compensan la deficiencia de dopamina que ocurre en el cerebro tras la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Estos fármacos no son tan efectivos como la L-DOPA a la hora de aliviar los síntomas y también producen efectos secundarios, algunos de ellos derivados de la falta de especificidad de los fármacos por receptores concretos. Los efectos secundarios son especialmente no motores, como depresión, psicosis, alucinaciones o desórdenes de control de impulsos (problemas de juego, compra compulsiva, etc). No obstante, tienen la ventaja de que

posponen la necesidad del tratamiento con L-DOPA o reducen la dosis necesaria para aliviar los síntomas, de forma que retrasan o reducen la aparición de LID. (9,12,13).

Se sabe que muchos fármacos anti-Parkinson actúan sobre más de un subtipo de receptor, ya que los receptores de una misma clase tienen una gran homología de secuencia en su sitio ortostérico, y por eso se ha intentado medir la afinidad de los fármacos por los receptores, para ver cuáles son más específicos y estudiarlos para desarrollar fármacos más efectivos. Sin embargo, los distintos laboratorios han obtenido resultados dispares, lo que ha dificultado todo este proceso. Diferentes estudios han demostrado que la selectividad de los fármacos por los receptores varía según las condiciones experimentales utilizadas (los ligandos utilizados, el tipo celular, etcétera). En este proyecto se pretende poner a punto un método para determinar la afinidad de los fármacos por los distintos receptores de manera inequívoca, que pueda ser utilizado para el desarrollo de fármacos más específicos y eficientes (8,14,15).

Por otra parte, también es de gran interés estudiar a fondo los receptores de dopamina, dado que son las dianas de los fármacos anti-Parkinson, con el objetivo de dilucidar su funcionamiento y diseñar fármacos más específicos y con menos efectos secundarios. Dentro de esta línea de investigación se ubica este proyecto, que se centrará en dos aspectos: el estudio de la variante Ser9Gly del receptor D₃R y su relación con la afinidad de los fármacos anti-Parkinson y el estudio del receptor D₄R para hallar las condiciones en las que es más estable para su posterior estudio estructural del sitio ortostérico.

2.4. Receptor D₃R, variante S9G.

El pramipexol es un fármaco agonista que supuestamente presenta una afinidad mayor por el receptor D₃R que por el resto de receptores de clase D₂. Se observó que la respuesta de los individuos enfermos a este fármaco varía según el genotipo del gen DRD3, que codifica el receptor D₃R (13). Este gen tiene 17133 polimorfismos de nucleótido único (SNPs), de los cuales el más estudiado es el rs6280, que consiste en el cambio de una citosina por una timina. Este cambio resulta en la mutación de la serina 9 a glicina (mutación S9G) (16,17) que ocurre en la cola N-terminal extracelular del receptor.

Se han realizado diferentes estudios (13,18) en los que se trataba durante un tiempo determinado a pacientes que sufrían de la enfermedad del Parkinson y que eran: homocigotos para serina (S/S), homocigotos para glicina (G/G) o heterocigotos (S/G). Así se observó que la respuesta al fármaco en pacientes homocigotos S/S era mayor que la de los pacientes heterocigotos S/G, y esta a su vez era superior a la de los pacientes homocigotos G/G. Por tanto, para que en los pacientes con genotipo G/G el fármaco ejerciera el mismo efecto era necesario suministrarles dosis más altas. Estos resultados llevan a la conclusión que la afinidad del receptor D₃R por el fármaco cambia según el genotipo.

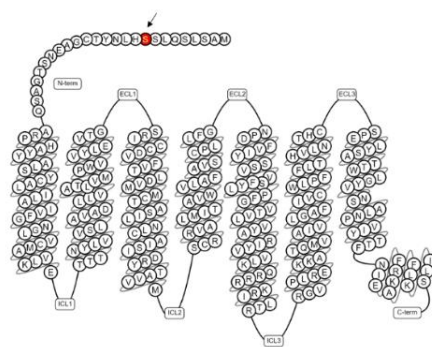


Figura 2.3 (19): estructura secundaria del receptor D₃R. En la cola N-terminal se marca en rojo la serina que muta a glicina.

Por otro lado, la mutación se encuentra en la cola N-terminal extracelular del receptor (Figura 2.3) que está desordenada en una estructura reciente del receptor en presencia de pramipexol (19).

Por esto, no se comprende cómo afecta esta mutación a la afinidad del fármaco si no se encuentra en el sitio ortostérico. En este proyecto se estudiará la afinidad del receptor D₃R wild-type (WT) y del receptor mutado por el pramipexol y otros fármacos, con el objetivo de clarificar si la afinidad cambia. Una vez se haya observado que la mutación sí influye en la afinidad de los fármacos por el receptor D₃R, los objetivos futuros serán determinar cuál es el mecanismo.

2.5. Receptor D₄R.

Este receptor está relacionado con la enfermedad de Parkinson y otros desórdenes neurológicos. Su nivel de expresión es menor que el de los otros receptores de dopamina, encontrándose mayoritariamente en el córtex prefrontal del cerebro.

Aunque aún hay pocos estudios al respecto, se ha observado que los fármacos antagonistas de D₄R podrían ejercer un efecto positivo en el tratamiento de LID, y por eso existe un interés en encontrar nuevos fármacos antagonistas de D₄R. No obstante, el principal obstáculo es obtener fármacos específicos para D₄R que no actúen sobre otros receptores (20).

En este proyecto se pretende obtener receptor D₄R funcional, de forma que en el futuro el grupo de investigación pueda resolver su estructura y estudiarla para comprender las bases de su activación, así como la selectividad para este receptor posibilitando la búsqueda de fármacos específicos.

3. Objetivos.

Los objetivos de este proyecto son:

- Poner a punto una técnica para medir la afinidad de fármacos anti-Parkinson por los receptores de dopamina de manera directa.
- Determinar si la mutación Ser9Gly del receptor D₃R influye en la afinidad de los fármacos por este receptor.
- Obtener receptor D₄R funcional *in vitro* para, en un futuro, poder estudiar su estructura, funcionamiento y activación, con la finalidad de desarrollar fármacos selectivos y entender cómo se unen diferentes fármacos.

4. Materiales y métodos.

4.1. Clonajes.

4.1.1. Diseño de las construcciones de DNA.

Se utilizaron las siguientes construcciones de cDNA de los receptores D₃R (*Figura 4.1 A*) y D₄R (*Figura 4.1 B*). En el N-terminal se encuentra la HA, que se corresponde con los aminoácidos 98-106 de la hemaglutinina, y es una etiqueta de epítipo. A continuación, se localiza una etiqueta de 10 histidinas, que precede al gen que codifica el receptor de dopamina. Después se encuentra la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV (ENLYFQ), y finalmente la secuencia de la proteína fluorescente verde (GFP).

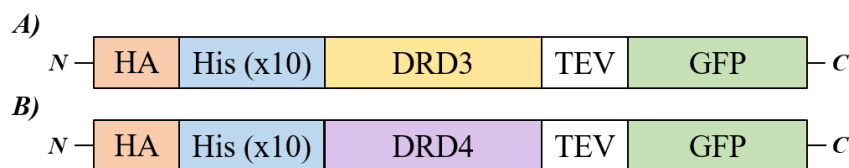


Figura 4.1: Representación de los constructos de DNA utilizados. A) Construido del receptor D₃R, codificado por el gen DRD3. B) Construido del receptor D₄R, codificado por el gen DRD4.

4.1.2. Clonaje mediante IVA.

El IVA (*In Vivo Assembly*) cloning es un sistema de clonaje *in vivo* que se basa en una vía de recombinación homóloga de *E. coli* independiente de recA (21,22). Esta vía no está completamente descrita, pero se sabe que recombina de forma eficiente fragmentos de DNA de cadena linear cortos y con secuencias complementarias. En la técnica de IVA cloning es la bacteria hospedadora la que realiza la recombinación de los fragmentos de DNA, lo que permite eliminar muchos pasos laboriosos del clonaje basados solo en PCR o en ensamblaje por tratamientos enzimáticos. Asimismo, la técnica presenta las ventajas de que la vía de recombinación homóloga independiente de recA se encuentra en todas las cepas de *E. coli* utilizadas en los laboratorios por lo que reduce el riesgo de que la estabilidad de los vectores utilizados pueda verse comprometida (21,22). Con esta técnica se han realizado todas las manipulaciones genéticas.

4.1.3. Mutagénesis.

El mutante F124W del receptor D₄R se realizó mutando el codón TTT (Phe) por TGG (Trp) en la posición 124 (Anexo 1, Tabla 1A, 2A). El mutante S9G del receptor D₃R se realizó cambiando el codón TCC (Ser) por GGT (Gly) (Anexo 1, Tabla 1A). Una vez realizada la PCR (Anexo 2) se corrió un gel de agarosa (1%) para comprobar que la reacción se había realizado correctamente y se transformó el producto en bacterias competentes XL-10 Gold mediante choque térmico. Para ello, se inocularon 3 µl del DNA en 100 µl de bacterias y se dejó incubar 5 minutos en hielo. A continuación, las alícuotas se calentaron a 42° C durante 30 segundos y luego se incubaron durante 2 minutos en hielo. Pasado este tiempo se añadieron 200 µl de medio de cultivo SOB (triptona 2% (m/v), extracto de levadura 0,5% (m/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, agua destilada) y se dejó incubar a 37° C durante 45 minutos. Las bacterias transformadas se sembraron en una placa de agar LB (agar 1,5% (m/v), triptona 1% (m/v), NaCl 1% (m/v), extracto de levadura 0,5% (m/v), agua destilada) con ampicilina para que solo las bacterias transformadas pudiesen crecer, pues los constructos utilizados contenían un gen de resistencia a ampicilina. Finalmente, se incubaron las placas sembradas a 37°C durante 24 horas.

4.1.4. Extracción de DNA plasmídico mediante protocolos Miniprep.

Para extraer los vectores resultantes se llevó a cabo una extracción de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina (miniprep). Para ello se amplificó una colonia en 3 ml de medio LB24 (triptona 1%, NaCl 0,5%, extracto de levadura 2,4%, agua destilada) O/N a 37°C en agitación a 180 rpm. El pellet se recuperó por centrifugación (4000 rpm, 5 minutos).

Para la extracción se incubó el pellet con 250 µl de tampón P1, que contenía EDTA y RNasa, para lisar las células y degradar el RNA. A continuación, se añadieron 250 µl de tampón P2 para llevar la solución a pH alcalino y se precipitó el DNA cromosómico con 350 µl de tampón N3 y centrifugación (13.000 rpm, 10 minutos), quedando el DNA plasmídico en el sobrenadante (ver composición de los buffers en anexo 1).

El DNA plasmídico se purificó con una columna de silica-gel con cargas positivas que retienen al DNA por interacción electrostática. Después del lavado con 750 µl de tampón PE, se eluyó el DNA con 100 µl de tampón EB. La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro DeNovix.

4.2. Cultivos celulares.

4.2.1. Líneas celulares.

Se trabajó con células de insecto pertenecientes a la línea High Five (BTI-Tn-5B1-4) (Tni), que derivan de células de ovario de *Trichoplusia ni*. Estas células se cultivaron en suspensión a 29° C en medio ESF-921 (Oxford Expression Systems), un medio libre de suero y de proteínas.

4.2.2. Transfección transitoria de células de insecto.

$$\text{Densidad celular (cel/ml)} = \frac{\text{Células vivas} \cdot 2 \cdot 10^4}{\text{Número de cuadrantes contados}}$$

Fórmula 1: para determinar la densidad celular del cultivo.

Las transfecciones se realizaron en una placa de 6 pocillos. En cada pocillo se añadió 1 ml de células a una concentración de $0,5 \cdot 10^6$ cel/ml. La densidad y viabilidad celular se determinaron utilizando azul tripán, un colorante que no puede atravesar la membrana de células viables, pero sí puede introducirse en el interior de células no viables, que tienen alteraciones en la membrana (Fórmula 1). Seguidamente, la placa se dejó reposar en el incubador a 29° C durante 10-15 minutos para que las células se adhiriesen a la superficie del pocillo. Para la transfección se mezclaron 100 µl de medio ESF-921 con 3 µg de DNA y 100 µl de medio ESF-921 con 6 µg de PEI Max (ratio 1:2 DNA:PEI) y se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, la mezcla se añadió lentamente a los pocillos con células, que se completaron con 3 ml de medio ESF-921. Las transfecciones se incubaron a 29° C durante 48 horas.

4.2.3. Transducción de células de insecto.

Se utilizó un virus que se había generado con anterioridad mediante el sistema Flashbac® Ultra. Este virus portaba el constructo genético del receptor D₄R (*Figura 4.1 B*). Para realizar la transducción se prepararon 10 ml de células Tni con una densidad celular de $2,5 \cdot 10^6$ cel/ml en medio ESF-921, y se añadieron 500 µl de virus, de forma que quedó a una concentración del 5%. Las células se incubaron a 29°C durante 48 horas. Para confirmar la expresión del receptor D₄R, se determinó la presencia de fluorescencia en las células mediante un microscopio de fluorescencia. A continuación, se centrifugaron las células a 800 g durante 5 minutos y después se retiró el medio cuidadosamente. El pellet resultante se dividió en alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -20° C hasta su posterior uso.

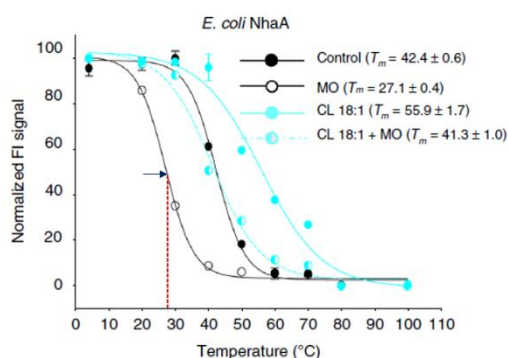
4.3. Análisis de proteínas.

4.3.1. Solubilización de receptores de membrana.

Se partió de pellets de células Tni que expresaban en su membrana el receptor de interés. Los pellets se resuspendieron con tampón de solubilización (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% de detergente o styrenemaleic acid co-polymer lipid particles (SMALPs), inhibidores de proteasas 1X, agua miliQ) y se incubaron durante 30 minutos a 4° C en agitación. La solubilización se clarificó mediante centrifugación (14.000 rpm, 10 minutos), de forma que los restos celulares precipitaron y los receptores se mantuvieron en solución.

4.3.2. Termoestabilidad basada en GFP (GFP-TS).

Para realizar los experimentos se utilizó la técnica de termoestabilidad basada en GFP, según se detalla en el artículo de Emmanuel Nji, Yurie Chatzikyriakidou et al (23). La técnica consiste en generar una proteína de fusión entre la proteína de interés y la GFP, y utilizar la señal fluorescente para seguir la desnaturalización de la proteína de interés. Para ello, alícuotas de receptor solubilizado se calientan en un rango de temperatura durante un tiempo determinado. Después, las muestras son centrifugadas para provocar la precipitación del receptor desnaturalizado y se determina la fluorescencia presente en el sobrenadante. Cuanta más proteína haya permanecido en estado nativo, y por tanto en solución, más intensidad de fluorescencia se detectará en la alícuota. Al representar la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura, los puntos correspondientes a cada alícuota conforman una curva de desnaturalización que se puede ajustar a una curva sigmoideal (Figura 4.2), en la que es posible localizar la temperatura a la que la mitad del receptor continúa en estado nativo (T_m).



Utilizando esta técnica de GFP-TS se midió la T_m de los receptores D₃R y D₄R. Para ello se tomaron 10 alícuotas de receptor solubilizado y se calentaron a: 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100° C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos. La medición de la fluorescencia se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos negra con fluorímetro Clario Star.

4.3.3. Optimización de la medida de afinidad de fármacos anti-Parkinson por el receptor D₃R.

Para buscar la temperatura óptima de trabajo (T_{opt}), el receptor con y sin fármaco se solubilizó y manipuló según lo descrito en los puntos 4.3.1. y 4.3.2, apareciendo para cada temperatura dos

medidas de fluorescencia, asociadas al receptor con y sin fármaco. Para las muestras con fármaco, los receptores fueron incubados con 200 μ M de ligando antes de la solubilización durante 30 minutos.

4.3.4. Medida de afinidad de fármacos anti-Parkinson por el receptor D₃R.

Para medir la afinidad de los fármacos se siguió un protocolo semejante al descrito en el punto 4.3.2. A diferencia de los ensayos de termoestabilidad, los receptores solubilizados se preincubaron a diferentes concentraciones de fármaco durante 30 minutos a 4° C. Seguidamente, se alicuotaron y calentaron a una única temperatura durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugaron y analizaron según el protocolo descrito en el punto 4.3.2.

4.3.5. Electroforesis de proteínas.

Electroforesis de proteínas en geles de SDS-PAGE

Las proteínas del solubilizado de células Tni que expresaban los receptores en su membrana se separaron mediante electroforesis en geles verticales desnaturizantes de SDS-PAGE comerciales FastCast de BioRad, de 12% de poliacrilamida (Anexo 1, tabla 4A). Se utilizó el running buffer Tris-Glicina (0,25 M, 1,92 M) 1X y las muestras se mezclaron con tampón de carga (Tris pH 6,8, DTT 100 mM, SDS 12%, azul de bromofenol 6X). Además, el marcador de peso molecular utilizado fue Color Prestained Protein Standard, Broad Range de New England BioLabs. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 300V durante 20 minutos.

Electroforesis en geles nativos

Se realizó la electroforesis en gel nativo del receptor D₄R, que tiene un punto isoeléctrico (pI) de 7,36. Se utilizó un gel Tris-Glicina (0,25 M, 1,92 M) pH 8,8, a una concentración de poliacrilamida del 8% (ver tabla 6A, anexo 1), quedando la proteína cargada negativamente y permitiendo su migración en el gel. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (Tris pH 6,8, azul de bromofenol 6X) y la electroforesis se realizó a 4° C a amperaje constante (40 mA) durante 2-3 horas.

4.3.6. Electrotransferencia e inmunodetección por Western-blot.

Se utilizó el kit comercial Transblot turbo RTA Mini Nitrocellulose. Se realizó una electrotransferencia semiseca a una membrana de nitrocelulosa. Para ello se colocaron, de abajo a arriba: 6 papeles de filtro superpuestos mojados en 20 ml de tampón de transferencia Trans-Blot Turbo 1X de Biorad, la membrana de nitrocelulosa, el gel y 6 papeles de filtro mojados en 20 ml de solución de transferencia. La transferencia se realizó en el sistema semiseco de transferencia “trans-blot turbo transfer system” durante 3 minutos.

La membrana se bloqueó durante 5 minutos con tampón de bloqueo EveryBlot Blocking buffer para evitar uniones inespecíficas. A continuación se añadió el anticuerpo primario conjugado Anti-His HRP (Santa Cruz), a una dilución de 1:1000, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora (o 4° C O/N). La membrana se lavó con solución TBS Tween 1X (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (w/v) Tween® 20) y se reveló por quimioluminiscencia con reactivos de revelado

Clarity™ Western ECL Substrate Luminol/Enhancer solution y Peroxide solution durante 5 minutos. Para la visualización de las membranas se utilizó el Chemidoc™ MP Imaging System de Biorad.

4.3.7. Purificación con resinas TALON®.

Las resinas de TALON® tienen cobalto, que se une a la cola de histidinas de la proteína de interés. Tras un previo equilibrado de la resina en tampón de lavado (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% DDM) se incubó el receptor solubilizado en agitación durante 30 minutos a 4° C. Seguidamente, se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 minutos con solución de lavado (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl). Después, se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 minutos y se eluyó con tampón de elución (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% DDM, imidazol 500 mM). El imidazol compete por la cola de histidinas con el cobalto de la resina, liberando la proteína de interés al sobrenadante.

4.3.8. Software y bibliografía.

Para el diseño de cebadores y cálculo de T_m se utilizaron los programas SnapGene y OligoCalc. Los datos de fluorescencia fueron analizados por el programa Prism 8.0, que también se utilizó para hacer los análisis estadísticos t-test. Para calcular el peso molecular y el pI de las proteínas de fusión se utilizó la herramienta ProtParam de ExPASy. Finalmente, el gestor bibliográfico utilizado fue Mendeley.

5. Resultados.

5.1. Puesta a punto de una técnica para medir la afinidad de fármacos por los receptores de dopamina.

5.1.1. Búsqueda de las condiciones óptimas para realizar las titulaciones.

Se utilizaron células Tni que expresaban el receptor D₃R fusionado a GFP (D₃R-GFP), se solubilizó el receptor con detergente DDM y se midió su termoestabilidad. Se realizaron 10 puntos, correspondientes a 10 temperaturas: 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100° C. Anteriormente el grupo de investigación había realizado más curvas de desnaturalización del receptor D₃R y obtuvo el mismo resultado.

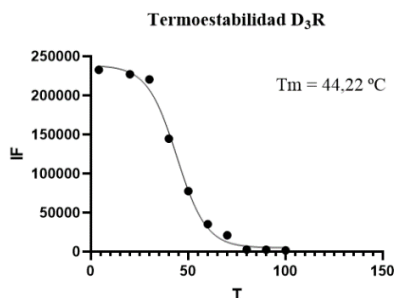


Figura 5.1: se representa la intensidad de fluorescencia (IF) frente a la temperatura. A menor IF menos cantidad de proteína permanece en solución y más proteína se ha desnaturalizado y precipitado. La temperatura a la que la mitad de la proteína está desnaturalizada es la T_m .

A continuación, se comenzó a optimizar la temperatura de trabajo, que se utilizaría posteriormente para realizar las titulaciones con los distintos fármacos. El objetivo era encontrar la temperatura a la que la diferencia de fluorescencia (y por tanto receptor estabilizado) es máxima ante la

presencia o ausencia del fármaco. Esto maximizaría el rango dinámico en las medidas de afinidad. Utilizando el receptor D₃R-GFP y el fármaco eticloprida a una concentración de 200 μ M, un antagonista de D₃R, se probaron diferentes temperaturas alrededor de la T_m (44,22° C), entre 41 y 54° C.

Puesto que la eticloprida estabiliza al receptor, la IF de las muestra con eticloprida será mayor que la de aquellas sin fármaco, ya que habrá más receptor que permanezca en solución. Se calculó la diferencia de IF de las muestras a cada temperatura con y sin fármaco para encontrar la temperatura a la que la diferencia fuese mayor. Esto es necesario porque a esta temperatura la estabilización es más evidente (hay más diferencia en la IF cuando el receptor está en solución o precipitado) y se utilizará para medir la constante de afinidad de los fármacos en las titulaciones. Se observa (Figura 5.2) que la mayor diferencia se encuentra en 49° C, por lo que se eligió esta temperatura como T_{opt}.

T (°C)	Δ IF	T (°C)	Δ IF
41	11265	48	99437
42	4573	49	110638
43	12874	50	26756
44	27715	51	26990
45	51538	52	25011
46	74789	53	42222
47	87732	54	16208

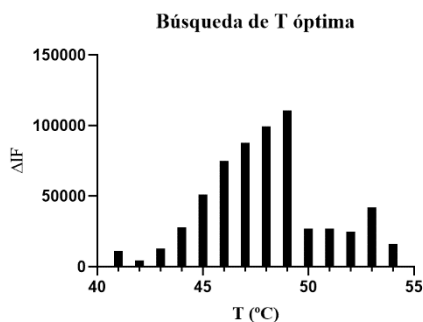
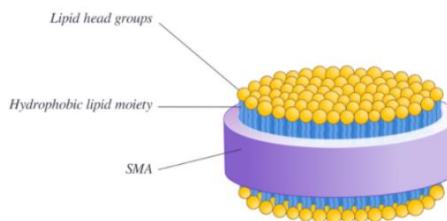


Figura 5.2: a la derecha se muestra la representación de la diferencia de IF frente a la temperatura y se observa que la mayor diferencia se encuentra a 49° C. A la izquierda se muestran los valores de Δ IF para cada temperatura.

Uso de styrene maleic acid co-polymer lipid particles (SMALPS)

Los SMALPS son una técnica de solubilización de la membrana plasmática sin detergentes. El ácido estireno-anhídrido maleico (SMA) interacciona con la bicapa lipídica para generar nanopartículas en forma de anillo llamadas SMALPS. La ventaja que ofrece este sistema es que, mientras que los detergentes ofrecen una aproximación del ambiente fisiológico de la membrana, en este caso se mantiene la membrana alrededor del receptor, de forma que se preservan las interacciones con los lípidos de membrana y la proteína se encuentra igual que en su estado fisiológico (24,25).

Figura 5.3: representación de un SMALP. Se observa el anillo de SMA rodeando a un fragmento de membrana.



Se utilizó este copolímero en lugar de detergente porque se quería observar si los lípidos tienen algún efecto en la afinidad de los fármacos y en la estabilidad del receptor D₃R. Para ello, se midió la T_m del receptor con el copolímero y se comparó con la obtenida anteriormente.

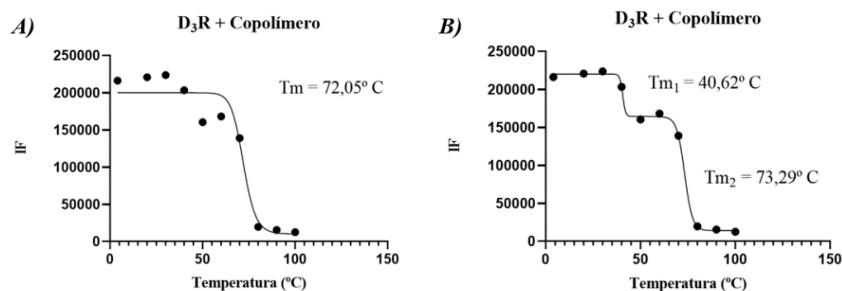


Figura 5.4: A) Curva sigmoideal de desnaturalización del receptor en presencia del copolímero ($n=2$). B) Curva bifásica de desnaturalización, que indica la presencia de dos especies en solución ($n=2$).

En estas condiciones, el ajuste de una curva sigmoideal proporciona una $T_m = 72,05^\circ \text{C}$. Sin embargo, los puntos se ajustan mejor a una curva bifásica (Figura 5.4 B), y se obtienen dos valores de T_m ($40,62^\circ \text{C}$ y $73,29^\circ \text{C}$), lo que indica la presencia de dos especies en solución. No se siguió investigando a qué puede deberse este fenómeno, podría estar ocasionado porque el receptor oligomeriza, de forma que una T_m correspondería al oligómero y la otra al monómero. Es un hallazgo interesante que será investigado más adelante. La complejidad de estas curvas no permitió un uso de los copolímeros para determinar la afinidad de los fármacos.

5.1.2. Estimaciones de afinidad de fármacos al receptor D₃R.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se comenzaron a realizar titulaciones con el receptor D₃R y distintos fármacos con el objetivo de determinar la constante de afinidad de cada uno de ellos. Primero se utilizó el fármaco eticloprida, un antagonista de D₃R. Tras solubilizar el receptor con DDM, se establecieron puntos a diferentes concentraciones (0, 2 pM, 20 pM, 200 pM, 2 nM, 20 nM, 200 nM, 2 μM , 20 μM , 200 μM), se calentaron a 49°C y se midió la intensidad de fluorescencia. Al representar la IF frente al logaritmo de la concentración de fármaco, se intentó ajustar una curva sigmoideal a los puntos. La constante de disociación del fármaco por el receptor (K_D) fue de 4575 nM (Figura 5.5), lejos del valor registrado en la base de datos IUPHAR (1,585 nM, ~ 2800 veces menor). Esta titulación se intentó repetir en 2 ocasiones, pero los datos obtenidos no se ajustaban a una curva sigmoideal y no se pudo calcular la K_D . Asimismo, para obtener una curva completa serían necesarios puntos de mayor concentración, y por ello se intentó aumentar el rango de concentraciones para añadir estos puntos en 3 ocasiones, pero los puntos que se obtuvieron no se ajustaban a una curva sigmoideal y no se pudieron determinar valores de K_D .

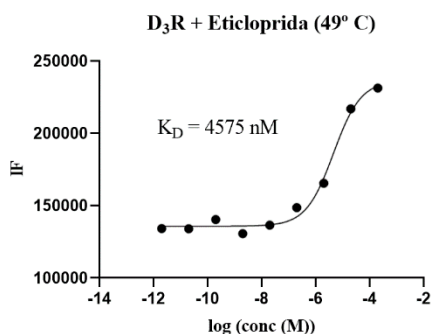


Figura 5.5: Titulación con eticloprida realizada a 49°C con el receptor D₃R.

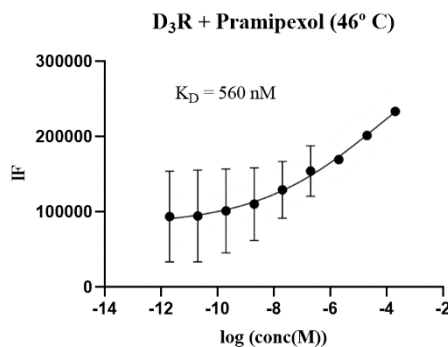


Figura 5.6: ajuste a curva sigmoideal de la titulación con pramipexol a 46°C con el receptor D₃R ($n=3$).

A continuación, se utilizó el pramipexol, un agonista de uso común en clínica, en el mismo rango de concentraciones. En este caso la temperatura óptima de trabajo es de 46° C, 2° C debajo de la T_m de la proteína en presencia de fármaco (48° C) calculada por el grupo de investigación en experimentos anteriores. Se asume que esta es la temperatura óptima porque en el caso de la eticloprida la T_{opt} se encontraba 2° C por debajo de la T_m de la proteína en presencia de fármaco y se extrapoló para el pramipexol.

Los puntos no se ajustan a una curva sigmoideal (Figura 5.6) y el error es muy grande en todos ellos. Asimismo, seguirían siendo necesarios puntos de mayor concentración, pero, aunque se intentó en 3 ocasiones, los puntos obtenidos al aumentar la concentración de fármaco no se ajustaban a una curva y no era posible calcular un valor de K_D . Por todos estos motivos el valor de 560 nM que se obtiene no es fiable y no es utilizado.

Tabla 5.1.

Fármaco	Kd (nM) IUPHAR	Kd (nM) empírica
Eticloprida	1,585	4575
Pramipexol	1,995 – 3,891	---

Tabla 5.1: muestra los valores de K_d obtenidos en el trabajo experimental, en un rango de concentraciones de entre 0 y 200 μM , y los registrados en la base de datos IUPHAR de los dos fármacos utilizados para las titulaciones realizadas con el receptor D3.

El valor de K_D obtenido para la eticloprida es ~ 2800 veces superior al registrado en la base de datos IUPHAR (Tabla 5.1). Es posible que al realizar la solubilización del receptor queden agregados de bajo peso molecular en suspensión que aumenten la señal fluorescente de forma inespecífica, dando lugar a valores de K_D superiores a los reales. Para provocar la precipitación de estos agregados de bajo peso molecular se utilizó el detergente β -octilglucósido (β -OG), pues se ha observado empíricamente que produce la precipitación de estos agregados. Así, se realizó una titulación en las mismas condiciones que la anterior (pramipexol, mismo rango de concentración, 46° C), pero añadiendo β -OG a una concentración del 1%.

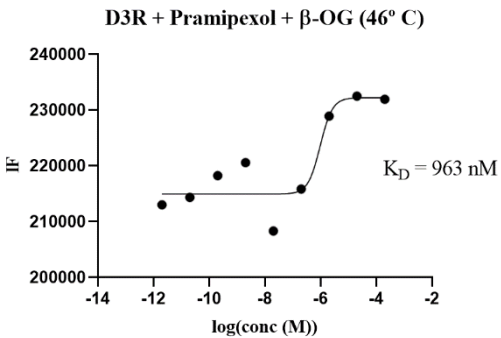


Figura 5.7: ajuste a una curva sigmoideal de la titulación con pramipexol y β -OG a 46° C y en un rango de concentraciones de entre 0 y 200 μM .

El valor de K_D obtenido en estas condiciones es de 963 nM, superior al obtenido en las condiciones anteriores (560 nM) y ~ 480 -241 veces mayor que el dato registrado en IUPHAR. Sin embargo, los puntos no se ajustan bien a una curva sigmoideal y por lo tanto este dato tampoco es fiable.

No se realizaron más réplicas porque el valor de 963 nM sigue siendo muy distante al registrado en IUPHAR (1,995-3,891 nM) y el ajuste de los puntos a una curva sigmoideal no es bueno, y por eso no se continuó investigando por esta línea. A continuación se muestra en una tabla un resumen de los valores de K_D obtenidos en diferentes condiciones.

Tabla 5.2.						
Fármaco	T	Rango de concentraciones	n	β-OG	K _D empíricas (nM)	K _D IUPHAR (nM)
Eticloprida	49	0-200 μM	1	No	4575	1,585
Pramipexol	46		3	No	560*	1,995 – 3,891
			1	Sí	963*	

Tabla 5.2: resumen de los valores de K_D obtenidos en el trabajo experimental, así como las diferentes condiciones de los experimentos. Asimismo, en la columna de la derecha se muestran los valores de K_D registrados en la base de datos IUPHAR. Los valores de K_D del pramipexol marcados con un asterisco no son fiables.

En estos experimentos se observa que los puntos no se ajustan correctamente a una curva sigmoidal y por eso los valores obtenidos al realizar el ajuste no son fiables. Por tanto, se puede concluir que esta técnica actualmente no puede ser utilizada para medir la afinidad de fármacos anti-Parkinson por receptores de dopamina y sería necesario continuar con la puesta a punto de la técnica.

5.1.3. Obtención de receptor D₃R mutante S9G.

Se realizó la PCR para introducir la mutación S9G en el constructo que contiene el gen del receptor D₃R (Figura 4.1. A). A continuación, se transformaron bacterias *E. coli* competentes con esta construcción y se extrajo el material genético mediante una miniprep. El DNA obtenido se utilizó para transfectar células Tni. El objetivo era obtener células Tni que expresasen el receptor D₃R mutante en su membrana, para generar pellets que se utilizarían en titulaciones con el receptor D₃R S9G y comparar los valores de K_D con los del receptor D₃R wild-type. Sin embargo, hubo problemas de contaminaciones y no se pudo obtener el receptor mutante. Por lo tanto, no se pudieron hacer titulaciones con este receptor.

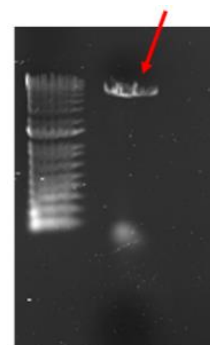


Figura 5.12: gel de agarosa con el resultado de la PCR. La banda de la derecha se corresponde al constructo del receptor

5.2. Obtención de receptor D₄R funcional.

5.2.1. Obtención de células que expresaban receptor D₄R.

El objetivo fue obtener receptor D₄R funcional para que en un futuro el grupo de investigación pueda realizar estudios estructurales. Se utilizó un virus que contenía el gen del receptor D₄R (Figura 4.1 B) y se infectaron células Tni para expresar el receptor.

5.2.2. Obtención de receptor D₄R estable en solución.

Para observar si al solubilizar se obtiene receptor estable en solución (en conformación nativa) se realizó una precipitación en resinas TALON®. Se utilizaron dos pellets: uno de las células que se habían infectado, que se llamó “n”, y otro de células que expresaban el receptor D₄R, que se habían generado con anterioridad a este proyecto, y que se llamó “v”. Las muestras que se tomaron

a lo largo de la precipitación fueron: load (L), Flow-through (FT), lavado (W) y elución (E); de forma que para cada muestra hay dos puntos, “n” y “v”.

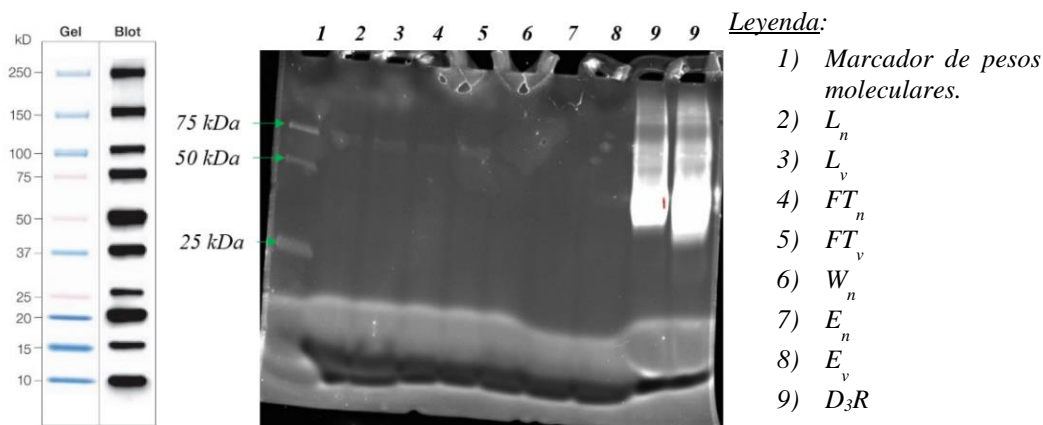


Figura 5.13: gel de poliácridamida en el que se muestran los resultados de la precipitación con resinas de TALON®. En los carriles de la derecha hay dos muestras de receptor D_3R . A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares Color Prestained Protein Standard, Broad Range de New England BioLabs, que se utilizó en todos los geles.

El peso molecular de la proteína es de 63,6 kDa y no se observa fluorescencia en los carriles de elución, donde debería encontrarse la proteína. En los carriles anteriores se aprecia una banda tenue a la altura de 75 kDa, que a priori no se corresponde con el receptor D_4R . Ante este resultado lo que se hizo fue comprobar de la misma manera si diferentes cepas de células de insecto influían en la expresión de receptor estable. Para ello se solubilizó el receptor de células Tni infectadas (n), Tni infectadas con anterioridad en el grupo (v) y Sf9 (una línea celular de insecto derivada de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda*) infectadas por el grupo (s). Además, se incluyó un control de receptor D_3R .

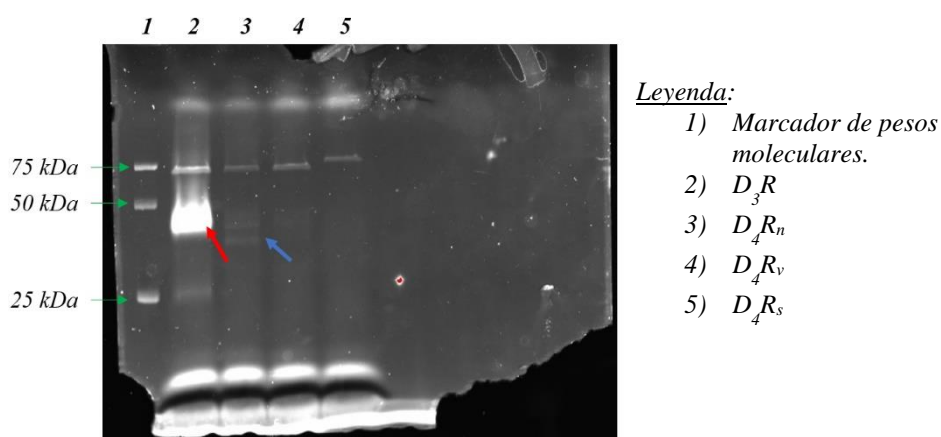


Figura 5.14: gel de poliácridamida con los solubilizados de los distintos pellets. La flecha roja marca la banda correspondiente al receptor D_3R . La flecha azul marca las bandas tenues que podrían corresponderse al receptor D_4R .

El receptor D_3R tiene un peso molecular de 65,6 kDa pero migra en electroforesis como una banda de 50 kDa. El receptor D_4R debería aparecer a una altura semejante al D_3R , por lo que las bandas que se observan a la altura de 75 kDa deben corresponderse a un contaminante. En el carril 3 se aprecian unas bandas tenues que se encuentran a la altura a la que se espera que aparezca el

receptor, mientras que en los carriles 4 y 5 no se observa fluorescencia a esa altura. Para determinar la presencia de D₄R se realizó un Western Blot con un anticuerpo anti-His.

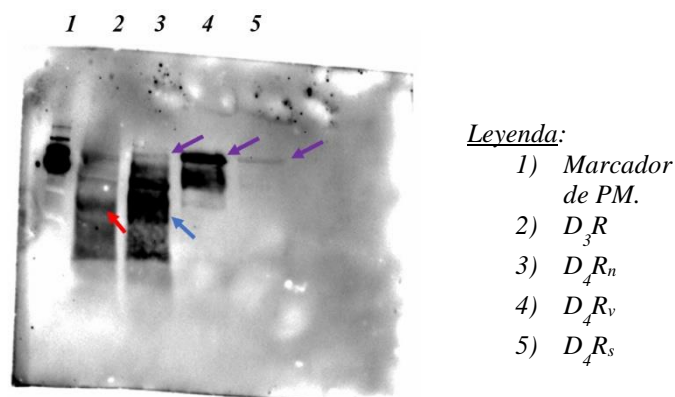


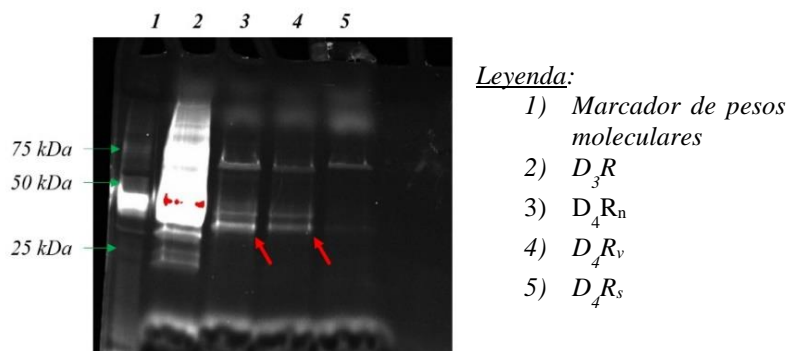
Figura 5.15: membrana de nitrocelulosa del Western-blot. La banda del receptor D₃R se indica con una flecha roja, y la zona donde se espera que aparezca el D₄R con una flecha azul. Las flechas moradas indican las bandas correspondientes al contaminante.

En el Western Blot (Figura 5.15) se observa una banda en el carril 3 a la altura de la banda correspondiente al D₃R, y en la misma localización en la que aparecían en el gel unas bandas tenues (Figura 5.14), por lo que podría tratarse de receptor D₄. Además, en el carril 4 y 5 se observan bandas inespecíficas y no hay ninguna banda a la altura a la que se espera que aparezca el receptor D₄R. Para evitar la aparición de estas bandas inespecíficas podría utilizarse un anticuerpo más específico, como uno anti-GFP, y también se podría añadir un control negativo. Por otra parte, en el Western Blot se puede observar que las bandas correspondientes al contaminante tienen diferentes intensidades, por lo que no es consistente con el gel (Figura 5.14) en el que todas las bandas a esa altura tenían la misma intensidad. Por eso, se concluye que se trata de un contaminante.

En el Western Blot (Figura 5.15), a la altura del receptor D₃R se observan proteínas en el carril 3 (D₄R_n), por lo que es probable que el receptor sí se encuentre en el solubilizado.

Hasta este momento la solubilización se había realizado con detergente DDM, puesto que funcionaba bien para el receptor D₃R (la señal fluorescente era elevada, lo que indicaba que gran cantidad de D₃R-GFP se encontraba en solución), pero era posible que no estabilizase lo suficiente al receptor D₄R y este se estuviera desnaturalizando. Esto explicaría por qué no se observa la proteína en los geles de poliacrilamida. Para probar esta hipótesis se utilizó el detergente LMNG + CHS, que estabiliza en mayor medida que el DDM, para realizar la solubilización y luego se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Figura 5.17: gel de poliacrilamida con los solubilizados de los distintos pellets en presencia de LMNG+CHS. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes al receptor D₄R.



En este caso, se sigue observando el contaminante a 75 kDa, pero también se observan dos bandas claramente a la altura del receptor D₃R (*flechas rojas, Figura 5.17*) que se corresponden con el receptor D₄R. Es probable que las dos bandas se deban a los diferentes estados de glicosilación del receptor. Una vez establecidas las condiciones en las que se obtiene el receptor en solución se procedió a realizar distintos experimentos para encontrar las condiciones donde el receptor es más estable en solución.

5.2.3. Estudio de la funcionalidad del receptor D₄R.

El objetivo fue obtener receptor D₄R funcional, es decir, que se una a fármaco y además se una a proteína G. Primero se realizó una curva de termoestabilidad del receptor con DDM para obtener su T_m, que fue de 46,31° C. Como se había observado que el DDM no estabiliza al receptor, se realizaron 4 réplicas de una curva de termoestabilidad con LMNG + CHS (*Figura 5.19*). Así, se obtuvo una T_m = 61,2° C, 14,9° C mayor que en presencia de DDM.

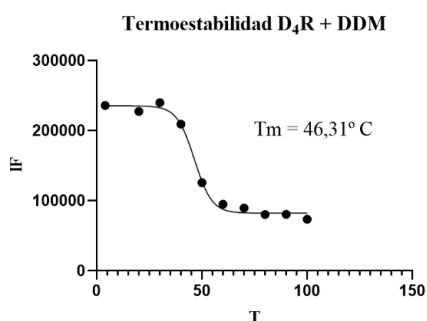


Figura 5.18: curva sigmoidal de desnaturalización del receptor D₄R solubilizado en DDM.

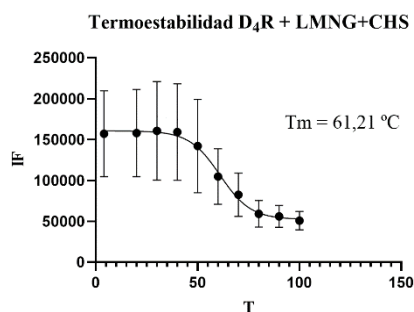


Figura 5.19: curva sigmoidal de desnaturalización del receptor D₄R solubilizado en LMNG + CHS.

Para observar si el receptor solubilizado se une a fármaco y a proteína G se realizó un gel nativo con muestras de receptor en distintas condiciones, con el objetivo de observar si la migración variaba, lo que indicaría que se une a la proteína G, a fármaco o a ambos.

Leyenda:

- 1) D₃
- 2) D₄_RG
- 3) D₄_R
- 4) D₄_LMNG
- 5) D₄_DDM
- 6) PM

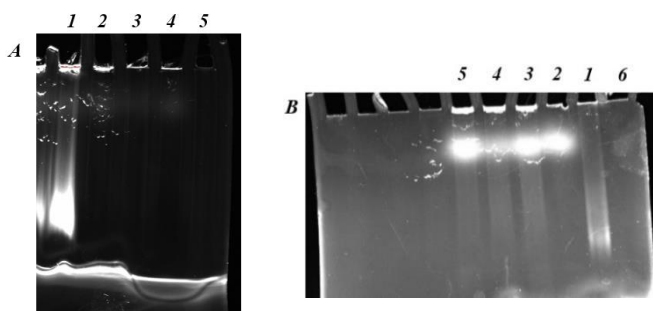


Figura 5.19: A) Primer gel nativo realizado. B) Segundo gel nativo realizado. En este caso en la solubilización se añadió β-OG para provocar la precipitación de los posibles agregados. En ambos geles la "R" indica que la muestra fue incubada con rotigotina, y "RG" indica que fue incubada con rotigotina y mini G₀.

El fármaco que se utilizó para realizar el ensayo fue la rotigotina, un agonista del receptor D₄R, y la proteína G que se utilizó fue la mini G₀. Esta proteína consiste en la clase G₀ de la subunidad G_α, que ha sido generada por ingeniería genética para que sea termoestable y pueda unir y estabilizar a GPCRs sin la necesidad de tener G_β y G_γ (26).

En el gel no se observa fluorescencia en los carriles correspondientes al receptor D₄R (Figura 5.19 A). Se pensó que podría haber agregados que eviten la entrada de la proteína en el gel, por lo que se utilizó β -OG para provocar su precipitación y se volvió a realizar un gel nativo (Figura 5.19 B). Se observa fluorescencia en los pocillos, lo que podría ocurrir porque el receptor quedaba en los pocillos y no entraba en el gel. Si el receptor no entra en el gel podría ser porque agrega en solución o en el propio gel. Para probar si el receptor está agregado en solución se realizó un experimento de termoestabilidad con rotigotina y β -OG. Si las muestras calentadas a distintas temperaturas no emitían fluorescencia significaría que el receptor está agregado en solución y precipita con las centrifugaciones y el β -OG. Sin embargo, los puntos se pudieron ajustar a una curva sigmoideal (Figura 5.20 A) y se obtuvo una T_m de 57,60 °C, por lo que el receptor no estaba agregado en solución. Sin embargo, podrían haber agregados de menor tamaño que no se estuviesen eliminando con el β -OG. Para asegurar que estos agregados eran eliminados se ultracentrifugaron las muestras, de forma que si al medir la fluorescencia después del procedimiento las muestras aún emitían fluorescencia significaría que el receptor agregaba en el gel nativo. Ultracentrifugando se hicieron dos curvas de termoestabilidad, una con eticloprida y otra con rotigotina. En ambos casos los puntos se ajustaban a una curva (Figura 5.20 B) y se obtuvieron valores de T_m de 60,82° C para la muestra con rotigotina y 63,76° C para la muestra con eticloprida.

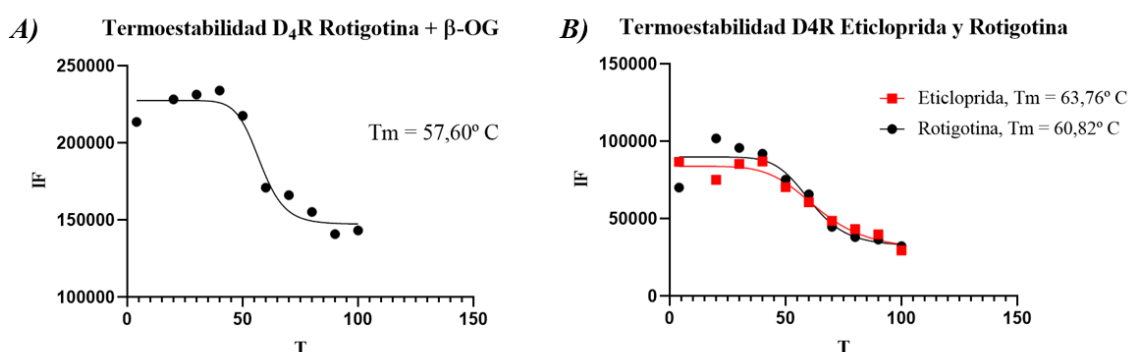


Figura 5.20: A) Curva de termoestabilidad con rotigotina y β -OG. B) Curva de termoestabilidad con eticloprida en rojo, y curva de termoestabilidad con rotigotina en negro.

Así se concluyó que el receptor D₄R agrega en el gel nativo y por eso permanece en el pocillo y no migra. Para evaluar la funcionalidad del receptor sería necesario emplear otra técnica.

5.2.4. Búsqueda del estado más estable del receptor D₄R.

Se realizaron diferentes experimentos de termoestabilidad del receptor D₄R en diferentes condiciones, que se muestran en la tabla 5.3. Para cada condición se calculó la T_m media, que se muestra en la figura 5.18.

Los ensayos de termoestabilidad se realizaron con: solubilizado con DDM y solubilizado con LMNG+CHS. Además, solubilizando con LMNG+CHS se ensayaron distintos fármacos: rotigotina (agonista), dopamina (agonista) y eticloprida (antagonista). Por otra parte, se utilizó la proteína mini Go, y el detergente β -OG.

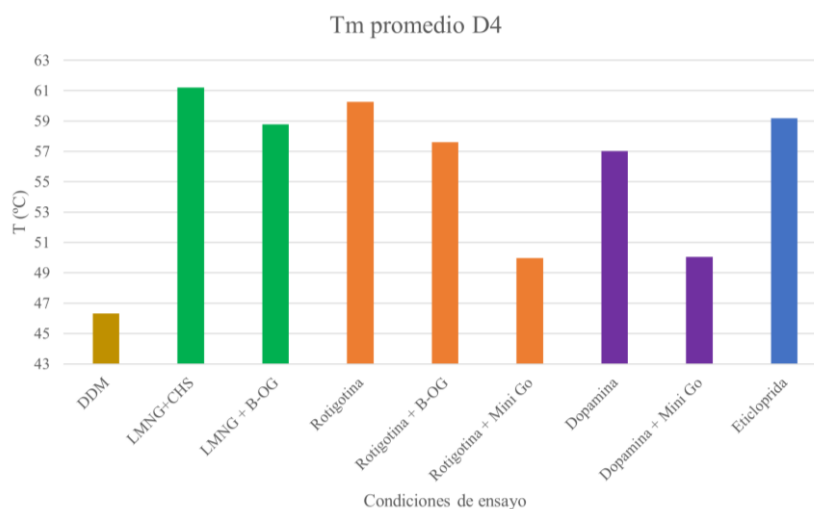


Figura 5.18: representación de las T_m medias en las diferentes condiciones ensayadas. En amarillo se representa la muestra con DDM, en verde con LMNG + CHS, en naranja con la rotigotina (fármaco agonista), en morado la dopamina y en azul con eticloprida (fármaco antagonista).

Condiciones experimentales	n	T_m media	t-test
DDM	1	46,31	---
LMNG+CHS	4	61,21	Control
LMNG+CHS + β -OG	3	58,78	NS
Rotigotina	3	60,27	NS
Rotigotina + β -OG	1	57,60	---
Rotigotina + Mini Go	2	49,97	**
Dopamina	2	57,02	NS
Dopamina + Mini Go	1	50,04	---
Eticloprida	4	59,18	NS

Figura 5.3: se muestran las distintas condiciones experimentales, así como el número de réplicas realizadas en cada caso y los valores medios de T_m obtenidos. Las curvas sigmoidales de las que se han obtenido estos valores se muestran en el anexo 3. En la tabla también se muestran los resultados de los t-test para ver si las variaciones eran estadísticamente significativas. “NS” indica que la variación no es significativa estadísticamente, mientras que los asteriscos marcan cómo de significativa es.

Los t-test se realizaron comparando cada condición $n > 1$ con la condición de LMNG + CHS (control positivo), de manera que se observó si la variación observada en cada caso era o no significativa estadísticamente.

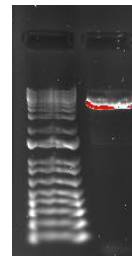
Se observa que la T_m en presencia de LMNG + CHS (61,21° C) es 14,9° C mayor que en presencia de DDM (46,31° C), lo que era de esperar en vista a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Sin embargo el resto de los resultados son contrarios a los esperados. La T_m media de las condiciones con mini G_O es 50,01° C, la menor de todas las condiciones, cuando debería ser la mayor porque la mini G_O está diseñada para estabilizar a GPCRs. Además, se observa que en todos los casos, al añadir fármaco (agonista o antagonista) la T_m disminuye, pero estas variaciones no son estadísticamente significativas, por lo que la adición de fármacos al receptor solubilizado en LMNG + CHS no modifica su estabilidad en solución.

5.2.5. Obtención del receptor D₄R mutante F124W.

El interés de obtener este receptor mutante reside en que se ha observado que aumenta la expresión del receptor. Se realizó la PCR para introducir la mutación en el constructo que contiene el gen del receptor D₄R (*Figura 4.1 B*) y el DNA obtenido se utilizó para transfectar células Tni.

No obstante, aunque se realizó la transfección en 3 ocasiones, hubo problemas de contaminaciones y no pudo obtenerse el receptor mutante, por lo que no se utilizó para otros experimentos.

Figura 5.19: gel de agarosa con el resultado de la PCR. La banda de la derecha se corresponde con el constructo del receptor mutado.



6. Discusión.

En este trabajo se ha pretendido poner a punto un método para medir la afinidad de fármacos por los receptores de dopamina, como solución a los problemas de medición que se han reportado por diferentes laboratorios (8,14,15). Para ello, utilizando el receptor D₃R, primero se buscaron las condiciones óptimas para realizar titulaciones con diferentes fármacos anti-Parkinson. En esta búsqueda se intentó solubilizar el receptor en membrana lipídica utilizando SMALPs y al realizar un ensayo de termoestabilidad se obtuvo una curva de desnaturalización bifásica (*Figura 5.4*). Esto podría indicar la presencia de dos especies en solución, que podrían ser el receptor monomérico y oligomerizado o complejos del receptor con una proteína de insecto que se encuentre también en *Homo sapiens*. Sin embargo no se siguió estudiando este fenómeno ni se continuó solubilizando en membrana lipídica porque todavía no hay explicación que justifique la presencia de una curva bifásica.

Las titulaciones se realizaron solubilizando con DDM y calentando a una temperatura de 2° C inferior a la T_m del receptor en presencia del fármaco. Los valores de K_D obtenidos variaban mucho en los diferentes ensayos y todos ellos eran ~241-2800 veces mayores que los valores registrados en la base de datos IUPHAR (*Tabla 5.2*). Hay varias causas posibles que podrían afectar al valor de la K_D y que provocasen que aumente tanto. Por una parte, al extraer al receptor de la membrana su entorno cambia porque se pierden interacciones con los lípidos de membrana, y esto podría estar afectando al valor de la K_D. Utilizando los SMALPs se podría seguir investigando cuál es el efecto de los lípidos de membrana sobre el valor de esta constante, pero no se siguió estudiando por la complejidad de las curvas obtenidas en presencia del copolímero.

En cuanto a los valores, solo se obtuvo un valor de K_D para la eticloprida (4575 nM) y aunque se intentaron realizar dos réplicas más de esa titulación los datos obtenidos no se ajustaban a una curva y no fue posible. Además, el valor de K_D = 560 nM obtenido para el pramipexol se obtuvo tras 2 intentos fallidos de realizar la titulación, y las 3 réplicas de las que se ha obtenido este dato son muy dispares. Por tanto, sería necesario realizar más réplicas para obtener un valor fiable que pueda compararse con el valor de K_D = 963 nM obtenido al añadir β-OG en la solubilización. En todas las titulaciones faltan puntos de mayor concentración. Por otra parte, se intentó cambiar el rango de concentraciones para añadir puntos de una concentración mayor en 3 ocasiones, pero los datos obtenidos no se ajustaban a una curva sigmoideal y será necesario seguir optimizando el método para incluirlos. Por tanto, actualmente esta técnica, aunque ha probado ser útil para medir la termoestabilidad de los receptores de dopamina, no sería adecuada para medir la afinidad de

fármacos anti-Parkinson por los receptores de dopamina. No obstante, se seguirá trabajando en la optimización del método para ampliar el rango de concentraciones y obtener resultados más homogéneos, de forma que pueda ser utilizarlo con este fin.

Otro de los objetivos de este trabajo era determinar si la mutación S9G en el receptor D₃R influye en la afinidad de los fármacos por el receptor. No ha sido posible determinarlo porque, a pesar de que sí pudo generarse el constructo genético del receptor mutado, al transfectarlo en células Tni de insecto hubo problemas de contaminaciones y no pudo obtenerse en solución. Las contaminaciones pudieron ser causadas porque el DNA estuviese contaminado, pero no se repitió el proceso por falta de tiempo.

El tercer objetivo consistía en obtener receptor D₄R funcional *in vitro*. Se obtuvieron células Tni que expresaban el receptor D₄R y, mediante la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida, se observó que el receptor es muy inestable en DDM (Figuras 5.14 y 5.15), pero sí permanecía estable en solución al solubilizar con LMNG + CHS (Figura 5.17). Esto tiene sentido porque el LMNG + CHS es un detergente menos agresivo que mantiene más la estructura de la proteína. Se modificó así el protocolo de solubilización y solubilizando con LMNG + CHS se estudiaron diferentes condiciones de termoestabilidad del receptor D₄R. Así se ha observado que el receptor es más estable en ausencia proteína G (Figura 5.18 y tabla 5.3), pues la T_m media de las condiciones con mini G₀ (50,01° C) es ~11° C menor que en la proteína con LMNG + CHS (61,21° C). Además, utilizando el programa Prism 8.0 se ha observado que la variación es estadísticamente significativa. Por otra parte, se ha observado que al añadir fármacos los valores de T_m disminuían, pero esta variación no es significativa estadísticamente, por lo que se puede concluir que el receptor es más estable en LMNG + CHS y los fármacos no alteran su estabilidad en solución. Este resultado es singular, pues se espera que los fármacos estabilicen al receptor (los antagonistas más que los agonistas).

Finalmente, se trató de obtener el receptor D₄R mutante F124W. Sin embargo, no se pudo obtener porque, al igual que ocurrió con el receptor D₃R, se generó el constructo genético del receptor mutado y se transfectó en células Tni de insecto, pero hubo problemas de contaminaciones y no pudo obtenerse en solución. Como se ha comentado, estas contaminaciones pudieron ser causadas porque el DNA estuviese contaminado, pero no pudo repetirse el proceso por falta de tiempo.

7. Conclusiones y perspectivas futuras.

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- 1) El método de termoestabilidad basada en GFP (GFP-TS) es fiable para medir la termoestabilidad de los receptores de dopamina, pero en el estado actual es poco reproducible y, por tanto, poco fiable para medir la afinidad de los fármacos anti-Parkinson por los receptores.
- 2) Se puede continuar con la puesta a punto del método GFP-TS para la medida de la afinidad de fármacos anti-Parkinson, centrándose en aumentar el rango de concentraciones y obtener valores de K_D más homogéneos.
- 3) Los constructos genéticos de los receptores mutantes D₃R S9G y D₄R F124W están preparados para ser utilizados en la determinación de afinidad de fármacos y estudios estructurales.

- 4) El receptor D₄R es más estable en LMNG + CHS que en DDM, y que en presencia de proteínas G. Sin embargo, los fármacos no modifican su estabilidad.
- 5) Se ha encontrado en qué condición es más estable el receptor D₄R en solución (en presencia de LMNG + CHS), por lo que puede llevarse a la siguiente fase de estudio estructural.

7. Conclusions

In view of the results obtained, it can be concluded that:

- 1) The GFP-based thermostability (GFP-TS) method is reliable for measuring dopamine receptors' thermostability, but in the current state it is difficult to reproduce and therefore, not very reliable for measuring anti-Parkinson drug affinities to the receptors.
- 2) The GFP-TS method can continue to be adjusted to measure anti-Parkinson drug affinities, focusing on increasing the concentration range and obtaining more homogeneous K_D values.
- 3) The D₃R S9G mutant receptor and the D₄R F124W mutant receptor genetic constructs are ready for use.
- 4) The D₄R receptor is more stable in LMNG + CHS than in DDM, and also than in the presence of G proteins. Nevertheless, drugs do not affect its stability.
- 5) The condition has been found in which the D₄R in solution is most stable (in the presence of LMNG + CHS); therefore, it can be taken to the next phase of structural study,

8. Bibliografía.

1. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 2018 391 [Internet]. 2018 Nov 16 [cited 2021 Jul 19];39(1):31–59. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-018-0632-3>
2. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Vol. 63, *Pharmacological Reviews*. 2011. p. 182–217.
3. Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J Ment Disord Treat*. 2016;2(2).
4. P R, G H, K VC. The dopamine D₄ receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jul 24];67(12):1971–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20165900/>
5. Beaulieu J-M, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Jul 20];172(1):1–23. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.12906>
6. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 39 [Internet]. 2002 Sep [cited 2021 Jul 20];3(9):639–50. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm908>
7. Leggio GM, Bucolo C, Platania CBM, Salomone S, Drago F. Current drug treatments targeting dopamine D₃ receptor. *Pharmacol Ther*. 2016 Sep 1;165:164–77.
8. AE M, RB F, DR S. Advances and challenges in the search for D₂ and D₃ dopamine receptor-selective compounds. *Cell Signal* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Jul 25];41:75–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28716664/>
9. Yang P, Perlmutter JS, Benzinger TLS, Morris JC, Xu J. Dopamine D₃ receptor: a neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? *Ageing Res Rev* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Jul 23];57:100994. Available from: [/pmc/articles/PMC6939386/](https://pmc/articles/PMC6939386/)

10. Giorgioni G, Del Bello F, Pavletić P, Quaglia W, Botticelli L, Cifani C, et al. Recent findings leading to the discovery of selective dopamine D4 receptor ligands for the treatment of widespread diseases. *Eur J Med Chem*. 2021 Feb 15;212:113141.
11. Cokan KB, Mavri M, Rutland CS, Glišić S, Senčanski M, Vrecl M, et al. Critical Impact of Different Conserved Endoplasmic Retention Motifs and Dopamine Receptor Interacting Proteins (DRIPs) on Intracellular Localization and Trafficking of the D2 Dopamine Receptor (D2-R) Isoforms. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Jul 25];10(10):1–18. Available from: [/pmc/articles/PMC7598153/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22093536/)
12. K K, L F, Z K, S B. Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. *Int J Clin Pract* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Jul 23];65(12):1289–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22093536/>
13. YZ L, BS T, XX Y, J L, DS O, LN N, et al. Association of the DRD2 and DRD3 polymorphisms with response to pramipexole in Parkinson's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 Jul 23];65(7):679–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19396436/>
14. F B, P G. The structural evolution of dopamine D3 receptor ligands: structure-activity relationships and selected neuropharmacological aspects. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Oct [cited 2021 Aug 5];112(1):281–333. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16905195/>
15. GT C, AH N, P G, KC R, SM H, C C, et al. Yawning and hypothermia in rats: effects of dopamine D3 and D2 agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2007 Aug [cited 2021 Aug 5];193(2):159–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17393143/>
16. rs6280 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. [cited 2021 Apr 27]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6280#frequency_tab
17. rs6280 - SNPedia [Internet]. [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs6280>
18. S X, J L, X Y, Y Q, Q X. Association of the DRD2 CA n-STR and DRD3 Ser9Gly polymorphisms with Parkinson's disease and response to dopamine agonists. *J Neurol Sci* [Internet]. 2017 Jan 15 [cited 2021 Jul 24];372:433–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27817855/>
19. Xu P, Huang S, Mao C, Krumm BE, Zhou XE, Tan Y, et al. Structures of the human dopamine D3 receptor-Gi complexes. *Mol Cell* [Internet]. 2021;81(6):1147–1159.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.003>
20. CW L, CR H. Return of D 4 Dopamine Receptor Antagonists in Drug Discovery. *J Med Chem* [Internet]. 2017 Sep 14 [cited 2021 Jul 24];60(17):7233–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28489950/>
21. García-Nafria J, Watson JF, Greger IH. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. Vol. 6, *Scientific Reports*. 2016.
22. Watson JF, García-Nafria J. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. Vol. 294, *Journal of Biological Chemistry*. 2019. p. 15271–81.
23. Nji E, Chatzikyriakidou Y, Landreh M, Drew D. An engineered thermal-shift screen reveals specific lipid preferences of eukaryotic and prokaryotic membrane proteins. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 May 24];9(1):1–12. Available from: www.nature.com/naturecommunications
24. Postis V, Rawson S, Mitchell JK, Lee SC, Parslow RA, Dafforn TR, et al. The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2015 Feb 1;1848(2):496–501.
25. 5.3: Styrene Maleic Acid Lipid Particles (SMALP) Technology - Physics LibreTexts [Internet]. [cited 2021 Aug 17]. Available from: [https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD%3A_Biophysics_241_-_Membrane_Biology/05%3A_Experimental_Characterization_-_Spectroscopy_and_Microscopy/5.03%3A_Styrene_Maleic_Acid_Lipid_Particles_\(SMALP\)_Technology](https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD%3A_Biophysics_241_-_Membrane_Biology/05%3A_Experimental_Characterization_-_Spectroscopy_and_Microscopy/5.03%3A_Styrene_Maleic_Acid_Lipid_Particles_(SMALP)_Technology)

26. Nehmé R, Carpenter B, Singhal A, Strega A, Edwards PC, White CF, et al. Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation. PLoS One [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Aug 18];12(4):e0175642. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175642>

Anexos

Anexo 1: tablas.

Tabla 1A: Cebadores utilizados en las PCR para realizar el mutante F124W del receptor D4 y el mutante S9G del receptor D3.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
DRD4 (Receptor D4)	D4R_F124W_Fw	C TTT GTA CGG CTT CTA TT TGG AAC CTT TGC GCT ATC AGT G
	D4R_F124W_Rev	CCAAAT AGA AGC CGT ACA AAG CAT CAC G
DRD3 (Receptor D3)	D3R_S9G_Fw	TCT CTG AGC CAG CTG AGT GGT CAC CTG AAC TAC ACC TGT G
	D3R_S9G_Rv	ACT CAG CTG GCT CAG AGA TGC GTG ATG GTG GTG GTG ATG A

Tabla 2A: composición de la mezcla de PCR.

Componente	Volumen (µl)
Oligos diluidos 1/20 en agua miliQ	1
Vector (1ng/ml)	1
Buffer de Phusion HF (5X)	5
dNTPs (2,5 mM)	2,5
DNA polimerasa Phusion de alta fidelidad (HF)	0,25
Betaína (5M)	5
DMSO (2,5%)	0,625
Agua	9,625

Tabla 3A: composición de los buffers de miniprep.

Buffer P1	50 mM Tris-HCl 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNasa A
Buffer P2	200 mM NaOH 1% SDS
Buffer N3	4,2 M clorhidrato de guanidina 0,9 M acetato de potasio pH 4,8
Buffer PE	10 mM Tris-HCl pH 7,5 80% etanol
Buffer EB	10 mM Tris-HCl pH 8

Tabla 4A: composición de los geles comerciales de poliacrilamida 12% FastCast de Biorad utilizados para la electroforesis SDS-PAGE.

Gel separador	2,5 ml solución comercial A 2,5 ml solución comercial B 25 µl APS 2,5 µl TEMED
Gel concentrador	0,6 ml solución comercial A 0,6 ml solución comercial B 6 µl APS 1,2 µl TEMED

Tabla 6A: composición de los geles nativos de poliacrilamida 8%.

Componente	Cantidad
H ₂ O	4,68 ml
Acrilamida 30%	2,66 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
APS 20%	100 µl
TEMED	10 µl

Anexo 2: programas PCR.

A) Programa PCR mutagénesis.

- | | | |
|--------------------------------|------|--|
| 1- Desnaturalización
previa | 30'' | 98° C |
| 2- Desnaturalización | 10'' | 98° C |
| 3- Hibridación | 30'' | T _m para cada pareja de cebadores |
| 4- Extensión | 3' | 72° C (temperatura de actuación de Phusion HF) |
| 5- Final de la reacción | 10' | 72° C |

La temperatura de hibridación (T_m) en cada caso dependía del par de cebadores utilizados. En el caso de los cebadores utilizados para realizar el mutante F124W del receptor D4 la T_m era 55° C, mientras que en el caso de los cebadores utilizados para generar el mutante S9G del receptor D3 la T_m era 54° C.

Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron durante 18 ciclos.

Anexo 3: gráficas de termoestabilidad del receptor D4R.

