



Universidad
Zaragoza



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

Trabajo Fin de Grado

Impacto de variantes genéticas en la señalización del receptor de dopamina 3 por fármacos de Parkinson

Impact of genetic variants on dopamine receptor 3
signaling by Parkinson's drugs

Autor

Javier Castillo García

Directores

Javier García Nafría
Sandra Arroyo Urea

Facultad de Ciencias
Año 2023/2024

Índice

1. Resumen	1
1. Abstract	1
2. Introducción	2
2.1. Enfermedad de Parkinson y sistema dopaminérgico.....	2
2.2. Tratamiento del Parkinson: Relevancia clínica del receptor de dopamina D ₃	3
2.3. Relevancia clínica del estudio de los polimorfismos de D ₃ R: Medicina personalizada.....	3
2.4. Mecanismo de acción de D ₃ R.....	4
3. Objetivos	4
4. Materiales y métodos	5
4.1. Clonajes: Generación de mutantes.....	5
4.1.1. IVA cloning: Diseño de cebadores, PCR y transformación en <i>E.coli</i>	5
4.1.2. Amplificación y purificación de ADN plasmídico.....	6
4.1.3. Verificación de los mutantes generados.....	6
4.2. Cultivos celulares.....	6
4.2.1. Mantenimiento de líneas celulares.....	6
4.3. Cuantificación del receptor en superficie celular.....	6
4.3.1. Fundamentos del ensayo de expresión en superficie.....	6
4.3.2. Preparación de placas para el ensayo de expresión en superficie.....	7
4.3.3. Transfección de células HEK 293T.....	7
4.3.4. Ensayo de expresión en superficie.....	7
4.3.5. Análisis estadístico.....	7
4.4. Ensayos de señalización celular para determinar EC ₅₀ y eficacia.....	8
4.4.1. Fundamentos del ensayo TRUPATH.....	8
4.4.2. Preparación de placas para el ensayo TRUPATH.....	8
4.4.3. Transfección de células HEK293T.....	8
4.4.4. Ensayo TRUPATH.....	9
4.4.5. Análisis estadístico.....	9
4.5. Acoplamiento molecular entre D ₃ R y quinpirol.....	9
5. Resultados	9
5.1. Análisis estructural de D ₃ R: Selección de polimorfismos.....	9
5.2. Generación de mutantes.....	13
5.3. Validación de equivalencia funcional entre constructos GFP y ΔGFP.....	13
5.3.1. Cuantificación de receptor en superficie celular.....	13
5.3.2. Equivalencia de EC ₅₀ y eficacia	14
5.4. Farmacología.....	15

5.4.1. Efecto funcional de las variantes de D ₃ R: Quinpirol como agonista.....	15
5.4.2. Modo de unión de quinpirol, pramipexol y FOB02-04A a D ₃ R.....	16
5.4.3. Efecto funcional de la variante S9G: Efecto de varios ligandos.....	18
5.4.4. Efecto funcional de la variante F346L: Efecto de varios ligandos.....	18
5.5. Análisis estructural	19
5.5.1. Resultados del acoplamiento molecular entre D ₃ R y quinpirol.....	19
5.5.2. Relación estructura-función de la variante F346L	20
6. Discusión	21
7. Conclusiones.....	22
7. Conclusions.....	23
8. Bibliografía.....	23
9. Anexos.....	26

1. Resumen

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente del mundo. Con una incidencia global de 15 personas por cada 100.000 habitantes, su prevalencia no ha dejado de aumentar en Europa durante las tres últimas décadas. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del cerebro, por lo que el tratamiento habitual de la enfermedad se suele suplementar con agonistas de los receptores de dopamina.

De entre los 5 subtipos de estos receptores se ha determinado que el receptor de dopamina D₃R posee hasta 20 veces mayor afinidad por la unión de agonistas comúnmente utilizados en clínica, lo que postula a D₃R como una diana relevante en el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), DRD3 es un gen muy polimórfico, de forma que frente a un mismo tratamiento la respuesta asociada de cada paciente no es homogénea.

Basándonos en la estructura tridimensional del receptor, se han seleccionado variantes de D₃R con potencial para alterar su función y se han caracterizado sus propiedades farmacológicas (potencia y eficacia) a través de ensayos celulares BRET con el objetivo de entender si estos polimorfismos presentes en la población tienen un impacto funcional.

En el presente trabajo se han encontrado variantes con un impacto significativo en la función del receptor, incluyendo un polimorfismo en el sitio de unión a ligando que disminuye la potencia de los agonistas (~40x) y aumenta su eficacia dependiente del tipo de fármaco (mutación F346L), así como un polimorfismo (S9G) que posee mayor eficacia independientemente del agonista usado. Otras variantes presentes en posiciones del receptor con potencial para modificar su función no han presentado variaciones significativas en potencia ni eficacia (variante V214A). Además, a lo largo del trabajo se cuantificó la expresión en superficie de estos polimorfismos y se determinó que el extremo N-terminal del receptor está implicado en el reconocimiento de agonistas. También se intentó dilucidar su mecanismo de acción, comprobando si esta región se pliega sobre el bolsillo de unión a ligando. Los resultados servirán potencialmente para optimizar el tipo y la dosis de fármacos para cada individuo.

1. Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder in the world. With a global incidence rate of 15:100.000, its prevalence has been increased in Europe for the past 3 decades. PD is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the brain. For this reason, the common treatment of PD is usually improved with dopamine receptor agonists.

Among the 5 subtypes of these dopamine receptors, it has been reported that D₃R has until 20 times more affinity for clinical commonly used agonists, so D₃R has been postulated like a relevant target in PD. In line with other G protein coupled receptors (GPCRs), DRD3 is a highly polymorphic gene so with the same treatment the therapeutical response for each patient is not homogeneous.

Through the three-dimensional structure of dopamine D₃ receptor, it has been selected D₃R polymorphisms with potential for modifying its function and it has been characterized its pharmacological properties (potency and efficacy) through BRET cellular assays for understand if these population variants have functional changes.

In this work, we have reported polymorphisms with a significant impact in receptor function, including a variant in the ligand binding pocket that decreases the potency of agonists (~40x) and increases their drug-dependent efficacy (F346L variant), as well as a polymorphism (S9G) that has higher efficacy independent of the drug applied. Other variants with structural potential for modifying its function do not have shown significant changes in potency or efficacy (V214A polymorphism). Moreover, in this research we have also quantified variations in surface expression between polymorphisms and we have been reported that N-terminal region of the receptor participates in agonists binding. Furthermore, we tried to elucidate the mode of action of this region, checking if N-terminal folds above the ligand binding pocket.

2. Introducción

2.1 Enfermedad de Parkinson y sistema dopaminérgico

La enfermedad de Parkinson es, tras el Alzheimer, la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en el mundo. Posee una incidencia global de 15 personas por cada 100.000 habitantes, pero esta cifra aumenta con la edad (principal factor de riesgo de la enfermedad) hasta el 1% de la población mayor de 65 años y el 5% de los mayores de 80. Además, otros factores como el sexo o la raza modulan el riesgo de padecer Parkinson, encontrándose la mayor incidencia de la enfermedad en hombres españoles e hispanoamericanos (1,2).

El Parkinson se caracteriza por una serie de síntomas motores entre los que destaca el temblor en manos, brazos y piernas, la rigidez muscular y lentitud de movimiento y la pérdida de coordinación y de equilibrio. Además, sus pacientes también sufren síntomas no motores como depresión, ansiedad o demencia (3,4). Aproximadamente un 10% de los casos de Parkinson tienen un origen en mutaciones monogénicas tanto de genes dominantes (α -sinucleína, LRRK2) como recesivos (gen *parkin*, PINK-1, DJ-1) siendo estos últimos responsables de la mayor parte de casos de Parkinson juvenil. El 90% de casos restantes, comúnmente denominado Parkinson idiopático o esporádico, tiene un origen indeterminado que combina factores genéticos y ambientales (1,5).

En cualquier caso, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por una acumulación de depósitos de α -sinucleína que forman inclusiones citoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en la *pars compacta* del cerebro. Este proceso acaba derivando en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas y, por tanto, en una disminución de la concentración de dopamina durante la sinapsis (3).

La dopamina es un neurotransmisor del sistema nervioso central, siendo la catecolamina más abundante del cerebro. Presenta un papel central en el control de funciones cognitivas y emocionales, en la regulación de la memoria, del movimiento y de la adicción. La desregulación del sistema dopaminérgico no sólo está asociada con el Parkinson, sino también con la esquizofrenia, el síndrome de Tourette o el síndrome de déficit de atención e hiperactividad (6,7).

En este contexto, la dopamina puede unirse a 5 subtipos distintos de receptores, todos ellos acoplados a proteínas G (GPCRs). Los receptores de dopamina se dividen en receptores de clase D₁ (D₁ y D₅) y de clase D₂ (D₂, D₃ y D₄). Los primeros están acoplados a proteínas G α_s , por lo que activan a la adenilato

ciclase y estimulan la producción de AMPc. Los receptores D₂, D₃ y D₄ están acoplados a G $\alpha_{i/o}$, por lo que inhiben a la adenilato ciclase disminuyendo así la concentración de AMPc intracelular (8).

2.2 Tratamiento del Parkinson: Relevancia clínica del receptor de dopamina D₃

El tratamiento principal de la enfermedad se basa en la administración de L-DOPA (levodopa), precursor de la dopamina que sí puede atravesar la barrera hematoencefálica y llegar hasta las neuronas dopaminérgicas, donde es transformada en dopamina. Junto a la levodopa es habitual administrar otros fármacos como los inhibidores de la MAO-B y la COMT (enzimas que degradan la dopamina) o administrar agonistas de los receptores de dopamina. Estos fármacos permiten reducir la dosis de levodopa, disminuyendo así sus efectos secundarios (principalmente discinesia) (4).

En general, debido a que hay una gran identidad de secuencia entre los distintos tipos de receptores de dopamina, la especificidad de estos agonistas no es muy elevada. Este hecho se ha postulado como una de las principales causas de los efectos secundarios que producen estos fármacos. Hasta el momento, la mayoría de los tratamientos se han centrado en los receptores D₁ y D₂, pues su abundancia en el ganglio estriado del cerebro es de 2 a 3 veces superior al resto de receptores (3). A pesar de ello, los agonistas de los receptores D₂/D₃ son los más efectivos en el tratamiento de los síntomas motores del Parkinson (9). Además, fármacos como el pramipexol, el ropinirol o la rotigotina (usados habitualmente en clínica para el tratamiento de la enfermedad) poseen ~20 veces mayor afinidad por D₃R que por D₂R, hecho que postula a este receptor como una diana farmacológica importante en el tratamiento de la enfermedad (10,11).

2.3 Relevancia clínica del estudio de los polimorfismos de D₃R: Medicina personalizada

Actualmente, más de un tercio de los fármacos aprobados por la FDA tienen como diana terapéutica un GPCR, genes que además son altamente polimórficos (12). Tras analizar el genotipo completo de 2504 individuos “sanos” (dentro del contexto del proyecto de los 1000 genomas), se determinó que de media un individuo posee 68 mutaciones puntuales únicamente dentro de la región codificante de un tercio de los GPCRs que actúan como dianas de fármacos aprobados para su uso en clínica (13). De hecho, los últimos estudios al respecto han identificado 14.192 mutaciones puntuales en los 108 GPCRs que actúan como dianas de fármacos (12), y evidentemente este número continúa aumentando. Concretamente, *Turner et al.* determinaron que en 1 de cada 300 nuevos nacimientos aparece una nueva mutación puntual en uno de estos GPCR (14).

Es precisamente esta gran variabilidad genómica la que determina que frente a un mismo tratamiento individuos distintos presenten respuestas diferentes. Por ejemplo, un receptor con menor afinidad producirá una respuesta disminuida, pudiendo llegar incluso a la ineficacia terapéutica (Figura 1) (12).

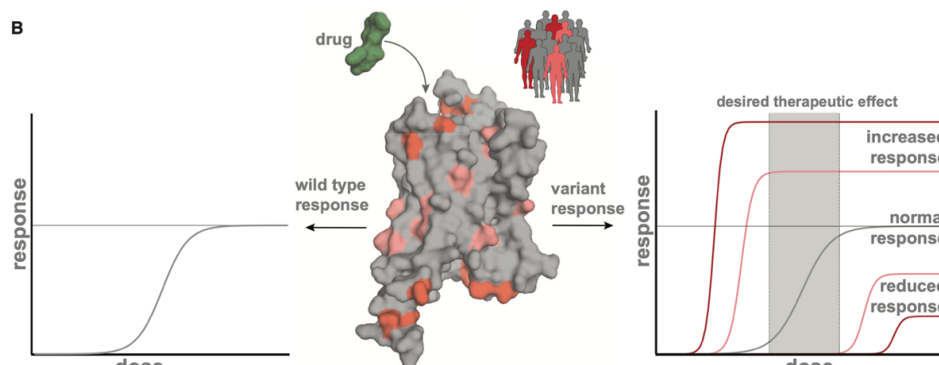


Figura 1: Curva concentración-respuesta de un individuo normal frente a pacientes con mayor o menor afinidad por el fármaco (12).

Las últimas estimaciones económicas realizadas al respecto consideran que solo en el Reino Unido, el gasto del Sistema Nacional de Salud en tratamientos con fármacos dirigidos contra GPCRs que acaban resultando ineficaces por esta variación genética interpersonal puede ascender hasta los 501 millones de libras (sin tener en cuenta hospitalizaciones por efectos adversos graves, y contabilizando únicamente polimorfismos localizados en la región codificante del receptor) (12).

En resumen, el estudio del efecto de los polimorfismos de D_3R y la aplicación de esta información en la práctica clínica (medicina personalizada) posibilitará la elección del tratamiento más eficaz para cada paciente, ajustando el tipo y la dosis de fármaco para mantener el efecto terapéutico óptimo. Todo ello disminuirá el número y la gravedad de las reacciones adversas al medicamento (RAM) y la ineficacia terapéutica, lo que en última instancia generará un aumento en la calidad de vida de los pacientes y un ahorro sustancial de los gastos sanitarios asociados.

2.4. Mecanismo de acción de D_3R

La unión de la dopamina u otro agonista análogo al receptor D_3 produce una serie de cambios conformacionales en el receptor que le permiten interactuar con la subunidad $G\alpha$ de una proteína G inhibidora $G\alpha_{i/o}$. Esta interacción induce un cambio conformacional en $G\alpha_{i/o}$ produciéndose un intercambio de GDP (forma inactiva) por GTP (forma activa). La entrada de GTP produce una disociación de $G\alpha_{i/o}$ del complejo que formaba con el receptor, $G\beta$ y $G\gamma$ y su movimiento hacia la adenilato ciclasa, que queda inhibida, disminuyendo la concentración de AMPc (Figura 2) (15).

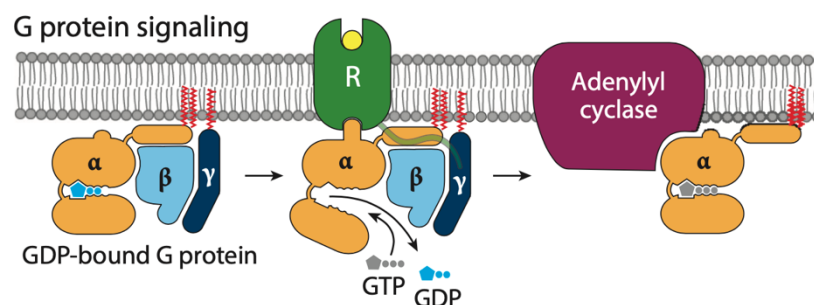


Figura 2: Mecanismo de acción de D_3R -verde- al ser activado por un agonista (círculo amarillo) (15)

3. Objetivos

- **Objetivo 1:** Elección de polimorfismos con potencial para tener un impacto en la función del receptor. Se realizó basándonos en la estructura tridimensional del receptor unido a un heterotrímero de proteínas $G\alpha\beta\gamma$ y en el conocimiento actual de su mecanismo funcional.
- **Objetivo 2:** Cuantificar la expresión de los distintos polimorfismos de D_3R en la superficie celular. Para ello se realizó un ensayo de cuantificación de expresión en superficie. Permite determinar si los polimorfismos afectan al tráfico hacia la membrana y se utiliza como control para asegurar que las diferencias de expresión en superficie no tienen impacto en los resultados de los ensayos de señalización.

- **Objetivo 3: Verificar la equivalencia funcional entre los constructos con y sin GFP extracelular.** La expresión del receptor D₃ puede monitorizarse mediante una fusión con GFP. Sin embargo, se utilizó un ensayo de expresión en superficie y ensayos de señalización BRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia) para asegurar que la GFP no interfiere en la función.
- **Objetivo 4: Determinar potencia y eficacia de los distintos polimorfismos usando el agonista quinpirol.** Para ello se realizaron ensayos celulares BRET, que permitirán cuantificar si un determinado polimorfismo posee mayor o menor potencia y eficacia que el receptor salvaje.
- **Objetivo 5: Determinar si las variaciones obtenidas en función de cada polimorfismo son dependientes de fármaco.** Se realizaron ensayos de señalización BRET para ver si el efecto producido por los polimorfismos es dependiente de fármaco.
- **Objetivo 6: Entender a nivel molecular los cambios en la actividad de cada polimorfismo con cada agonista utilizado.** Para ello se utilizaron las estructuras resueltas presentes en la bibliografía y se realizó un acoplamiento molecular de aquella para la que no hay estructura experimental.
- **Objetivo 7: Determinar si el dominio N-terminal del receptor D₃ se pliega sobre el bolsillo de unión a ligando, comprobar si está implicado en el reconocimiento de fármacos y entender su mecanismo de acción.** Se realizó a través de ensayos de señalización BRET con diferentes ligandos.

4 Materiales y métodos

4.1. Clonajes: Generación de mutantes

4.1.1 IVA cloning: Diseño de cebadores, PCR y transformación en *E.coli*

Todos los mutantes de este trabajo fueron generados mediante IVA (*In Vivo Assembly*) cloning. Este sistema permite el ensamblaje *in vivo* de fragmentos de ADN de forma ordenada al estar guiados por secuencias homólogas. El proceso es llevado a cabo en *E.coli* a través de una vía de recombinación homóloga independiente de recA, que se encuentra presente en cualquier cepa utilizada comúnmente en los laboratorios, lo que elimina la necesidad de complejos tratamientos enzimáticos o múltiples PCR, simplificando el procedimiento (16). El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Diseño de cebadores: En la región 3' del cebador directo se encuentra la región de unión al ADN molde, que debe tener al menos 18-22 pares de bases y un T_m ~60°C. Por otro lado, en el extremo 5' se encuentra la región complementaria al cebador reverso, que debe tener menos de 15 pares de bases y una T_m inferior a 50°C. Entre ellas se encuentra el codón mutado (optimizado para *Homo sapiens*). El cebador reverso no contiene la mutación (17). La secuencia de los oligos fue diseñada mediante SnapGene Viewer 7.0.2, la T_m de cada uno se calculó con OligoCalc y se verificó mediante IDT-Oligo Analyzer que no formaran homo o heterodímeros.
- 2) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La secuencia de los cebadores, la composición de la mezcla de PCR, las T_m utilizadas y el programa detallado de PCR se encuentran en el Anexo I.
- 3) Gel de agarosa (1% en tampón TBE) para verificar la correcta amplificación de la PCR.
- 4) Digestión de los productos de PCR con DpnI (endonucleasa específica de ADN metilado y hemimetilado) a 37°C durante 15 minutos. Este tratamiento permite eliminar el ADN molde.

- 5) Transformación mediante choque térmico a 42°C de *E. coli XL-10 Gold- Ultracompetent Cells*: Para ello se inocularon 4 µL de ADN de los productos de PCR digeridos con DpnI en 100 µL de *XL-Gold* y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se mantuvieron 30 segundos en choque térmico a 42°C, se dejaron en hielo 2 minutos y se añadieron 200 µL de medio SOB. Por último, se plaquearon en medio LB24 suplementado con ampicilina para la selección de los clones transformados con el vector. La composición de los medios se detalla en el Anexo I.

De esta forma se generaron los mutantes S9G, V136I, V214A y F346L en plásmidos GFP-DRD3-pcDNA4 (con GFP extracelular) y ΔGFP-DRD3-pcDNA4 (sin GFP extracelular), obteniendo 8 mutantes en total.

4.1.2 Amplificación y purificación de ADN plasmídico

Para amplificar el ADN plasmídico, se realizó un cultivo líquido en 3 mL de medio LB24 con ampicilina y se mantuvo O/N a 37°C y en agitación a 180 rpm. Expandida la colonia, se purificó el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina siguiendo el protocolo adjunto en el kit de miniprep de BioRad.

4.1.3 Verificación de los mutantes generados

Una vez obtenido el ADN plasmídico, éste se secuenció para asegurar que el vector obtenido presentaba únicamente la mutación deseada. Esta comprobación se realizó mediante secuenciación de Sanger, y se utilizó Clustal Omega para realizar los alineamientos de secuencia y ESPrict 3.0 para visualizar los resultados.

4.2 Cultivos celulares

4.2.1 Mantenimiento de líneas celulares

Para la realización de todos los experimentos del presente trabajo se utilizó la línea celular adherente HEK 293T (embrionarias de riñón humano transformadas con adenovirus que son ampliamente utilizadas por su alta ratio de transfección y facilidad de crecimiento) (18). HEK 293T se mantuvo en estufa a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% de estreptomicina y penicilina.

4.3 Cuantificación del receptor en superficie celular

4.3.1 Fundamentos del ensayo de expresión en superficie

La realización de este experimento garantiza que el receptor se expresa en superficie. Con este ensayo se pretenden cuantificar las diferencias de expresión que puedan existir entre los distintos polimorfismos de D₃R, lo que nos permitirá confirmar que las variaciones en potencia y eficacia obtenidas en los ensayos de señalización celular se deben únicamente al efecto funcional de la mutación, y no a cambios en su expresión en superficie.

Además, basándonos en la experiencia previa del laboratorio, una proteína de fusión GPCR-GFP aumenta mucho la expresión del receptor en superficie. Para asegurar que la GFP no impide el plegamiento ni la expresión del receptor, se realizó un ensayo de expresión en superficie comparando cuantitativamente la presencia en membrana de todos los mutantes generados con el

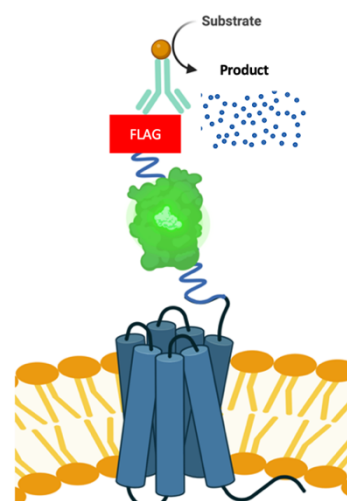


Figura 3: Mecanismo de acción del ensayo de expresión en superficie en GFP-DRD3-pcDNA4. En el caso de ΔGFP-DRD3-pcDNA4, FLAG estaría unida directamente a D₃R. Elaboración propia.

vector GFP-DRD3-pcDNA4 (constructos con GFP extracelular) y Δ GFP-DRD3-pcDNA4 (constructos sin GFP extracelular).

El ensayo de expresión en superficie se basa en la detección específica de una etiqueta FLAG, que está presente en el extremo N-terminal de todos los constructos utilizados en este trabajo (Anexo II). Para ello se utiliza un anticuerpo anti-FLAG conjugado con la enzima HRP (peroxidasa de rábano). HRP puede oxidar sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno. En este caso, la oxidación de luminol acaba generando emisión de luz (quimioluminiscencia) (Figura 3). Al no poder atravesar la membrana plasmática, el anticuerpo solo podrá unirse a aquellos receptores presentes en la superficie celular.

4.3.2 Preparación de placas para el ensayo de expresión en superficie

Para poder realizar los ensayos posteriormente, es necesario sembrar en una placa de 96 pocillos blanca y opaca 50.000 células por pocillo. Para mejorar la fijación de las células, la placa se trató previamente con polilisina (19). La densidad celular y la viabilidad se determinaron con azul Trypan en un contador de células automatizado Invitrogen Countess3.

4.3.3 Transfección de células HEK 293T

La transfección se realiza pasadas 24 horas de la siembra de células en la placa de ensayo (apartado 4.3.2). Para realizar el ensayo de expresión en superficie, se transfecta el ADN del receptor utilizando polietilamina (PEI). El PEI es un polímero catiónico capaz de unirse por interacciones electrostáticas al ADN y formar complejos que serán endocitados por las células. Este método proporciona una alta tasa de transfección (20).

Para ello se añaden en cada pocillo 10 μ L de OptiMem (medio sin FBS, pues éste inhibe la endocitosis y por tanto la transfección) que contiene 100 ng del ADN del receptor a transfectar mezclado con PEI en ratio 2:1 (PEI:ADN). Antes de añadir la mezcla se deja incubar 10 minutos para que se formen los complejos ADN-PEI y se cambia el medio de cada pocillo por 90 μ L de DMEM fresco. Tras añadir la mezcla de transfección, se deja incubar la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas.

4.3.4 Ensayo de expresión en superficie

Se realiza 48 horas después de haber transfectado las células (apartado 4.3.3). Para ello es necesario eliminar el medio de cultivo de los pocillos y realizar un lavado con PBS de los mismos. A continuación, se fijan las células con paraformaldehído (PFA) 4% y se deja incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se vuelve a lavar 2 veces con PBS y se añaden 100 μ L/pocillo de PBS-BSA (5% m/v) para bloquear el pocillo e impedir uniones inespecíficas del anticuerpo y se deja incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 100 μ L/pocillo del anticuerpo anti-FLAG conjugado con HRP (diluido 1:10000). La reacción se deja incubando 30 minutos a temperatura ambiente y pasado este tiempo se lava 2 veces con PBS y se añaden 50 μ L de los agentes de revelado (que contienen el sustrato de HRP y peróxido de hidrógeno) BioRad-Clarity Max™ Western ECL Substrate. Tras 5 minutos de reacción, se obtienen los valores de luminiscencia total de todo el espectro en el lector de placas CLARIOstar Plus®.

4.3.5 Análisis estadístico

Para cada mutante se realizaron tres replicas biológicas. Cada una de ellas está formada por tres replicas técnicas (3 replicas por placa significa n=1). De esta forma se calculó la media de cada

experimento y se normalizó con respecto al valor obtenido en el D₃R salvaje (D₃R WT). A partir de estos valores normalizados se calculó el error entre los distintos días. Los datos se representan según la media ± SEM (error estándar de la media). El cálculo de estos parámetros y su representación gráfica se realizó mediante GraphPad Prism 10.2.3.

4.4 Ensayos de señalización celular para determinar EC₅₀ y eficacia

4.4.1 Fundamentos del ensayo TRUPATH

TRUPATH es un ensayo de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) que permite cuantificar en tiempo real la activación de los GPCR en células vivas. Aunque se han desarrollado otros ensayos de tipo BRET y FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) para medir la activación de GPCRs (21–23) TRUPATH permite la visualización de varias proteínas G bajo un mismo sistema, y se encuentra optimizado en el laboratorio (24).

El ensayo TRUPATH detecta la activación del GPCR midiendo la tasa de disociación de la proteína G. Para ello utiliza una proteína G α fusionada con la luciferasa de *Renilla* (Rluc8), una proteína G β y una G γ fusionada en su N-terminal con GFP2 (variante F64L, con mayor fluorescencia) (24).

De esta forma, cuando el receptor está inactivo G α , G β y G γ se encuentran formando un complejo, por lo que la luciferasa está próxima a la GFP. Al añadir el sustrato de la luciferasa (colenteracina 400a) esta produce luz a 400 nm. Debido a la cercanía de la GFP, esta se excitará y generará fluorescencia a 498 nm -señal BRET- (Figura 4A). Por el contrario, si el receptor es activado por un agonista, se genera un cambio conformacional que conlleva la disociación de la proteína G heterotrimérica. En este caso, aunque la luciferasa genere luz, la GFP no llega a excitarse, o genera fluorescencia con menor intensidad -disminución de la señal BRET- (Figura 4B y 4C)

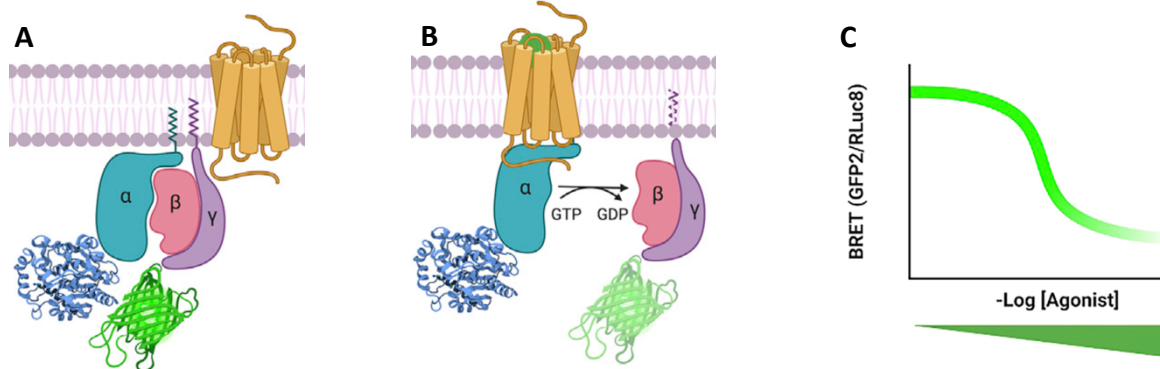


Figura 4: En azul se representa G α unida a la luciferasa Rluc8, en morado G γ unida a GFP. **A)** Receptor inactivo. No se produce señal BRET (19). **B)** Activación del receptor tras la unión de agonista y producción de fluorescencia -señal BRET- (19) **C)** Curva TRUPATH: Disminución de la señal BRET al aumentar la concentración de agonista (19).

4.4.2 Preparación de placas para el ensayo TRUPATH

Se sembraron 50.000 células por pocillo según lo dispuesto en el apartado 4.3.2.

4.4.3 Transfección de células HEK293T

La transfección se realiza 24 horas después de la siembra de células en la placa de ensayo. En este caso se transfecta el ADN del receptor y de G α_{0A} , G β_3 y G γ_9 mediante TransIt-2020. A continuación, se

preparan 10 μL de OptiMem por pocillo que contengan el ADN del receptor $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en proporción 2:1:1:1 y 0,3 μL de TransIt-2020. Tras verificar la expresión en superficie del receptor con y sin GFP extracelular se transfectaron 50 ng de ADN del receptor y 25 ng de ADN de $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ por pocillo en ambos casos. La mezcla se deja incubando de 20 a 30 minutos y se añade a la placa de 96 que se deja incubando 48 horas a 37°C y 5% de CO_2 .

4.4.4 Ensayo TRUPATH

A la hora de realizar el ensayo TRUPATH, el primer paso es retirar el medio de cada pocillo. A continuación, se añaden 90 μL /pocillo de una disolución de colenteracina 400a 7,5 μM disuelta en tampón HBSS 1x con 20 mM HEPES (pH7,4). La colenteracina 400a es sensible a la luz por lo que a partir de este momento la placa se mantiene en oscuridad. A continuación, se añaden 10 μL /pocillo de la disolución de ligando. Cada curva TRUPATH (Figura 4C) está formada por mediciones de 10 pocillos con concentraciones decrecientes de agonista. Para obtener la curva se realizan diluciones seriadas 1:10 de ligando desde una concentración de 10 μM en el primer pocillo. El último pocillo no contiene agonista. En este trabajo se utilizaron los agonistas quinpirol, pramipexol y FOB02-04A (en adelante ligando bitópico). Por último, se llevó la placa de 96 pocillos al lector CLARIOstar Plus® y se midió la ratio GFP2/Rluc8 (498nm/400nm) para obtener la señal BRET.

4.4.5 Análisis estadístico

Para obtener las curvas concentración-respuesta de cada mutante se realizaron al menos 3 experimentos, cada uno de los cuales es a su vez un triplicado. Los datos se representan como media \pm SEM (error estándar de la media de triplicados entre experimentos). La determinación de la significancia estadística se realizó mediante:

- $p\text{EC}_{50}$: Análisis de la varianza unidireccional (*One-way ANOVA*), corrigiendo la comparación múltiple con un análisis de Dunnett y utilizando un p-valor de 0,05.
- Eficacia (E_{max}) normalizada frente a $D_3\text{WT}$ activado por quinpirol: t-test múltiple, corrigiendo las comparaciones múltiples con el método de Holm-Sidak, y utilizando un p-valor de 0,05.

4.5 Acoplamiento molecular entre $D_3\text{R}$ y quinpirol

Para intentar comprender las causas moleculares que produce cada polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la actividad del receptor es necesario poseer la estructura del mismo con cada ligando. A lo largo del trabajo se utilizó quinpirol, pramipexol y FOB02-04A (ligando bitópico) como agonistas de $D_3\text{R}$. Las estructuras de $D_3\text{R}$ con pramipexol y ligando bitópico ya se encuentran resueltas (25,26), lo que no ocurre con quinpirol. Es por ello que se realizó un docking entre $D_3\text{R}$ y este ligando mediante el servidor SwissDock, restringiendo la zona de búsqueda al bolsillo ortostérico.

5. Resultados

5.1 Análisis estructural de $D_3\text{R}$: Selección de polimorfismos

Para la selección de los polimorfismos a estudiar en el presente trabajo se intentó llegar a un compromiso entre:

- El número de personas que poseen cada polimorfismo del receptor D_3 , es decir, la frecuencia de la mutación.
- El potencial para tener impacto en la función, basándonos en la posición de las variantes con respecto a los motivos funcionales y bolsillos de unión del receptor: Se seleccionaron SNPs que

estuvieran presentes en regiones implicadas en la transducción de señal del receptor: unión a dopamina y unión a proteínas G.

Para poder elegir las variantes adecuadamente cumpliendo estos requisitos es fundamental llevar a cabo una revisión bibliográfica de la relación estructura-función del receptor:

D₃R comparte la estructura típica de los GPCRs. Está formado por dominio N-terminal extracelular, un dominio C-terminal intracelular y 7 hélices transmembrana (TM) conectadas entre sí por 3 bucles extracelulares (ECL) y tres bucles intracelulares (ICL) (Figura 5A) (15).

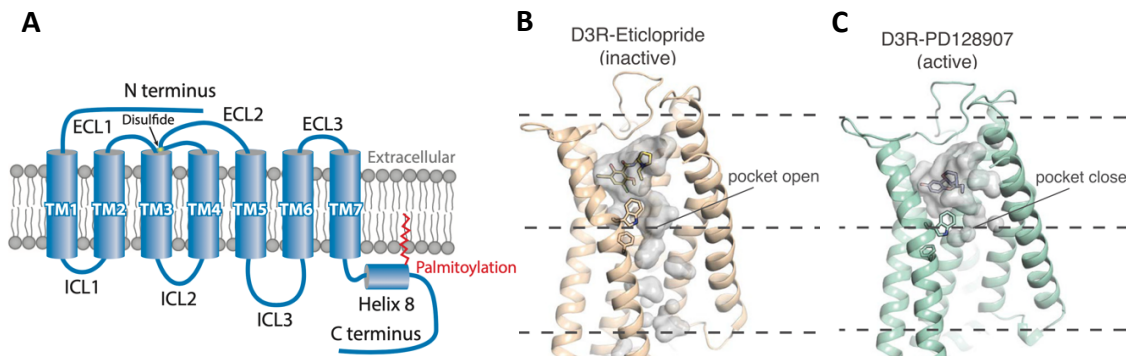


Figura 5: **A)** Estructura de D₃R, compartida por el resto de GPCR (15). **B)** Estructura de D₃R unido al antagonista eticloprida -estado inactivo- (27). **C)** D₃R unido al agonista PD128907 -estado activo- (27).

En contacto con el espacio extracelular, D₃R contiene un bolsillo de unión a ligando que se extiende a lo largo de toda la región transmembrana cuando el receptor se encuentra en estado inactivo. De esta forma, el sitio de unión a ligando está formado por residuos de todas las TMs y de los tres bucles extracelulares (27,28).

Sin embargo, una vez que el receptor une un agonista, este último induce un cambio en la conformación del residuo W342 (6.48) produciendo un desplazamiento del mismo hacia abajo. Este movimiento prácticamente cierra el canal, dividiéndolo en una mitad superior donde quedará alojado el ligando y una mitad inferior que tras nuevos cambios conformacionales podrá interactuar con la subunidad α de la proteína G inhibidora (Figura 5B, 5C) (27,28).

Al igual que el resto de receptores de dopamina, el bolsillo de unión a ligando de D₃R -sitio ortostérico- posee carga negativa, lo que le permite interactuar correctamente con su ligando (que poseen el grupo amino, cargado positivamente), que es estabilizado mediante puentes de hidrógeno, interacciones polares, electrostáticas, hidrofóbicas... A pesar de que estas uniones pueden hasta cierto punto variar con el ligando, sí que hay varias interacciones clave que se mantienen entre distintos tipos de ligandos de D₃R, como el puente de hidrógeno mantenido entre D110 y el grupo amina del ligando o la interacción hidrofoba que forma el fármaco con F345. La mutación de estos aminoácidos prácticamente impide la unión del ligando al receptor (28).

En el momento en el que el receptor se une a un agonista, este produce un desplazamiento del residuo W342 hacia abajo. Este movimiento a su vez induce un movimiento hacia abajo en I118, F338 (motivo PIF) y R128 (motivo DRY). Por último, R128 hace rotar las cadenas laterales de N379 e I138 (motivo NPxxY) (Figura 6) (27).

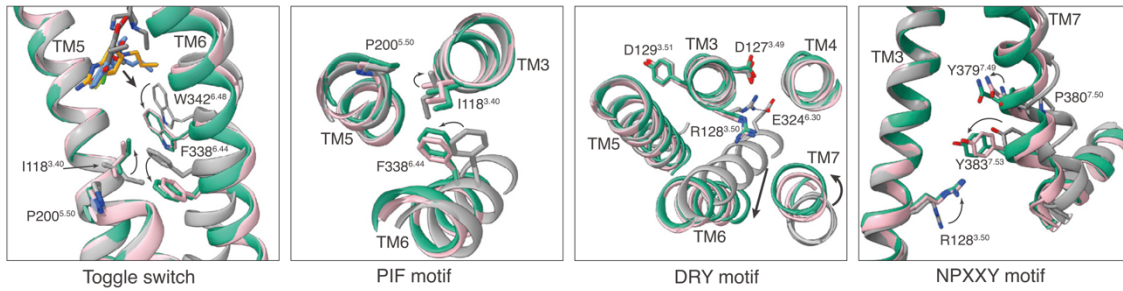


Figura 6: Cambios conformacionales inducidos en los motivos PIF, DRY y NPxxY producidos por la bajada de W342 (“toggle switch”) (27).

Todos estos cambios conformacionales producidos en los motivos PIF, DRY y NPxxY producen que la TM6 se desplace hacia fuera y la TM7 hacia dentro (Figura 7B), de forma que se genera una cavidad intracitoplasmática donde se aloja la subunidad α de la proteína G inhibitoria ($G\alpha_i$) (Figura 7A) (27). Sin el desplazamiento de la TM6, $G\alpha_i$ no puede interactuar con el receptor (Figura 7C).

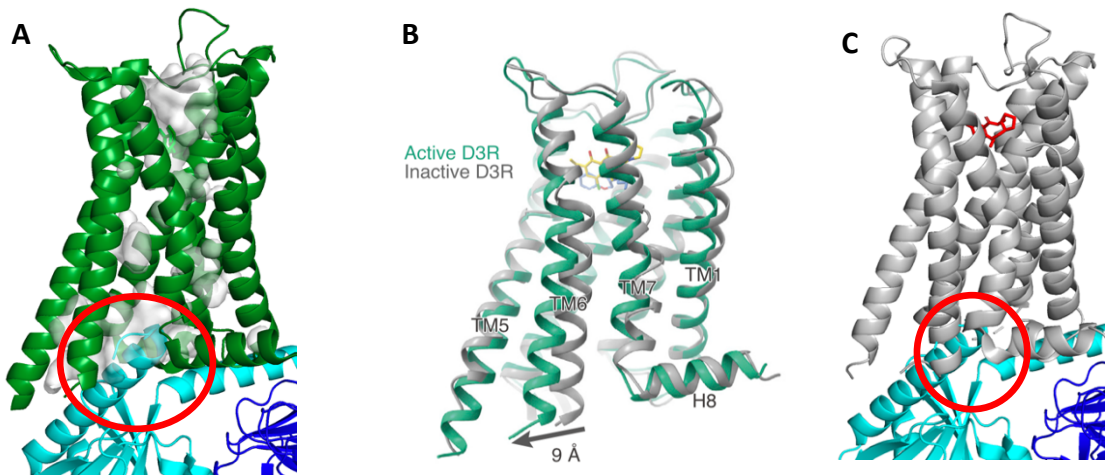


Figura 7: (A) Interacción de D_3R (verde inactivo, gris activo) con $G\alpha_i$ (azul celeste). (B) Desplazamiento de TM6. (27) (C) D_3R inactivo no puede interactuar con $G\alpha_i$

De esta forma, D_3R interactúa con $G\alpha_i$ a través de dos superficies. La mayor de ellas es la cavidad central citoplasmática, formada entre la TM3 y la TM5/6 de D_3R (que interactúa con los 15 últimos residuos del C-terminal de la hélice α 5 de la $G\alpha_i$) (Figura 7A). La segunda interacción se establece con la hélice ICL2 de D_3R , que se empaqueta con el dominio similar a Ras de la $G\alpha_i$ (27). La interacción entre D_3R y $G\alpha_i$ se produce mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las hélices del D_3R son anfipáticas, pero todas las zonas de interacción de D_3R con $G\alpha_i$ (TM3,5,6,7, e ICL2) son hidrofóbicas y poseen carga muy positiva, que contrasta con la carga negativa de la zona de interacción de $G\alpha_i$. Estas características se encuentran conservadas entre GPCRs unidos a $G\alpha_i$ (27,29).

Una vez conocida la transducción de señal del receptor, se seleccionaron mutaciones en regiones clave de la proteína (Figuras 8 y 9) teniendo en cuenta también su frecuencia en la población:

- **S9G:** Es el polimorfismo que se encuentra más extendido entre la población, estando presente en el 30-44% de la población caucásica (30). Este SNP se encuentra en la región N-terminal (extracelular) de la proteína (Figuras 8 y 9). El mecanismo de acción de esta zona del receptor se desconoce actualmente, pues su gran movilidad ha impedido su modelado en los diversos estudios estructurales (26–28,31). Sin embargo, mediante experimentos *in-silico* de dinámica

molecular se ha determinado que el dominio N-terminal se pliega sobre el bolsillo de unión a ligando. Además, el N-terminal adopta distintas conformaciones dependiendo de si D₃R está unido a un agonista o a un antagonista. Por todo ello, el dominio N-terminal podría estar implicado en el reconocimiento de ligandos (32). Además, bibliográficamente se ha determinado que la variante S9G tiene más afinidad y eficacia que el receptor salvaje por la unión de dopamina (33,34), lo que podría explicar la relación encontrada entre la esquizofrenia y la variante S9G, sobre todo en individuos homocigotos (35,36). Sin embargo, otros trabajos más recientes no han encontrado esta asociación significativa (30,37,38).

- **V136I:** Este residuo se encuentra en la región ICL2, implicada en la unión del receptor con G α_i (segunda superficie de interacción entre D₃R y el dominio similar a Ras de G α_i) (Figuras 8 y 9). En este caso se produce una sustitución por un aminoácido más voluminoso, lo que podría generar efectos estéricos que dificulten la transducción de señal (Figura 9). Esta mutación está presente en 6 de cada 10.000 personas (39).
- **V214A:** Se encuentra ubicada en la región intracelular de la TM5, concretamente en la región que forma la cavidad citoplasmática que interacciona con la hélice α_5 de G α_i . V214A aparece en 6 de cada 100.000 habitantes (39).
- **F346L:** Forma parte de la TM6 y del bolsillo de unión a ligando del receptor, y se ha señalado que puede mantener interacciones hidrofóbicas con el pramipexol (27). Su frecuencia de aparición es de 3 personas por cada 100.000 habitantes (39).

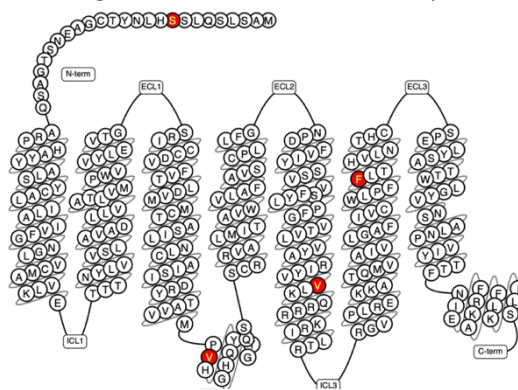


Figura 8: Estructura de D₃R con los mutantes realizados en rojo (39).

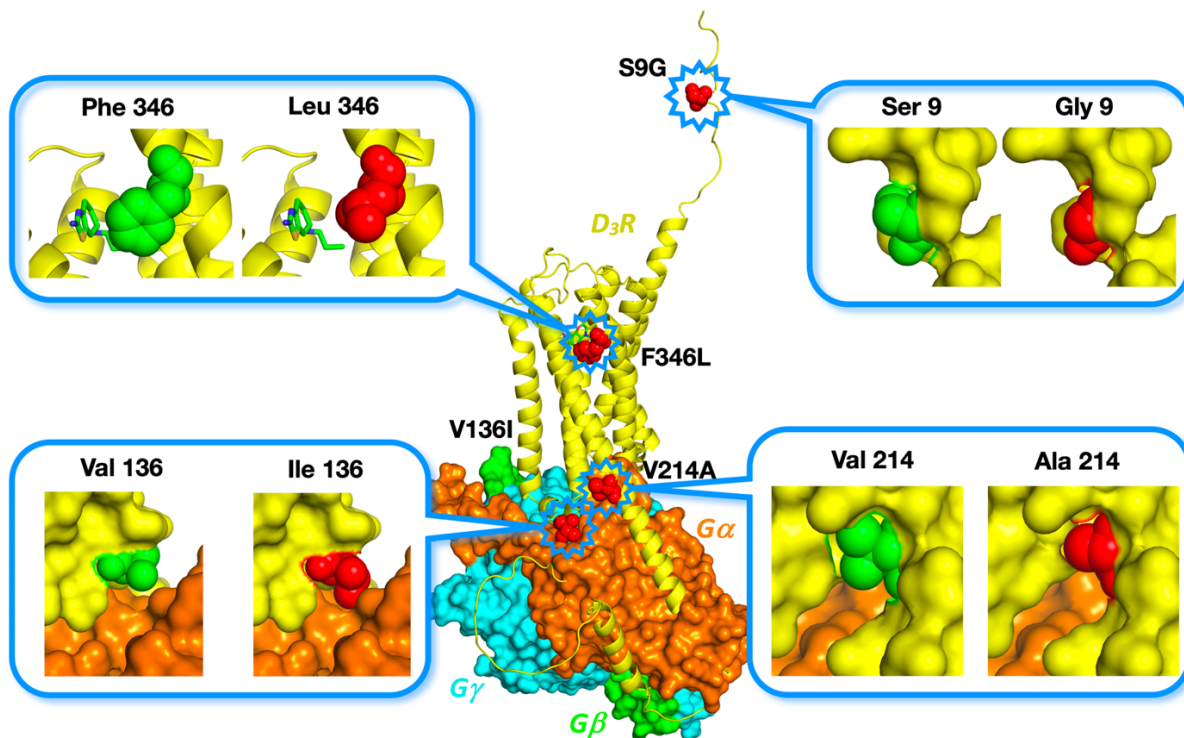


Figura 9: Polimorfismos estudiados en D₃R. En el centro se representa el receptor -amarillo- con la posición de los residuos a mutar en rojo, G α -naranja-, G β -azul- y G γ -verde-. A los lados se representan en verde los residuos del receptor salvaje y en rojo las mutaciones realizadas. La mutagénesis in-silico y la representación de las figuras se realizó mediante Pymol.

5.2 Generación de mutantes

Tras diseñar de los cebadores se realizó una PCR para introducir las mutaciones S9G, V136I, V214A y F346L en los plásmidos GFP-DRD3-pcDNA4 (contiene GFP extracelular) y Δ GFP-DRD3-pcDNA4 (sin GFP extracelular). Para verificar la amplificación se cargó el resultado de la PCR en un gel de agarosa 1% (Figura 10).

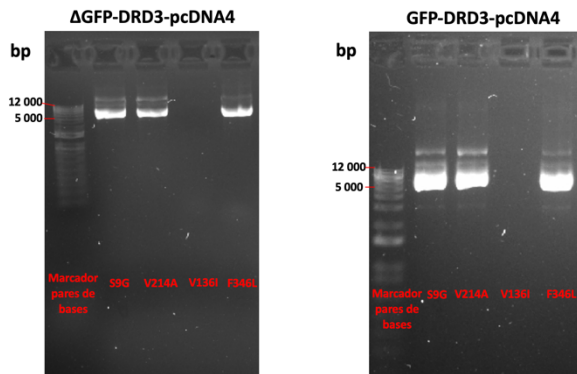


Figura 10: A la izquierda mutantes generados en el vector Δ GFP-DRD3-pcDNA4, a la derecha los mutantes generados en GFP-DRD3-pcDNA4. Al margen, número de pares de bases (bp) del marcador.

En la figura 10 podemos ver que se ha producido amplificación en los mutantes S9G, V214A y F346L. Sin embargo, para el mutante V136I no se consiguió amplificación a pesar de variar las T_m y modificar la cantidad de ADN molde y cebadores, probablemente por la formación de homodímeros de cebadores. Por último, para verificar que la mutación se había generado correctamente y no había errores en la secuencia del receptor, se secuenció cada mutante mediante Sanger.

5.3 Validación de equivalencia funcional entre constructos GFP y Δ GFP

5.3.1 Cuantificación de receptor en superficie celular

Para garantizar la mayor reproducibilidad posible dentro del experimento es necesario verificar mediante microscopía de fluorescencia que las células han sido transfectadas correctamente (expresan GFP) antes de realizar el ensayo (Figura 11). Este paso sólo se realizó con los constructos generados con el vector GFP-DRD3-pcDNA4, pues Δ GFP-DRD3-pcDNA4 no contiene GFP extracelular.

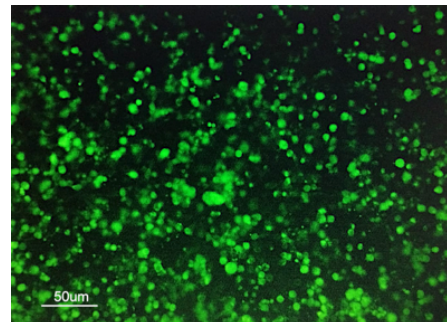


Figura 11: HEK 293T transfectadas con GFP-DRD3-pcDNA4 vistas al microscopio de fluorescencia.

Una vez verificada la transfección por microscopía de fluorescencia se realizó el ensayo de expresión en superficie con D₃R WT, Δ D₃R WT, S9G, Δ S9G, 214, Δ 214, 346 y Δ 346, obteniendo los resultados mostrados en la figura 12.

Como primera conclusión de las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 11) y del ensayo de expresión en superficie (Figura 12) podemos afirmar que el receptor se expresa en la superficie celular. Por otro lado, tampoco se observan diferencias significativas de expresión entre mutantes, lo que significa que si existen diferencias funcionales, éstas se deben al impacto de la mutación en la función del receptor y no en su expresión. Además, tampoco existen diferencias significativas en la expresión de los mutantes GFP y Δ GFP (aunque el error es algo elevado, las medias sí que coinciden) (Figura 12). Por todo ello, a la hora de realizar el ensayo TRUPATH se transfectó con la misma cantidad de ADN para todos los mutantes.

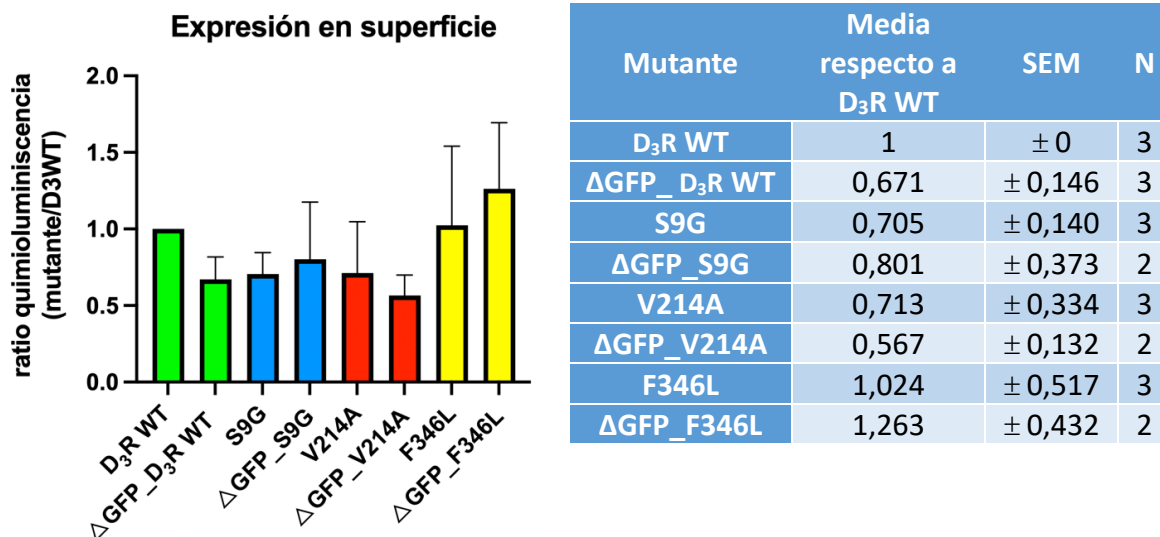


Figura 12: Datos obtenidos en el ensayo de expresión en superficie y su representación en forma de histograma. Se representa la media \pm SEM de la ratio de quimioluminiscencia de cada mutante normalizado frente a D₃R WT. “N” hace referencia al número de experimentos. Cada experimento a su vez es un triplicado de la muestra. En todos los casos se transfectaron 100 ng de ADN/pocillo.

5.3.2 Equivalencia de EC₅₀ y eficacia

Actualmente todavía no se ha podido caracterizar la función del extremo N-terminal de D₃R. Sin embargo, algunos autores sostienen que podría plegarse sobre el bolsillo de unión y estar implicado en el reconocimiento del ligando (32). En el caso de los mutantes generados en los constructos con GFP extracelular, esta proteína podría interferir en la actividad del dominio N-terminal e impedir su correcto plegamiento. Es por ello que es necesario verificar que la actividad (EC₅₀ y eficacia) del receptor no varía entre los constructos con y sin GFP. Para ello se realizó un ensayo TRUPATH de los mutantes S9G y ΔGFP_S9G utilizando quinpirol, un agonista estándar de D₃R (40).

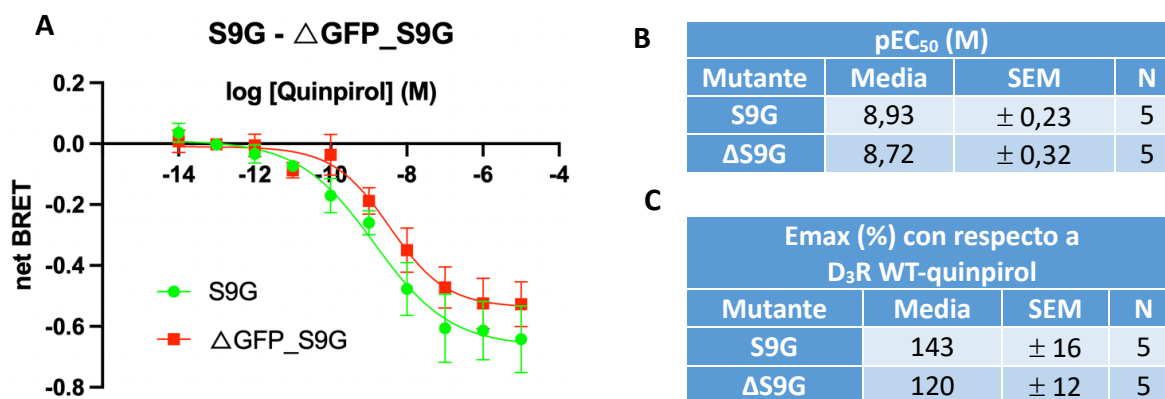


Figura 13: (A) Curva concentración-respuesta de S9G (verde) y ΔGFP_S9G (rojo) tras la activación del receptor por quinpirol (mostrado como net BRET). Los datos se representan según media \pm SEM de 5 experimentos distintos, cada uno de los cuales es a su vez un triplicado. (B) EC₅₀ de mutantes S9G y ΔGFP_S9G. (C) Eficacia de los mutantes S9G y ΔGFP_S9G normalizados respecto a D₃R WT quinpirol.

Tal y como se puede apreciar en la figura 13, las curvas concentración-respuesta son muy parecidas entre S9G con y sin GFP extracelular. Además, no se encontraron cambios significativos en la potencia (EC₅₀) y eficacia (Emax) de ambos mutantes tras realizar un análisis estadístico según lo detallado en el

apartado 4.4.5. Por todo ello, podemos afirmar que los constructos con y sin GFP extracelular son funcionalmente equivalentes y que la GFP no interfiere en la actividad del receptor.

Como los mutantes GFP y Δ GFP no presentan diferencias significativas en su expresión en membrana, potencia ni eficacia, el resto del trabajo se realizó con los mutantes con GFP.

5.4 Farmacología

5.4.1 Efecto funcional de las variantes de D₃R: Quinpirol como agonista

Para estudiar el efecto en la actividad de D₃R en los distintos mutantes generados en el vector GFP_DRD3_pcDNA4 se utilizó inicialmente quinpirol, un agonista estándar de D₃R (40).

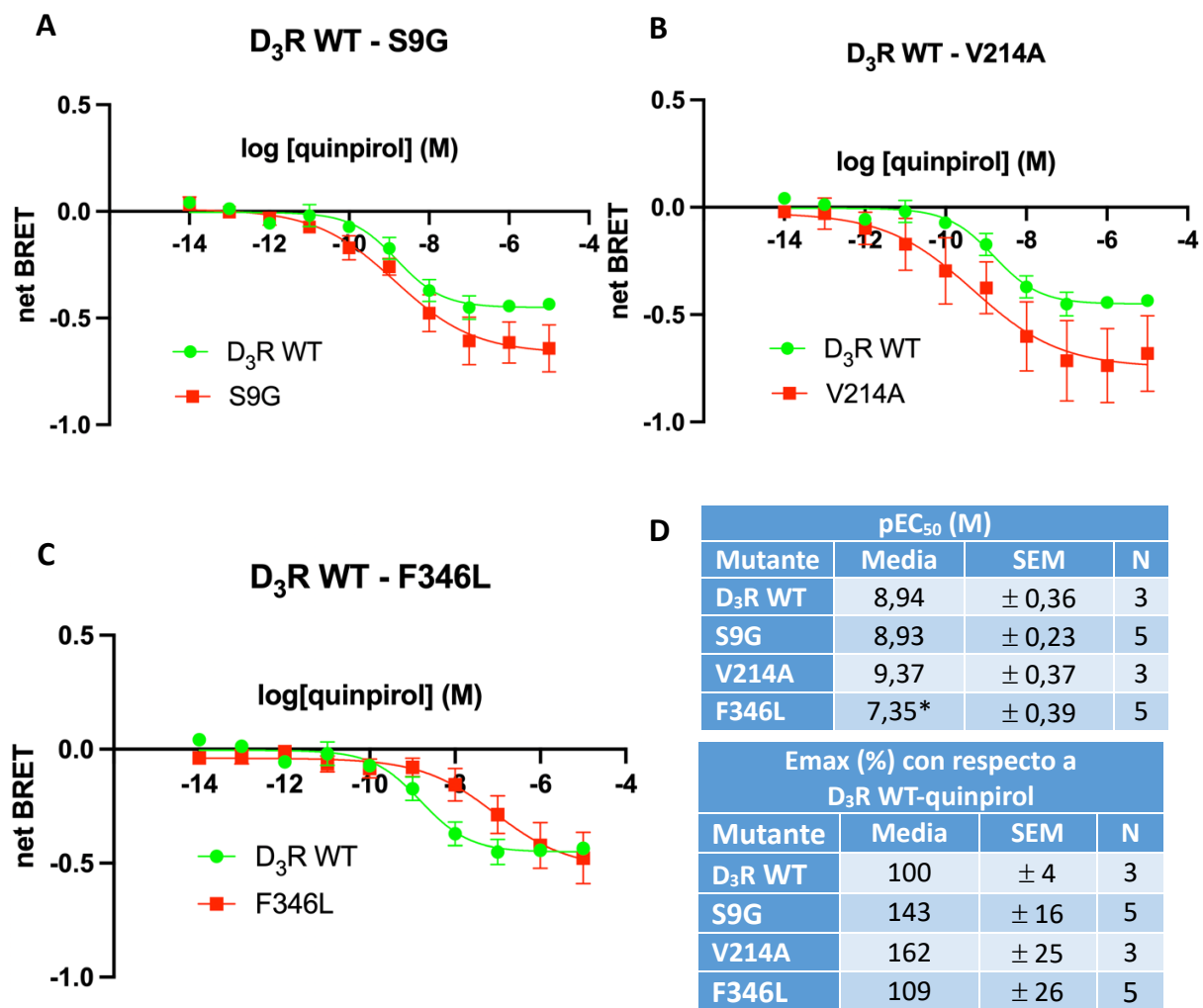


Figura 14: (A), (B), (C) Curva concentración-respuesta de D₃R WT (verde) y distintos mutantes (rojo) tras la activación del receptor por quinpirol (mostrado como net BRET). Los datos se representan según media \pm SEM de 3 a 5 experimentos distintos, cada uno de los cuales es a su vez un triplicado. (D) pEC₅₀ y eficacia de los distintos mutantes normalizados respecto a D₃R WT. Las variaciones significativas* obtenidas en potencia poseen $p < 0,05$ en test ANOVA unidireccional y análisis de Dunnett posterior.

S9G: Analizando los datos mostrados en la figura 14A, se puede observar que S9G tiene prácticamente la misma potencia (EC_{50}) que D_3R WT. Por otro lado, las diferencias en la eficacia entre ambas variantes no son significativas. Sin embargo, sí que existe una tendencia que parece indicar que la variante S9G posee más eficacia que el receptor salvaje, lo que concuerda con lo descrito bibliográficamente (33). Esta variante produjo curvas más ruidosas, y a pesar de hacer 5 duplicados con tres replicas técnicas en cada experimento no se consiguió reducir el error.

V214A: Respecto a la variante V214A, los datos de potencia y eficacia se representan en la figura 14B. De nuevo, no existen diferencias significativas entre la pEC_{50} y la E_{max} . Sin embargo, sí que existe una tendencia que parece indicar que la variante V214A es más eficaz que D_3R salvaje, resultado inesperado debido a que el residuo 214 se encuentra en la región de interacción entre D_3R y $G\alpha_i$.

F346L: Por último, la potencia (EC_{50}) de F346L (Figura 14C) es significativamente menor que la de D_3R salvaje ($\sim 40x$), mientras que ambas variantes poseen la misma eficacia. Este hecho nos indica que el residuo 346 establece algún tipo de interacción con el quinpirol, que se ve modificada al mutar el residuo (apartado 5.5.2).

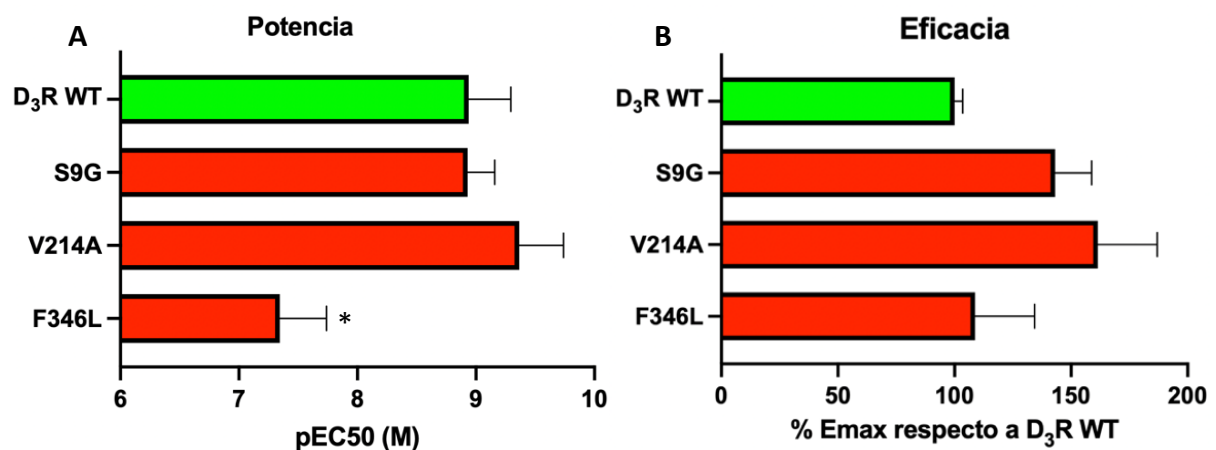


Figura 15: (A) Representación en forma de histograma de la pEC_{50} de los distintos mutantes generados. Las variaciones significativas* poseen $p < 0,05$ en test ANOVA unidireccional y análisis Dunnett posterior. **(B)** Representación como histograma de la E_{max} de cada mutante normalizada con respecto a D_3R WT.

Tal y como se puede observar en la figura 15 ni el SNP S9G ni V214A presentan variaciones significativas en la pEC_{50} ni en la eficacia. Es por ello que se decidió probar el efecto de F346L con distintos agonistas para ver si el efecto es dependiente de ligando.

5.4.2 Modo de unión de quinpirol, pramipexol y FOB02-04A a D_3R

Tanto el pramipexol (25) como el quinpirol (acoplamiento molecular, apartado 5.5.1) se unen únicamente al sitio ortostérico de D_3R . Sin embargo, el grupo dispone de un ligando bitópico (FOB02-04A) que está formado por un farmacóforo primario (PP) capaz de unirse al sitio ortostérico del receptor, un linker y un farmacóforo secundario que puede unirse en un sitio alostérico de D_3R (Figura 16). Cada una de estas tres regiones del ligando establece una interacción clave con residuos del receptor, y la mutación de uno de ellos impide la activación del receptor(26).

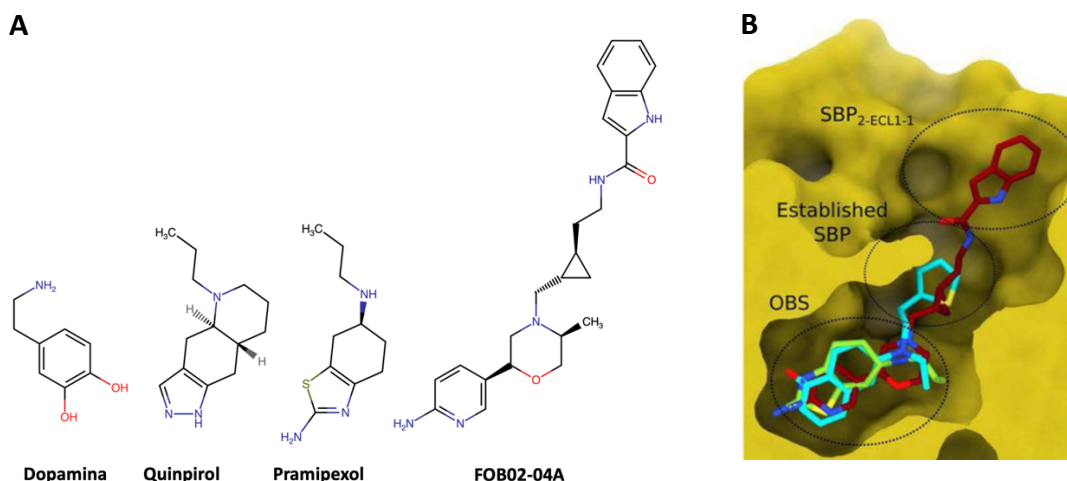


Figura 16: (A) Estructura química de la dopamina, quinpirol, pramipexol y ligando bitópico mostrado como sticks y coloreado según los componentes. Modificado de (26). **(B)** Estructura del ligando bitópico -rojo-, pramipexol -verde- y rotigotina -azul- unidos a D₃R. OBS: Sitio ortostérico. SBP: Sitio alostérico (26).

Con el objetivo de intentar observar *in-vivo* si el extremo N-terminal de D₃R se pliega sobre el bolsillo de unión a ligando y establece interacciones con el mismo, se decidió realizar también el ensayo TRUPATH con el ligando bitópico ya que la unión de este agonista al bolsillo alostérico de D₃R produce que el ligando sobresalga del receptor, por lo que podría impedir el correcto plegamiento del N-terminal sobre D₃R y su interacción con el agonista (Figura 17).

Para poder comparar el efecto que tiene cada uno de los ligandos sobre cada SNP, se comparó la potencia y la eficacia de D₃R WT activado por quinpirol, pramipexol y ligando bitópico (Figura 18). No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros, por lo que podemos asumir que las variaciones en potencia y eficacia detectadas entre fármacos con cada SNP dependerán únicamente de la interacción entre la mutación y el agonista.

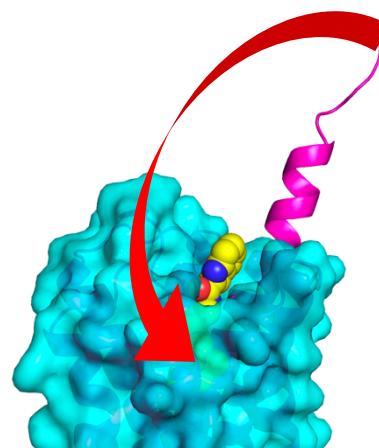


Figura 17: Movimiento del N-terminal de D₃R detectado *in-silico*. En amarillo se representa el ligando bitópico.

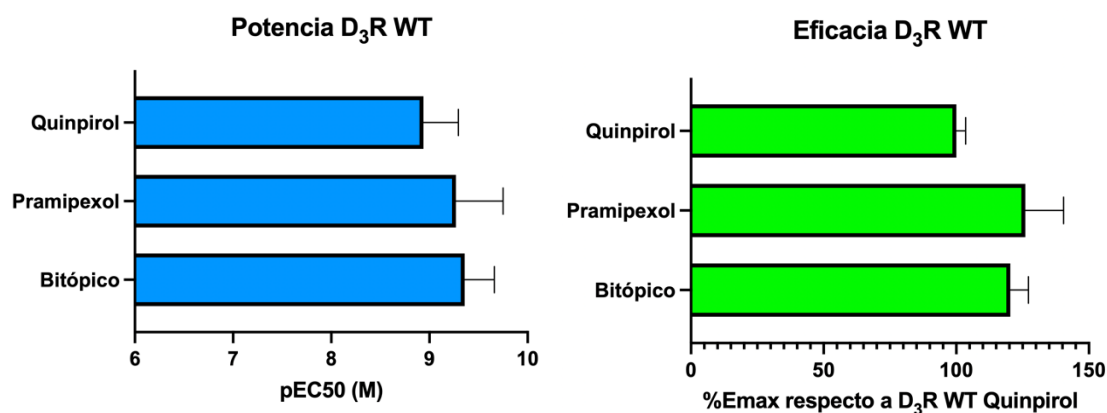


Figura 18: (A) Representación en forma de histograma de la pEC₅₀ de D₃R WT tras la activación por distintos agonistas. **(B)** Representación en forma de histograma de la Emax de D₃R WT tras la activación por distintos agonistas -normalizado frente a D₃R WT Quinpirol-. Los datos de pEC₅₀ y Emax de D₃R WT pramipexol y ligando bitópico se generaron con anterioridad a la realización de este trabajo.

5.4.3 Efecto funcional de la variante S9G: Efecto de varios ligandos

Al comparar las pEC₅₀ obtenidas al activar D₃R con quinpirol, pramipexol o ligando bitópico no se encontraron diferencias significativas, aunque parece existir una tendencia que indica que quinpirol es más potente (Figuras 19 y 20A).

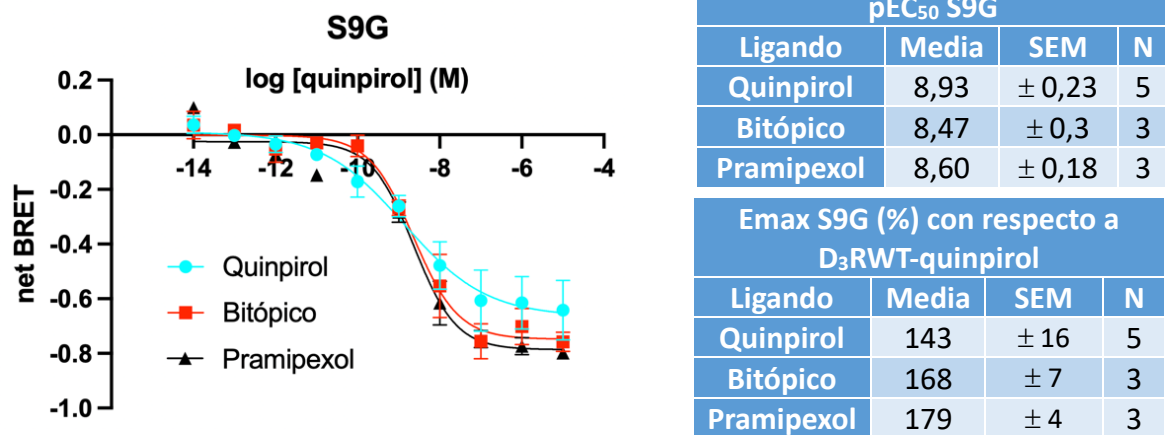


Figura 19: (A) Curva concentración-respuesta de S9G tras la activación del receptor con distintos ligandos. Los datos se representan según media ± SEM de 3 o 5 experimentos distintos, cada uno de los cuales es a su vez un triplicado. (B) pEC₅₀ de S9G tras ser activado por distintos ligandos. (C) Eficacia de S9G normalizada respecto a D₃R WT quinpirol tras ser activado por distintos ligandos. Las variaciones significativas* poseen p < 0,05 en t-test múltiple corregido con el método de Holm-Sidak.

Sin embargo, la tendencia observada en el apartado 5.4.1 que indicaba que S9G tenía una mayor eficacia que D₃R WT se vuelve más marcada al activar el receptor con pramipexol y ligando bitópico, y en esta ocasión, las diferencias sí que son significativas (Figuras 19 y 20B).

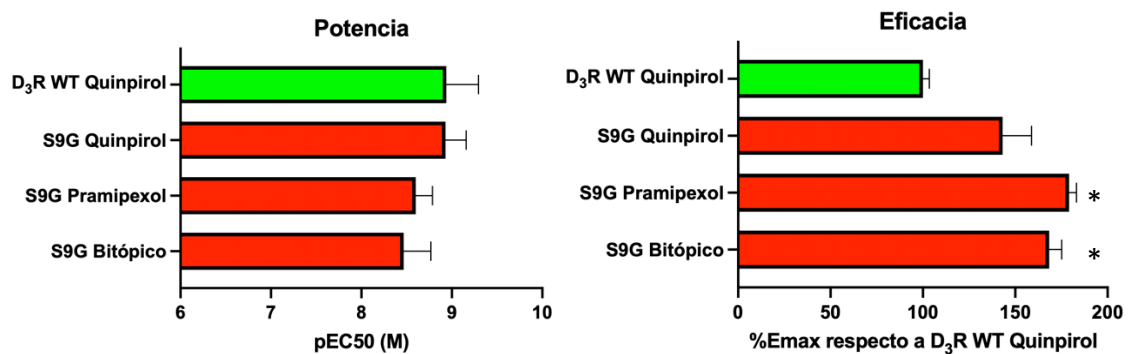


Figura 20: (A) Representación en forma de histograma de la pEC₅₀ de D₃R WT Quinpirol y S9G activado por distintos ligandos. (B) Representación en forma de histograma de la Emax de D₃R WT Quinpirol S9G activado por distintos ligandos -normalizada con respecto a D₃R WT quinpirol-. Las variaciones significativas* poseen p < 0,05 en t-test múltiple corregido usando el método de Holm-Sidak.

Aunque en un principio se esperaba que el ligando bitópico pudiera empeorar la afinidad del receptor, los datos obtenidos indican que S9G posee una mayor eficacia que D₃R WT. A pesar de ello, el aumento de eficacia de S9G tanto con pramipexol como con el ligando bitópico nos indica que el N-terminal del receptor sí que interactúa de alguna forma con el ligando y que el mecanismo de acción de esta interacción no se encuentra impedido por el farmacóforo secundario del ligando bitópico.

5.4.4 Efecto funcional de la variante F346L: Efecto de varios ligandos

Resulta particularmente interesante realizar el ensayo TRUPATH con pramipexol, agonista utilizado en el tratamiento del Parkinson, pues ni quinpirol ni el ligando bitópico se usan en clínica.

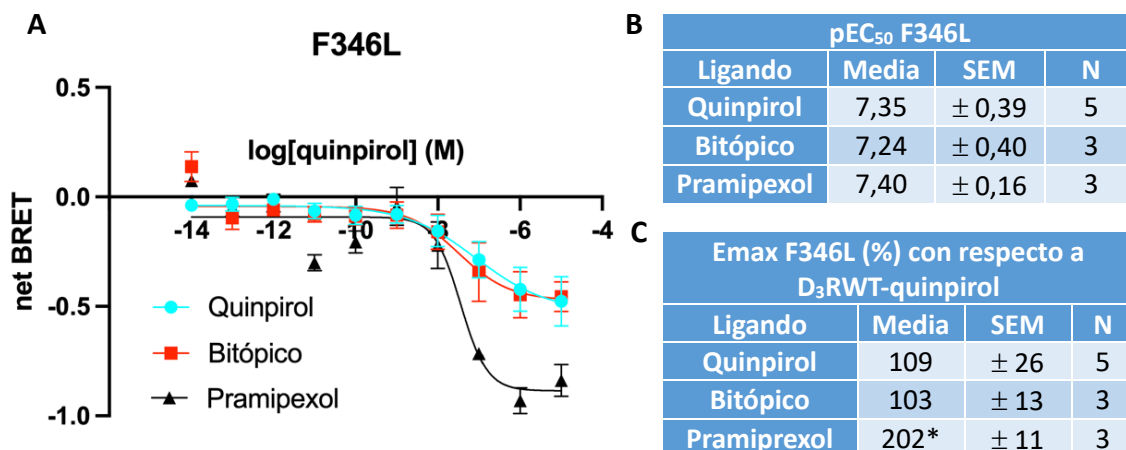


Figura 21: (A) Curva concentración-respuesta de F346L tras la activación del receptor con varios ligandos. Los datos se representan según media \pm SEM de 3 o 5 experimentos distintos, cada uno de los cuales es a su vez un triplicado. (B) pEC₅₀ de F346 tras ser activado por distintos ligandos. (C) Eficacia de F346 normalizada respecto a D₃R WT quinpirol tras ser activado por distintos ligandos. Las variaciones significativas* poseen p < 0,05 en t-test múltiple corregido con el método de Holm-Sidak.

Analizando las figuras 21 y 22A se puede observar que de nuevo F346L posee una menor potencia (~40x) que el receptor salvaje, y que este efecto es independiente del ligando utilizado. Sin embargo, la eficacia del receptor varía en función del agonista utilizado (Figura 22B):

- F346L activado por quinpirol y ligando bitópico posee prácticamente la misma eficacia que D₃R WT.
- F346L activado por pramipexol prácticamente dobla la eficacia de D₃R WT.

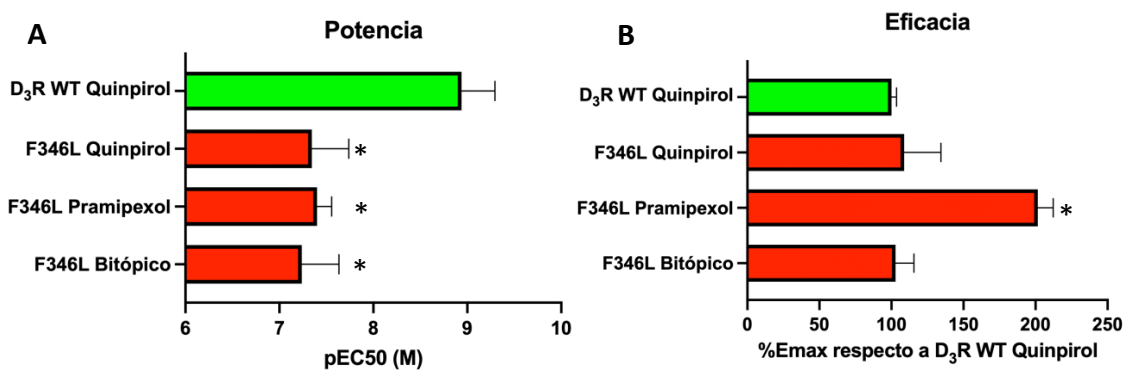


Figura 22: (A) Representación en forma de histograma de la pEC₅₀ de D₃R WT Quinpirol y F346L activado por distintos ligandos. Las variaciones significativas* poseen p < 0,05 en test ANOVA unidireccional y análisis Dunnett posterior. (B) Representación en forma de histograma de la Emax de D₃R WT Quinpirol y F346L activado por distintos ligandos -normalizada con respecto a D₃R WT Quinpirol-. Las variaciones significativas* poseen p < 0,05 en t-test múltiple corregido usando el método de Holm-Sidak.

5.5 Análisis estructural

5.5.1 Resultados del acoplamiento molecular entre D₃R y quinpirol

Analizando las distintas posiciones obtenidas, se seleccionó la opción con tercera mejor energía libre de Gibbs, debido a que era la primera que mantenía el puente salino entre el aspartato 110 y la amina del ligando, interacción que bibliográficamente se ha determinado esencial para la interacción con el agonista (Figura Suplementaria 1) (27). Los resultados del docking (mejores posiciones según energía libre de Gibbs) y una representación gráfica de posición seleccionada se encuentran en el Anexo III.

5.5.2 Relación estructura-función de la variante F346L

La reducción de potencia del receptor F346L puede explicarse por la interacción hidrófoba que se establece entre F346 y el quinpirol (3,8 Å), interacción que aumenta la estabilidad del ligando. Dicha interacción desaparece al mutar el residuo por leucina, pues su cadena lateral se encuentra demasiado alejada (5 Å al realizar la mutación *in-silico*) (Figura 23).

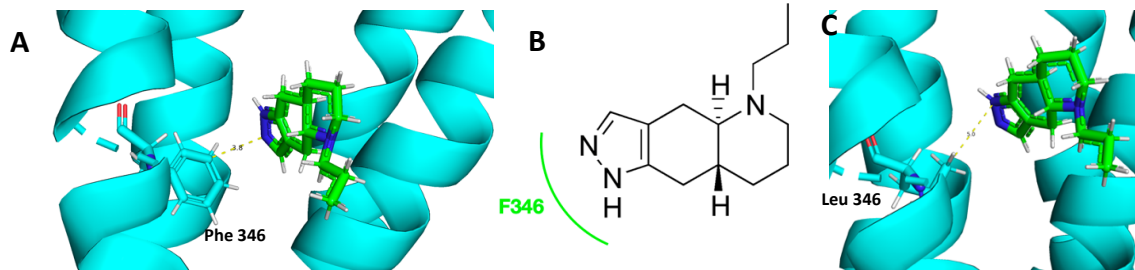


Figura 23: (A) Interacción hidrófoba entre F346 y quinpirol. (B) Interacción hidrófoba entre F346 y quinpirol. (C) L346 y quinpirol no establecen interacciones hidrófobas.

La reducción de la potencia observada en F346L activado por pramipexol puede explicarse por el mismo motivo. F346 mantiene una interacción hidrófoba con el pramipexol (4,1 Å) (25), pero la mutación del residuo a leucina impide la interacción (7 Å) (Figura 24).

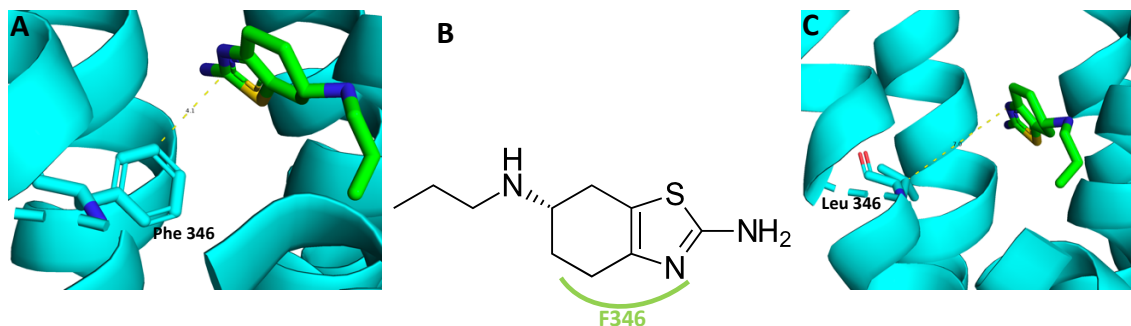


Figura 24: (A) Interacción hidrófoba entre F346 y pramipexol. (B) Interacción hidrofóbica entre F346 y pramipexol. (C) L346 y pramipexol no establecen interacciones hidrofóbicas.

En el caso del ligando bitópico, este de nuevo forma una interacción hidrófoba con F346 (26) (3,5 Å). La mutación F346L impide esta interacción, alejando hasta 4,5 Å el ligando de la leucina, lo que explica la disminución de la potencia observada (Figura 25).

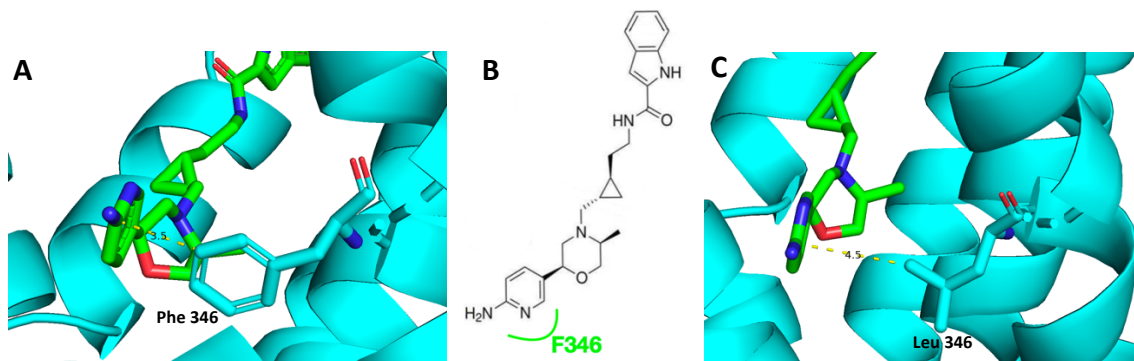


Figura 25: (A) Interacción hidrófoba entre F346 y ligando bitópico. (B) Interacción hidrófoba entre F346 y bitópico. (C) L346 y bitópico no establecen interacciones hidrófobas.

6. Discusión y perspectivas futuras

Mediante la realización de este trabajo se ha pretendido caracterizar el impacto funcional de distintos polimorfismos del receptor de dopamina D₃R, cuantificando los cambios producidos en potencia y eficacia con respecto al receptor salvaje. Para ello se realizaron ensayos (BRET).

Para llevar a cabo dicho objetivo, fue fundamental asegurar que los diferentes receptores generados eran capaces de expresarse en membrana correctamente, y que estos polimorfismos no modificaban su expresión en superficie. Este punto se verificó a través de la realización del ensayo de expresión en superficie (Figura 12), que indicó que no existían variaciones significativas en la expresión del receptor, lo que nos permite atribuir los resultados del ensayo BRET únicamente a variaciones en la potencia y eficacia del receptor, y no a cambios en su expresión.

Una vez realizados los ensayos BRET se determinó que sí existían variaciones en potencia y eficacia entre los distintos polimorfismos. Además, contrariamente a lo que sucede en los receptores salvajes (Figura 18) en algunos mutantes existe una variación en estos parámetros al utilizar distintos agonistas (Figura 22 B):

S9G está localizado en el extremo N-terminal extracelular de D₃R, región que posee una gran flexibilidad. En trabajos anteriores se ha determinado que este polimorfismo poseía una mayor potencia y eficacia que el receptor salvaje en la unión de dopamina (midiendo la variación en la concentración de AMPc intracelular en células HEK293T transfectadas) (34). En este trabajo, a través de ensayos BRET se corroboró con 3 agonistas distintos (quinpirol, pramipexol y ligando bitópico) que S9G posee una mayor eficacia (~1,5x) que el receptor salvaje (Figura 20B). Sin embargo, este cambio sólo es estadísticamente significativo en el caso del pramipexol y ligando bitópico, pero no en quinpirol (aunque se aprecia la misma tendencia). Por otro lado, en contra de lo descrito previamente para la unión de dopamina, no se detectaron cambios significativos en la potencia del receptor (Figura 20A), por lo que es probable que el efecto se deba al cambio de ligando. En cualquier caso, el aumento de la eficacia de S9G podría requerir una disminución de la dosis de tratamiento en pacientes tratados con pramipexol.

La gran movilidad del extremo N-terminal de D₃R ha impedido la caracterización de su mecanismo de acción en diversos estudios estructurales (26–28,31). Sin embargo, mediante estudios *in-silico* se ha postulado que esta región de la proteína puede plegarse sobre el centro activo y estar implicada en el reconocimiento del ligando (32). Para intentar aclarar este proceso se realizó el ensayo BRET con el ligando bitópico, capaz de unirse tanto al bolsillo ortostérico como a un nuevo sitio alostérico de D₃R (Figura 16), esperando que esta última unión produjera impedimentos estéricos que impidieran el correcto plegamiento del N-terminal sobre el sitio de unión a ligando (Figura 17). Sin embargo, en contra de lo esperado la eficacia de S9G con ligando bitópico aumentó.

Este hecho, refrendado por el aumento de eficacia en quinpirol y pramipexol, nos indica que el extremo N-terminal sí que está implicado en el reconocimiento del ligando, y que la presencia del farmacóforo secundario y del linker del ligando bitópico no interfieren en este proceso. A pesar de ello, con los resultados actuales no podemos afirmar que el N-terminal se pliegue sobre el bolsillo de unión a ligando. Para verificar este aspecto podría realizarse un ensayo BRET/FRET con un fluoróforo en la parte extracelular del bolsillo de unión a ligando y otro en el N-terminal, de forma que se obtuviera señal si este se pliega.

V214A, localizada en la TM5 de D₃R interacciona con la hélice $\alpha 5$ de $G\alpha_{i/o}$. Al realizar el ensayo BRET activando el receptor con quinpirol, no se detectaron cambios significativos en la potencia del receptor con respecto a D₃R WT. En el caso de la eficacia, de nuevo los cambios no son significativos, aunque sí que se puede observar una tendencia que parece apuntar una mayor eficacia de V214A (Figura 15).

F346L se localiza en el bolsillo de unión a ligando. Tras activar al receptor con 3 ligandos diferentes (quinpirol, pramipexol y ligando bitópico) se observó una reducción muy significativa de la potencia (~40x) en los tres casos (Figura 22A). Estructuralmente, esta disminución de la potencia puede explicarse a través de la interacción hidrófoba que mantiene F346 con el ligando (25,26). Al mutar este residuo, la cadena lateral de la leucina queda demasiado alejada para mantener la interacción, produciéndose así la disminución de la afinidad de F346L (Figuras 23, 24 y 25).

En un principio se podría suponer que esta disminución en la potencia del receptor requeriría un aumento de la dosis de tratamiento. Sin embargo, la eficacia de F346L al ser activado por pramipexol (fármaco estándar empleado en el tratamiento de la enfermedad) se duplica con respecto a D₃R WT (Figura 22B), por lo que podría existir un efecto compensatorio en pacientes tratados con esta medicación.

Teniendo en cuenta que ni el quinpirol ni FOB02-04A produjeron un aumento de la eficacia del receptor, y que en principio la disminución de la potencia es un efecto independiente de ligando, es probable que *in-vivo* F346L aumente la susceptibilidad de la enfermedad de Parkinson en pacientes con este polimorfismo, sobre todo en homocigotos. Sin embargo, los últimos estudios GWAS realizados no han asociado ningún SNP en DRD3 con una mayor probabilidad de padecer la enfermedad (41–43), y tampoco se ha realizado ningún trabajo concreto que haya estudiado esta relación. Teniendo en cuenta que su frecuencia de aparición es de 3 personas por cada 100.000 habitantes (39), y que en pacientes de Parkinson este número podría estar sobrerrepresentado, merece la pena continuar la investigación a este respecto, caracterizando también el efecto de diferentes fármacos para poder ajustar las dosis de cada uno de ellos.

A lo largo del presente trabajo se han encontrado variantes que presentaban un error elevado en los ensayos BRET. A pesar de que en algunos casos sí que se pueden observar cambios marcados entre mutantes, es probable que el alto error obtenido nos impidiera categorizar estas diferencias como significativas. Sin embargo, un mayor número de réplicas u otros métodos de detección diferentes podrían revelar un impacto funcional y solventar este problema.

7. Conclusiones

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que:

- 1) Los distintos polimorfismos estudiados no afectan a la expresión de D₃R en superficie.
- 2) Los constructos generados con y sin GFP extracelular no presentan cambios significativos en la expresión en membrana y son equivalentes funcionalmente.
- 3) Los polimorfismos del receptor de dopamina D₃R pueden presentar cambios en potencia y eficacia, y en contra de lo observado con el receptor salvaje, este efecto puede variar con los fármacos:
 - S9G: Presenta mayor eficacia al ser activado con pramipexol y FOB02-04A (~1,5x), pero no así con quinpirol (aunque existe la misma tendencia). Requerirá experimentos para demostrar si una disminución de la dosis de tratamiento podría reducir los efectos secundarios por uniones inespecíficas a otros receptores.
 - V214A: No presenta variaciones significativas en potencia ni eficacia.

- **F346L**: Presenta una disminución significativa de la potencia (~40x) con quinpirol, pramipexol y FOB02-04A (debido a interacciones electrostáticas entre F346 y el ligando, que no se producen en L346). Además, su eficacia se duplica únicamente con pramipexol, pero no varía con quinpirol ni con FOB02-04A. Es necesaria más investigación para determinar la variación de la dosis de tratamiento (si corresponde) o si aumenta la susceptibilidad a Parkinson.
- 4) El extremo N-terminal de D₃R participa en el reconocimiento del ligando, y la unión de un agonista al sitio alostérico de D₃R no impide este proceso. Con los resultados obtenidos no se puede determinar si el N-terminal se pliega sobre el bolsillo de unión a ligando.
 - 5) Por todo ello, individuos con algunas de estas variantes pueden requerir un tratamiento diferente, lo que podría realizarse variando la dosis o usando fármacos alostéricos que potenciasen la función del D₃R a través de un bolsillo alternativo (sin embargo, no existen en la actualidad agonistas alostéricos de D₃R).

7. Conclusions

In view of the results obtained, we conclude that:

- 1) The different D₃R polymorphisms studied do not affect surface expression of the receptor.
- 2) D₃R expressed with and without extracellular GFP do not exhibit significant changes in surface expression and they are functionally equivalent.
- 3) The D₃R receptor polymorphisms may exhibit changes in potency and efficacy. Unlike D₃R WT, these changes may be altered by different ligands:
 - S9G: It has higher efficacy than D₃R WT with the agonists pramipexole and FOB02-04A (~1,5x). In contrast, the change with quinpirole is not significant (although we observed the same tendency). It will be necessary new experiments to demonstrate if a decrease in treatment dose would decrease secondary effects by unspecific binding with other receptors.
 - V214A: It does not have significant effects in potency and efficacy.
 - F346L: It has a significant decrease of potency (~40x) with quinpirole, pramipexole and FOB02-04A (because of hydrophobic interaction between F346 and the ligand, which is not formed in L346). Furthermore, F346L maximum efficacy is only double with pramipexol, but there are not changes with quinpirole and FOB02-04A. It will be necessary more research to elucidate the medical treatment dose variation (if necessary) or if the susceptibility of PD is increased.
- 4) The N-terminal region of D₃R is involved in ligand recognition, and this process is not blocked by the binding of an agonist to the allosteric site of D₃R. With the results obtained in this work, it cannot be concluded if N-terminal region folds above the ligand binding site.
- 5) Patients with some of these variants may need a different medical treatment. It could be achieved with a variation of the medicine dose or with an allosteric drug with the capacity of increasing D₃R function through an alternative ligand fold. However, allosteric drugs are not currently available.

8. Bibliografía

1. Zhang PL, Chen Y, Zhang CH, Wang YX, Fernandez-Funez P. Genetics of Parkinson's disease and related disorders. Vol. 55, Journal of Medical Genetics. BMJ Publishing Group; 2018. p. 73–80.
2. Van Den Eeden SK. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. Am J Epidemiol. 2003 Jun 1;157(>11):1015–22.
3. Yang P, Perlmutter JS, Benzinger TLS, Morris JC, Xu J. Dopamine D3 receptor: A neglected participant

in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? Vol. 57, Ageing Research Reviews. Elsevier Ireland Ltd;2020

4. La enfermedad de Parkinson: causas, síntomas y tratamientos | National Institute on Aging [Internet]. [cited 2024 Apr 27]. Available from: <https://www.nia.nih.gov/espanol/parkinson/enfermedad-parkinson-causas-sintomas-tratamientos>
5. Cramb KML, Beccano-Kelly D, Cragg SJ, Wade-Martins R. Impaired dopamine release in Parkinson's disease. Vol. 146, Brain. Oxford University Press; 2023. p. 3117–32.
6. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/neubiorev
7. Sibley DR, Monsma FJ. Molecular biology of dopamine receptors.
8. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. NC-IUPHAR REVIEW. 2014; Available from: www.brjpharmacol.org
9. Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, Krack P, David O, Savasta M, et al. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? Transl Psychiatry [Internet]. 2016 [cited 2024 Apr 27];6(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26954980/>
10. Cortés A, Moreno E, Rodríguez-Ruiz M, Canela EI, Casadó V. Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies. Expert Opin Drug Discov [Internet]. 2016 Jul 2 [cited 2024 Apr 27];11(7):641–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27135354/>
11. Ryoo HL, Pierrotti D, Joyce JN. Dopamine D3 receptor is decreased and D2 receptor is elevated in the striatum of Parkinson's disease. Mov Disord [Internet]. 1998 [cited 2024 Apr 30];13(5):788–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9756147/>
12. Hauser AS, Chavali S, Masuho I, Jahn LJ, Martemyanov KA, Gloriam DE, et al. Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. Cell. 2018 Jan 11;172(1–2):41–54.e19.
13. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. Vol. 526, Nature. Nature Publishing Group; 2015. p. 68–74.
14. Turner TN, Yi Q, Krumm N, Huddleston J, Hoekzema K, Stessman HAF, et al. NAR Breakthrough Article denovo-db: A compendium of human de novo variants. Nucleic Acids Res. 2017 Jan 1;45(D1):D804–11.
15. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem->
16. García-Nafria J, Watson JF, Greger IH. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. Sci Rep. 2016 Jun 6;6.
17. Arroyo-Urea S, Watson JF, García-Nafria J. Molecular Cloning Using In Vivo DNA Assembly. Methods Mol Biol; 2633:33–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36853454/>
18. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. Vol. 9, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2021.
19. DiBerto JF, Smart K, Olsen RHJ, Roth BL. Agonist and antagonist TRUPATH assays for G protein-coupled receptors. STAR Protoc. 2022 Jun 17;3(2).
20. Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, Teper P, Gawron K, Kowalczyk A, et al. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. Vol. 9, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2021.
21. Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EMM, et al. Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. BMC Biol. 2011 May 27;9.
22. Yano H, Provasi D, Cai NS, Filizola M, Ferré S, Javitch JA. Development of novel biosensors to study receptor-mediated activation of the G-protein subunits Gs and Golf. Journal of Biological Chemistry. 2017 Dec 8;292(49):19989–98.
23. Van Unen J, Stumpf AD, Schmid B, Reinhard NR, Hordijk PL, Hoffmann C, et al. A new generation of FRET sensors for robust measurement of Gαi1, Gαi2 and Gαi3 activation kinetics in single cells. PLoS One. 2016 Jan 1;11(1).
24. Olsen RHJ, DiBerto JF, English JG, Glaudin AM, Krumm BE, Slocum ST, et al. TRUPATH, an open-

- source biosensor platform for interrogating the GPCR transducerome. *Nat Chem Biol.* 2020 Aug 1;16(8):841–9.
25. 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.* 2021 Mar 18;81(6):1147–1159.e4.
 26. Arroyo-Urea S, Nazarova A, Bonifazi A, Battiti F, Lam J, García-Nafria J. Structure of the dopamine D3 receptor bound to a bitopic agonist reveals a new specificity site in an expanded allosteric pocket. *Research Square Preprint [Internet].* 2023; Available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3433207/v1>
 27. 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.* 2021 Mar 18;81(6):1147–1159.e4.
 28. Xu P, Huang S, Krumm BE, Zhuang Y, Mao C, Zhang Y, et al. Structural genomics of the human dopamine receptor system. *Cell Res.* 2023 Aug 1;33(8):604–16.
 29. Draper-Joyce CJ, Khoshouei M, Thal DM, Liang YL, Nguyen ATN, et al. Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor–Gi complex. *Nature.* 2018 Jun 20;558(7711):559–63.
 30. Li XN, Zheng JL, Wei XH, Wang BJ, Yao J. No association between the Ser9Gly polymorphism of the dopamine receptor D3 gene and schizophrenia: A meta-analysis of family-based association studies. *BMC Med Genet.* 2020 Apr 21;21(1).
 31. Chien EYT, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science (1979).* 2010 Nov 19;330(6007):1091–5.
 32. Weng WH, Li YT, Hsu HJ. Activation-Induced Conformational Changes of Dopamine D3 Receptor Promote the Formation of the Internal Water Channel. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
 33. Lundstrom K, Turpin MP. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 1996 Aug 23 [cited 2024 Apr 27];225(3):1068–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8780735/>
 34. Jeanneteau F, Funalot B, Jankovic J, Deng H, Lagarde JP, Bard Lucotte G, et al. A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor [Internet]. 2006. Available from: www.hapmap.org
 35. Crocq MA, Mant R, Asherson P, Williams J, Hode Y, Mayerova A, et al. Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene.
 36. Spurlock G, Williams J, McGuffin P, Aschauer HN, Lenzinger E, Fuchs K, et al. European multicentre association study of schizophrenia: a study of the DRD2 Ser311Cys and DRD3 Ser9Gly polymorphisms. *Am J Med Genet.* 1998 Feb 7;81(1):24–8.
 37. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature.* 2014;511(7510):421–7.
 38. Chen CH, Liu MY, Wei FC, Koong FJ, Hwu HG, Hsiao KJ. Further evidence of no association between Ser9Gly polymorphism of dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1997 Feb 21;74(1):40–3.
 39. GPCRdb [Internet]. [cited 2024 Apr 6]. Available from: https://gpcrdb.org/protein/drd3_human/
 40. Park J, Moon E, Lim HJ, Kim K, Hong YR, Lee JH. Changes of Locomotor Activity by Dopamine D2, D3 Agonist Quinpirole in Mice Using Home-cage Monitoring System. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience.* 2023 Nov 1;21(4):686–92.
 41. Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson’s disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2019 Dec;18(12):1091–102.
 42. Foo JN, Chew EGY, Chung SJ, Peng R, Blauwendraat C, Nalls MA, et al. Identification of Risk Loci for Parkinson Disease in Asians and Comparison of Risk Between Asians and Europeans: A Genome-Wide Association Study. *JAMA Neurol [Internet].* 2020 Jun 1 [cited 2024 Jun 6];77(6):746–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32310270/>
 43. Carrasco AM, Real R, Lawton M, Reynolds RH, Tan M, Wu L, et al. Genome-wide Analysis of Motor Progression in Parkinson Disease. *Neurol Genet.* 2023 Oct 8;9(5).

9. Anexos

ANEXO I:

Tabla 1.1: Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR para generar los distintos mutantes y T_m utilizada en cada una de las reacciones

Mutación	Primer	Secuencia (5´-3´)	T_m (°C) Vector GFP- D3-pcDNA4	T_m (°C) Vector ΔGFP- D3-pcDNA4
S9G	DRD3_S9G_Fw	catctctgagccagctgagt ggccacctgaactac	68	69
	DRD3_S9G_Rv	actcagctggctcagagat gcaggtccctgga		
V136I	DRD3_V136I_F w	ctgcagtggtcatgcccat ccactaccagcatg		
	DRD3_V136I_Rv	gggcatgaccactgcagt gtacctgtctatgctg		
V214A	DRD3_214A_Fw	gtctatgccagaatctatgt ggccctgaaacaaagga ga	66	69
	DRD3_214 ^a _Rv	cacatagattctggcatag acaaggacagtcactcc		
F346L	DRD3_F346L_F w	ctgctggctgcccttctctgt tgaccatgttctc	68	69
	DRD3_F346L_Rv	gaagggcagccagcaga caatgaaggccc		

Tabla 1.2: Composición de la mezcla de PCR para ambos vectores.

Componentes	Volumen (μ L) Vector GFP-D3-pcDNA4	Volumen (μ L) Vector ΔGFP-D3-pcDNA4
Primers diluidos 1/20 en agua miliQ	1	1
ADN molde (1ng/mL)	1	5
Buffer 5x	5	5
dNTPs (2,5 mM)	2,5	2,5
ADN polimerasa (Phusion de alta fidelidad)	0,25	0,25
Betaína (5M)	5	5
DMSO (2,5%)	0,625	0,625
H ₂ O	9,625	9,625

Tabla 1.3: Programa de PCR.

Fase PCR	Duración	Temperatura (°C)
<i>Hot Start</i>	30''	98
Desnaturalización	10''	98
Hibridación	30''	T _m de cada pareja de cebadores
Elongación	3'	72
Elongación final	10'	72

Tabla 1.4: Composición de medios.

Medio SOB
Triptona 2% (m/v)
Extracto de levadura 0,5% (m/v)
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
MgCl ₂ 10mM
Agua destilada

Medio LB24
Agar 1,5% (m/v)
Triptona 1% (m/v)
NaCl 1% (m/v)
Extracto de levadura 0,5% (m/v)
Agua destilada

ANEXO III:

Resultados del acoplamiento molecular entre D₃R y quinpirol



Figura Suplementaria 1: (A) Puente salino entre Asp110 y el grupo amino del ligando a una distancia de 3,5 Å. En azul se muestran los átomos de nitrógeno y en rojo los de oxígeno. **(B)** Ranking de las 5 mejores posiciones obtenidas en el acoplamiento molecular con SwissDock, ordenadas según su energía de Gibbs. En rojo se encuentra remarcada la elegida.