

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Modulación de los canales de calcio presinápticos por
variantes de receptores acoplados a proteína G humanos:
“el receptor opioide mu y el receptor de ghrelina”

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Eduardo Javier López Soto

Directores: Dra. Jesica Raingo

Dra. Cecilia Inés Catanesi

Lugar de trabajo: Laboratorio de Electrofisiología, Instituto
Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE – CICPBA/CONICET)

La Plata, 2015.



Entre todas las aventuras, las más fascinantes son las exploraciones a lo desconocido.

(...) Y esa fascinación reside en que la curiosidad es uno de los motores de la evolución. Incluso los animales inferiores son curiosos y buscar comida o albergue en terreno desconocido es una aventura también para ellos.

La ciencia tiene la fascinación de la aventura porque, por encima de todo, es una exploración a lo desconocido.

(Cesar Milstein, 15-12-1999)

Resumen

Los canales de calcio activados por voltaje pre-sinápticos (Ca_v2) son proteínas de transmembrana altamente especializadas en la transducción de señales eléctricas en señales químicas. Dado que, en las terminales axonales, la entrada de Ca^{2+} a través de los Ca_v2 es condición necesaria para la liberación de neurotransmisores, su modulación constituye un blanco regulatorio de alta efectividad de la actividad neuronal. Dentro de los mecanismos que regulan la actividad de los Ca_v2 en las membranas pre-sinápticas se encuentra la activación de diversos receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*). Estos receptores modulan negativamente la actividad de los Ca_v2 y, en consecuencia, reducen la liberación de neurotransmisores tanto excitatorios como inhibitorios dependiendo de la sinapsis en la que actúen.

Los GPCRs constituyen una súper-familia de receptores activados por una gran variedad de ligandos y, dada su participación en múltiples procesos fisiológicos representan blancos terapéuticos muy importantes. La unión de un ligando a su GPCR desencadena la activación de la proteína G, la cual al activarse se escinde en sus subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ siendo capaces de activar diversas cascadas de señalización intracelular y modular múltiples efectores intracelulares, entre los que se encuentran los Ca_v2 pre-sinápticos. Sin embargo, el 15 % de los GPCRs pueden adquirir un estado activo en ausencia de ligando que podría potencialmente impactar en la actividad de los Ca_v2 . Adicionalmente, tanto esta actividad constitutiva como la actividad dependiente de agonista pueden verse drásticamente alteradas por la presencia de variaciones en la secuencia de los genes que codifican los GPCRs. Así, debido a los distintos modos de activación y a los subtipos que ocurren como consecuencia de variantes de los GPCRs, es preciso realizar estudios detallados de los mecanismos que median los efectos de cada GPCR de interés para el desarrollo de estrategias farmacológicas efectivas.

En este contexto, en el presente trabajo de tesis estudiamos el impacto de la activación de dos GPCRs fisiológicamente muy relevantes sobre la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos: el receptor opioide μ (MOR, del inglés *μ opioid receptor*), el cual constituye la principal puerta de entrada de los potentes efectos analgésicos de los opioides más eficaces y utilizados en la historia humana; y el receptor de ghrelina (GHSR1a, del inglés *growth hormone secretagogue receptor type 1a*), receptor de la única hormona orexigénica y el cual despliega la actividad constitutiva de mayor nivel conocida entre los GPCRs. Adicionalmente, evaluamos cómo variantes de los genes

que codifican ambos receptores modifican su actividad y determinamos sus frecuencias en nuestra población.

El polimorfismo de un nucleótido N40D de MOR, cuya frecuencia varía notablemente entre las poblaciones humanas, altera las funciones celulares del receptor llevando a diferencias en la sensibilidad al dolor y al tratamiento con opioides. La activación de MOR por agonistas opioides en las terminales de neuronas periféricas que transmiten la sensación dolorosa, inhibe los $Ca_v2.2$ disminuyendo, consecuentemente, la liberación de neurotransmisores excitatorios que potencian la señal dolorosa. En estas neuronas se expresa en forma exclusiva una isoforma de *splicing* alternativo de los $Ca_v2.2$, $Ca_v2.2e37a$, que posee una sensibilidad aumentada a MOR. En este trabajo evaluamos si la activación de los subtipos de MOR producto de N40D (MOR-N y MOR-D) tiene un impacto diferencial sobre la actividad de los $Ca_v2.2e37a$ exclusivos de las vías del dolor. Utilizando como modelo de estudio un sistema de expresión heteróloga, mediante la técnica patch-clamp en configuración de célula entera con fijación de voltaje, encontramos que N40D impacta en los efectos inhibitorios de MOR sobre los $Ca_v2.2$ provocando una ganancia de función para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ pre-sinápticas mediadas por la isoforma de *splicing* del canal específica de las vías del dolor, $Ca_v2.2e37a$, y por la isoforma de *splicing* de expresión ubicua en el sistema nervioso, $Ca_v2.2e37b$. Así mismo, nuestro análisis genético-poblacional reveló que N40D se encuentra en un ~ 18 % en una región de nuestro país y, que su distribución a lo largo de distintas poblaciones mundiales, permite identificar una estructura poblacional formada por tres grupos que se corresponden a distintos linajes de ancestría humana. De esta manera, nuestros resultados sugieren que el polimorfismo humano N40D de MOR impacta en la respuesta fisiológica de la activación de este receptor y que podría estar involucrado, de manera condicionada por la ancestría, en las diferencias inter-individuales de la sensibilidad al dolor y tratamientos opioides.

Por otro lado, GHSR1a es el único receptor conocido de la hormona ghrelina. Esta hormona es sintetizada en células endócrinas del estómago, y desde allí llega hasta el cerebro donde casi exclusivamente accede al hipotálamo provocando sus potentes efectos orexigénicos. Ghrelina, tras unirse a GHSR1a, activa transcripcional y eléctricamente a las neuronas hipotalámicas por mecanismos post-sinápticos, sin embargo, GHSR1a también se localiza en las membranas pre-sinápticas, en donde se desconoce si contribuye a dicha activación neuronal. Curiosamente, GHSR1a es el GPCR con mayor actividad constitutiva conocido y tampoco se conoce si esta activación independiente de ghrelina participa en la activación neuronal. Dado que los Ca_v2 son muy sensibles a la modulación por GPCRs, indagamos si GHSR1a

impactaba en la actividad de los Ca_v2 . Utilizando como modelo un sistema de expresión heteróloga, mediante patch-clamp en configuración célula entera y con fijación del voltaje, encontramos que la activación de GHSR1a inhibe drásticamente las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$. Mientras su actividad constitutiva modula los Ca_v2 por una disminución crónica de la densidad de canales en la membrana plasmática dependiendo de los niveles de expresión del receptor y por un mecanismo mediado por la proteína Gi/o ; la actividad de GHSR1a evocada por ghrelina modula negativamente la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos de manera reversible y saturable a niveles muy bajos del receptor. Adicionalmente, la inhibición mediada por la activación de GHSR1a por ghrelina involucra a ambas subunidades de la proteína Gq , siendo más sensibles a esta inhibición los $Ca_v2.2$ que los $Ca_v2.1$. También encontramos que una propiedad fundamental de esta inhibición, como es la dependencia del voltaje, se altera completamente dependiendo del subtipo de subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ que acompaña al canal. Para estudiar si la actividad de GHSR1a expresado a niveles nativos y en un contexto neuronal modula las corrientes Ca_v2 utilizamos cultivos primarios de neuronas hipotalámicas de rata sobre-expresando GHSR1a y de un modelo de ratón transgénico que expresa eGFP (del inglés *enhanced green fluorescent protein*) bajo el promotor del gen GHSR. En estos experimentos encontramos que GHSR1a es capaz de reducir las corrientes Ca_v2 pre-sinápticas en neuronas hipotalámicas tanto por su actividad constitutiva como por la dependiente de ghrelina.

Posteriormente, indagamos también el efecto de la mutación A204E humana de GHSR1a, que elimina la actividad constitutiva del receptor, y su prevalencia en una población argentina. Encontramos que A204E impacta en la modulación de los Ca_v2 pre-sinápticos por GHSR1a provocando una inhibición de las corrientes Ca_v2 sólo cuando es activado por ghrelina tanto es un sistema de expresión heteróloga como en neuronas hipotalámicas en cultivo. Adicionalmente, A204E no constituye un sitio de variación genético-poblacional en la población argentina analizada. De esta manera, A204E, con un impacto poblacional muy bajo, provoca una pérdida de función del rol modulador de GHSR1a sobre las corrientes Ca_v2 .

Por último, abordamos un posible impacto fisiológico de la modulación de los Ca_v2 por GHSR1a. Dado que en el hipotálamo predomina un tono GABAérgico que controla diversos núcleos neuronales, estudiamos si la modulación de los Ca_v2 por GHSR1a regulaba la liberación de GABA en neuronas hipotalámicas como un posible mecanismo de activación neuronal. Encontramos que ambos modos de activación de GHSR1a regulan negativamente la liberación de GABA en neuronas hipotalámicas, sólo cuando la misma está mediada por mecanismos dependientes del ingreso de

Ca^{2+} a través de los Ca_v a las terminales axonales. Este mecanismo podría cobrar relevancia fisiológica en situaciones de ayuno, cuando la expresión de GHSR1a se encuentra aumentada, contribuyendo a la activación neuronal descrita en estas condiciones fisiológicas.

Nuestros datos demuestran que GHSR1a modula la actividad de los Ca_v pre-sinápticos tanto por vías convencionales de inhibición de los Ca_v (activación de GPCRs dependiente de agonistas), como por vías no convencionales (activación constitutiva de GPCRs), sugiriendo un rol fundamental de la actividad constitutiva de GHSR1a en la fisiología sináptica de neuronas hipotalámicas. Así, GHSR1a modula drásticamente las corrientes Ca_v2 pre-sinápticas por mecanismos completamente distintos dependientes de su modo de activación.

En resumen, en esta tesis describimos por primera vez diferentes mecanismos no convencionales de modulación de los Ca_v2 pre-sinápticos por la activación de GPCRs. Esta modulación, sumamente efectiva para regular la actividad sináptica, requiere estudios detallados de sus componentes participantes que la median y de sus interacciones para poder comprender el alcance de la misma en distintos contextos celulares. Así mismo, demostramos que las variaciones de los genes de los GPCRs pueden alterar drásticamente su capacidad para modular los Ca_v2 , llevando a grandes diferencias en las respuestas fisiológicas de las que participan, planteando además la relevancia de determinar el alcance poblacional de cada una de ellas para poder encarar estrategias terapéuticas.

Abstract

Voltage gated calcium channels (Ca_v2) are transmembrane proteins highly specialized in transduction of electrical into chemical signals. Since Ca^{2+} influx to axonal terminals through the Ca_v2 is a required condition for neurotransmitter release, Ca_v2 regulation is a highly effective control point of neuronal activity. Activation of several presynaptic G-protein coupled receptors (GPCR) is a common mechanism that controls Ca_v2 activity. These receptors negatively modulate the Ca_v2 activity and consequently reduce both excitatory and inhibitory neurotransmitter release depending on the synapse subtype.

Since GPCRs are a super-family of receptors activated by several agonists and they are involved in multiple physiological mechanisms, they represent one major therapeutic target. Ligand binding to its specific GPCR triggers the activation of G protein, which gets cleaved into its forming subunits $G\alpha$ and $G\beta\gamma$, which are able to activate intracellular signaling cascades and impact in multiple intracellular effectors as presynaptic Ca_v2 . However, around 15 % of the GPCRs can be active without any ligand and they could potentially impact on Ca_v2 activity. Additionally, this constitutive activity and the agonist-dependent activity could be dramatically modified by variations in the DNA sequence of the GPCR gene. Taking into account these different activation modes and gene variations of GPCR, detailed studies of the mechanisms involved on the effects of each GPCR are required in order to develop safer therapeutic strategies.

Here we studied the impact of the activation of two physiologically relevant GPCRs: the μ -opioid receptor (MOR), which is the main gateway of the potent effect of the most effective and used analgesic in human history; and ghrelin receptor (GHSR1a), the only known receptor of the orexigenic hormone ghrelin, and which displays the highest level of constitutive activity among GPCRs, on presynaptic Ca_v2 activity, and how variants of their genes with different frequencies in an Argentinean population modify their activity.

N40D is a single nucleotide polymorphism of MOR, with frequencies which differ among human populations, that disrupts cell functions of MOR leading to pain sensitivity and opioid treatment differences. MOR activation by opioid agonists in peripheral neuronal terminals, that transmit pain sensation, inhibits $Ca_v2.2$ activity decreasing consequently the excitatory neurotransmitter release. In these neurons is exclusively expressed an alternative splicing isoform of $Ca_v2.2$, $Ca_v2.2e37a$, which has an increased sensitivity to MOR activation. So, we investigated whether activation of MOR subtypes resulting from N40D (MOR-N and MOR-D) had a differential impact on inhibitory modulation of MOR on $Ca_v2.2e37a$ activity. We used a heterologous

expression system and patch-clamp technique in whole-cell configuration with voltage-clamp mode and found that N40D impacts on MOR inhibitory effects on $Ca_v2.2e37a$. Thus, N40D produces a gain of function to inhibit presynaptic $Ca_v2.2$ currents from splicing isoform specific of pain pathways. Moreover, we found the same effect of N40D on the splicing isoform ubiquitously expressed in nervous system, $Ca_v2.2e37b$. Additionally, our genetic-population analysis showed that N40D is present in about 18 % of the samples of an Argentinean population and its distribution throughout several world populations allows us to identify a genetic population structure defined by three clusters, corresponding to different human lineages of ancestry. Thus, our results suggest that human N40D polymorphism of MOR impacts on the physiological response of MOR activation and could be involved, conditioned by ancestry, in the inter-individual differences in pain sensitivity and analgesic treatment with opioids compounds.

On the other hand, we studied the only known receptor of hormone ghrelin GHSR1a. Ghrelin is synthesized in stomach endocrine cells, and reaches the hypothalamus producing a potent orexigenic effects while its access to other brain areas is much more restricted. When ghrelin binds to GHSR1a, it activates electrical and transcriptional activity in hypothalamic neurons by postsynaptic mechanisms; however, GHSR1a is also located at the presynaptic terminals, where it is unknown whether contributes to this neuronal activation. Interestingly, GHSR1a is the GPCR which displays the highest levels of constitutive activity and it is not known whether this agonist independent activation of GHSR1a is involved in neuronal activation. Since Ca_v2 are very sensitive to modulation by GPCRs, we investigated whether GHSR1a activation impacts on Ca_v2 activity. We used a heterologous expression system, and by patch-clamp whole-cell configuration in voltage-clamp mode, we found that activation of GHSR1a dramatically inhibits both $Ca_v2.1$ and $Ca_v2.2$ currents. While constitutive activity modulates Ca_v2 , by chronic decrease of channels density from plasma membrane depending on receptor expression levels and mediated by a G_i/o protein; ghrelin-evoked activation of GHSR1a also negatively modulates the Ca_v2 activity in a reversible manner. In addition, this inhibition involves both subunits of Gq protein, and $Ca_v2.2$ is more sensitive to ghrelin-dependent inhibition of GHSR1a than $Ca_v2.1$. We also found that the voltage dependency of this inhibition is completely altered depending on auxiliary subunit subtype of $Ca_v\beta$ in the channel. Next, we studied whether in a neuronal context, where GHSR1a and Ca_v2 are expressed at native levels, GHSR1a modulates Ca_v2 mediated currents. We used primary cultures of rat hypothalamic neurons over-expressing GHSR1a and a transgenic mouse model that expresses eGFP under the control of GHSR gene promoter. In these experiments,

we found that both constitutive and ghrelin-dependent activities of GHSR1a reduce presynaptic Ca_v2 currents in hypothalamic neurons.

Also, we studied the effect of a human GHSR1a mutation that eliminates constitutive activity, A204E, and its prevalence in an Argentinean population. We found that A204E impacts on GHSR1a modulation on presynaptic Ca_v2 by producing a reversible inhibition of Ca_v2 currents only by ghrelin dependent activity in the heterologous expression system and in hypothalamic cultured neurons. Additionally, we did not find A204E represented in the Argentinean population. Thus, A204E, with a very low population impact, produces a loss of function of the modulatory role of the GHSR1a on Ca_v2 currents.

Finally, we evaluated a putative physiological impact of Ca_v2 modulation by GHSR1a. As a predominantly GABAergic tone controls several neuronal nuclei in the hypothalamus, we studied whether Ca_v2 modulation by GHSR1a could be involve in the GABA release in hypothalamic neurons as a mechanism of neuronal activation. We found that both activation modes of GHSR1a negatively regulate GABA release in hypothalamic neurons, only when GABA release depends on the Ca^{2+} influx through Ca_v2 in the axon terminals. This mechanism could have physiological relevance in conditions such as fasting, when the expression of GHSR1a is increased, contributing to neuronal activation described in these physiological situation.

Our results demonstrated that GHSR1a activity inhibits presynaptic Ca_v2 activity by canonical (GPCR agonist-dependent activation) and non-canonical pathways (GPCR constitutive activation), suggesting a key role of GHSR1a constitutive activity in synaptic physiology of hypothalamic neurons. Thus GHSR1a modulates presynaptic Ca_v2 currents by fundamentally different mechanisms dependent on mode activation of the receptor.

In summary, in this thesis we described for the first time different unconventional mechanisms of presynaptic Ca_v2 modulation by GPCR activation. This highly effective modulation to regulate synaptic activity requires detailed studies of its components and their interactions to completely understand the effects in different cellular contexts. Also, we demonstrated that gene variations on GPCRs can dramatically alter its ability to modulate the Ca_v2 , leading to large differences in the cellular and physiological responses which are depending on their population frequency to address therapeutic strategies.

Trabajos publicados

Los resultados de la presente tesis doctoral fueron publicados en los trabajos que se citan a continuación:

López Soto EJ, Raingo J. (2012) "*A118G Mu Opioid Receptor polymorphism increases inhibitory effects on Ca_v2.2 channels*". *Neuroscience Letters* 523(2):190-194.

López Soto EJ, Agosti F, Catanesi CI, Raingo J. (2013) "*Impact of A118G polymorphism on the Mu opioid receptor function in pain*". *Journal of Pain and Relief* 2:1-6.

López Soto EJ, Catanesi CI. (2015) "*Human population genetic structure detected by pain-related mu opioid receptor gene polymorphisms*". *Genetics and Molecular Biology*. En prensa.

López Soto EJ, Agosti F, Cabral A, Mustafa ER, Martínez Damonte V, Gandini MA, Rodríguez S, Castrogiovanni D, Felix R, Perelló M, Raingo J. (2014) "*Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impair CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons*". En revisión.

Trabajo publicado relacionado a esta tesis doctoral:

Mani BK, Walker AK, **López Soto EJ**, Raingo J, Lee CE, Perelló M, Andrews ZB, Zigman JM. (2014) "Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse". *Journal of Comparative Neurology* 1;522(16):3644-3666.

Agradecimientos

Cuando me puse a pensar en toda la gente que me dio una mano con mi tesis, me di cuenta que todo este trabajo es realmente un logro en equipo. Un equipo que lo componen desde compañeros de la escuela, de la facultad y del laboratorio, amigos de siempre y otros más nuevos, amigos del laboratorio, del día a día y amigos de viajes y congresos, técnicos e investigadores y, sin dudas, mi familia. Todos, que desde su lugar y a su manera, me empujaron a construir esta tesis y con los que voy a estar eternamente agradecido.

Quiero agradecer a Jesica, mi directora. En primer lugar por dirigirme, y porque con esa dirección vinieron acompañando unas inmensas ganas de enseñarme y formarme en neurociencias, las cuales espero haber aprovechado al 100 %. Por haberme enseñado a reflexionar y a discutir ciencia con herramientas sólidas. Por ayudarme a construir un criterio científico. Por estimular el trabajo en grupo. Por exigirme siempre un poco más. Por ser una científica a la que admiro enormemente. Por ser una compañera más del laboratorio. Por haber llegado justo a tiempo y sumarse al desafío. Obviamente por la paciencia. También agradezco los sermones y retos, las risas y los ceños fruncidos. Pero por sobre todas las cosas le agradezco por haberme contagiado y enseñado a ponerle el corazón y la pasión a lo que hago.

Quiero agradecer a Silvia, que apareció de un día para el otro, pero desde ese momento no tengo dudas que me compartió ciencia, anécdotas, alegrías, lágrimas, dulces y salados. Que siempre me brindó orejas, manos, pies y cabeza y hasta el tiempo que no tenía para laburar en equipo. Y principalmente porque es una compañera de oro, de esas que ya nadie encuentra.

También quiero agradecer a Cecilia, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, allá por el 2009, y haberme permitido que vaya haciendo mi camino en la disciplina que más me gusta.

A Mario. Por contagiarme su dedicación, por darme siempre su punto de vista, por enseñarme, por sus discusiones, por el trabajo en grupo y por sus tiempos.

Gracias a las autoridades del IMBICE por darme un lugar para aprender y crecer personal y profesionalmente. Sin dudas también gracias al CONICET y a la AGENCIA por haber financiado mi trabajo.

Gracias a todos los miembros de los laboratorios de Electrofisiología y Neurofisiología: Fran, Valen, Román, Santi, María José, Mirta, Nico, Pau, Spring, Gime, Victoria y Guada. Muchas gracias por darme una mano siempre en todo, por los consejos, las risas, los mates, el aliento, la alegría que me transmitieron siempre, y también por haber hecho del laboratorio un lugar donde me encanta trabajar y

compartirlo con Ustedes. Especialmente quiero agradecer a Fran, por su inmensa paciencia desde que comenzamos juntos dando los primeros pasos, por su compañerismo, por su aguante, por su amistad y todo el tiempo que me brindó. A todos, muchas gracias por el trabajo en equipo!

Quiero también agradecer a las chicas del laboratorio de Genética Molecular, pero sobre todo a Flor, Miri y Sil, que desde los viejos tiempos siempre me dieron sus consejos técnicos y no tan técnicos, compartiendo charlas científicas y no tan científicas. Gracias por los mates y las risas contagiosas.

A la gente del laboratorio de Genética Molecular Poblacional y del laboratorio de Epidemiología Genética: Rita, Jorge, Hebe, Graciela y Claudio, que siempre y sin dudarlos me enseñaron, me brindaron su tiempo, consejos y críticas. Gracias por todo el cariño y la contención.

Gracias a mis amigos Marie, Bel, Smel, Juli y Román. Gracias porque son amigos de fierro y mi familia platense, de los que realmente me bancan en mis días felices y en los no tan felices. De los que me hacen reír hasta doler la panza. De los que siempre tienen tiempo y ganas de escucharme. De esos amigos que siempre saben todo, y si no lo saben me lo inventan. De esos amigos compañeros, luchadores y caminantes. De esos amigos con los que tengo mil historias compartidas y mil más por compartir. Y sobre todo por ser de esos amigos que el laboratorio me permitió conocer y de los que me quiero llevar para siempre. Inmensas gracias!

A todos mis compañeros del IMBICE: Guille, Lu, Anita, Juli, Smel, Marie, Bel, Román, Andre, Jessi, Fran, Agus, Spring, Nati, Ana, Jime, Gime, Pau, Nico, Mari Sol, Márix, Sil y Meli. Gracias por compartir el día a día, por enseñarme, por los consejos, por las charlas, los mates, las risas. Muchas gracias!

A los chicos del sector de cultivo: Miguel, Daniel y Juli, por darme una mano siempre.

A toda la gente del IMBICE: Amanda, Mariela, Verónica, Miguelito, Lucas, Gisela, Joel, Silvina, Josefina, Bamba y Betty.

A mis amigos “de ciencia, viajes, mates y charlas kilométricas”: Esteban, Fer y Trini, que tuve la suerte de conocer y de compartir con ellos paisajes, charlas y momentos imposibles de olvidar.

A mis viejas amigas de la facu: Romi, Sail, Sil y Costy. Que con sus enloquecedoras visitas traían aires cálidos y renovadores. Y especialmente a Romi, por haberme soportado cotidianamente y por las charlas, mates, almuerzos, cenas y cientos de anécdotas compartidas cuando vivimos juntos.

A mis viejos y aguantadores hermanos de la vida: Walter, Martin, Lucre y Jesi. Por su compañía a la distancia. Por la paciencia y el terrible aguante. Por las orejas y

los hombros que me brindaron siempre. Por las risas eternas. Por los abrazos. Por las visitas. Muchas gracias por cada segundo compartido!

A todos mis amigos de Corrientes, los de la escuela, los de la facu y los de siempre. A Carla y Silvina, gracias por el aliento y la compañía a la distancia siempre!

A Ale. Que desde el primer día en que nos conocimos lleno de color, música y energía todos mis días. Gracias por cuidarme, por contenerme, por divertirme, por escucharme, por bancarme, por alentarme, por alegrarme, por tirar para adelante. Gracias por hacerme tan feliz!

Y en primer lugar, siempre en primer lugar, a mi familia. Por ser mi cable a tierra, mi hinchada, mi pequeño inmenso mundo que siempre me alentó y me cuidó a la distancia. Que junto a mis abuelos me enseñaron los valores del trabajo, la responsabilidad, del respeto, de la constancia, de la amistad, del compañerismo, de la sinceridad. Que siempre me apoyaron en todas las decisiones, aún en las más difíciles. Gracias viejos por los empujones a la distancia, por la calidez y el amor que me hicieron y hacen llegar todos los días. Después de un par de añitos, algunos más largos y algunos más cortos, de estar haciendo esta tesis, les quiero decir ¡Nos doctoramos juntos!

A mis papás y abuelos

Índice

Introducción	- 1 -
Ca _v pre-sinápticos.....	- 4 -
Regulación de los Ca _v pre-sinápticos por receptores acoplados a proteína G.....	- 6 -
El receptor opioide μ.....	- 10 -
El receptor de ghrelina	- 16 -
Objetivos	- 20 -
Objetivo general	- 21 -
Objetivos específicos.....	- 21 -
Materiales y métodos.....	- 22 -
1. Modelos experimentales	- 23 -
1.1. Línea celular HEK 293T	- 23 -
1.2. Animales	- 23 -
1.2.1. Rattus norvegicus.....	- 23 -
1.2.2. Mus musculus.....	- 23 -
1.2.2.1. Ratones <i>wild type</i>	- 23 -
1.2.2.2. Ratones GHSR-eGFP	- 23 -
1.2.2.3. Ratones GHSR-KO.....	- 24 -
2. Cultivos celulares	- 24 -
2.1. Cultivos de células HEK 293T.....	- 24 -
2.2. Cultivos primarios de neuronas de ratas	- 24 -
2.3. Cultivos primarios de neuronas de ratón.....	- 25 -
3. Expresión heteróloga.....	- 25 -
3.1. Transfecciones transitorias de células HEK 293T	- 25 -
3.2. Transfecciones transitorias de neuronas hipotalámicas de rata.....	- 26 -
3.3. Transducción con vectores lentivirales de cultivos neuronales de ratón GHSR-KO.....	- 26 -
3.3.1 Producción de vectores lentivirales recombinantes.....	- 27 -
3.3.2 Transducción de cultivos primarios neuronales	- 27 -
4. Protocolos generales de trabajo con plásmidos.....	- 27 -
4.1. Competencia bacteriana	- 27 -
4.2. Transformación de bacterias competentes	- 28 -
4.3. Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (midi-prep).....	- 28 -

4.4.	Cuantificación de ADN	- 29 -
4.5.	Obtención de plásmidos lentivirales de transferencia	- 29 -
4.5.1.	Sub-clonado de plásmidos lentivirales de transferencia	- 29 -
4.5.2.	Extracción de ADN plasmídico con fenol/cloroformo	- 30 -
4.5.3.	Extracción del ADN del gel de agarosa con fenol/cloroformo	- 30 -
5.	Ensayo de <i>binding</i>	- 30 -
6.	Fraccionamiento sub-celular de proteínas y <i>western blot</i>	- 31 -
7.	Electrofisiología	- 31 -
7.1.	Corrientes de sodio y bario en neuronas hipotalámicas	- 32 -
7.2.	Corrientes de calcio en células HEK 293T transfectadas	- 32 -
7.3.	Corrientes de potasio en neuronas hipocampales	- 33 -
7.4.	Corrientes inhibitorias post-sinápticas en neuronas de hipotalámicas	- 33 -
7.5.	Drogas	- 33 -
8.	Determinación ex vivo de la liberación de [3H]-GABA	- 33 -
9.	Determinación de ARNm	- 34 -
10.	Análisis genético-poblacional	- 34 -
10.1.	Muestras biológicas	- 34 -
10.2.	Extracción de ADN	- 35 -
10.2.1.	Extracción de ADN de sangre periférica	- 35 -
10.2.2.	Extracción de ADN a partir de hisopado bucal	- 35 -
10.3.	Genotipificación	- 36 -
10.3.1.	Polimorfismo N40D del gen OPRM1	- 36 -
10.3.2.	Mutación A204E del gen GHSR	- 36 -
10.4.	Secuenciación de fragmentos	- 37 -
10.5.	Muestras poblacionales incluidas en el análisis genético-poblacional	- 37 -
11.	Estadística	- 38 -
Capítulo I	- 39 -
Cap I: Resultados	- 40 -
Registros control de las corrientes de Ca ²⁺ por patch-clamp: diferencias entre las isoformas de <i>splicing</i> Ca _v 2.2e37b y Ca _v 2.2e37a	- 41 -
Impacto del polimorfismo N40D de MOR sobre la modulación de los Ca _v 2.2 específicos de las vías de dolor	- 45 -
Distribución poblacional del polimorfismo N40D del MOR	- 53 -
Cap I: Discusión	- 59 -
Cap I: Conclusiones	- 65 -

Capítulo II	- 68 -
Cap II: Resultados.....	- 69 -
Impacto de la actividad de GHSR1a sobre los canales Ca _v 2.....	- 70 -
Vías de señalización involucradas en la inhibición de los Ca _v 2 por la actividad de GHSR1a dependiente de ghrelina.....	- 75 -
Vías de señalización involucradas en la inhibición de los Ca _v 2 por la actividad constitutiva de GHSR1a.....	- 78 -
Detección de la mutación A204E de GHSR1a en una muestra de una población argentina.....	- 82 -
Impacto de la actividad de GHSR1a sobre los Ca _v 2 nativos en neuronas hipotalámicas	- 83 -
Impacto fisiológico de la actividad constitutiva de GHSR1a en neuronas del hipotálamo.....	- 93 -
Cap II: Discusión	- 98 -
Cap II: Conclusiones.....	- 111 -
Anexo	- 115 -
Bibliografía.....	- 122 -

Introducción



Los canales de calcio activados por voltaje son los principales mediadores de la entrada de iones Ca^{2+} al interior celular provocado por la despolarización inducida por potenciales de acción en células excitables. El flujo de Ca^{2+} a través de estos canales tiene un doble impacto celular: despolarización de la membrana debido a la corriente positiva entrante, y un incremento de la concentración de Ca^{2+} a nivel de nano- o micro-dominio celular. El Ca^{2+} es un segundo mensajero esencial que interviene en diversos procesos celulares incluyendo la activación de enzimas, la iniciación de la transcripción génica, la contracción muscular, la secreción de hormonas y la liberación de neurotransmisores (Reuter, 1979; Tsien, 1983; Tanabe et al., 1988; Catterall, 1991; Dunlap et al., 1995; Delmas y Brown, 2005; Yang y Berggren, 2006; Flavell y Greenberg, 2008; Ribeiro et al., 2014). Así, los canales de calcio activados por voltaje son proteínas de transmembrana altamente especializadas en la transducción de señales eléctricas en señales químicas, convirtiendo cambios en el potencial de membrana en incrementos localizados y rápidos de la concentración de Ca^{2+} intracelular desencadenando un amplio abanico de respuestas fisiológicas.

En el sistema nervioso la concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular es de aproximadamente 1,1 mM (Nicholson et al., 1977), un valor al menos 11000 veces mayor que la concentración intracelular que se encuentra en el rango de 10-100 nM (Dubinsky y Rothman, 1991). Dado el rol fisiológico fundamental que juegan los cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, las neuronas poseen sólo un número limitado de canales iónicos (incluyendo canales activados por ligando) con permeabilidad al Ca^{2+} . Entre ellos, los canales de calcio activados por voltaje son proteínas hetero-oligoméricas exquisitamente selectivas para el Ca^{2+} , siendo casi impermeables a otros cationes presentes en el medio extracelular (Ellinor et al., 1995; Tang et al., 2014). Estos canales permiten un rápido y controlado flujo de Ca^{2+} a favor del importante gradiente de concentración de este ion.

En las neuronas existen diferentes subtipos de canales de calcio activados por voltaje. Los canales de calcio tipo L (del inglés *Long Lasting*) que se localizan principalmente en el soma y en las dendritas, son los encargados de iniciar eventos de transcripción génica dependientes de Ca^{2+} (Hell et al., 1993; Westenbroek et al., 1998; Dolmetsch et al., 2001; Wheeler et al., 2008; Brittain et al., 2012), y en algunos casos particulares intervienen en la regulación de la liberación de neurotransmisor, como por ejemplo en el sistema auditivo (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Los canales de calcio tipo T (del inglés *Transient*), que también se pueden encontrar en soma, dendritas y a lo largo del axón, funcionan principalmente como reguladores de la excitabilidad neuronal (Perez-Reyes, 2003; McKay et al., 2006; Molineux et al., 2006), pudiendo en algunos casos particulares controlar también la neurosecreción (Carbone

et al., 2006; Giancippoli et al., 2006; Weiss et al., 2012). Y por último, los canales de calcio tipo N (del inglés, *Non-L and Neuronal*), tipo P/Q (del inglés *Purkinje*) y tipo R (del inglés *Resistant*) que se sub-localizan principalmente en las terminales nerviosas donde su apertura inicia la liberación de neurotransmisores (Westenbroek et al., 1992; Westenbroek et al., 1995; Reid et al., 2003).

Si bien los canales de calcio activados por voltaje constituyen complejos heteroméricos compuestos generalmente por cuatro subunidades distintas: α_1 , β , α_2 y δ , todos poseen una subunidad α_1 (Curtis y Catterall, 1984; Hosey et al., 1987; Catterall, 2010). Esta subunidad está formada por más de 2000 aminoácidos y contiene el poro selectivo del canal, el sensor de voltaje, determinante de los mecanismos de compuerta, y es sustrato de diversos sitios de modulación por segundos mensajeros, drogas y toxinas (Takahashi et al., 1987; Catterall, 2000; Catterall et al., 2005; Catterall, 2010, 2011). En forma análoga a la subunidad α de los canales de sodio activados por voltaje (Na_v), la subunidad α_1 de los canales de calcio voltaje activados está organizada en cuatro dominios homólogos (I-IV) cada uno con seis segmentos hélice α transmembrana (S1-S6) (Takahashi et al., 1987; Catterall, 2010). El poro del canal se forma mediante los segmentos S5 y S6 de cada dominio y los bucles asociados a membrana S5-S6. El lado extracelular del poro está delineado por residuos negativos de glutamato altamente conservados, determinando su alta selectividad y permeabilidad al Ca^{2+} (Ellinor et al., 1995). Por otro lado, el sensor de voltaje está conformado por los segmentos S4 cargados positivamente de cada dominio homólogo. Cada subtipo de canal contiene una subunidad α_1 determinada, que le otorga propiedades cinéticas de activación e inactivación particulares, así como una sensibilidad diferencial ante distintos antagonistas (Ellinor et al., 1995; Catterall et al., 2005; Tang et al., 2014). Adicionalmente en neuronas, la subunidad auxiliar citoplasmática β , y las subunidades de transmembrana α_2 y δ (unidas entre sí por puentes disulfuro) se asocian por interacciones no covalentes a la subunidad principal α_1 y regulan la estabilidad y el tráfico a membrana del complejo (Curtis y Catterall, 1984; Hosey et al., 1987; Catterall, 2010). Así, el modelo hetero-oligomérico ampliamente aceptado en neuronas de los canales de calcio está compuesto por una subunidad principal α_1 transmembrana de 190-250 kDa, asociada a un dímero $\alpha_2\delta$ de 170 kDa unido por puentes disulfuro, y una subunidad intracelular β de 55 kDa (Takahashi et al., 1987). Aunque las subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$ modulan el canal, las distintas corrientes de calcio fueron definidas en base a herramientas farmacológicas y a sus propiedades biofísicas generadas por las diferentes subunidades α_1 . De esta manera, los diferentes subtipos de canales de calcio activados por voltaje se distinguen por múltiples características que incluyen

propiedades biofísicas y farmacológicas, localización sub-celular y funciones fisiológicas.

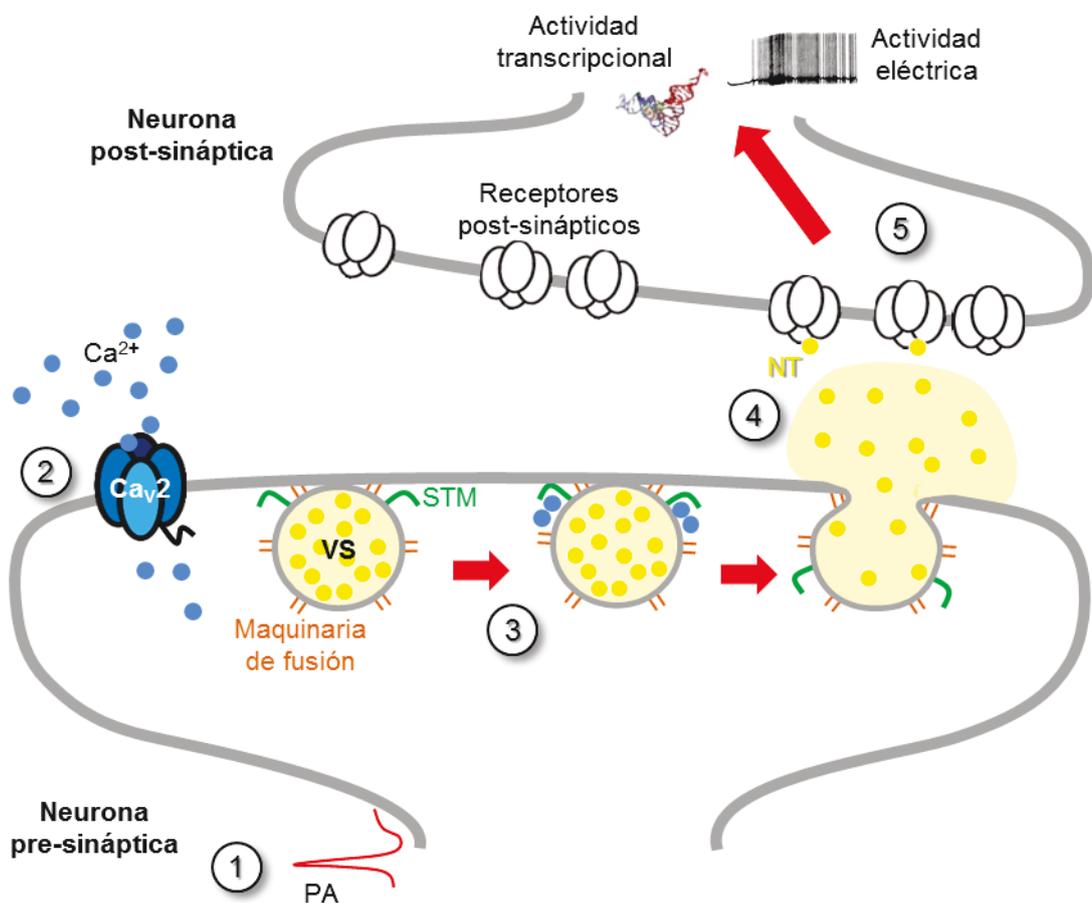
La nomenclatura de los canales de calcio activados por voltaje ha sufrido diversos cambios y varios criterios de clasificación han sido utilizados al mismo tiempo en la etapa previa al clonado de los genes que codifican cada subunidad α_1 . Esto presentó una gran dificultad para la estandarización del conocimiento sobre estas proteínas (Birnbaumer et al., 1994). Durante la década de los noventa, la expansión de la biología molecular ha permitido clonar muchos de los genes codificantes de las subunidades α_1 de los canales de calcio. En el año 2000 varios investigadores referentes del área definieron una nomenclatura simple basada en el grado de homología de las secuencias aminoacídicas de las regiones más conservadas (segmentos transmembrana) de cada subunidad α_1 (Ertel et al., 2000). Siguiendo los delineamientos de la nomenclatura de los canales de K^+ activados por voltaje (Chandy, 1991), los canales de calcio activados por voltaje fueron nombrados utilizando el símbolo químico del ion que permean (Ca) con el principal regulador fisiológico (voltaje) indicado como un subíndice (Ca_v), seguido por un identificador numérico para designar la familia (determinadas por el grado de homología de la secuencia de aminoácidos) y subfamilias (siguiendo el orden de descubrimiento dentro de la familia) a la que pertenecen ($Ca_{v.n.n}$). De acuerdo con este criterio, se identificaron tres familias de Ca_v : Ca_{v1} (1.1, 1.2, 1.3 y 1.4) que median las corrientes L, Ca_{v2} que median las corrientes P/Q, N y R (2.1, 2.2 y 2.3) y Ca_{v3} (3.1, 3.2 y 3.3) que median las corrientes T (Ertel et al., 2000; Catterall et al., 2005).

Ca_v pre-sinápticos

La especialización funcional de los distintos Ca_v se ve reflejada en la especificidad de su localización sub-celular. Algunos subtipos de Ca_v son mediadores críticos en la transferencia de información entre neuronas y se encuentran estratégicamente localizados en ambos extremos de la sinapsis: la membranas pre- (Ca_{v2}) y post-sináptica (Ca_{v1}), donde integran señales e inician respuestas que impactan en la actividad neuronal.

En las terminales axonales, la entrada de Ca^{2+} es condición necesaria para la liberación de transmisores involucrados en la neurotransmisión rápida, cuya magnitud depende en forma exponencial de la extensión del ingreso de Ca^{2+} en las cercanías de los sitios activos de liberación (Zucker y Regehr, 2002). La familia de los Ca_{v2} representa la mayor vía de ingreso de Ca^{2+} en estas terminales (Catterall, 2011). Allí,

son activados por la llegada de los potenciales de acción y permiten el ingreso de iones Ca^{2+} , desencadenando el proceso de exocitosis de neurotransmisores (Dunlap et al., 1995) (esquema 1). Por lo tanto, la sub-localización y el nivel de activación de los Ca_v2 resultan en cambios drásticos en la exocitosis de los neurotransmisores (Catterall y Few, 2008; Pan y Zucker, 2009). Los $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ son los subtipos de Ca_v2 más representados en las terminales nerviosas centrales y periféricas, mientras que la participación de los $\text{Ca}_v2.3$ está más restringida a ciertas sinapsis centrales, como en el hipocampo (Ermolyuk et al., 2013; Zamponi y Currie, 2013). Por su rol fundamental en la neurotransmisión los Ca_v2 pre-sinápticos constituyen un blanco regulatorio de alta efectividad.



Esquema 1. Neurotransmisión rápida mediada por los Ca_v2 en la membrana pre-sináptica. Tras la llegada de potenciales de acción (PA) (1), los Ca_v2 pre-sinápticos se abren permitiendo el ingreso del ion Ca^{2+} al citoplasma (2). El Ca^{2+} se une a la proteína sinaptotagmina-1 (STM) localizada en la membrana de las vesículas sinápticas (VS) provocando que la maquinaria de fusión de la VS actúe, y se liberen los neurotransmisores (NT) a la hendidura sináptica (3). Los NT se unen a sus receptores post-sinápticos (4), produciendo cambios en la actividad eléctrica y/o transcripcional de la neurona post-sináptica (5).

Regulación de los Ca_v pre-sinápticos por receptores acoplados a proteína G

Dentro de los factores que regulan la actividad de los Ca_v2 en las membranas pre-sinápticas se encuentran los receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*). Estos receptores, en general, modulan negativamente la actividad de los Ca_v2 y, en consecuencia, reducen la liberación de neurotransmisores tanto excitatorios como inhibitorios (Catterall y Few, 2008; Zamponi y Currie, 2013), contribuyendo así a la modulación de la activación neuronal.

Los GPCRs constituyen una súper-familia de proteínas codificadas por aproximadamente 800 genes en el genoma humano que son activados por una gran variedad de ligandos (Takeda et al., 2002; Fredriksson et al., 2003). Dada su gran diversidad de funciones y participación en múltiples procesos fisiológicos representan blancos terapéuticos muy importantes (Klabunde and Hessler, 2002). Los GPCRs poseen un dominio N-terminal extracelular, siete dominios transmembrana α hélice y un dominio C-terminal intracelular al cual se acoplan los distintos subtipos de proteínas G. La unión de ligandos en el lado extracelular del receptor produce un cambio conformacional que desencadena la activación de la proteína G (Vaidehi et al., 2014).

Las proteínas G son hetero-trímeros anclados a membrana formados por una subunidad $G\alpha$, y una $G\beta$ y $G\gamma$ que actúan como heterodímero obligado ($G\beta\gamma$). En los humanos, existen al menos 16 genes codificantes de la subunidad $G\alpha$ de proteínas G, las cuales se clasifican en tres familias principales: $G\alpha_s$, $G\alpha_i/o$, y $G\alpha_q$. Por otro lado, 5 genes codifican a las subunidades $G\beta$ y 12 a las subunidades $G\gamma$ (Zamponi y Currie, 2013). La unión del agonista al GPCR cataliza el intercambio de GDP (del inglés *guanosine diphosphate*) por GTP (del inglés *guanosine triphosphate*) en la subunidad $G\alpha$ provocando cambios en su conformación que desencadena la disociación del monómero $G\alpha$ de $G\beta\gamma$ (Venkatakrishnan et al., 2013). Así, las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ liberadas son capaces de activar diversas cascadas de señalización intracelular y modular múltiples efectores intracelulares, como los Ca_v2 pre-sinápticos (Zamponi y Currie, 2013).

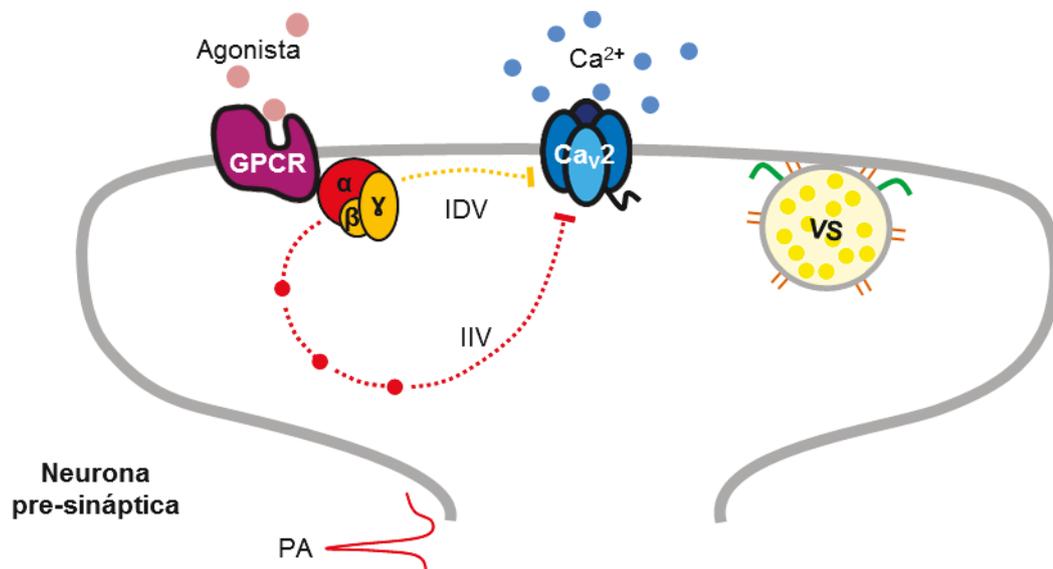
La inhibición de los Ca_v2 por la activación de GPCRs fue demostrada por primera vez hace más de 30 años en el laboratorio de Dunlap y Fischbach quienes reportaron que la norepinefrina, el ácido γ -aminobutírico (GABA, del inglés *gamma-aminobutyric acid*), la encefalina y la serotonina reducían la amplitud de las corrientes tipo N en neuronas sensoriales (Dunlap y Fischbach, 1978, 1981). Posteriormente el descubrimiento de una gran variedad de neurotransmisores y neuromoduladores que actuaban sobre sus GPCRs inhibiendo las corrientes Ca_v2 , generalizó a este

mecanismo como un modulador importante de la actividad sináptica (Catterall y Few, 2008; Zamponi y Currie, 2013).

Existen numerosas vías de señalización activadas por los GPCRs que convergen impactando en la actividad de los Ca_v2 . En neuronas, la vía mejor estudiada es mediada por el heterodímero $G\beta\gamma$ de la proteína G_i/o , no involucra otros segundos mensajeros y, por lo tanto, inhibe muy rápidamente las corrientes (en menos de 1 s (Zhou et al., 1997)) (esquema 2). Este mecanismo está restringido a la membrana plasmática y la inhibición es producto de la unión directa de una molécula de $G\beta\gamma$ a la subunidad α_1 de los Ca_v2 (Herlitz et al., 1996; Ikeda, 1996; Zamponi y Snutch, 1998), específicamente en el bucle I-II, aunque probablemente también participen los dominios N- y C- terminal (Zhang et al., 1996; De Waard et al., 2005). Esta unión puede ser transitoriamente liberada por períodos de despolarización de la membrana (Zamponi y Currie, 2013), motivo por el cual es conocida como inhibición dependiente del voltaje. La principal consecuencia de esta característica es un desplazamiento de la curva de activación en función del voltaje de la corriente macroscópica de los $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ hacia potenciales más positivos cuando están inhibidos. Así, se plantea que este mecanismo puede contribuir a la plasticidad a corto plazo en algunas sinapsis (Catterall y Few, 2008), siendo la inhibición más efectiva en neuronas que disparan potenciales de acción a baja frecuencia en comparación con neuronas que atraviesan períodos de disparos a altas frecuencias (Williams et al., 1997; Park y Dunlap, 1998; Elmslie, 2003).

La activación de GPCRs también puede evocar una inhibición de las corrientes Ca_v2 que es resistente a la despolarización, y en consecuencia independiente del voltaje. Este tipo de inhibición puede estar mediado por cascadas muy diversas de señalización involucrando la activación de proteína $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha s}$ como $G_{\alpha i/o}$, el subsecuente aumento de la concentración de diversos segundos mensajeros que inhiben los Ca_v2 mediante fosforilaciones del canal (Raingo et al., 2007) o por disminución de su densidad en membrana (Beedle et al., 2004) sin modificación de la activación por voltaje de la corriente macroscópica (Zamponi y Currie, 2013) (esquema 2). Debido a que esta inhibición involucra varios pasos en sus cascadas de señalización, es más lenta (aproximadamente 9 s (Zhou et al., 1997)) que la inhibición dependiente del voltaje. Algunas de las vías mejor descritas para esta inhibición son aquellas activadas por GPCRs acoplados a proteína G_q (G_q PCR), las cuales incluyen activación de fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase C*) y la consecuente depleción de su sustrato, el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂, del inglés *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (Suh et al., 2010); la generación de ácido araquidónico (Liu y Rittenhouse, 2000, 2003; Delmas y Brown, 2005) y la participación

de la subunidad $G\beta\gamma$ (Kammermeier et al., 2000). Por lo tanto, la inhibición independiente del voltaje se caracteriza por sus múltiples vías de señalización sin modificar la dependencia del voltaje de la activación de los canales (Delmas y Brown, 2005).



Esquema 2. Modulación de los Ca_v2 pre-sinápticos por GPCR. Cuando un agonista se une a su GPCR, activa la proteína G a la cual se acopla, pudiendo inhibir por dos mecanismos distintos la actividad de los Ca_v2 . Por un lado, las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G se unen directamente al canal provocando una inhibición dependiente del voltaje (IDV), mientras que la subunidad α provoca una inhibición independiente del voltaje (IIV) que involucra diferentes mediadores dependiendo el tipo de subunidad α activada. Así, tras la llegada de potenciales de acción (PA), los Ca_v2 pre-sinápticos inhibidos permiten un ingreso del ion Ca^{2+} reducido al citoplasma y consecuentemente se disminuye la liberación de los neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas (VS) al espacio sináptico.

Si bien la inhibición dependiente del voltaje por $G\beta\gamma$ es la más asociada a la activación de GPCRs acoplados a G_i/o (G_i/o PCRs), estos receptores también pueden inhibir a los $Ca_v2.2$ en forma independiente del voltaje. Con respecto a esto se ha descrito que la inclusión en el segmento C terminal intracelular de la subunidad $\alpha 1$ de uno de los exones mutuamente excluyentes 37b o 37a modifica la sensibilidad de $Ca_v2.2$ a la inhibición por G_i/o PCRs, como así también sus propiedades biofísicas y densidad en membrana (Bell et al., 2004; Castiglioni et al., 2006; Raingo et al., 2007). La isoforma que contiene el exón 37a, $Ca_v2.2e37a$, se expresa exclusivamente en nociceptores, y es susceptible de ser inhibida en forma independiente del voltaje

debido a que en su secuencia contiene un sitio blanco de fosforilación por tirosina quinasa (Raingo et al., 2007). De esta manera los mecanismos del *splicing* alternativo de los Ca_v2.2 controlan la sensibilidad de los mismos a la inhibición independiente del voltaje.

Como mencionamos previamente, la activación de los GPCRs por sus agonistas modula la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos. Sin embargo, el 15 % de los GPCRs pueden adquirir un estado activo en ausencia de ligando (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002) que potencialmente podría impactar en la actividad de los Ca_v2. Esta actividad constitutiva de los GPCRs oscila entre niveles de activación leves a muy altos dependiendo del receptor y del contexto celular (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002; Tao, 2008). Si bien escasos estudios han abordado el efecto de este tipo de actividad de los GPCRs sobre las corrientes Ca_v2, la inhibición de los canales podría tener un impacto fisiológico importante debido a una reducción crónica de la neurotransmisión. Hasta el momento, se ha descrito este tipo de interacción solamente para los Ca_v2 y dos GPCRs, el receptor de glutamato, mGluR1 (del inglés *metabotropic glutamate receptor subtype 1*) y receptor de nociceptina, ORL1 (del inglés *opioid receptor-like 1*), que a través de una actividad independiente de agonista pueden inhibir las corrientes Ca_v2.1 y Ca_v2.2, respectivamente (Kitano et al., 2003; Beedle et al., 2004). Si bien estos estudios demuestran que mGluR1 y ORL1 inhiben las corrientes e interaccionan físicamente con el canal formando complejos (Kitano et al., 2003; Beedle et al., 2004), no logran determinar si la causa de la inhibición es la sola presencia del GPCR o su actividad constitutiva. Adicionalmente, la actividad constitutiva y la dependiente de agonista pueden verse drásticamente alteradas por la presencia de mutaciones o polimorfismos en la secuencia de ADN de los genes que codifican los GPCRs. Estos cambios, dependiendo de su localización dentro del gen, pueden impactar en el funcionamiento del receptor, modificando los niveles de expresión de ARN y proteína, tráfico a membrana, modo de activación y acoplamiento a proteínas intracelulares (Rana et al., 2001). La presencia de estas variaciones a nivel de la secuencia de ADN puede producir subtipos de GPCRs con distintas propiedades que podrían impactar en la actividad moduladora de los GPCRs sobre los Ca_v2 pre-sinápticos.

Los GPCRs constituyen la familia de blancos terapéuticos más importante de la industria farmacéutica (Klabunde y Hessler, 2002) y el desarrollo de drogas que actúen activando o bloqueando estos receptores es una estrategia terapéutica muy utilizada. Sin embargo, debido a la diversidad de acción de los GPCRs y a las modulaciones finas que ocurren como consecuencia de variantes tanto de los receptores como de sus blancos, es preciso realizar estudios detallados de los mecanismos que median los efectos de cada GPCR de interés para un desarrollo seguro de nuevos fármacos.

En este contexto, nos proponemos estudiar el impacto de la activación de dos GPCRs relevantes fisiológicamente: el receptor opioide μ y el receptor de ghrelina, y cómo impactan los cambios de sus secuencias en la actividad moduladora sobre los Ca_v2 pre-sinápticos, moléculas claves en el control de la neurotransmisión.

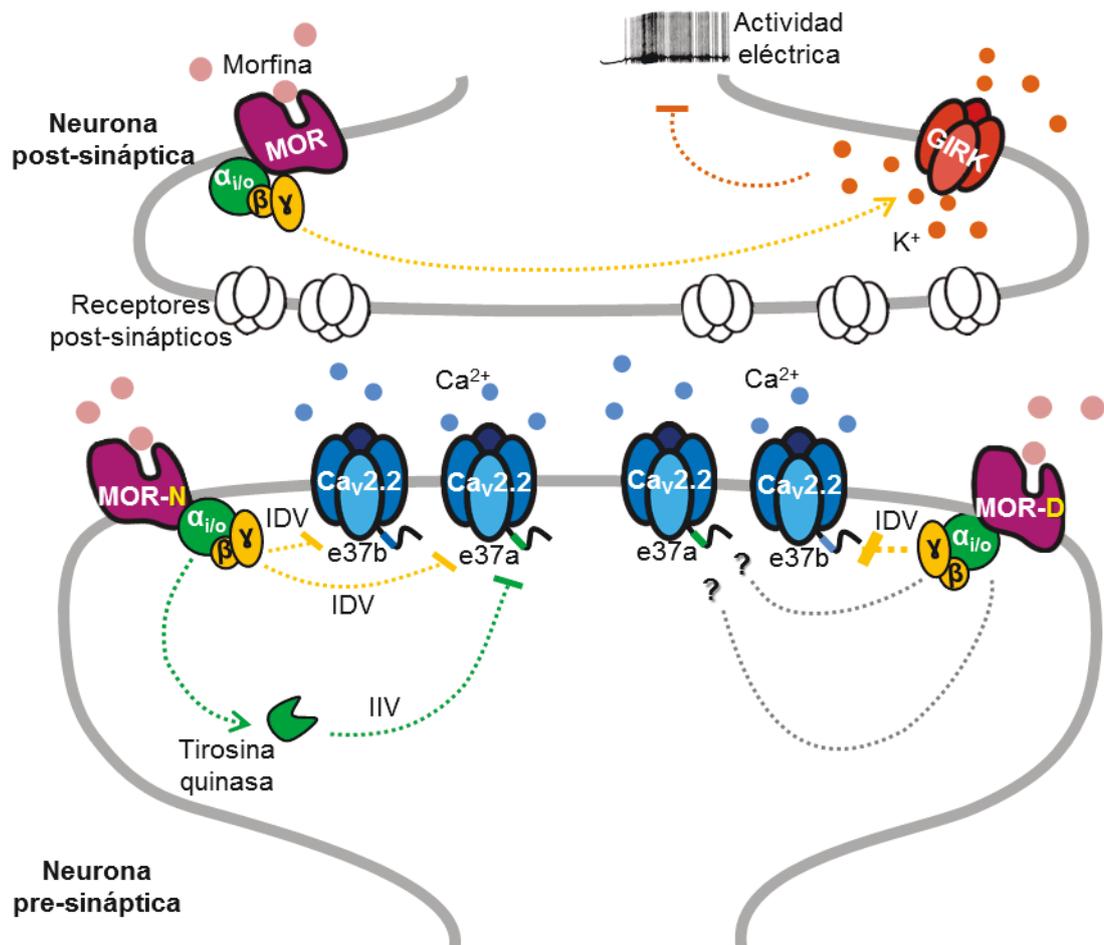
El receptor opioide μ

Los compuestos opioides son los analgésicos más eficaces y más utilizados en la historia humana (Brownstein, 1993). Los mediadores fisiológicos de sus efectos, tanto de péptidos opioides endógenos como exógenos, son los receptores opioides. Estos receptores constituyen una familia de GPCRs, de alta homología, que incluyen cuatro miembros: receptores opioides δ (DOR, del inglés *delta opioid receptor*) (Evans et al., 1992; Simonin et al., 1994), receptores opioides κ (KOR, del inglés *kappa opioid receptor*) (Yasuda et al., 1993), receptores opioides μ (MOR, del inglés *mu opioid receptor*) (Chen et al., 1993) y los ORL1 (Chen et al., 1994; Mollereau et al., 1994). Si bien, el uso de agonistas de estos receptores en la práctica clínica incluye diferentes opioides, el más utilizado es la morfina, un alcaloide analgésico muy potente y con propiedades adictivas, identificado como el principio activo de la planta del opio o adormidera (*Papaver somniferum*), cuyo uso data de la edad antigua (Brownstein, 1993). Por otro lado, se han descrito diversos ligandos endógenos, que si bien no son específicos de un receptor opioide, presentan una mayor afinidad selectiva sobre determinado receptor. Así, las endorfinas se unen preferentemente a receptores μ , las encefalinas a receptores δ , las dinorfinas a receptores κ y las nociceptinas/orfaninas a los ORL1 (Mayer y Hollt, 2001; Pasternak, 2004, 2014).

El primer receptor opioide en ser clonado fue el DOR (Evans et al., 1992), el cual presenta una distribución restringida al bulbo olfatorio, neo-córtex, núcleo *accumbens* y en menor grado en el tálamo, hipotálamo y médula. A nivel celular, se localiza pre- sinápticamente donde participa regulando la liberación de neurotransmisores en vías aferentes nociceptivas (Beaudry et al., 2011; Chu Sin Chung y Kieffer, 2013). Hasta el momento no existen drogas de uso clínico que actúen por activación de DOR (Pasternak, 2014). ORL1 es el receptor opioide más recientemente identificado (Chen et al., 1994; Mollereau et al., 1994), el cual se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso periférico donde modula la liberación de neurotransmisores tanto en el sistema simpático y parasimpático como en nervios sensitivos (Giuliani et al., 2000; Meunier, 2003). Si bien ORL1 participa activamente de procesos anti-nociceptivos, hasta el momento no se han sintetizado compuestos que

estén en uso que sean específicos de ORL1 aunque algunos antagonistas opioides se pueden unir a él (Chiou et al., 2007). KOR y MOR, por otro lado presentan una distribución más amplia, incluyendo el área tegmental ventral, núcleo *accumbens*, corteza pre-frontal, *striatum*, amígdala, locus *coeruleus*, sustancia *nigra*, habénula, hipotálamo, hipocampo, medula y nervios periféricos entre otros, con una localización celular tanto pre como post-sináptica (Chen et al., 1993; Yasuda et al., 1993; Knapp et al., 1995; Minami y Satoh, 1995; Simonin et al., 1995). KOR participa en la regulación de la liberación de neurotransmisores en vías nociceptivas a nivel cerebral (Bruijnzeel, 2009), sin embargo, el desarrollo de analgésicos de uso clínico ha sido limitado por los efectos secundarios indeseables que generan por la participación de KOR en otros aspectos del sistema nervioso. MOR tiene una amplia distribución tanto a nivel central como periférico y una alta eficacia para aliviar el dolor tras su activación específica por diversos compuestos naturales como la morfina y la codeína o sintéticos como el tramadol y el fentanilo, por lo tanto constituye el miembro más estudiado de la familia de los receptores opioides para el desarrollo de terapias paliativas del dolor en la actualidad (Gourlay, 2005; Ross et al., 2006; Trescot et al., 2008; Pasternak, 2010; Rachinger-Adam et al., 2011; Pasternak, 2012; Pasternak y Pan, 2013; Pasternak, 2014).

Siendo el principal mediador de los potentes efectos de los opioides, MOR juega un papel fundamental en diversas funciones biológicas incluida la analgesia, la respuesta al estrés, respuestas emocionales, la tolerancia y dependencia a distintas drogas, el aprendizaje y la memoria, entre otras (Bodnar, 2014). Para ejercer estos efectos, MOR se acopla a nivel molecular principalmente a Gi/o, cuya activación en neuronas impacta en diversos efectores tendientes, en general, a disminuir la actividad neuronal: disminuye el potencial de membrana y la excitabilidad, dado que promueve la apertura de canales rectificadores anómalos de la entrada de K⁺ activados por proteína G; reduce la liberación de neurotransmisores excitatorios, por inhibición de la actividad de los Ca_v2; y regula negativamente sistemas de segundos mensajeros y la expresión génica, por reducción de la actividad de adenilato ciclasa (Ikeda et al., 2002) (esquema 3). De esta manera, la activación de MOR por agonistas opioides interviene en numerosos procesos fisiológicos impactando en diversos efectores que en conjunto tienden a disminuir la actividad transcripcional y eléctrica de las neuronas.



Esquema 3. Impacto neuronal de la activación de MOR pre- y post-sináptico por morfina. Cuando morfina se une a MOR en la neurona post-sináptica, genera la activación de los canales de K^+ de rectificación anómala regulados por la proteína G (GIRK, del inglés *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*) vía activación de las subunidades $\beta\gamma$. De esta manera, genera una disminución de la actividad eléctrica neuronal. Por otro lado, en la neurona pre-sináptica, la activación de MOR (MOR-N) por morfina provoca una inhibición dependiente del voltaje (IDV) de $Ca_v2.2e37b$, mediante la unión de las subunidades $\beta\gamma$, disminuyendo la liberación de neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas (VS). Así mismo, provoca la misma inhibición sobre $Ca_v2.2e37a$, isoforma exclusiva de los nociceptores, sumada a una inhibición independiente del voltaje (IIV) producto de la activación de una tirosina quinasa por la subunidad α_i/o . La variante de MOR resultado de la sustitución aminoacídica N40D (MOR-D) posee una mayor potencia en inhibir $Ca_v2.2e37b$ (línea de mayor grosor) tras su activación con morfina, sin embargo, se desconoce el impacto de su activación sobre $Ca_v2.2e37a$. Las líneas de punto terminadas con flecha indican vías de activación, sin flechas vías de inhibición y con signos de interrogación vías aún no evaluadas.

Si bien los opioides siguen constituyendo analgésicos de elección en muchos tratamientos, su utilización puede generar efectos adversos como tolerancia y desarrollo de dependencia. Estos dos factores como así también la respuesta analgésica a una determinada dosis de opioides varían ampliamente entre individuos (Pasternak, 2004; Bodnar, 2014), por lo que la aplicación de dosis estandarizadas puede llevar a graves efectos secundarios indeseables (Pasternak, 2014). Así, una predicción de los resultados clínicos basados en las diferencias inter-individuales reduciría la incidencia de terapias inadecuadas y el número de pacientes que desarrollan dependencia. Una de las causas posibles de estas diferencias inter-individuales es la existencia de polimorfismos en los genes de los receptores. En el caso del receptor MOR existen estudios de asociación que sugieren que ciertos polimorfismos de este gen generan diferencias en la percepción de estímulos nocivos (Fillingim, 2005; Fillingim et al., 2005; Buskila, 2007; Sia et al., 2008), y en la respuesta a distintas drogas analgésicas (Janicki et al., 2006; Bruehl et al., 2008; Campa et al., 2008). Si bien la variabilidad inter-individual de caracteres resulta, en general, de interacciones complejas entre factores ambientales y genéticos, lo contrario se ha demostrado para varios genes específicos cuyas variantes son suficientes para determinar un fenotipo. Reportes de este tipo incluyen estudios de patrones de desequilibrios de ligamiento, de asociación caso-control, y de familias (Violon y Giurgea, 1984; Hartrick et al., 1986; Bachiocco et al., 1993; Mogil, 1999; Mayer y Holtt, 2001; Levran et al., 2011; Pecina et al., 2014).

Las variaciones en el genoma humano capaces de generar un fenotipo en forma poco dependiente del ambiente incluyen principalmente a los polimorfismos de un nucleótido, los cuales ocurren cada 100-300 pares de bases, dando cuenta del 90 % de las variaciones genéticas (Venter et al., 2001; Lercher y Hurst, 2002; Shastry, 2002). El impacto de un polimorfismo depende del nucleótido que es alterado y de su localización. Los polimorfismos sinónimos pueden alterar un nucleótido en un exón sin modificar el aminoácido resultante en la proteína (polimorfismo silencioso), o polimorfismos no-sinónimos que resultan en la alteración de la secuencia aminoacídica de la proteína. Adicionalmente, pueden ocurrir en regiones promotoras, intrónicas o inter-génicas y, consecuentemente pueden afectar la transcripción, el procesamiento, la estabilidad y la traducción. En este contexto, el polimorfismo de un nucleótido más estudiado del gen de MOR (*OPRM1*, *opioid receptor μ 1*) es N40D. Este polimorfismo no-sinónimo, en el cual la adenina de la posición +118, dentro del exón I, es sustituida por una guanina, genera en la secuencia aminoacídica un cambio de asparagina (N) por aspartato (D) en la posición 40 (N40D) (Bergen et al., 1997). El aminoácido 40 se ubica en el extremo N-terminal, formando parte del dominio extracelular del receptor.

Las consecuencias del cambio de N por D en la posición extracelular 40 incluyen que el subtipo MOR-D (que contiene D en la posición 40) posea un sitio menos de glicosilación que el MOR-N (que contiene N en la posición 40) ya que N40 constituye, junto a otros cuatro residuos N, sitios de glicosilación (Mestek et al., 1995; Huang et al., 2012). Adicionalmente, en diferentes estudios *in vitro* se han evaluado otros efectos de N40D sobre la función del receptor, obteniéndose resultados conflictivos hasta el momento (Lopez Soto et al., 2013). En ensayos de expresión, el receptor mutado MOR-D mostró mayor afinidad de unión a la β -endorfina, que el receptor MOR-N (Bond et al., 1998). Sin embargo, otros estudios no detectaron cambios significativos en la afinidad o la potencia de la β -endorfina, y los mecanismos de señalización entre subtipos (Befort et al., 2001; Beyer et al., 2004). Se ha reportado, además, que en células CHO (del inglés, *chinese hamster ovary*) transfectadas con MOR-D, los niveles de expresión de ARNm y proteínas de este receptor son menores que en aquellas transfectadas con el receptor silvestre MOR-N (Zhang et al., 2005). Así, N40D parece afectar directamente distintos aspectos del efecto de MOR a nivel celular pero los datos actuales no son suficientes para entender en profundidad este proceso.

La activación de MOR por agonistas desencadena la activación de las vías de señalización de Gi/o, inhibiendo la actividad de los $Ca_v2.2$ pre-sinápticos (esquema 3). Así, a nivel periférico, se inhibe la liberación de neurotransmisores excitatorios en las terminales nerviosas de la raíz dorsal de la médula espinal, promoviendo consecuentemente una disminución de la señal dolorosa (Polo-Parada y Pilar, 1999; Bourinet y Zamponi, 2005). Debido a la importancia de este mecanismo en el efecto analgésico de MOR, se ha comenzado a indagar en el impacto de N40D sobre la modulación de $Ca_v2.2$ por MOR. Con respecto a esto, se encontró que en neuronas simpáticas transfectadas con MOR-N las corrientes $Ca_v2.2$ son menos sensibles a la modulación por dos agonistas de MOR, morfina y DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly^{ol}]-enkephalin), que las transfectadas con MOR-D (Margas et al., 2007) (esquema 3). Estos datos sugieren un rol modulador diferencial para los subtipos de MOR sobre la actividad de los $Ca_v2.2$. Así, entender cómo estas modificaciones impactan en la señalización nociceptiva puede ayudar a desarrollar estrategias para combatir distintos estados de dolor. En este contexto, nosotros proponemos determinar cuál es la sensibilidad de la isoforma $Ca_v2.2e37a$, exclusiva de las neuronas nociceptivas, a los dos subtipos de MOR (esquema 3).

Diversos estudios han asociado a N40D con diferencias en la sensibilidad al dolor y respuestas analgésicas entre poblaciones humanas. En diferentes poblaciones el alelo D40 ha sido asociado con respuestas aumentadas al dolor y umbrales del

dolor disminuidos (Sia et al., 2008; Tan et al., 2009), y un aumento de los requerimientos de opioides en pacientes con dolor post-operatorio (Klepstad et al., 2004; Chou et al., 2006a; Chou et al., 2006b; Sia et al., 2008; Tan et al., 2009). Sin embargo, otros estudios no pudieron encontrar estas asociaciones (Pettersson et al., 2012; De Gregori et al., 2013; Solak et al., 2014; Xu et al., 2014) o inclusive encontraron asociaciones opuestas (Janicki et al., 2006; Song et al., 2013). Dados los múltiples componentes genéticos de las poblaciones mundiales actuales, se ha propuesto que las discrepancias entre estos estudios se deben a la contribución de un proceso de estratificación poblacional en la constitución de los fenotipos observados (Levrán et al., 2011). D40 es muy frecuente en poblaciones asiáticas, muy poco frecuente en poblaciones africanas y afroamericanas, y presenta frecuencias intermedias en las poblaciones europeas (Bergen et al., 1997; Bond et al., 1998; Gelernter et al., 1999; Klepstad et al., 2004; Janicki et al., 2006; Landau et al., 2008; Tan et al., 2009; Levrán et al., 2011). Las poblaciones africanas y europeas están representadas en el pool génico de las poblaciones sudamericanas, en las cuales se desconoce por completo cuáles son las frecuencias de N40D. Adicionalmente, las diferencias en la frecuencia de N40D entre poblaciones no han sido abordadas por estudios de genética poblacional que determinen si existe una correlación entre las diferencias en sus frecuencias genotípicas y el grado de diferenciación entre las poblaciones, por lo que estudios donde se compare su distribución podrían ofrecer información acerca de estos aspectos. De esta manera, a pesar de la enorme cantidad de estudios de asociación de N40D con aspectos asociados a la sensibilidad al dolor y requerimientos analgésicos, no se ha alcanzado un consenso sobre el impacto de N40D en diferentes poblaciones humanas.

En esta tesis nos planteamos entender el impacto funcional de los subtipos de MOR sobre la actividad de los $Ca_v2.2$ específicos de las vías de dolor (esquema 3). Por otro lado, dado que las poblaciones de distinta procedencia étnica y geográfica pueden presentar diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de sus polimorfismos genéticos, impactando en características fenotípicas complejas como la sensibilidad a estímulos dolorosos, nos proponemos determinar las frecuencias de N40D en una población argentina como un primer aporte al conocimiento de su variabilidad e incidencia en nuestra región. Así, esperamos que el estudio de la variabilidad genética de MOR y de sus mecanismos moduladores sobre los canales $Ca_v2.2e37a$ contribuya a conocer las bases moleculares de las diferencias observadas en la sensación dolorosa y la respuesta a tratamientos analgésicos.

El receptor de ghrelina

La hormona ghrelina es la única hormona peptídica circulante que estimula el apetito (Tschop et al., 2000; Nakazato et al., 2001). Ghrelina es producida principalmente por células endócrinas del estómago (Kojima et al., 1999), pasa al torrente sanguíneo y actúa principalmente a nivel hipotalámico uniéndose a su receptor, GHSR1a (del inglés, *growth hormone secretagogue receptor type 1a*) (Howard et al., 1996) produciendo un potente efecto orexigénico. La forma bioactiva de ghrelina requiere de una acilación con un residuo de ácido octanoico en la tercera serina de su secuencia peptídica por parte de la enzima ghrelina O-aciltransferasa (Yang et al., 2008), siendo el único péptido conocido que presenta esta modificación post-traducciona. Los aumentos en los niveles de ghrelina producen, además de efectos en el control de la homeostasis, alteraciones en procesos como la memoria, el aprendizaje, la respuesta al estrés y algunos aspectos hedónicos relacionados con el consumo de alimentos (Diano et al., 2006; Perello et al., 2010; Cabral et al., 2012; Mason et al., 2014; Perello y Dickson, 2014; Ribeiro et al., 2014). Así, desde su descubrimiento, tanto ghrelina como GHSR1a han tenido un enorme impacto como posibles blancos farmacológicos para tratar a pacientes con desórdenes alimenticios y, actualmente, patologías relacionadas con la memoria (Shi et al., 2013; Mason et al., 2014; Ribeiro et al., 2014). Por esta razón, es necesario un conocimiento profundo del sistema ghrelina/GHSR1a para el desarrollo seguro de drogas que modulen este sistema.

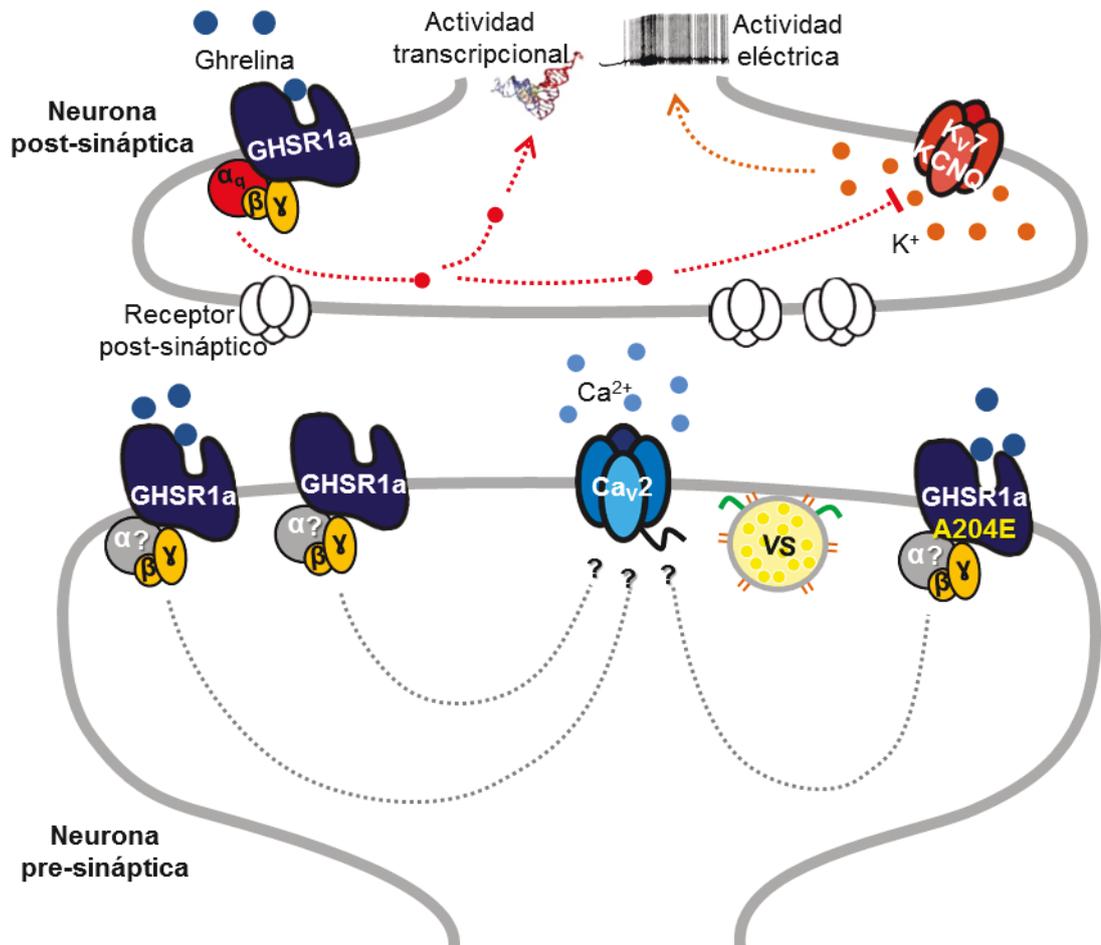
En neuronas hipotalámicas, la ghrelina ejerce sus efectos orexigénicos a través de las neuronas que expresan el péptido relacionado a agouti y el neuropéptido Y en el núcleo arcuato (Willesen et al., 1999; Cowley et al., 2003). Ghrelina al unirse a GHSR1a a nivel de las dendritas o el soma de neuronas aumenta la actividad de las mismas por mecanismos post-sinápticos: promueve la movilización de Ca^{2+} de compartimientos intracelulares, estimula la transcripción génica y aumenta la frecuencia de disparos de potencial de acción por inhibición de los canales de K^+ tipo Kv7/KCNQ (Howard et al., 1996; Dickson y Luckman, 1997; McKee et al., 1997; Cowley et al., 2003; Holst et al., 2003; Andrews et al., 2008; Shi et al., 2013) (esquema 4). Por otro lado, se ha sugerido también un rol de ghrelina actuando sobre GHSR1a localizados en la pre-sinapsis, modificando la liberación de neurotransmisor en neuronas hipotalámicas (Yang et al., 2011). En este contexto, cabe destacar que el hipotálamo cuenta con una amplia inervación inhibitoria GABAérgica (Decavel y Van den Pol, 1990), que establece un tono inhibitorio esencial en los mecanismos que regulan la ingesta de alimento y apetito (Wu et al., 2009; Kawabe et al., 2013). De esta

manera una modulación negativa de la neurotransmisión GABAérgica por el sistema ghrelina/GHSR1a en la pre-sinapsis también podría contribuir a un efecto excitatorio por des-inhibición de las neuronas post-sinápticas.

Dado que los Ca_v pre-sinápticos poseen una alta sensibilidad a los GPCRs, una inhibición de su actividad por GHSR1a constituye un mecanismo muy probable de acción de GHSR1a en la pre-sinapsis. Así, un mecanismo posible de acción del GHSR1a, un GPCR acoplado principalmente a Gq, es modificar la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos ($Ca_v2.2$ y $Ca_v2.1$) (esquema 4). Como mencionamos antes, los GPCRs acoplados a proteínas Gq inhiben los Ca_v2 a través de un mecanismo independiente del voltaje (Zamponi y Currie, 2013). La activación de Gq activa varias cascadas de señalización de las cuales las más importantes son la activación de las enzimas PLC y fosfolipasa A_2 , las cuales producen inositol trifosfato y diacilglicerol y, ácido araquidónico respectivamente a partir del fosfolípidos de la membrana plasmática (Hille et al., 2014; Jalink y Adjobo-Hermans, 2014; Zhou y Bohn, 2014). Las vías de señalización activadas por los segundos mensajeros productos de estas reacciones, así como la depleción de PIP_2 en la membrana plasmática impactan en la actividad de Ca_v2 mediante fosforilación del canal, unión de ácido araquidónico, desestabilización del canal por depleción de PIP_2 en la membrana, internalización del canal o co-internalización del canal y el GPCR (Kammermeier y Ikeda, 1999; Kammermeier et al., 2000; Liu y Rittenhouse, 2003; Suh et al., 2010; Suh et al., 2012; Zamponi y Currie, 2013). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si la actividad del GHSR1a tiene un impacto en la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos.

GHSR1a posee una alta actividad en ausencia de ligando, la cual alcanza el 50 % del máximo de actividad en presencia de agonista (Holst et al., 2003), convirtiéndose de este modo en el GPCR con mayor actividad constitutiva conocido. Se ha descrito que esta actividad constitutiva tiene un rol en los mecanismos neuronales que controlan la ingesta de alimento y apetito (Petersen et al., 2009), pero se desconoce por completo su impacto a nivel neuronal. Con respecto a esto, se ha identificado una variante humana del GHSR1a, GHSR1aA204E, provocada por una mutación puntual a nivel de la secuencia de su gen GHSR. Esta mutación consiste en una transversión, de citosina por adenina en la posición +611, que genera una sustitución de alanina (A) por glutamato (E) en la posición 204 (A204E) dentro del segundo segmento transmembrana del receptor. El mutante GHSR1aA204E carece completamente de la actividad independiente de agonista característica del GHSR1a salvaje, pero conserva la propiedad de activarse por ghrelina (Pantel et al., 2006). La sustitución A204E ha sido identificada en fenotipos de estatura baja, pero es aun completamente desconocido cómo impacta en el desarrollo de dicho fenotipo. Por otro

lado, se desconoce si A204E constituye una mutación o un polimorfismo en nuestra población, por lo cual realizar análisis de sus frecuencias en distintas poblaciones resulta muy importante para determinar su impacto poblacional.



Esquema 4. Impacto neuronal de la activación de GHSR1a pre- y post-sináptico. Cuando ghrelina se une a GHSR1a en la membrana post-sináptica, genera la inhibición de los canales de K^+ $K_V7/KCNQ$ vía activación de la proteína G_q , la cual incluye distintos mediadores, desencadenando un aumento de la actividad eléctrica. Adicionalmente, también induce un aumento de la actividad transcripcional. Por otro lado, a nivel de la membrana pre-sináptica se desconoce el impacto de la activación de GHSR1a tanto de manera constitutiva como evocada por ghrelina sobre la actividad de los Ca_V2 y la liberación de los neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas (VS). También se desconoce el impacto de la variante mutante sin actividad constitutiva, GHSR1a-A204E, sobre los Ca_V2 . Las líneas de punto terminadas con flecha indican vías de activación, sin flechas vías de inhibición, con puntos pasos intermedios, y con signos de interrogación vías aún no evaluadas.

La importancia del estudio genético-poblacional y del impacto funcional de las variantes de los GPCRs, MOR y GHSR1a, sobre los mecanismos moduladores de los Ca_v2 , radica en el aporte al conocimiento de la variabilidad genética de la región y de los efectos específicos de determinados polimorfismos sobre la actividad de los Ca_v y consecuentemente sobre la neurotransmisión.

Objetivos



Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es estudiar la modulación de los Ca_v pre-sinápticos por la actividad de subtipos de GPCRs humanos, específicamente de MOR y de GHSR1a. Así, en el largo plazo, esperamos contribuir al conocimiento de los mecanismos que controlan la neurotransmisión y cómo estos mecanismos difieren entre individuos con distinto componente genético.

Objetivos específicos

1 (A) - Determinar el impacto del polimorfismo N40D sobre la actividad inhibitoria de MOR sobre los Ca_v pre-sinápticos específicos de las vías del dolor.

(B) - Determinar las frecuencias genéticas del polimorfismo N40D de MOR en una población argentina.

2 (A) - Determinar el impacto de la actividad de GHSR1a y de la mutación A204E sobre los Ca_v pre-sinápticos.

(B) - Determinar las frecuencias genéticas de la mutación A204E de GHSR1a en una población argentina.

Materiales y métodos



1. Modelos experimentales

1.1. Línea celular HEK 293T

Como modelo de célula eucariota se utilizó la línea celular HEK 293T gentilmente cedida por el Dr. Osvaldo Uchitel (Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) y depositada en el banco de células del sector de cultivos del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular).

1.2. Animales

Se utilizaron ratas y ratones siguiendo estrictamente, en todos los procedimientos llevados a cabo, las recomendaciones de *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health*.

Los animales se mantuvieron en el cuarto de cría en el sector de bioterio del IMBICE con ciclos fijos de 12 horas luz / oscuridad y con una temperatura ambiental controlada (23 °C). Fueron alimentados con acceso *ad libitum* de agua y un alimento comercial completo para roedores (GEPESA, Grupo Pilar, Buenos Aires, Argentina). La eutanasia de los ejemplares adultos se realizó por decapitación por personal experimentado del bioterio.

1.2.1. Rattus norvegicus

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley en edad fértil provenientes del sector de bioterio del IMBICE.

1.2.2. Mus musculus

1.2.2.1. Ratones *wild type*

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL6/J en edad fértil provenientes del sector de bioterio del IMBICE.

1.2.2.2. Ratones GHSR-eGFP

Se utilizaron ratones transgénicos que expresan la proteína eGFP (del inglés, *enhanced green fluorescent protein*) bajo el control del promotor del gen GHSR (ratones GHSR-eGFP) originados en el *Mouse Mutant Regional Resource Center* (STOCK Tg(Ghsr-EGFP)KZ65Gsat/Mmucd, #030942-UCD, Universidad de California, Estados Unidos) (Mani et al., 2014). Este ratón fue generado por el proyecto de la Expresión Génica Atlas del Sistema Nervioso (*Gene Expression Nervous System Atlas-GENSAT*) de la Universidad de Rockefeller. Luego de la extracción de ADN a

partir de tejido, el genotipo de estos animales se determinó mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) y electroforesis en geles de agarosa (ver Anexo).

1.2.2.3. Ratones GHSR-KO

Se utilizaron ratones nulos condicionales para el gen GHSR (ratones GHSR-KO) (Zigman et al., 2005). Del mismo modo que para los ratones GHSR-eGFP, se extrajo el ADN y se genotificaron mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa (ver Anexo).

2. Cultivos celulares

2.1. Cultivos de células HEK 293T

Los cultivos de células HEK 293T se mantuvieron rutinariamente en frascos de cultivo celular estériles de 25 cm² de superficie (NEST Biotechnology Co., cat#707003, Jiangsu, China) con medio de cultivo *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM, Laboratorios Microvet, cat#P3030, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 10 % suero fetal bovino (FBS, cat#1650-01, Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina) a 37 °C en una atmósfera con 95 % O₂ y 5 % CO₂ y humedad controlada. Los subcultivos se realizaron en placas de poliestireno transparentes de 35 mm de diámetro (NEST, cat# 706001). Para ello, cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia del ~ 100 %, se retiró el medio de cultivo de los frascos, se agregaron 3 ml de solución cítrico salina (ver Anexo) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Luego se dispersaron las células mecánicamente y se agregaron 0,5 ml de la suspensión celular a cada placa de cultivo para obtener una confluencia del 60 - 70 %, en volumen final de 2,5 ml con DMEM + 10 % FBS. Estas placas fueron incubadas hasta su uso en condiciones iguales a las descriptas para los frascos.

2.2. Cultivos primarios de neuronas de ratas

Los cultivos primarios enriquecidos en neuronas hipotalámicas fueron obtenidos de ratas Sprague-Dawley en los días embrionarios 17-18 (E17-18). El procedimiento seguido fue similar al descrito en (Agosti et al., 2014). Brevemente, se anestesiaron las ratas preñadas con hidrato de cloral (500 mg / kg) y se removieron los embriones. Los cerebros de los embriones se expusieron de lado ventral y se removió el hipotálamo con pinzas. El tejido se colocó en solución de Hank estéril (Laboratorios Microvet, cat#L2005-500) enfriada en hielo, luego de dos lavados se incubó a 37 °C

por 20 minutos en solución de Hank con tripsina 0,25 mg / ml (Microvet, cat#L2700-100) y desoxyribonucleasa I de páncreas bovino 0,28 mg / ml (Sigma Aldrich, cat#D5025, Missouri, Estados Unidos), y luego se agregaron 300 µl de FBS para detener la digestión. Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de solución de Hank y se disoció mecánicamente el tejido usando diversas pipetas Pasteur de vidrio con puntas de diámetros de tamaño decreciente. Posteriormente se sembraron 70000 células en vidrios estériles de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma Aldrich, cat#P8920) en placas estériles de 24-wells de 15 mm de diámetro (Greiner Bio-One, cat#662-160, Kirchdorf an der Krems, Austria). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 95 % O₂ y 5 % CO₂ con 0,5 ml de DMEM / F12 1:1 suplementado (ver Anexo). El cuarto día de cultivo se reemplazó la mitad del medio con medio con citosina-β-D-arabinofuranosida (Sigma Aldrich, cat# C1768) alcanzando una concentración final de 5 µM.

2.3. Cultivos primarios de neuronas de ratón

Utilizamos ratones GHSR-eGFP y ratones GHSR-KO en el día E17-18 para realizar cultivos primarios enriquecidos de neuronas hipotalámicas. El protocolo de cultivo fue similar al descrito anteriormente para el cultivo primario de neuronas de rata, excepto por la adición del suplemento B27 (1:50) (GIBCO, cat#17504-044) al medio DMEM / F12 1:1 suplementado.

Adicionalmente se realizaron cultivos primarios enriquecidos en neuronas de hipocampo de ratones GHSR-eGFP. Una vez retirado el hipotálamo, del mismo ejemplar se procedió a extraer completamente el hipocampo de acuerdo al procedimiento descrito en (Raingo et al., 2012). Brevemente, se extrajo el cerebro y se lo colocó en una placa de Petri con solución de Hank estéril previamente enfriada en hielo. Utilizando una lupa binocular, se colocó el cerebro en posición dorsal, se identificaron los hemisferios cerebrales y se los separó. Se extrajeron las meninges, y se identificó y extrajo cada hipocampo. Posteriormente se siguió el procedimiento previamente descrito para realizar el cultivo primario de neuronas de rata con adición del suplemento B27 (1:50) al medio DMEM / F12 1:1 suplementado.

3. Expresión heteróloga

3.1. Transfecciones transitorias de células HEK 293T

Se realizaron transfecciones transitorias de células HEK 293T al 70 - 80 % de confluencia, utilizando el método de liposomas catiónicos con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat#11668-019, Massachusetts, Estados Unidos) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Los plásmidos de los GPCRs utilizados fueron: MOR-N y MOR-D provistos gentilmente por el Dr. Víctor Ruiz Velazco (University of Pennsylvania, Estados Unidos); y GHSR1a, GHSR1a-YFP, GHSR1a-A204E y GHSR1a-A204E-YFP provistos gentilmente por el Dr. Jacky Marie (Universités Montpellier I & II, Francia). Los plásmidos de las subunidades principales de los Ca_v utilizados fueron: $Ca_v2.1$ (#AY714490), $Ca_v2.2e37b$ (#AF055477), $Ca_v2.2e37a$ (#AY211500); los de sus subunidades auxiliares fueron: $Ca_v\alpha_2\delta_1$ (#AF286488), $Ca_v\beta_3$ (#M88751) y $Ca_v\beta_{2a}$ (#M80545) provistos gentilmente por la Dra. Diane Lipscombe (Brown University, Estados Unidos). En algunos experimentos co-transfectamos además el plásmido pcDNA3.1+ (Invitrogen, cat#V790-20), el dominio C-terminal asociado a membrana de la quinasa 2 acoplada a GPCR (MAS-GRK2-ct, del inglés *membrane-associating C-terminal construct of a G protein coupled receptor kinase 2*) o un mutante $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$ -Q209L/D277N, Missouri S&T cDNA Resource Center, cat#GNA0Q000C0, Missouri, Estados Unidos) provistos gentilmente por el Dr. Gustavo Paratcha (instituto de Biología Celular y Neurociencia, Prof. E. De Robertis, Buenos Aires, Argentina) y la Dra. Diane Lipscombe, respectivamente.

Se transfectaron iguales proporciones molares de cada plásmido excepto en algunos experimentos donde se utilizaron cantidades decrecientes de los plásmidos GHSR1a y GHSR1a-A204E.

3.2. Transfecciones transitorias de neuronas hipotalámicas de rata

Se realizaron transfecciones al sexto día de cultivo de las neuronas de los cultivos primarios de hipotálamo de rata previamente descritos. Se utilizó la técnica de fosfato de calcio descrita en (Jiang y Chen, 2006) dado que aumenta considerablemente la eficiencia de transfección de células post-mitóticas en comparación con la metodología de liposomas catiónicos. Se utilizaron los plásmidos eGFP, y GHSR1a o GHSR1a-A204E unidos a la secuencia de la proteína amarilla fluorescente (YFP = del inglés, *yellow fluorescent protein*) (GHSR1a-YFP y GHSR1a-A204E-YFP). Luego de 48 horas se realizaron los registros de patch-clamp en las neuronas verdes.

3.3. Transducción con vectores lentivirales de cultivos neuronales de ratón GHSR-KO

En el laboratorio se utilizaron vectores lentivirales de tercera generación con bioseguridad incrementada (Tiscornia et al., 2006). Adicionalmente, ya que el virus del cual derivan es un patógeno humano (virus de la inmunodeficiencia humana), durante la realización de los experimentos que involucraron la producción de lentivirus se siguieron estrictamente las normas de bioseguridad recomendadas por la *American Biological Safety Association*.

3.3.1 Producción de vectores lentivirales recombinantes

Se transfectaron cultivos de células HEK 293T con los 3 plásmidos de empaquetamiento lentiviral de tercera generación pMDL, pRSV y pVSVg (provistos gentilmente por el Dr. Ege Kavalali, University of Texas, Estados Unidos), y el vector de transferencia FUGW-GHSR1a-YFP o FUGW-GHSR1a-A204E-YFP (sub-clonados en nuestro laboratorio) en una proporción molar 1:2:2:3. Luego de 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo de las células HEK 293T con 2,5 ml de medio DMEM / F12 1:1 suplementado (ver Anexo). Se cosechó el medio con la producción de vectores lentivirales 24 horas después, se lo centrifugo a 1000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se lo filtró con un filtro de 0,45 μm . La producción de vectores lentivirales se guardó en tubos estériles hasta su uso en el mismo día.

3.3.2 Transducción de cultivos primarios neuronales

Al quinto día de cultivo, se reemplazaron los 0,5 ml de medio DMEM / F12 1:1 suplementado de los cultivos primarios de neuronas de hipotálamo de ratón GHSR-KO, guardándolos en tubos de 1,5 ml estériles a 37 °C, por 0,5 ml de medio con la producción de lentivirus; y se incubaron por 4 horas a 37 °C en una atmósfera con 95 % O₂ y 5 % CO₂. Luego, se reemplazó el medio con la producción de lentivirus por el medio previamente guardado. Los experimentos se realizaron al día 15 de cultivo (= día 10 post-transducción lentiviral).

4. Protocolos generales de trabajo con plásmidos

4.1. Competencia bacteriana

Se utilizaron las cepas JM109 y DH5 α de *Escherichia coli* dado que carecen de los genes codificantes de la endonucleasa A y recombinasa A, por lo que garantizan estabilidad y calidad de las preparaciones de plásmidos obtenidas a partir de las mismas.

Para la competencia bacteriana se utilizó el método de Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan y Meselson, 1983). Para ello, con un anza se realizaron estrías de bacterias (de un stock conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) en una placa de Petri estéril con medio Luria Bertani (LB) - agar 1,5 % (ver Anexo) y se incubó durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se transfirió una colonia de 2-3 mm de diámetro a 10 ml de medio LB sin antibiótico a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación ~ 18 horas. Con 100 μl de este medio saturado se inoculó 4 ml de medio LB sin antibiótico y se lo incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,55. Luego se enfrió el cultivo de bacterias en hielo durante 10 minutos y se lo centrifugó a 4000 r.p.m. por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 32 ml de solución de competencia enfriada en hielo (ver Anexo), y se centrifugó del mismo modo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 8 ml de solución de competencia fría, se adicionó 0,64 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se incubó en hielo por 10 minutos. Por último, la suspensión de bacterias se alicuotó de a 200 μl en tubos estériles previamente enfriados en hielo, y se conservaron inmediatamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

4.2. Transformación de bacterias competentes

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook, J y col, 2001). Para ello se adicionaron aproximadamente 100 ng de ADN plasmídico a 200 μl de suspensión de bacterias competentes, y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego, el tubo se transfirió a un baño de agua a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realizar un choque térmico de 45 segundos. Se colocó el tubo inmediatamente en hielo, se agregaron 0,8 ml de medio SOC (ver Anexo) y se incubó 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de la incubación, las bacterias se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina (100 mg / ml), y se incubaron a 37°C durante una noche.

4.3. Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (midi-prep)

Se transfirió una colonia de bacterias transformadas con el plásmido de interés a 5 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección. Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 horas con agitación vigorosa (300 r.p.m.). Se inoculó con 0,5 ml del cultivo de bacterias 200 ml de LB con antibiótico, y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche con agitación vigorosa. Posteriormente, se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 8000 r.p.m. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando un kit comercial (QIAGEN, cat# 12145, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4. Cuantificación de ADN

Se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Delaware, Estados Unidos). Además, para determinar posibles contaminaciones de la muestra, se tuvieron en cuenta las relaciones 230 / 260 y 280 / 260, y se realizó la corrección correspondiente.

4.5. Obtención de plásmidos lentivirales de transferencia

4.5.1. Sub-clonado de plásmidos lentivirales de transferencia

Se realizaron diversas digestiones con enzimas de restricción para construir los plásmidos pFUGW conteniendo las secuencias para GHSR1a-YFP y GHSR1aA204E-YFP. Se partió de los plásmidos pFUGW conteniendo la secuencia codificante para la proteína rSyb2mOrange (Raingo et al., 2012), y pKR6 conteniendo las secuencias para GHSR1a-YFP y GHSR1aA204E-YFP. Mediante el programa Clone Manager Basic 9 (Scientific & Educational Software, Nueva York, Estados Unidos) se estudiaron los sitios de corte por enzimas de restricción. Se digirieron los tres plásmidos por separado con la enzima EcoRI (Promega Corp., cat#R6011, Wisconsin, Estados Unidos) en una mezcla de reacción conteniendo 10 µg de ADN, 2 µl de buffer 10X, 2 µl de BSA 10X, 10 U de EcoRI y agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 20 µl. Se incubó a 37 °C durante toda la noche. Se realizó una extracción de ADN plasmídico fenol/cloroformo (sección 4.5.2) para luego digerir con otras enzimas. El plásmido pFUGW-rSyb2mOrange ya linealizado fue digerido con la enzima de restricción HpaI (Fermentas, cat#ER1031 Massachusetts, Estados Unidos) en una mezcla de reacción con: ADN extraído, 2 µl de buffer 10X, 10 U de HpaI y agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 20 µl; mientras que los plásmidos pKR6- GHSR1a-YFP y GHSR1aA204E-YFP se digirieron con la enzima HincII (Fermentas, cat#ER0491) en una mezcla de reacción de la misma composición que la utilizada para HpaI. Las tres mezclas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Los productos se sembraron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Aldrich, cat#A9414-10G) al 0,8 %, y se extrajeron las porciones de gel conteniendo los fragmentos de ADN de interés. Luego, el ADN se recuperó mediante una extracción con solventes orgánicos (sección 4.5.3) y se procedió a la ligación de los fragmentos de ADN. Se realizaron mezclas con distintas proporciones molares fragmento/vector: se mezclaron 75 ng de cada fragmento (GHSR1a-YFP o GHSR1a-A204E-YFP) con 77,9 ng del vector pFUGW (relación 1:5 molar), o 75 ng de cada fragmento con 15,6 ng del vector (relación 1:1 molar), más 2 µl de buffer 10 X, 2 U de la enzima T4 DNA ligasa y agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 20 µl en cada tubo

de reacción. Se incubó durante 1 hora a 22 °C y luego 10 minutos a 65 °C para inactivar la ligasa. Para verificar los productos de ligación se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa JM109. Se extrajo el ADN plasmídico de diferentes colonias crecidas en medio LB con ampicilina utilizando un kit comercial (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizaron cortes enzimáticos con distintas enzimas de restricción: PstI, XbaI, HincII y Acc65I. Luego de analizar los patrones de restricción en un gel de agarosa al 2 %, se escogieron aquellas muestras que revelaron el patrón de digestión esperado.

4.5.2. Extracción de ADN plasmídico con fenol/cloroformo

Se adicionó 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) a la mezcla de reacción de la digestión. Se mezcló por inversión hasta obtener una emulsión y se realizó una centrifugación a 13000 r.p.m. por 1 minuto. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se agregaron 100 µl de cloroformo. Luego de mezclar y realizar otra centrifugación, se volvió a transferir la fase acuosa a un tubo limpio para adicionar un 10 % de acetato de sodio 3 M y 250 µl de etanol 96 %. Se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4 °C por 30 minutos a 16000 r.p.m. Se lavó con 100 µl de etanol al 70 %, se centrifugó 15 minutos en las mismas condiciones, se descartó el etanol y luego de que se evaporó por completo el etanol, el ADN se resuspendió en agua desionizada estéril.

4.5.3. Extracción del ADN del gel de agarosa con fenol/cloroformo

Se pesó la porción de agarosa conteniendo el ADN de interés, y se adicionaron 3 volúmenes de buffer TE (ver Anexo) y se calentó a 65 °C por 10 min, o, en su defecto, hasta fundido completo de la agarosa. Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se agregó un volumen de fenol y se agitó vigorosamente. Luego de centrifugar a 12000 r.p.m por 10 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se prosiguió de la misma manera que en la extracción de ADN plasmídico fenol/cloroformo.

5. Ensayo de *binding*

Se transfectaron células HEK 293T con 150 y 600 ng de los plásmidos GHSR1a o pcDNA3.1+ (como control). Luego de 24 horas se incubaron las células con 400 nM ghrelina unida a fluoresceína (FLUO-ghrelina (McGirr et al., 2011)) en el buffer de *binding* (ver Anexo). Después de 30 minutos se lavaron las células con buffer fosfato

salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) (ver Anexo), se fijaron con formaldehído al 4 %, y se montaron con medio de montaje (anti-fade con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI)). Las células se observaron en un microscopio Eclipse 50i Nikon filtrando con un filtro de 500 nm y se tomaron microfotografías con una cámara DS-Ri1 Nikon. El análisis de las imágenes se realizó con el programa ImageJ V1.48.

6. Fraccionamiento sub-celular de proteínas y *western blot*

Se transfectaron células HEK 293T con los plásmidos de $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$, más las subunidades auxiliares $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$, y los GHSR1a, GHSR1a-A204E o pCDNA3.1+. Se utilizó un kit de extracción (BioVision Cat. # K268-50, California, Estados Unidos) para extraer las proteínas de membrana y se siguió el procedimiento descrito en (Gandini et al., 2014). Para cada condición se utilizaron 6 placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Las concentraciones de proteínas citosólicas y de membrana plasmática se determinaron mediante el ensayo de ácido bicinconínico. Se calentaron 45 μ g de cada muestra de proteínas por 5 minutos en buffer de carga (ver Anexo) y se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 7 % para luego ser transferidos a membranas de nitrocelulosa (Immobilon, Merck Millipore, cat#IPFL00010, Massachusetts, Estados Unidos). Luego de bloquear con 5 % de leche deshidratada sin grasa disuelta en TBST (ver Anexo), las membranas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios: anti- $Ca_v2.1$ (1:300 en TBST con 2,5 % de leche, Alomone Labs, cat#ACC-001, Jerusalén, Israel), anti- $Ca_v2.2$ (1:200 en TBST, Calbiochem, Merck Millipore, cat#AB5154-50UL), anti-cadherina (1:200 en TBST, Zymed, cat#71-7600, California, Estados Unidos), anti-AKT (1:15000 en TBST, Santa Cruz Biotechnology, cat#sc-1618, Texas, Estados Unidos) y anti-Hsp90 (1:2000 en TBST, Cell Signaling, cat#4874, Massachusetts, Estados Unidos). Las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido en TBST con 5 % de leche. Para el análisis semi-cuantitativo la señal de los Ca_v fue normalizada con la señal de la proteína cadherina. El análisis por densitometría se llevó a cabo usando el programa ImageJ V1.48.

7. Electrofisiología

Se realizaron registros de patch-clamp en su configuración de célula entera, utilizando la modalidad de fijación de voltaje con un amplificador Axopatch 200 (Molecular Devices, California, Estados Unidos). Los datos fueron muestreados a 20 kHz y filtrados a 10 kHz (-3 dB) utilizando el programa pClamp8.2 (Molecular Devices)

mediante un conversor analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices). Se utilizaron micro-electrodos de registros constituidos por un alambre de plata clorada (Ag/AgCl) incluido en una micro-pipeta de vidrio/borosilicato (diámetro externo 1,5 mm e interno 1,1 mm, King Precision Glass Inc., cat#KG-33, California, Estados Unidos), fabricadas con un estirador de pipetas (Sutter Instrument Co., P-80, California, Estados Unidos) y cargadas con solución intracelular (ver Anexo). Las resistencias de los micro-electrodos conteniendo la solución interna fueron entre 2 - 4 M Ω . Se admitieron resistencias en serie < 6 M Ω y se compensaron en un ~ 80 % con un 10 μ s lag-time. Se sustrajeron de manera online las corrientes de fuga usando un protocolo P/-4 (excepto durante los registros de las corrientes de K⁺). Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente.

7.1. Corrientes de sodio y bario en neuronas hipotalámicas

Se realizó patch clamp entre los días 7-10 en cultivo en neuronas hipotalámicas de rata y ratón. La composición de las soluciones interna y externas de detallan en el Anexo. Se midieron las corrientes de sodio con una solución externa alta en sodio (135 mM de NaCl) (ver Anexo). Mientras que para medir las corrientes Ca_v se reemplazó la solución externa alta en sodio por una solución externa alta en bario (10 mM BaCl₂) (ver Anexo) y con 1 μ M de tetrodotoxina (TTX, Sigma Aldrich, cat#T8024, Missouri, Estados Unidos) manteniendo la neurona de registro a -80 mV para que la solución despolarizante no la dañe. El potencial de mantenimiento utilizado fue de -80 mV, y se aplicaron pulsos de voltaje de 0 mV de 20 ms de duración en intervalos de 10 s. Los protocolos de voltaje utilizados para obtener las relaciones de voltaje-corriente (curvas IV) consistieron en pulsos cuadrados de voltaje de 20 ms de duración cada 5 s desde -60 hasta +50 mV.

7.2. Corrientes de calcio en células HEK 293T transfectadas

Se utilizó la misma solución interna descrita para los registros de neuronas y una solución externa de calcio (2 mM CaCl₂) (ver Anexo). Se aplicaron pulsos cuadrados de voltaje a +10 mV de 15 ms duración cada 10 s, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. En algunos experimentos se aplicó también un protocolo con un pre-pulso de +80 mV de 15 ms de duración, 12,5 ms antes del pulso para remover eficientemente toda la inhibición dependiente del voltaje de los Ca_v2 provocada por la modulación de los GPCRs (Raingo et al., 2007; Lopez Soto y Raingo, 2012).

7.3. Corrientes de potasio en neuronas hipocampales

Se registraron corrientes Kv7/KCNQ de neuronas piramidales de cultivos primarios de hipocampo del ratón reportero de GHSR, entre los días 9-13 en cultivo. Se utilizaron las soluciones descritas en (Shi et al., 2013) (ver Anexo). Se aplicó un protocolo de voltaje de deactivación estándar que consistió en pulsos hiperpolarizantes de -30 mV de 500 ms de duración, cada 10 s, desde un potencial de mantenimiento de -20 mV.

7.4. Corrientes inhibitorias post-sinápticas en neuronas de hipotálamicas

Entre los días 13 y 22 en cultivo, se registraron corrientes inhibitorias post-sinápticas (=IPSCs, del inglés *inhibitory post-synaptic currents*) en cultivos primarios de neuronas hipotálamicas del ratón GHSR-KO. Las soluciones internas y externas se encuentran descritas en el Anexo. Las neuronas se mantuvieron a -80 mV y, para evocar las IPSCs, se utilizó estimulación eléctrica de campo con electrodos de platino paralelos con una duración de 1 ms y una amplitud de 20 mA. Por otro lado, los IPSCs miniatura espontáneos (mIPSCs) se registraron en presencia de 1 μ M de TTX en la solución externa y a un potencial de -70 mV. Adicionalmente, en algunos experimentos se aplicó un pulso de solución externa hiper-osmótica alta en sacarosa (0,5 M) en presencia de 1 μ M de TTX para evocar una liberación masiva de neurotransmisor independiente de potenciales de acción e ingreso del ion Ca^{2+} en las terminales manteniendo el potencial a -70 mV (Rosenmund y Stevens, 1996).

7.5. Drogas

Se utilizó [*D*-Ala², *N*-MePhe⁴, Gly-*o*]-enkephalin (DAMGO, Sigma Aldrich, cat#E7384), ghrelina esterificada con ácido n-octanoico (Global Peptide, cat#PI-G-03, Colorado, Estados Unidos); [*D*-Arg¹,*D*-Phe⁵,*D*-Trp^{7,9},Leu¹¹]-substance P (SPA, del inglés *substance-P analog*, Biotechnology, Texas, Estados Unidos); un inhibidor específico de la proteína Gs, la toxina del cholera (ChTx, Sigma Aldrich, cat#C8052); un inhibidor específico de la proteína Gi/o, la toxina Pertussis (PTx, Sigma Aldrich, cat#P7208); el bloqueante de los Ca_v2.1, la ω -agatoxina-IVA (Peptides International, cat#4256-s, Kentucky, Estados Unidos); el bloqueante de los Ca_v2.2, la ω -conotoxina-GVIA (Alomone lab., cat#C-300, Jerusalén, Israel).

8. Determinación ex vivo de la liberación de [³H]-GABA

Se utilizó una matriz de acero inoxidable para cerebro de ratón para cortar cerebros de ratones salvajes ayunados durante 48 horas o alimentados ad libitum en

secciones coronales de 1 mm de diámetro. De las secciones adecuadas se micro-disectaron los núcleos arcuatos hipotalámicos. Se incubó el tejido en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato (ver Anexo) saturado con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ por 10 minutos a 37 °C. Luego se incubaron con [3H]-GABA (367cpm/ml, con una actividad específica de 92.1 Ci/mmol) (Perkin Elmer) en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato por 20 minutos para llenar las vesículas sinápticas con el trazador, y se lavó dos veces con el buffer. Posteriormente se añadió al medio 150 µl del centelleador (Ecolite) y se midió la radioactividad en un contador β (liberación basal). Finalmente, al estabilizarse la liberación basal, se incubó por 10 minutos en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato alto en K⁺ (ver Anexo), y se volvió a medir la radioactividad.

9. Determinación de ARNm

Al igual que en la sección 8, se realizaron micro-disecciones de las porciones de tejido correspondiente al hipotálamo. El ARN total de los tejidos fue aislado utilizando el kit de extracción RNA STAT-60 (Tel-Test inc., Texas, Estados Unidos). El ARN total fue tratado con DNAasa libre de ARNasa (Roche) y se retro-transcribió a ADN copia utilizando el kit SuperScript II Reagents (Invitrogen, cat#18064-014). La PCR cuantitativa se realizó utilizando el sistema de detección de secuencias de Applied Biosystem 7900HT y Syber Green (Applied Biosystem) y los cebadores específicos de GHSR fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (PerkinElmer Life Science) y validados mediante un análisis de curvas de disociación. Los cebadores utilizados fueron “Fw GHSR-2” 5`-ACCGTGATGGTATGGGTGTCG-3` y “Rv GHSR-2” 5`-CACAGTGAGGCAGAAGACCG-3`, los cuales hibridan específicamente en el exón 2 de GHSR. Estos resultados fueron confirmados mediante un segundo par de cebadores específicos de GHSR los cuales hibridan en el exón 1 y exón 2 (“Fw GHSR-1” 5`-ATCTCCAGTGCCAGGCACTGCT-3` y “Rv GHSR-1” 5`-AATGGGCGCGAGCAGGAA-3`). Los niveles de ARNm se expresaron en referencia a la expresión del gen constitutivo 36B4 y fueron calculados por el método comparativo de ciclos umbral ($\Delta\Delta Ct$) (Kurrasch et al., 2004).

10. Análisis genético-poblacional

10.1. Muestras biológicas

Se muestrearon 90 individuos habitantes de la ciudad de Corrientes (Provincia de Corrientes, Argentina). Del total de muestras, 60 fueron de sangre periférica (3 ml

de sangre + 300 µl de anticoagulante glucosa-citrato) obtenidas gracias a la colaboración del Dr. Héctor Enrique Vila, Jefe de hemoterapia del Instituto de Cardiología de Corrientes “Juana Francisca Cabral”, mientras que las 30 restantes fueron obtenidas por hisopados bucales. En todos los casos los donantes voluntarios leyeron una “carta de información para los participantes” (ver Anexo) y cedieron las muestras bajo Consentimiento Informado (ver Anexo), el cual se encuentra aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas del IMBICE.

10.2. Extracción de ADN

10.2.1. Extracción de ADN de sangre periférica

Se realizó la técnica de extracción de ADN con fenol-cloroformo descrita en Sambrook et al. (1989). Se agregó a la sangre 12 ml de buffer A (ver Anexo), se mezcló por inversión 10 veces, y se incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó 30 minutos a 4000 r.p.m. a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Se agregaron de a 2 ml, 8 ml de buffer A al precipitado, vorteoando entre medio, se centrifugó 30 minutos a 4000 r.p.m. a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado con 3 ml de buffer B (ver Anexo), se vorteoó y se agregó 150 µl de SDS (del inglés *sodium dodecyl sulfate*) al 20 % y 100 µg / ml de proteinasa K (Fermentas, cat#E00492, Massachusetts, Estados Unidos), y se incubó durante toda la noche a 56 °C. Luego se agregaron 3 ml de fenol saturado (Sigma Aldrich, cat# P4557-100ML) se mezcló por inversión 10 veces, se centrifugó 10 minutos a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente, y se recuperó la fase acuosa (sobrenadante). Se agregó 1,5 ml de fenol (saturado con buffer TRIS, pH 8) y 1,5 ml de cloroformo, se mezcló por inversión 10 veces, se centrifugó 10 minutos a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente, y se recuperó la fase acuosa (sobrenadante). Se agregaron 3 ml de cloroformo, se mezcló por inversión 10 veces, se centrifugó 10 minutos a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente, y se recuperó la fase acuosa (sobrenadante). Se agregaron 300 µl de solución 0,3 M de acetato de sodio y 6 ml de etanol 100 %. Se procedió a enroscar el ADN precipitado con una pipeta Pasteur estéril, se lo lavó con una solución de etanol 70 %, y se desenroscó en 200 µl de TE (ver Anexo). Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su uso.

10.2.2. Extracción de ADN a partir de hisopado bucal

Se utilizó la resina Chelex 100® (Walsh et al., 1991) (Bio-Rad Inc., California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La técnica consistió en resuspender el hisopo en 1 ml de PBS (ver Anexo), agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se retiró el hisopo, se centrifugó la suspensión 30

minutos a 10000 r.p.m., y se eliminó el sobrenadante; se agregaron al precipitado 200 µl de la resina Chelex al 5 %, y se incubó 1 hora a 56 °C y luego 8 minutos a 98 °C. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su uso.

10.3. Genotipificación

Para la identificación del polimorfismo N40D del gen OPRM1 y de la mutación A204E del gen GHSR se amplificaron secuencias específicas de ADN utilizando la técnica PCR y se tipificaron siguiendo distintas estrategias que se detallan a continuación.

10.3.1. Polimorfismo N40D del gen OPRM1

Se eligió la técnica PCR-RFLP (del inglés *restriction fragment length polymorphism*) para su genotipificación, dado que el polimorfismo N40D genera en la secuencia de OPRM1 un sitio de restricción que es reconocido por una endonucleasa específica y se producen, de este modo, fragmentos de ADN de distinta longitud. En primer lugar, se amplificó una secuencia de 154 pb (pares de bases) del gen OPRM1 que contiene el locus del polimorfismo N40D utilizando los cebadores específicos descritos en (Gelernter et al., 1999). Las condiciones de ciclado fueron levemente modificadas (ver Anexo). Posteriormente, se digirió el producto de PCR con la enzima de restricción MboI (Fermentas, cat#ER0811, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para separar los fragmentos de ADN previamente amplificados y digeridos se utilizó la técnica electroforesis en geles de agarosa (Promega Corp. Cat# V3125, Wisconsin, Estados Unidos) al 4 %, con 0,2 µl / ml de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., cat#41003, California, Estados Unidos) en solución TAE 1X (ver Anexo). Para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos, en el mismo gel sembramos el marcador de peso molecular Cien-Marker (Biodynamics, cat#B040-50, California, Estados Unidos). De esta manera se asignaron los genotipos por muestra de acuerdo al patrón de digestión específico obtenido: N/N: una banda de 154 pb; N/D: tres bandas, una de 154 pb, otra de 129, y la última que no se detectaba en el gel de 25 pb; y D/D: dos bandas, una de 129 y la de 25 pb.

10.3.2. Mutación A204E del gen GHSR

Para la mutación A204E se utilizó la técnica de PCR alelo-específica. Se diseñó un trio de cebadores alelo-específicos con el programa Primer 3 V4.0.0 (Untergasser et al., 2012). El trio de cebadores consistió en dos cebadores *forwards*, uno que hibrida con la secuencia *wild type* y otro con la secuencia mutada, y un

cebador *reverse*. Adicionalmente, a los cebadores *forwards* se les introdujo un *mismatch* con el fin de aumentar su temperatura de *melting* (ver Anexo). Se realizaron PCRs con gradientes de temperatura de *annealing* con muestras de ADN control, para determinar la temperatura óptima a la que cada cebador hibrida específicamente y permite una amplificación de la secuencia deseada. Posteriormente, para cada muestra de ADN a genotipificar se realizaron dos PCRs, una con el cebador *forward* para la secuencia salvaje y el cebador *reverse*, y otra con el cebador *forward* para la secuencia mutante y el cebador *reverse*.

Se utilizó la técnica electroforesis, y se sembraron los pares de producto de PCR junto con el marcador de peso molecular en geles de agarosa al 2 %, con 0,2 µl / ml de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain en solución TAE 1X (ver Anexo). De este modo se genotipificó la mutación A204E en cada muestra por ausencia / presencia de banda de 213 pb en cada par de productos de PCR.

10.4. Secuenciación de fragmentos

Se amplificaron 10 fragmentos de ADN conteniendo el locus del polimorfismo N40D y 10 con el locus de la mutación A204E mediante PCR (descrita previamente para cada caso), y fueron secuenciados como control de calidad para confirmar la identidad de la secuencia amplificada y la precisión de los resultados obtenidos por PCR-RFLP y po PCR alelo-específica. Se utilizaron los servicios de la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea).

10.5. Muestras poblacionales incluidas en el análisis genético-poblacional

Se incluyeron 9 poblaciones de la base de datos genéticos HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>): población de residentes Utah con ascendencia europea norte y este de la colección CEPH (del francés *Centre d'Étude du Polymorphisme Human*) (RUE), población china Han en Beijín (CHB), población china en Denver Metropolitano, Colorado (CHD), población india Gujarati en Houston, Texas (IGH), población japonesa en Tokio, Japón (JPT), población de ascendencia mexicana en Los Ángeles, California (MEX), población Maasai en Kinyawa, Kenia (MKK), población toscana en Italia (TSI) y población de ascendencia africana del sureste de los Estados Unidos (ASE). Las poblaciones de Luhya en Webuye, Kenia y Yoruba en Ibadán, Nigeria no fueron incluidas debido a que los SNPs no alcanzaban a estar genotipificados en el 50 % de la muestra poblacional.

11. Estadística

Analizamos y graficamos los datos utilizando los programas OriginPro 8 (OriginLab Corp., Massachusetts, Estados Unidos) y GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos). En todos los casos examinamos la distribución normal por el test de Kolmogorov-Smirnov. Dependiendo de los parámetros y los grupos experimentales a comparar utilizamos las siguientes pruebas estadísticas: test t de Student de una muestra, de dos muestras apareadas, de dos muestras independientes y ANOVA con el post-test de Dunnett o el post-test de Tukey. La significancia estadística fue considerada con un $p < 0,05$. Los datos se expresaron como el promedio \pm el error estándar con el número de observaciones entre paréntesis.

Se ajustó la ecuación de Hill a las curvas de concentración-respuesta de ghrelina y DAMGO y comparamos los parámetros obtenidos con una significancia estadística con un $p < 0,05$ con el test F de Fisher (GraphPad Prism 5).

Para el análisis genético-poblacional se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas por conteo directo. Se estimó el Equilibrio de Hardy Weinberg utilizando el programa Arlequín v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), y mediante un test exacto con una significancia estadística correspondiente a un $p < 0,05$ se determinó si las frecuencias observadas se desviaban de las esperadas. Utilizando el mismo programa se calcularon las distancias genéticas entre pares de poblaciones por el índice F_{st} y se analizaron diferentes estructuras genéticas entre las poblaciones estudiadas por AMOVA (del inglés, *analysis of molecular variance*). En ambos casos se estimó su significancia estadística por 1023 permutaciones con un $p < 0,05$.

Capítulo I



Cap I: Resultados



Registros control de las corrientes de Ca^{2+} por patch-clamp: diferencias entre las isoformas de *splicing* $\text{Ca}_v2.2e37b$ y $\text{Ca}_v2.2e37a$

Dado que los Ca_v son canales activados por voltaje, y su apertura genera el flujo de Ca^{2+} al interior celular, para evaluar su actividad utilizamos la técnica patch-clamp que permite la fijación de voltaje en una célula y el registro simultáneo de la corriente eléctrica que pasa a través de su membrana en tiempo real. Particularmente en neurociencias, conocer el funcionamiento de los canales iónicos de las células excitables ha sido uno de los mayores desafíos. El desarrollo de la técnica patch-clamp, por Neher y Sakmann a fines de los años 70, ha permitido el registro de corrientes iónicas a través de la membrana de una célula con alta resolución. Sin embargo, dada su complejidad técnica, la extensiva formación y buenas habilidades requeridas por el experimentador, junto con la necesidad de un equipamiento muy sensible y costoso, han convertido al patch-clamp en una de las técnicas con mayores exigencias en los laboratorios actuales.

La técnica de patch-clamp permite el estudio de la actividad de los canales iónicos en muchos tipos celulares. Los Ca_v dejan pasar en promedio 10^6 Ca^{2+} por segundo, generando corrientes de solo unos pocos pico amperes (pA) (Sather y McCleskey, 2003; Tang et al., 2014). El registro de una corriente de esta magnitud demanda una alta resolución del equipamiento utilizado. Para ello se requiere lograr un sello de alta resistencia del orden de los gigaohms (G Ω) entre el extremo romo de una pipeta de vidrio y la membrana plasmática de la célula, y posteriormente generar una comunicación entre el citoplasma y la solución interna de la pipeta. Esta configuración de “célula entera” crea un circuito eléctrico entre dos electrodos de Ag / AgCl conectados a un micro-amplificador que censa la diferencia de potencial entre ambos: uno de referencia en el líquido que baña las células y otro dentro de la pipeta. En esta configuración se interpone la membrana plasmática entre ambos electrodos por lo que la corriente que fluye entre ambos debe necesariamente atravesar la membrana plasmática.

En cada momento que el potencial de membrana (V_m) es censado por el sistema y comparado con el potencial comando, una corriente de compensación que se asemeja a la corriente que fluye a través de la membrana es generada por el micro-amplificador como un mecanismo de retroalimentación negativa. De esta manera, el V_m puede ser manipulado (modo fijación de voltaje) y esto permite el estudio de la actividad de aquellos canales dependientes del voltaje que se abren ante despolarizaciones, como los Ca_v , y las relaciones corriente-voltaje de los mismos. La aplicación de protocolos de voltaje con pulsos despolarizantes, en los que los Ca_v

están abiertos, desde un potencial de mantenimiento hiperpolarizado, en los que los Ca_v están cerrados, permite de manera eficiente estudiar el funcionamiento en concierto de estas proteínas y de sus corrientes macroscópicas en tiempo real.

En esta tesis, utilizamos un sistema heterólogo de expresión para estudiar el funcionamiento de Ca_v2 recombinantes y su modulación por dos GPCRs. Nuestro sistema consistió en la línea celular derivada de la línea HEK 293 (del inglés *Human Embryonic Kidney*), HEK 293T, como modelo de célula eucariota, transfectadas transitoriamente con plásmidos conteniendo secuencias de interés. Esta línea presenta varias ventajas: es una línea celular altamente transfectable y contiene el antígeno T del SV40 (del inglés *Simian Vacuolating virus 40*) lo que permite la replicación episomal de los plásmidos que contengan el origen de replicación del SV40. De este modo, el incremento en la amplificación de los plásmidos transfectados genera una mayor eficiencia en la expresión temporal de los productos de los genes de interés. Adicionalmente, tiene la ventaja de poseer una exhaustiva maquinaria intracelular que permite el estudio de las interacciones receptores-canales sin la necesidad de transfectar los componentes participantes de las vías de señalización (Thomas y Smart, 2005). Cabe destacar, además, que no expresan de forma endógena ningún subtipo de Ca_v ni los GPCRs bajo estudio (Raingo et al., 2007; Zamponi y Currie, 2013).

Mediante la técnica de liposomas catiónicos transfectamos transitoriamente células HEK 293T con plásmidos conteniendo la secuencia de los canales: $Ca_v2.2e37b$, el cual posee una amplia expresión en el sistema nervioso, o $Ca_v2.2e37a$, expresado específicamente en nociceptores, junto con sus subunidades auxiliares: $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en iguales proporciones molares (1:1:1). Realizamos registros de patch-clamp en configuración célula entera con fijación de voltaje, y medimos las corrientes de Ca^{2+} utilizando en la solución externa 2 mM de Ca^{2+} como ion de carga.

Con el fin de recapitular las diferencias observadas anteriormente entre las corrientes de Ca^{2+} producidas por $Ca_v2.2e37b$ y $Ca_v2.2e37a$ realizamos curvas de relación entre el voltaje aplicado y la corriente registrada (curvas IV), evocando las corrientes de Ca^{2+} con la aplicación de pulsos cuadrados de voltaje de 50 ms de duración desde -60 a +80 mV, cada 10 s, con un potencial de mantenimiento de -100 mV (protocolo de IV, figura 1.A). Para independizar nuestros datos del tamaño de las células realizamos una normalización de los mismos expresando los valores como densidad de corriente. Para esto dividimos los valores de corriente por la capacitancia de cada célula, medida con el micro-amplificador durante el experimento en pico faradios (pF). Encontramos que los niveles de densidad de corriente en las células que

expresaban Ca_v2.2e37a fueron ~1.6 veces mayores que aquellas que expresaban Ca_v2.2e37b al potencial de máxima corriente (+5 mV, figura 1). Nuestros datos son consistentes con estudios previos, confirmando así que la inclusión del exón 37a en el canal Ca_v2.2 genera niveles de corriente significativamente mayores que la inclusión del exón 37b.

Para determinar y comparar la dependencia del voltaje de la activación de ambas variantes de *splicing* de Ca_v2.2, se utilizó la función Boltzmann sumada a la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Castiglioni et al., 2006). A partir de ella se pueden obtener los parámetros: $V_{1/2}$, que corresponde al potencial al cual se alcanza el 50 % de la activación de los canales, y k , que es la pendiente de la curva de activación. Adicionalmente, permite obtener el potencial de reversión (V_{rev}), que es el potencial de membrana al cual no hay corriente neta aún con los canales abiertos. Luego del ajuste realizado a las curvas IV de ambas isoformas de Ca_v2.2, encontramos que el $V_{1/2}$ de las corrientes Ca_v2.2e37a fue significativamente menor que el de las corrientes Ca_v2.2e37b, mientras que sus k fueron similares (figura 1.B). Adicionalmente observamos que el V_{rev} fue igual para ambas variantes (figura 1.B). De esta manera, corroboramos también que la inclusión del exón 37a genera un desplazamiento de la dependencia del voltaje de la activación de Ca_v2.2 hacia potenciales más hiperpolarizados en comparación con la isoforma Ca_v2.2e37b.

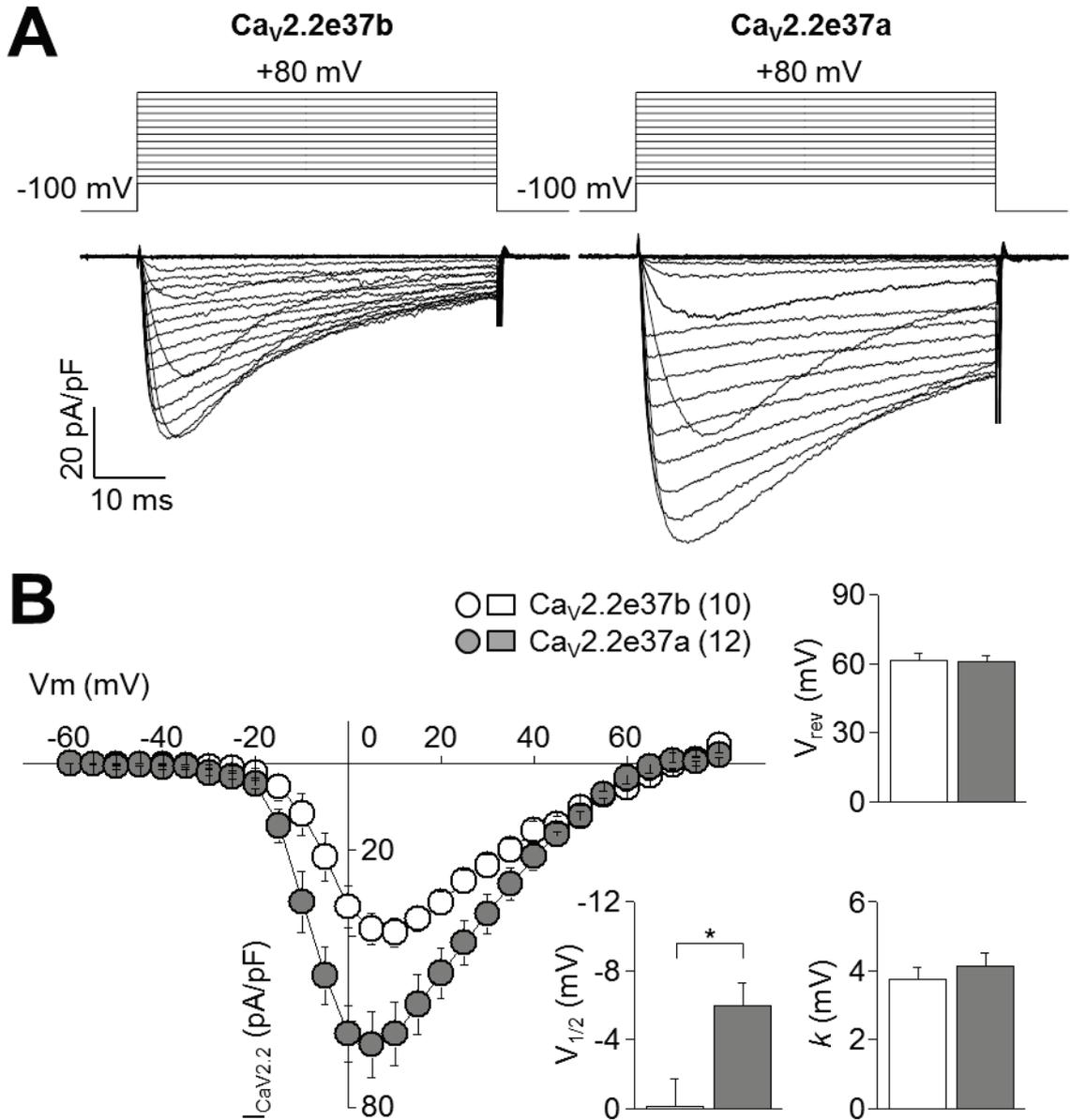


Figura 1. Las corrientes de Ca²⁺ de la isoforma Ca_v2.2e37a, específica de las vías del dolor, son mayores que las de la isoforma Ca_v2.2e37b, de expresión ubicua. **(A)** Trazos representativos de corrientes Ca²⁺ evocadas con pulsos de 50 ms de duración desde -60 a +80 mV (con 5 mV de diferencia entre cada uno) aplicados en intervalos de 10 s, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV (protocolo IV, trazos de potencial arriba de los registros de las corrientes) en células expresando Ca_v2.2e37b (izquierda) o Ca_v2.2e37a (derecha), y Ca_vβ₃ y Ca_vα₂δ₁. **(B)** Curvas IV (izquierda) para Ca_v2.2e37b (círculos blancos) y Ca_v2.2e37a (círculos grises), y valores promedio de V_{1/2}, V_{rev} y K (derecha) obtenidos del ajuste de la ecuación Boltzman-Goldman-Hodgkin-Katz para las curvas IV individuales de Ca_v2.2e37b (barras blancas) y Ca_v2.2e37a (barras grises). El n se indica entre paréntesis. Test t de Student, * p < 0,05.

Impacto del polimorfismo N40D de MOR sobre la modulación de los $Ca_v2.2$ específicos de las vías de dolor

Para evaluar el impacto del polimorfismo N40D sobre la actividad inhibitoria de MOR sobre los $Ca_v2.2$ específicos de las vías de dolor, $Ca_v2.2e37a$, transfectamos células HEK 293T con MOR-N, MOR-D o el vector pcDNA3.1+ vacío (como control negativo) y $Ca_v2.2e37a$ junto con sus subunidades auxiliares $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en proporciones equimolares. Dado que ambas isoformas presentaron su pico máximo de corriente muy cercano a +10 mV (figura 1.B), utilizamos pulsos cuadrados despolarizantes a +10 mV en los protocolos de voltaje para evaluar de manera más efectiva la actividad de los $Ca_v2.2$ y su modulación por MOR. En primer lugar para determinar si la co-expresión de las variantes de MOR tenía un efecto constitutivo sobre las corrientes de Ca^{2+} , comparamos los picos de densidad de corriente $Ca_v2.2e37a$, evocándolas en células control y en células que expresaban MOR-N o MOR-D. En estos experimentos, no encontramos diferencias significativas entre los niveles de corriente $Ca_v2.2e37a$ entre las tres condiciones (figura 2). Estos resultados demuestran que la expresión de ambas variantes de MOR no ejercen un efecto constitutivo sobre las corrientes de Ca^{2+} $Ca_v2.2e37a$.

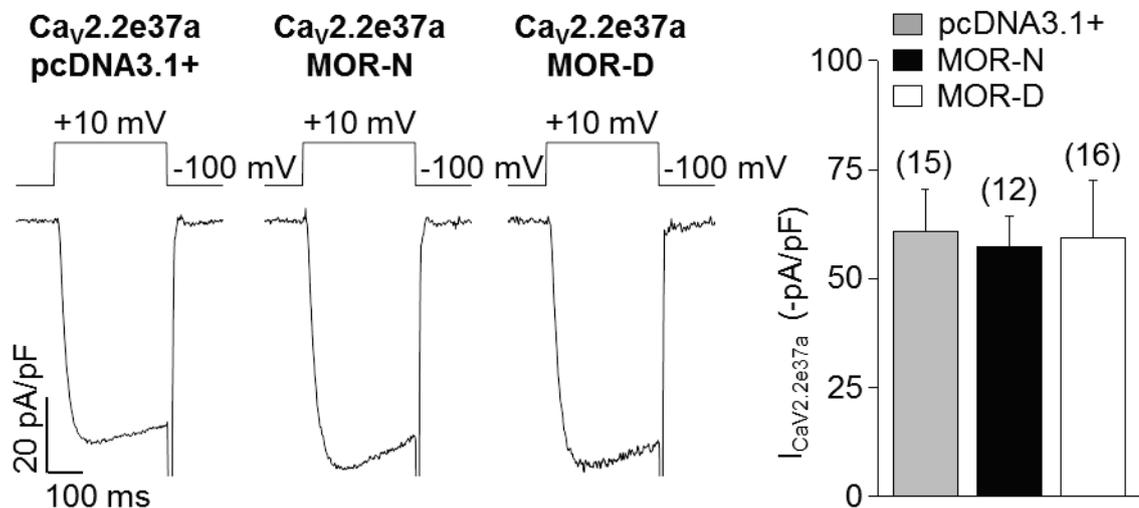


Figura 2. La expresión de los subtipos de MOR, MOR-N y MOR-D, no modifica los niveles de corriente basal $Ca_v2.2e37a$. Trazos de corrientes $Ca_v2.2e37a$ de células co-transfectadas con $Ca_v2.2e37a$, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta$ y pcDNA3.1+ (condición control, izquierda), MOR-N (medio) o MOR-D (derecha); y valores promedio de la densidad de corriente $Ca_v2.2e37a$ en las mismas condiciones.

Una vez obtenida nuestra condición experimental y habiendo realizado los controles que detallamos previamente, evaluamos si los subtipos de MOR generados por el polimorfismo N40D tenían un impacto sobre la inhibición de las corrientes de la isoforma $Ca_v2.2e37a$. El agonista específico de MOR que elegimos para nuestros ensayos fue el péptido sintético [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina (DAMGO) (Onogi et al., 1995), uno de los más utilizados para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ en estudios previos (Beedle et al., 2004; Margas et al., 2007; Raingo et al., 2007; Ramchandani et al., 2011). En primer lugar determinamos si la aplicación aguda de DAMGO producía un efecto sobre las corrientes de Ca^{2+} en forma independiente de su acción sobre MOR. Aplicamos DAMGO a células transfectadas únicamente con $Ca_v2.2e37a$ y sus subunidades auxiliares, y corroboramos que las corrientes de Ca^{2+} se mantenían inalteradas ($1,46 \pm 2,37$ % de variación de la corriente $Ca_v2.2e37a$, $n = 5$; test t, no significativamente distinto de 0, $p > 0,05$). Una vez confirmado esto, co-expresamos $Ca_v2.2e37a$, sus subunidades auxiliares y MOR-N o MOR-D y evaluamos la inhibición de las corrientes para ambas condiciones provocada por concentraciones crecientes de DAMGO. Con estos datos generamos curvas de inhibición-concentración de DAMGO (figura 3) y observamos que concentraciones de DAMGO por encima de 10^{-2} M fueron efectivas para inhibir las corrientes $Ca_v2.2e37a$ de manera rápida y reversible en células expresando ambas variantes de MOR. A concentraciones saturantes del agonista (> 100 nM), el efecto inhibitorio sobre las corrientes $Ca_v2.2e37a$ fue similar en ambas condiciones, alcanzando aproximadamente un 60 % de inhibición de las corrientes. Sin embargo, a concentraciones no saturantes (< 100 nM), la inhibición producida por DAMGO fue mayor en células expresando MOR-D que MOR-N (figura 3.A).

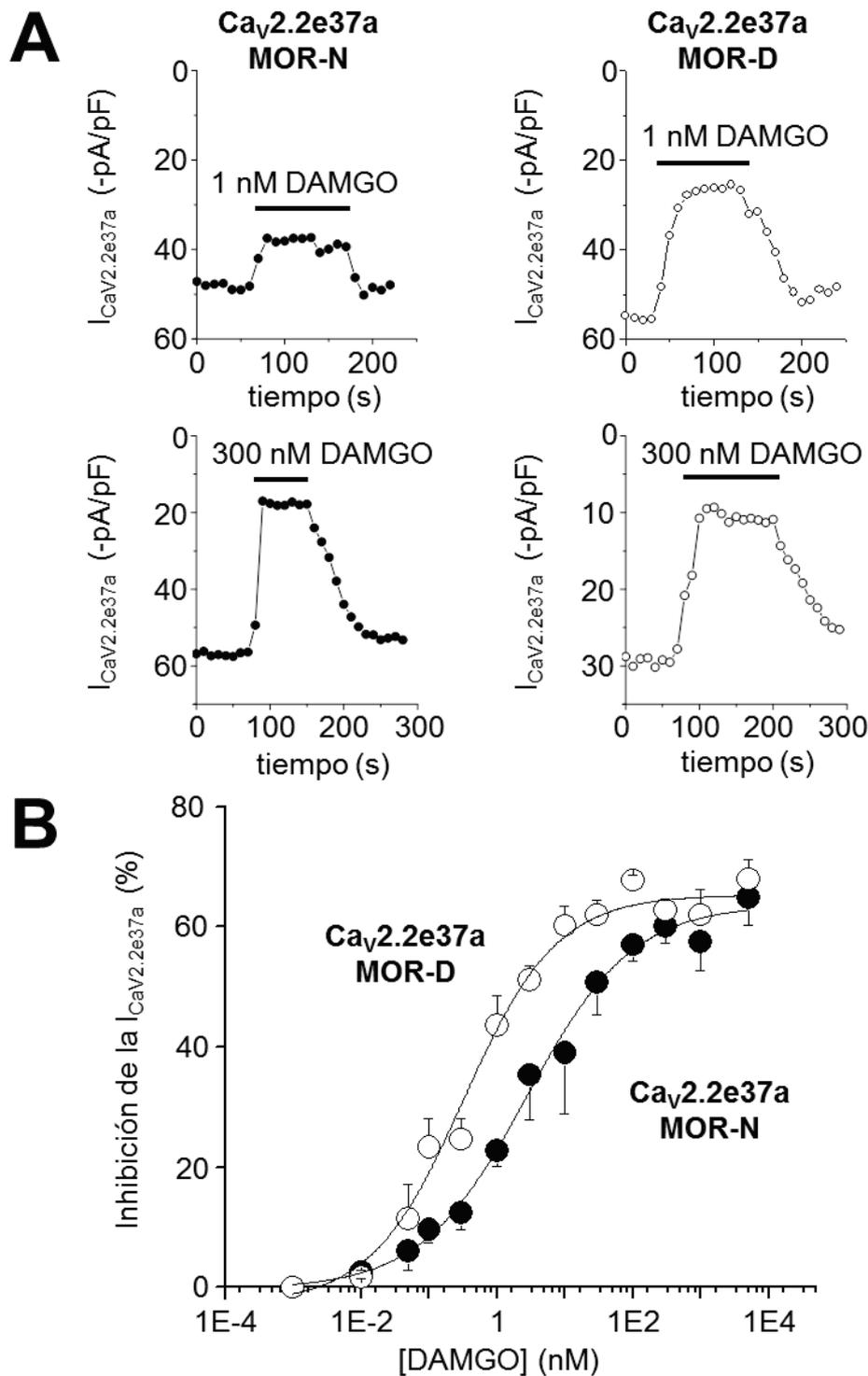


Figura 3. MOR-D inhibe con mayor potencia las corrientes Ca_v2.2e37a que MOR-N. **(A)** Curso temporal de la inhibición de corrientes Ca_v2.2e37a por la aplicación de 1 (arriba) o 300 nM (abajo) de DAMGO en células expresando Ca_v2.2e37a y MOR-N (izquierda) o MOR-D (derecha). **(B)** Curvas concentración de DAMGO - inhibición de las corrientes Ca_v2.2e37a en células expresando Ca_v2.2e37a y MOR-N (círculos negros; n = 77 células) o MOR-D (círculos blancos; n = 73 células). Las líneas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos (Ca_v2.2e37a + MOR-N, r² = 0,87; y Ca_v2.2e37a + MOR-D, r² = 0,85).

Para analizar estadísticamente este efecto, utilizamos la ecuación de Hill como modelo cinético de ajuste de las respuestas observadas. Esta ecuación describe con un comportamiento no-lineal y saturable la relación entre las variables “concentración” y “respuesta” ajustándose de manera flexible y efectiva a los datos experimentales (Goutelle et al., 2008). De la misma se extraen tres parámetros fundamentales: (1) EC_{50} , o concentración efectiva media, concentración a la cual el agonista induce un 50 % de la respuesta total provocada por el mismo; (2) E_{max} , respuesta máxima inducida por el agonista, y; (3) coeficientes de Hill, que dan idea de cuán sigmoidea es la curva, y en algunos casos representa el número de sitios de unión del agonista al receptor (Weiss, 1997). Así, ajustamos la ecuación a la relación concentración de DAMGO-inhibición de las corrientes $Ca_v2.2e37a$ mediadas por ambos subtipos de MOR, y estimamos sus parámetros. Encontramos que los EC_{50} s para el efecto de DAMGO en células expresando MOR-N y MOR-D fueron significativamente distintos ($2,72 \pm 1,04$ y $0,32 \pm 0,12$ nM, respectivamente; test de Fisher, $p < 0,001$) mientras que la inhibición máxima ($63,7 \pm 4,0$ % para MOR-N y $65,3 \pm 2,3$ % para MOR-D) y los coeficientes de Hill ($0,56 \pm 0,12$ para MOR-N y $0,63 \pm 0,12$ para MOR-D) fueron similares (figura 3.B). De acuerdo con los resultados obtenidos, tras su activación con DAMGO, MOR-D posee una potencia 8,5 veces mayor que MOR-N en inhibir las corrientes $Ca_v2.2e37a$, alcanzando en ambos casos una eficacia similar.

Los GPCRs utilizan dos vías funcional- y molecularmente distintas para inhibir a los canales Ca_v2 : una dependiente y otra independiente del voltaje (Zamponi y Currie, 2013). En los nociceptores, la inclusión preferencial de uno de los exones mutuamente excluyentes, 37a o 37b, en la subunidad $\alpha1$ de los $Ca_v2.2$ por mecanismos de *splicing*, controla la vía principal de inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ mediada por la activación de MOR (Raingo et al., 2007; Andrade et al., 2010). La inclusión del exón 37b provoca una inhibición completamente dependiente del voltaje, mientras que la inclusión del exón 37a en el canal, provoca la adición de una inhibición independiente del voltaje. Dado que encontramos que la activación de MOR-D es más potente en inhibir las corrientes $Ca_v2.2e37a$ que MOR-N, decidimos evaluar si esta diferencia podría estar mediada por un incremento en alguna de las vías intracelulares activadas por MOR. Para ello, utilizamos protocolos de voltaje con pre-pulsos altamente despolarizantes, los cuales remueven completamente la inhibición dependiente del voltaje (Ikeda, 1991), permitiendo identificar una inhibición remanente correspondiente a la vía independiente del voltaje. En primer lugar, controlamos que el protocolo de pre-pulso diseñado no produjera facilitación de las corrientes de Ca^{2+} en células expresando la isoforma $Ca_v2.2e37a$ junto con sus subunidades auxiliares. Realizamos protocolos IV sin y con pre-pulsos a + 80 mV de 15 ms de duración y 12,5

ms antes de la aplicación del pulso, y encontramos que ni los máximos de las corrientes $Ca_v2.2e37a$ a todos los potenciales ni los parámetros de las curvas IV se vieron afectados por la aplicación del pre-pulso (figura 4.A). Adicionalmente, evaluamos el efecto de la expresión de MOR-D y MOR-N en la aplicación del pre-pulso, y las corrientes $Ca_v2.2e37a$ tampoco se vieron alteradas expresando ninguna de las variantes de MOR (figura 4.B).

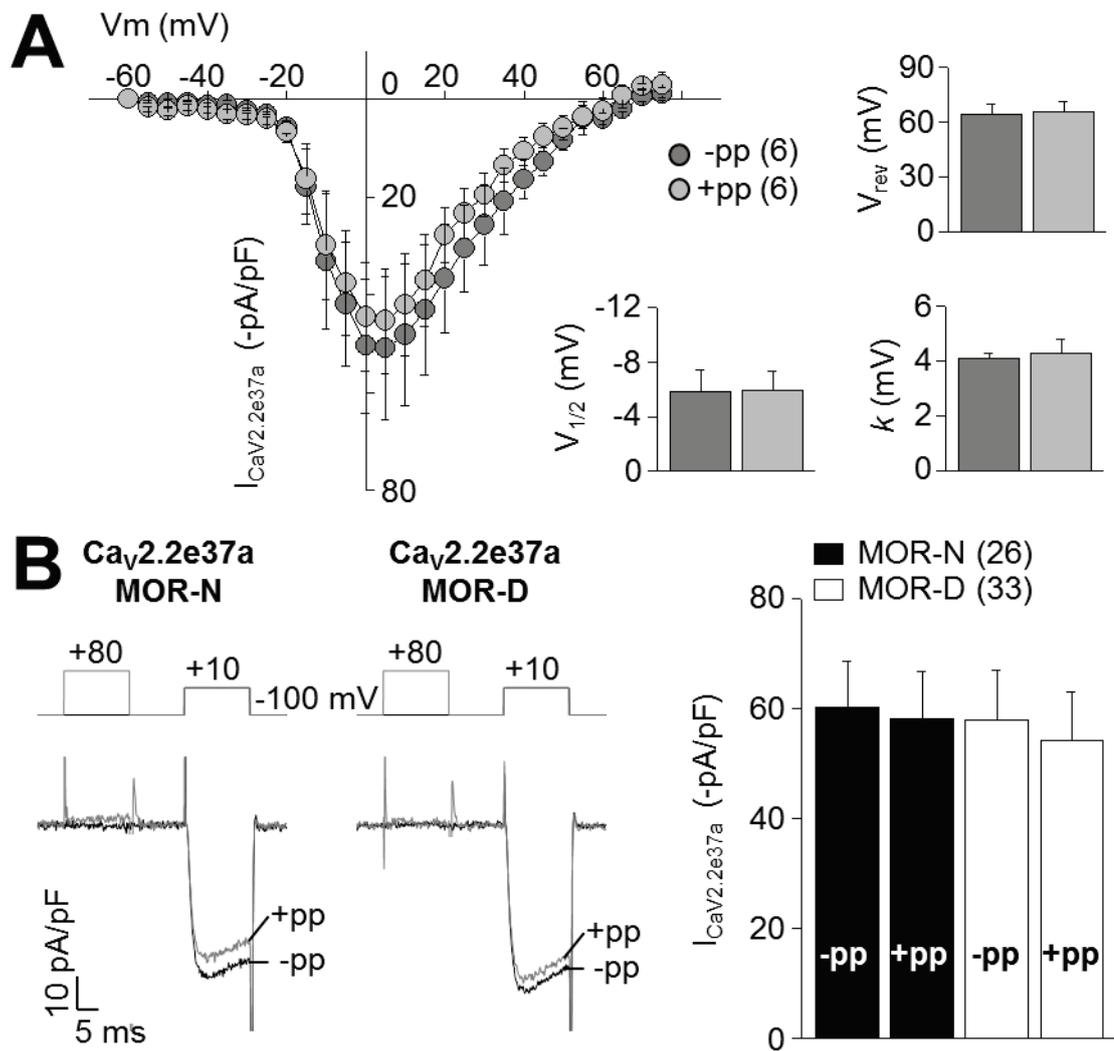


Figura 4. La aplicación de un pre-pulso despolarizante no altera la densidad de corriente basal $Ca_v2.2e37a$ expresado solo, con MOR-N o MOR-D. **(A)** Curvas IV (izquierda) para $Ca_v2.2e37a$ sin (círculos grises oscuro, -pp) y con (círculos grises claro, +pp) la aplicación del pre-pulso despolarizante a +80 mV; y valores promedio de $V_{1/2}$, V_{rev} y K (derecha) obtenidos del ajuste de la ecuación Boltzman-Goldman-Hodgkin-Katz para las curvas IV individuales sin (barras grises oscuro) y con (barras grises claro) la aplicación del pre-pulso. **(B)** Trazos representativos de corrientes $Ca_v2.2e37a$ evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración cada 10 s, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, sin (trazos negros, -pp) y con (trazos grises, +pp) la aplicación del pre-pulso despolarizante a +80 mV de 15 ms de duración, 12.5 ms antes del pulso, en células expresando $Ca_v2.2e37a$, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y MOR-N (izquierda) o MOR-D (derecha). Valores promedio de la densidad de corriente $Ca_v2.2e37a$ sin y con la aplicación del pre-pulso a +80 mV. El n se indica entre paréntesis.

Posteriormente, medimos la contribución de la inhibición dependiente e independiente del voltaje de las corrientes $Ca_v2.2e37a$ mediadas por DAMGO en células expresando MOR-D y MOR-N, y encontramos que, en ambos casos y para todas las concentraciones de DAMGO evaluadas, aproximadamente un 65 % de la acción inhibitoria de DAMGO sobre las corrientes $Ca_v2.2e37a$ fue mediada por una vía independiente del voltaje, la cual resiste a los pre-pulsos despolarizantes (figura 5). Para poder concluir que, efectivamente, la contribución de la inhibición independiente del voltaje no explica las diferencias entre los EC_{50} s de ambas variantes de MOR, realizamos un tratamiento estadístico de estos datos estimando la relación entre las variables dependiente “% de inhibición independiente del voltaje” e independiente “concentración de DAMGO” expresando la primera en términos de una función lineal de la segunda. Analizamos y comparamos la proporción de la inhibición independiente del voltaje en función de las distintas concentraciones de DAMGO, y encontramos que las líneas de regresión para ambos conjuntos de datos tienen pendientes no diferentes de cero ($Ca_v2.2e37a$ y MOR-N = $0,00002 \pm 0,00188$; $Ca_v2.2e37a$ y MOR-D = $0,0001 \pm 0,0016$; test de Fisher, $p > 0,05$) y que las ordenadas al origen de ambas rectas no son significativamente distintas entre sí ($Ca_v2.2e37a$ y MOR-N = $66,61 \pm 2,06$ %; $Ca_v2.2e37a$ y MOR-D = $67,19 \pm 1,76$ %; test de Fisher, $p = 0,8661$). Estos resultados demuestran que las fracciones de inhibición independiente y dependiente del voltaje son constantes a todas las concentraciones de DAMGO para ambas variantes de MOR (figura 5). De esta manera, las diferencias en la potencia de inhibición de las corrientes $Ca_v2.2e37a$ de MOR-D y MOR-N no estarían mediadas por cambios en la activación de las vías intracelulares que participan en ambos tipos de inhibición.

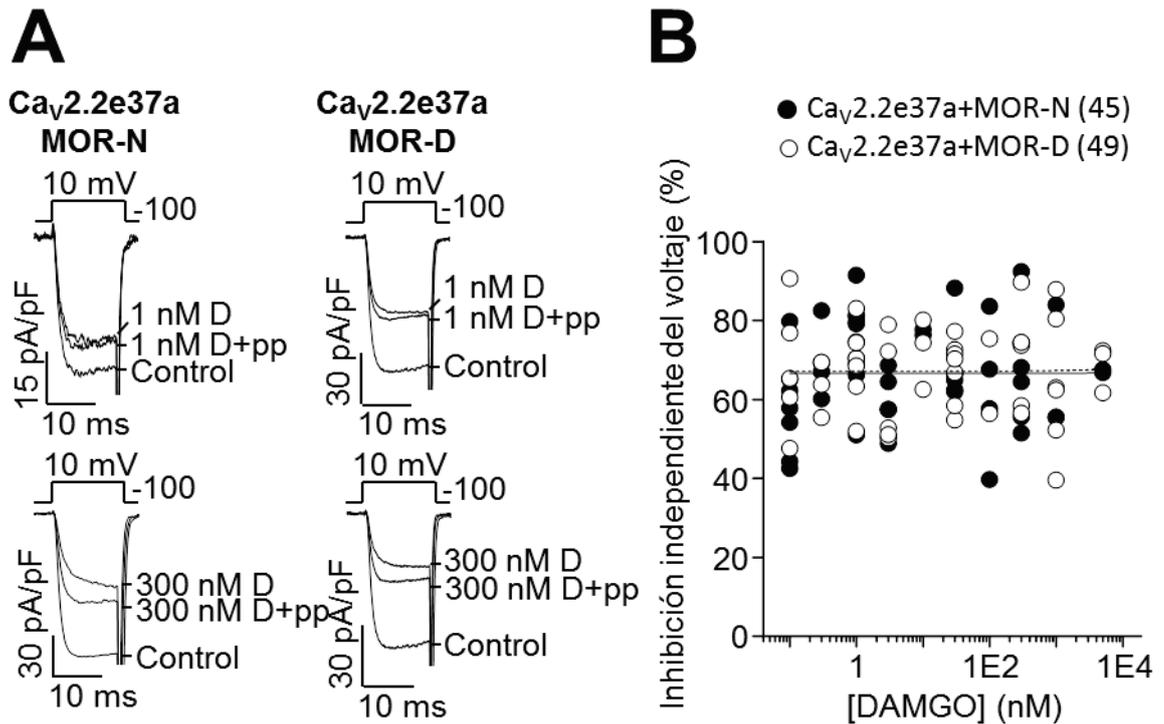


Figura 5. La proporción de inhibición independiente del voltaje de Ca_v2.2e37a por MOR-N y MOR-D es constante a todas las concentraciones de DAMGO. **(A)** Trazos representativos de corrientes de Ca_v2.2e37a evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV antes (control) y después de la aplicación de DAMGO 1 (arriba) o 300 nM (abajo), con (D +pp) o sin (D) la aplicación del pre-pulso a +80 mV en células expresando Ca_v2.2e37a, Ca_vβ₃, Ca_vα₂δ₁ y MOR-N (izquierda) o MOR-D (derecha). **(B)** Grafico de % de inhibición independiente del voltaje de Ca_v2.2e37a versus concentración de DAMGO en células expresando MOR-N (círculos negros) o MOR-D (círculos blancos). Las líneas representan las rectas del ajuste de regresión lineal a los datos (continua para Ca_v2.2e37a + MOR-N y punteada para Ca_v2.2e37a + MOR-D).

Dado que los nociceptores también expresan la isoforma de *splicing* Ca_v2.2e37b de expresión ubicua, analizamos cómo el polimorfismo N40D de MOR impacta sobre sus acciones inhibitorias sobre las corrientes Ca_v2.2e37b, y las comparamos con sus acciones inhibitorias sobre las corrientes Ca_v2.2e37a. Encontramos que ambas formas de *splicing* de Ca_v2.2 son igualmente inhibidas por concentraciones saturantes como no saturantes de DAMGO. Sin embargo, la aplicación de DAMGO fue más efectiva en inhibir las corrientes Ca_v2.2e37b en células que expresaban MOR-D en comparación con las que expresaban MOR-N a concentraciones no saturantes, como observamos anteriormente para Ca_v2.2e37a (figura 6).

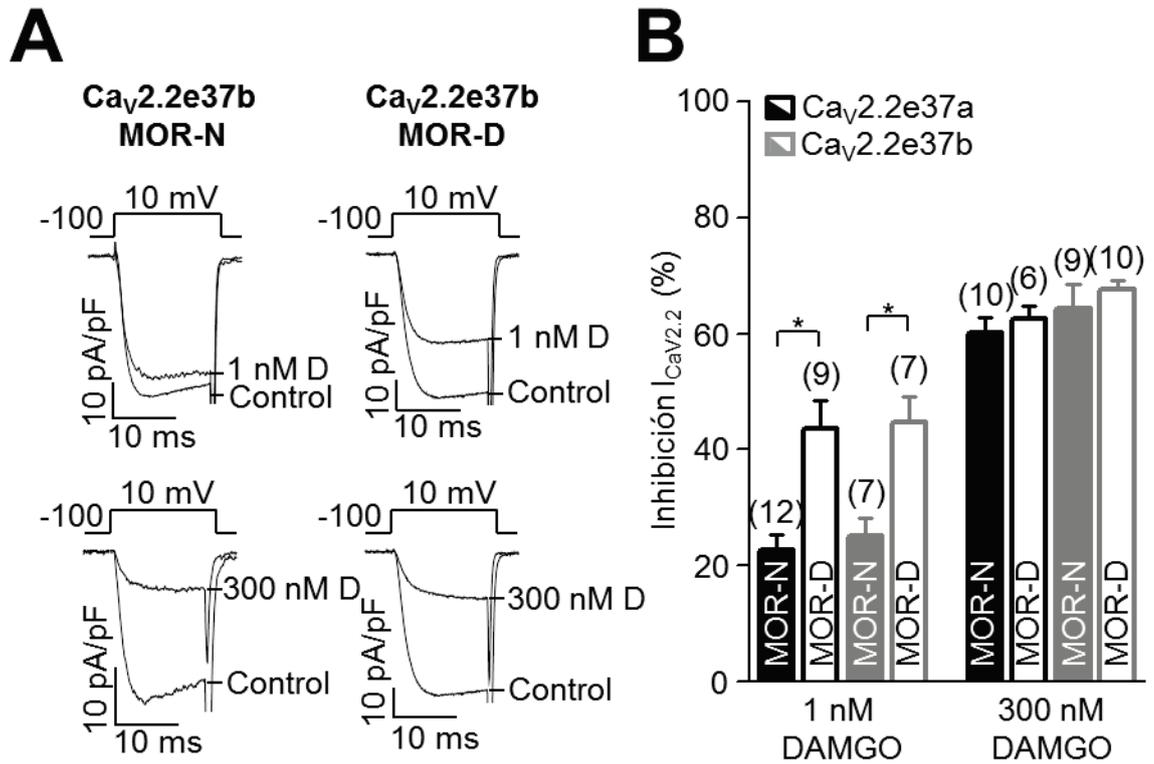


Figura 6. MOR-D inhibe con mayor potencia las corrientes Ca_v2.2 que MOR-N independientemente de la isoforma de *splicing* de Ca_v2.2, 37a/37b. **(A)** Trazos representativos de corrientes Ca_v2.2e37b evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV antes (control) y después de la aplicación de DAMGO (D) 1 (arriba) o 300 nM (abajo) en células expresando Ca_v2.2e37b, Ca_vβ₃, Ca_vα₂δ₁ y MOR-N (izquierda) o MOR-D (derecha). **(B)** Valores promedio de los % de inhibición de las corrientes Ca_v2.2 por la activación de MOR con 1 (izquierda) o 300 nM (derecha) de DAMGO en células expresando Ca_v2.2e37b (barras grises) o Ca_v2.2e37a (barras negras), y Ca_vβ₃, Ca_vα₂δ₁ y MOR-N (barras llenas) o MOR-D (barras vacías). El n se detalla entre paréntesis. Test t de Student, * p < 0,05.

De esta manera nuestros resultados demuestran que N40D impacta en los efectos inhibitorios de MOR sobre los canales de Ca_v2.2e37a, específicos de las vías del dolor, así como también en la isoforma de expresión ubicua, Ca_v2.2e37b.

Distribución poblacional del polimorfismo N40D del MOR

Como mencionamos antes no existen datos sobre la distribución del polimorfismo N40D en poblaciones sudamericanas. Estas poblaciones se caracterizan por tener un componente genético variado incluyendo diversas ancestrías, algunas con altas y bajas frecuencias de N40D y otras, como las americanas nativas, de las

cuales se desconocen sus frecuencias. Por lo tanto, es imposible predecir cuál será la contribución de este polimorfismo clínicamente relevante en nuestra población. En esta tesis decidimos indagar la frecuencia poblacional genética de N40D en una población argentina, como un primer aporte al conocimiento de la variabilidad de N40D en Sudamérica. Para esto, elegimos realizar un muestreo en la población de la ciudad de Corrientes (CTES; provincia de Corrientes), dado que los estudios con marcadores neutros muestran similitudes con otras poblaciones urbanas argentinas (Glesmann et al., 2013). Además, contábamos con la documentación y procedimientos éticos aprobados para la toma de muestras biológicas humanas en instituciones de salud de dicha localidad, lo que permitió la realización de esta etapa en tiempo y forma.

Recolectamos 90 muestras biológicas de individuos no emparentados habitantes de CTES. Realizamos la extracción de ADN de las muestras y, mediante las técnicas de PCR-RFLP y electroforesis en geles de agarosa genotificamos el polimorfismo N40D. Para esto, luego de la amplificación por PCR del fragmento de interés, debido a que N40D genera un sitio de restricción para la enzima MboI, digerimos el amplificado, y sembramos el producto de digestión en un gel de agarosa. El patrón específico de bandas nos permitió asignar un genotipo (homocigota N/N, heterocigota N/D u homocigota D/D) a cada muestra (figura 7.A). Adicionalmente, enviamos a secuenciar 10 muestras al azar, para controlar que se amplificaba específicamente el fragmento de interés y que el genotificado por PCR-RFLP fuera correcto (figura 7.B).

Para llevar a cabo el análisis genético-poblacional, en primer lugar evaluamos si las frecuencias de N40D estaban distribuidas al azar dentro de la población analizada. Para ello, calculamos sus frecuencias alélicas y genotípicas, y utilizamos el modelo de Hardy-Weinberg para analizar su dinámica en la población bajo estudio. El alelo y el genotipo más frecuente fue N, y su combinación homocigota (figura 7.C), y las frecuencias genotípicas observadas no se desviaron significativamente de aquellas esperadas por el modelo de Hardy-Weinberg (heterocigosis observada = 0,31 y heterocigosis esperada = 0,30; test exacto, $p = 1,00$). De acuerdo a estos resultados, N40D presenta una distribución aleatoria en la población estudiada.

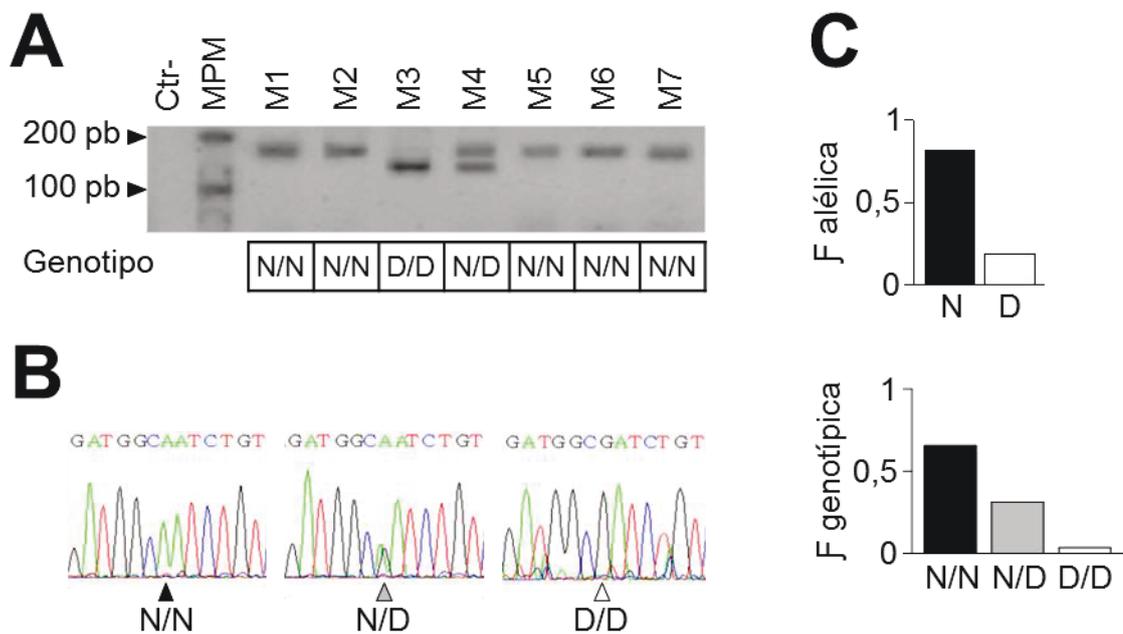


Figura 7. N40D de MOR constituye un locus polimórfico en la población de CTES. **(A)** Gel de agarosa al 4 % con los productos de PCR-RFLP de 7 muestras analizadas (M1 a M7) demostrando el patrón de bandas correspondientes a cada genotipo (N/N = una banda de 154 pb, N/D = una banda de 154 pb y otra de 129 pb, y D/D = una banda de 129 pb), el marcador de peso molecular de 100 pb (MPM) y el control negativo (Ctr-). En la tabla se detallan los genotipos correspondientes a cada muestra. **(B)** Electroferogramas de la secuenciación del producto de PCR de la región de ADN que contiene el locus N40D (flechas) mostrando los genotipos encontrados. **(C)** Frecuencias alélicas y genotípicas observadas en la muestra de CTES (n = 90 individuos).

En la población humana se encuentran diferencias genéticas tanto entre grupos poblacionales, como entre las poblaciones dentro de esos grupos (Sawyer et al., 2005; Ruiz-Linares, 2014). Estas diferencias pueden surgir como resultado de la acción de diversos procesos aleatorios o determinísticos. En el caso de N40D, sus frecuencias difieren significativamente en su distribución entre numerosas poblaciones (Bond et al., 1998; Gelernter et al., 1999; Levrán et al., 2011). Para determinar si las frecuencias observadas de N40D en CTES eran similares o no a las de otras poblaciones del mundo las comparamos con las depositadas en HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). HapMap es una base de datos de variabilidad genómica humana, que incluye desde polimorfismos y mutaciones puntuales hasta haplotipos y patrones de desequilibrio de ligamiento. Se enmarca en el proyecto del mismo nombre, y constituye el mayor esfuerzo internacional en investigación para construir una base de datos de polimorfismos humanos, ofreciendo información sobre sus patrones de asociación en diferentes poblaciones del mundo (Consortium, 2003).

El perfil genético dentro de una población global varía típicamente de un lugar a otro, a lo largo de su rango de distribución, dando lugar a una diferenciación entre las poblaciones. Este grado de diferenciación puede ser calculado mediante el índice de fijación de Wright (F_{st}), el cual describe el nivel de diferenciación genética entre dos poblaciones, midiendo las diferencias de las heterocigosidades de dos poblaciones comparadas con la heterocigosidad de una población global formada por todos los miembros de las dos poblaciones (Reynolds et al., 1983; Weir et al., 2005; Excoffier y Lischer, 2010). Así, los valores de F_{st} representan distancias genéticas que permiten percibir cuán similares son las poblaciones en un locus determinado. Para realizar el análisis, tomamos las frecuencias genéticas de N40D de las siguientes poblaciones de HapMap: RUE, CHB, CHD, IGH, JPT, MEX, MKK, TSI y ASE, y evaluamos si las mismas varían significativamente entre ellas y respecto a la población de CTES. Para ello, calculamos los índices F_{st} entre pares poblacionales y encontramos que sólo algunas de las poblaciones poseen diferencias significativas entre sus frecuencias (tabla 1). Nuestro análisis muestra que no existen diferencias entre poblaciones que poseen una ancestría mayoritaria común (casilleros grises, tabla 1) mientras que sí existen diferencias entre pares de poblaciones con una ancestría mayoritaria no compartida (casilleros blancos, tabla 1), excepto en las comparaciones poblacionales entre América (CTES y MEX) y Europa (RUE y TSI). De acuerdo con estos resultados, las frecuencias de N40D de CTES se diferenciaron significativamente de las poblaciones con ancestría mayoritariamente asiática y africana; y por otro lado nos permitió distinguir una estructura genética poblacional conformada por tres grupos: (1) poblaciones europeas y americanas (CTES, RUE, TSI y MEX), (2) poblaciones asiáticas (CHB, CHD, JPT y IGH), y (3) poblaciones africanas (ASE y MKK).

	Muestras europeas y americanas					Muestras asiáticas					Muestras africanas		
	CTES	RUE	TSI	MEX	CHB	CHD	JPT	IGH	ASE	MKK			
CTES	0.00000												
RUE	-0.03060	0.00000											
TSI	-0.00256	-0.00984	0.00000										
MEX	-0.00880	-0.02114	-0.00003	0.00000									
CHB	0.07178*	0.14913*	0.06052*	0.07697*	0.00000								
CHD	0.11305*	0.17014*	0.10448*	0.11007*	-0.00212	0.00000							
JPT	0.14357*	0.20374*	0.13548*	0.14233*	0.00785	-0.00043	0.00000						
IGH	0.07846*	0.10898*	0.07556*	0.07294*	-0.01576	-0.00338	0.00110	0.00000					
ASE	0.04789*	0.05385*	0.03497*	0.04293*	0.17912*	0.21191*	0.26375*	0.17033*	0.00000				
MKK	0.03454*	0.02272*	0.02544*	0.03417*	0.16738*	0.21235*	0.25623*	0.17665*	-0.00014	0.00000			0.00000

Tabla 1. La distribución poblacional de N40D muestra una estructura poblacional de tres grupos. Valores de Fst entre pares poblacionales, los casilleros grises muestran los pares de poblaciones con valores de Fst no significativos. Las poblaciones utilizadas para este análisis fueron: la muestra obtenida de la población de Corrientes (CTES) y las de la base de datos Hapmap población de residentes Utah con ancestría europea norte y este de la colección CEPH (del francés *Centre d'Étude du Polymorphisme Human*) (RUE), población china Han en Beijing (CHB), población china en Denver Metropolitan, Colorado (CHD), población india Gujarati en Houston, Texas (IGH), población japonesa en Tokio, Japón (JPT), población de ancestría mexicana en Los Ángeles, California (MEX), población Maasai en Kenia (MKK), población toscana en Italia (TSI) y población de ancestría africana del sureste de los Estados Unidos (ASE). Número de permutaciones 1023, * valores estadísticamente significativos $p < 0.05$.

Debido a que el análisis de los *Fst* reveló una estructura genética basada en las variaciones de las frecuencias de N40D, decidimos utilizar el análisis de la varianza molecular (AMOVA, del inglés *analysis of molecular variance*) para estimar el grado de diferenciación dentro y entre los grupos poblacionales revelados. AMOVA es un método estadístico para estimar los componentes de la varianza, reflejando la diversidad genotípica, a distintos niveles jerárquicos: “entre grupos”, “entre las poblaciones dentro de grupos” y “dentro de las poblaciones” (Excoffier et al., 1992). Este análisis jerárquico requiere predefinir grupos poblacionales para evaluar la significancia estadística de los componentes de la varianza asociados con los diferentes posibles niveles jerárquicos de una estructura genética dada. Consideramos dos criterios diferentes de agrupamiento (tabla 2): (1) un grupo, donde se reunieron todas las poblaciones, lo que permite detectar el porcentaje de variación “entre” el total de poblaciones; y (2) tres grupos, correspondientes a la estructura genética detectada por el análisis de *Fst*. Cuando definimos un grupo, la variación entre las poblaciones representa un 15,68 % de la variación total indicando que, efectivamente hay una estructura genética. Adicionalmente, cuando analizamos los tres grupos encontramos que el componente de la varianza “entre grupos” alcanza un nivel significativo del 20,19 %, sin evidenciar diferencias entre las poblaciones dentro de cada grupo. De esta manera, mediante AMOVA, confirmamos una estructura genética poblacional debido a la distribución del polimorfismo N40D basada en tres grupos que se corresponden, en gran medida, con distintos linajes humanos: el grupo asiático, el africano y el europeo-americano.

Estructura poblacional	% de variabilidad genética		
	Dentro de las poblaciones	Entre las poblaciones (dentro de los grupos)	Entre grupos
Un grupo	84,31*	15,68*	-
Tres grupos	79,62*	0,19	20,19*

Tabla 2. La distribución de N40D entre las poblaciones define una estructura poblacional de tres grupos con una alta variabilidad. AMOVA: los valores indican los % del componente de la varianza en cada uno de los niveles jerárquicos en la estructura genética analizada. 1023 permutaciones, * valores estadísticamente distintos de 0, $p < 0,05$.

Cap I: Discusión



La importancia del impacto de N40D sobre la actividad de MOR a nivel celular se refleja a nivel fisiológico en diferencias en la percepción de estímulos dolorosos entre individuos que portan las dos variantes en distintas especies. Por otro lado, diversos estudios han descrito que la frecuencia de este polimorfismo codificante de MOR varía entre las poblaciones humanas de distintos orígenes. En el capítulo I de esta tesis demostramos cómo N40D influencia la capacidad de MOR de inhibir a los canales $Ca_v2.2$ específicos de las vías del dolor, uno de los principales blancos de MOR. Así mismo, demostramos que la distribución de N40D a lo largo de numerosas poblaciones humanas permite detectar grupos poblacionales, que se correlacionan de manera general con una distribución por ancestría.

La activación de MOR por agonistas tiene un fuerte rol modulador sobre la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos. Al igual que muchos GPCR acoplados a Gi/o, la unión de un agonista a MOR produce una inhibición de corrientes Ca_v2 pre-sinápticas completamente mediada por $G\beta\gamma$, y en consecuencia dependiente del voltaje (Seward et al., 1991). De esta manera MOR modula la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos en el sistema nervioso central y periférico ante la unión de agonistas endógenos, como las β -endorfinas, y exógenos, como la morfina.

Los Ca_v2 pueden alterar dramáticamente su sensibilidad a la regulación por Gi/oPCRs mediante variaciones de su secuencia aminoacídica por mecanismos de *splicing* alternativo de su gen *Cacna1b* generando las isoformas $Ca_v2.2e37b$ y $Ca_v2.2e37a$ (Bell et al., 2004; Castiglioni et al., 2006; Raingo et al., 2007; Andrade et al., 2010). Estas isoformas se distinguen por la inclusión mutuamente excluyente del exón 37b o 37a, respectivamente. Mientras que $Ca_v2.2e37b$ presenta un patrón de expresión ubicuo en el sistema nervioso central y periférico, $Ca_v2.2e37a$ se expresa exclusivamente en neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal (Bell et al., 2004). *Cacna1b* posee sitios de *splicing* altamente conservados entre los mamíferos (Lipscombe, 2005; Gray et al., 2007), y consecuentemente con esto, el exón 37a se expresa en nociceptores de rata y ratón. Por lo tanto, es muy probable que la isoforma $Ca_v2.2e37a$ esté presente en los nociceptores humanos. Notablemente, la isoforma $Ca_v2.2e37a$ posee una mayor sensibilidad a la activación de los Gi/oPCRs.

Recientemente se han demostrado las consecuencias celulares y fisiológicas de la inclusión del exón 37a por *splicing* alternativo (Bell et al., 2004; Castiglioni et al., 2006; Raingo et al., 2007; Andrade et al., 2010). Los nociceptores que expresan $Ca_v2.2e37a$ presentan corrientes $Ca_v2.2$ de mayor amplitud comparadas con aquellos que sólo expresan $Ca_v2.2e37b$ (Bell et al., 2004; Andrade et al., 2010). Esta diferencia se debe a que los $Ca_v2.2e37a$ permanecen más tiempo abiertos y se expresan en mayor densidad en la membrana plasmática que los $Ca_v2.2e37b$ (Castiglioni et al.,

2006). Esto concuerda con nuestro resultado mostrando que las corrientes $Ca_v2.2e37a$ fueron 1,6 veces más grandes que las $Ca_v2.2e37b$. Así mismo observamos un corrimiento de la dependencia del voltaje hacia potenciales más hiperpolarizados de las corrientes $Ca_v2.2e37a$ en comparación con las corrientes $Ca_v2.2e37b$, similares a lo descrito en estudios previos (Castiglioni et al., 2006; Raingo et al., 2007). También se ha descrito que los $Ca_v2.2e37a$ son más sensibles a la inhibición mediada por la activación de MOR, dado que la inclusión del exón 37a posiciona en el canal un sitio blanco de fosforilación por tirosina quinasa pp60c-src, creando un módulo adicional de inhibición independiente del voltaje (Raingo et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que la presencia de $Ca_v2.2e37a$ potencia las acciones analgésicas de la morfina (Andrade et al., 2010; Jiang et al., 2013). De este modo, la inclusión del exón 37a en el canal $Ca_v2.2$ constituye un mecanismo neuronal altamente especializado para controlar la densidad de corriente $Ca_v2.2$ y la inhibición independiente del voltaje mediada por los GPCRs, aumentando así las acciones analgésicas de morfina *in vivo*.

Sumados a los mecanismos de los Ca_v2 que permiten controlar la sensibilidad a la regulación por MOR, MOR también puede tener su acción inhibitoria alterada por cambios en su secuencia aminoacídica. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes. Nuestros datos demuestran que el polimorfismo N40D impacta en la actividad inhibitoria de MOR sobre los $Ca_v2.2$ específicos de las vías del dolor. Encontramos que la activación de MOR-D por DAMGO posee una potencia 8,5 veces mayor para inhibir las corrientes $Ca_v2.2e37a$ en comparación con la activación de MOR-N. Así mismo, a dosis no saturantes encontramos que MOR-D también fue más efectivo en inhibir las corrientes $Ca_v2.2e37b$ que MOR-N. Nuestros resultados son consistentes con los observados en neuronas simpáticas transfectadas con ARNm de MOR-N o MOR-D, donde la aplicación de DAMGO o de morfina fue más potente en inhibir los Ca_v nativos cuando se expresaba MOR-D, sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias con otros agonistas, específicamente morfina-6-glucurónico o endomorfina-1 (Margas et al., 2007). Por otro lado, en dos modelos de ratones modificados genéticamente, que expresan los subtipos humanos de MOR-D o MOR-N, se encontró que MOR-D fue menos efectivo que MOR-N para inhibir las corrientes Ca_v totales con morfina en neuronas del nervio trigémino, sin encontrar diferencias en la potencia de inhibición de DAMGO o fentanilo (Mahmoud et al., 2011; Ramchandani et al., 2011). Las diferencias observadas en la aplicación de diferentes agonistas puede deberse a una selectividad funcional, es decir, a la activación específica de una de las vías de señalización asociadas a MOR. Este fenómeno se ha descrito para diversos GPCRs (Strachan et al., 2014; Wisler et al., 2014), incluido

MOR (Xu et al., 2008; Zheng et al., 2010; Thompson et al., 2014). Sin embargo, también son evidentes las diferencias en los efectos de un mismo agonista entre los diferentes modelos de estudio. Esta discrepancia puede deberse a una contribución diferencial de subtipos de Ca_v a la corriente Ca_v nativa total registrada en los distintos tipos neuronales, e inclusive de diferentes isoformas de $Ca_v2.2$. Si bien en nuestro modelo no se evalúa el impacto de N40D sobre MOR en un contexto neuronal, tiene la ventaja de permitir determinar el efecto específico sobre las corrientes Ca_v aisladas. De este modo identificar un impacto sobre las corrientes Ca_v pre-sinápticas no tendría la misma relevancia fisiológica que identificarlo en corrientes de Ca_v con localización somática como los Ca_v1 . Así, N40D impacta sobre la capacidad de MOR para inhibir las corrientes Ca_v en forma dependiente de múltiples variables: del tipo neuronal, del subtipo de Ca_v , del agonista y del sistema de estudio.

Por otro lado, los GPCRs pueden modular la actividad de los Ca_v2 en ausencia de ligandos (Kitano et al., 2003; Beedle et al., 2004). Niveles leves y moderados de actividad constitutiva ha sido reportada para MOR (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002). Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, la expresión de ambos subtipos de MOR no impacta en los niveles basales de corriente de $Ca_v2.2e37a$. Consistentemente, se ha descrito que MOR no genera ningún tipo de inhibición tónica de las corrientes $Ca_v2.2$ de manera constitutiva en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y en un sistema de expresión heterólogo (Beedle et al., 2004). Así, nuestros datos indican que ni MOR-N ni MOR-D ejercen un efecto constitutivo sobre las corrientes Ca_v2 .

A la hora de identificar las causas de la mayor potencia de la activación de MOR-D por DAMGO en inhibir las corrientes Ca_v2 que MOR-N el escenario es complejo. Posiblemente este efecto se deba a diferencias entre las isoformas en términos de su unión al agonista, cambio de conformación a la forma activa del receptor o acoplamiento a la proteína G efectora. Sin embargo, es difícil identificar, con nuestras herramientas disponibles, cuál de estas tres propiedades da cuenta del mecanismo preciso. Por otro lado, existe una estrecha relación mutuamente influenciada entre la activación del receptor y la unión del agonista (Colquhoun, 1998). En este sentido, se ha descrito que la afinidad de DAMGO por MOR se mantiene inalterada entre MOR-N y MOR-D (Befort et al., 2001). Por otro lado, es poco probable que un acoplamiento diferencial de los subtipos de MOR a las proteínas G sea la causa del efecto diferencial en la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$, dado que la dependencia del voltaje de la inhibición fue constante y similar para ambos subtipos. Además, estas diferencias no podrían explicarse por una alteración en los niveles de expresión por N40D dado que diversos estudios, en distintos sistemas, han

demostrado que la expresión de MOR-D es menor que la de MOR-N (Zhang et al., 2005; Mague et al., 2009; Pecina et al., 2014). En este sentido, estos cambios en los niveles de expresión pueden llevar incluso a enmascarar un efecto mayor en las diferencias de la potencia de DAMGO sobre MOR-D y MOR-N en la inhibición de los $Ca_v2.2$. Otra posibilidad, incluye un mayor efecto de DAMGO sobre sub-poblaciones de receptores con diferentes propiedades de activación por homo-dimerización (Wang et al., 2005). Si bien es difícil identificar los motivos de los efectos observados, estas evidencias parecerían indicar que N40D genera cambios en la activación de MOR que producen una mayor potencia de DAMGO en inhibir las corrientes $Ca_v2.2$.

Una situación aún más compleja es esperable en el uso terapéutico de agonistas de MOR, dado que N40D afecta otros aspectos de su biología, como su glicosilación, tráfico a membrana, afinidad de ciertos agonistas, niveles de expresión y eficacia de activación de proteína quinasa A (Mestek et al., 1995; Bond et al., 1998; Zhang et al., 2005; Mayer y Holtt, 2006; Deb et al., 2010). Varios estudios clínicos han reportado que la morfina es menos efectiva en producir analgesia en pacientes portadores del alelo D del gen OPRM1 comparado con los homocigotas para el alelo N (Buskila, 2007; Campa et al., 2008; Bruehl et al., 2009). Estos estudios incluyen pacientes con cáncer (Klepstad et al., 2004; Campa et al., 2008) y con dolor post-quirúrgico (Chou et al., 2006a; Chou et al., 2006b; Sia et al., 2008; Tan et al., 2009). Sin embargo, otros estudios han fallado en encontrar resultados similares (Janicki et al., 2006; Landau et al., 2008; De Gregori et al., 2013; Ginosar et al., 2013; Gong et al., 2013; Song et al., 2013; Xu et al., 2014). En pacientes con dolor crónico portadores del alelo D las dosis de morfina efectivas para aliviar el dolor son menores que las requeridas para pacientes no portadores de esta variante (Janicki et al., 2006). En este contexto, nuestros datos sugerirían que los individuos homocigotas D o heterocigotas podrían tener una sensibilidad aumentada a la activación de MOR por analgésicos opioides por un impacto funcional sobre los $Ca_v2.2e37a$. De este modo, la mayor eficacia de MOR-D en inhibir los $Ca_v2.2e37a$ que se expresan en nociceptores podría contribuir a los requerimientos diferenciales de agonistas en algunos pacientes con dolor crónico.

Diversos estudios genético-poblacionales han demostrado que la distribución del polimorfismo N40D de MOR varía entre las poblaciones humanas, encontrándose en muy baja frecuencia en poblaciones africanas (< de 0,4 %), en frecuencias moderadas en poblaciones europeas y americanas (de ~1 a ~ 20 %) y en alta frecuencia en poblaciones asiáticas (de ~ 35 a ~ 50 %) (Kreek et al., 2005). Consistentemente, en esta tesis encontramos que en la población estudiada de Argentina, N40D alcanza un ~18 %. Así mismo, de acuerdo a nuestro análisis

genético-poblacional, mediante F_{st} y AMOVA, encontramos que la distribución de N40D permite identificar tres grupos poblacionales que se corresponden de manera general a tres linajes de ancestría: un grupo asiático, un grupo africano y, un grupo común europeo-americano. Diversos estudios han demostrado que desde la colonización, el flujo genético entre América y Europa ha sido muy importante y ha tenido un fuerte impacto en el acervo genético de las poblaciones americanas (Díaz-Lacava et al., 2011; Avena et al., 2012; Manta et al., 2013; Marcheco-Teruel et al., 2014; Noguera et al., 2014; Verdu et al., 2014). Estos eventos histórico-demográficos podrían explicar la similitud entre las poblaciones americanas y europeas en la variabilidad del polimorfismo N40D de OPRM1. La principal limitación de nuestro estudio es el análisis restringido a un solo polimorfismo de OPRM1, probablemente llevando a una pérdida de la sensibilidad para detectar estructuras poblacionales y subestimando una diferenciación intra-grupos.

La identificación de una estructura poblacional mediante el análisis de las frecuencias de N40D en las poblaciones permite determinar que la variabilidad del gen OPRM1 está asociada a una fuerte estratificación poblacional. Como mencionamos previamente, los diferentes estudios de asociación que involucran a N40D con las respuestas ante la administración de analgésicos y la sensibilidad al dolor comprenden resultados muy conflictivos. Estos estudios de asociación genética son susceptibles a sesgos por estratificación poblacional o por patrones de desequilibrio de ligamiento. El primero de los casos puede tener lugar cuando: los controles difieren de los casos en la ancestría, las frecuencias alélicas varían entre las poblaciones, como es el caso de N40D, o las tasas de ocurrencia de la característica estudiada son diferentes entre los grupos poblacionales (Flores-Alfaro et al., 2012). Adicionalmente, se ha descrito que N40D se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos, definiendo haplogrupos específicos para determinadas poblaciones (Levrán et al., 2011). De esta manera, no tener en cuenta las diferencias en diversidad genética entre las poblaciones humanas, modeladas principalmente por procesos de deriva génica (Ortega y Meyers, 2014), llevan a los estudios de asociación a perder asociaciones genuinas y no poder reproducir resultados previos (Ziv y Burchard, 2003; Marchini et al., 2004; Hu y Ziv, 2008).

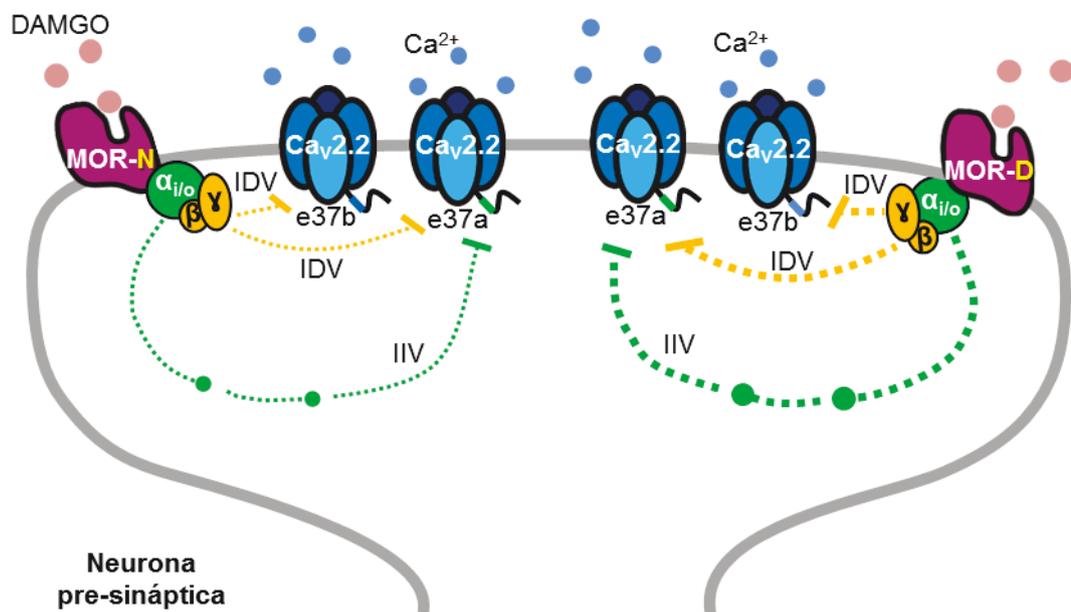
De este modo, encontramos que el polimorfismo humano N40D de MOR, posee una distribución altamente variable entre las poblaciones y, a nivel funcional, modifica el comportamiento inhibitorio de MOR sobre las corrientes $Ca_v2.2$ pre-sinápticas dominantes en las vías del dolor, impactando probablemente en la sensación de dolor y en los requerimientos analgésicos de cada individuo.

Cap I: Conclusiones



Nuestros resultados demuestran que el polimorfismo codificante de MOR, N40D, de gran variabilidad entre las poblaciones humanas, impacta en la capacidad de MOR provocando una ganancia de función para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ pre-sinápticas. La activación de MOR-D inhibe con mayor potencia que MOR-N a las corrientes mediadas por la isoforma de *splicing* del canal $Ca_v2.2$, específica de las vías del dolor, $Ca_v2.2e37a$ (esquema 5). Así mismo, la activación de MOR-D también es más potente en inhibir las corrientes $Ca_v2.2e37b$, la isoforma de *splicing* del canal $Ca_v2.2$ de expresión ubicua en el sistema nervioso (esquema 5). Adicionalmente, confirmamos que $Ca_v2.2e37a$ presenta corrientes de Ca^{2+} más grandes que la isoforma $Ca_v2.2e37b$ caracterizándose además por una activación desplazada hacia potenciales más hiperpolarizados.

Por otro lado, nuestro análisis genético-poblacional reveló que la distribución de N40D a lo largo de distintas poblaciones mundiales permite identificar tres grupos, uno compuesto por poblaciones de ascendencia asiática, otro compuesto por poblaciones de ascendencia africana, y un tercero compuesto por poblaciones europeas y americanas mestizas. Así, N40D presenta una estructura poblacional a nivel mundial reflejando relaciones histórico-demográficas.



Esquema 5. Impacto funcional del polimorfismo N40D sobre la actividad inhibitoria de MOR sobre los $Ca_v2.2$ de las vías del dolor. La activación de MOR-D por DAMGO inhibe con mayor potencia tanto las corrientes $Ca_v2.2e37b$ como las $Ca_v2.2e37a$, que MOR-N, de manera dependiente (IDV) e independiente del voltaje (IIV) a $Ca_v2.2e37a$, y únicamente de manera dependiente del voltaje a $Ca_v2.2e37b$. Las líneas de punto de mayor espesor representan una mayor potencia de inhibición en comparación con las de menor espesor.

En conjunto, nuestros resultados del primer capítulo de esta tesis sugieren que el polimorfismo humano N40D de MOR impacta en la respuesta fisiológica a la activación de este receptor y, que este impacto está condicionado por la ancestría de las distintas poblaciones del mundo.

Capítulo II



Cap II: Resultados



Impacto de la actividad de GHSR1a sobre los canales Ca_v2

Para determinar si la actividad constitutiva y la dependiente de ghrelina de GHSR1a modulan la actividad de los Ca_v pre-sinápticos realizamos registros de patch-clamp en configuración de célula entera con fijación de voltaje en células HEK 293T co-expresando los canales y el receptor. Dado que la mutación puntual A204E genera un receptor (GHSR1a-A204E (Pantel et al., 2006) que carece de la alta actividad constitutiva característica de GHSR1a (Holst et al., 2003), utilizamos este mutante como herramienta experimental. Cabe recordar que este mutante es proclive de ser activado por la unión a agonistas en forma indistinguible del GHSR1a salvaje. En primer lugar, examinamos el efecto de la actividad constitutiva, evaluando si la co-expresión de GHSR1a o GHSR1a-A204E alteraba las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ basales. Para ello utilizamos células HEK 293T transfectadas con plásmidos conteniendo la secuencia de GHSR1a, GHSR1a-A204E o el vector pcDNA3.1+ vacío (como control) y $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$ junto con sus subunidades auxiliares $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$, en una relación molar 1:1:1:1. Evocamos las corrientes de Ca^{2+} por pulsos de voltaje a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV con una solución externa conteniendo Ca^{2+} (2 mM) como ion de carga. En estos experimentos encontramos que las corrientes de Ca^{2+} $Ca_v2.1$ y las $Ca_v2.2$ fueron significativamente menores en las células que expresaban GHSR1a en comparación con la condición control (figura 8.A). Por el contrario, las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en las células que expresaban GHSR1a-A204E no fueron diferentes de los registros control (figura 8.A). Dado que la expresión de GHSR1a redujo drásticamente los niveles basales de corrientes Ca_v2 cuando el receptor y las subunidades del canal eran transfectadas en la misma proporción molar (la cantidad de plásmido transfectado de receptor en esta condición corresponde a 0,6 μ g), decidimos ensayar con el mismo paradigma experimental proporciones reducidas de plásmido conteniendo GHSR1a. Al medir en estas condiciones las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ encontramos que las densidades de corrientes de ambos Ca_v2 fueron incrementándose a medida que utilizamos menor proporción de plásmido GHSR1a en la transfección (Figura 8.A). Para corroborar que, al manipular la concentración de plásmido GHSR1a utilizado, se modificaban los niveles de expresión de GHSR1a en la membrana plasmática, realizamos ensayos de *binding* con FLUO-ghrelina en células HEK 293T transfectadas con las diferentes cantidades del plásmido GHSR1a. La FLUO-ghrelina es un trazador peptídico sintético análogo a la ghrelina conjugado con una molécula de fluoresceína en su extremo C-terminal, lo que permite conservar una correcta unión a su receptor y sus efectos biológicos (McGirr et al., 2011). En estos experimentos observamos que la unión de

FLUO-ghrelina a las células aumentó a medida que incrementamos la proporción de plásmido GHSR1a utilizado para la transfección (figura 8.B). Así, podemos confirmar que la expresión de GHSR1a reduce las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ de una manera dependiente del nivel de expresión del receptor, mientras que la versión mutada de GHSR1a que carece de actividad constitutiva no afecta los niveles de corriente.

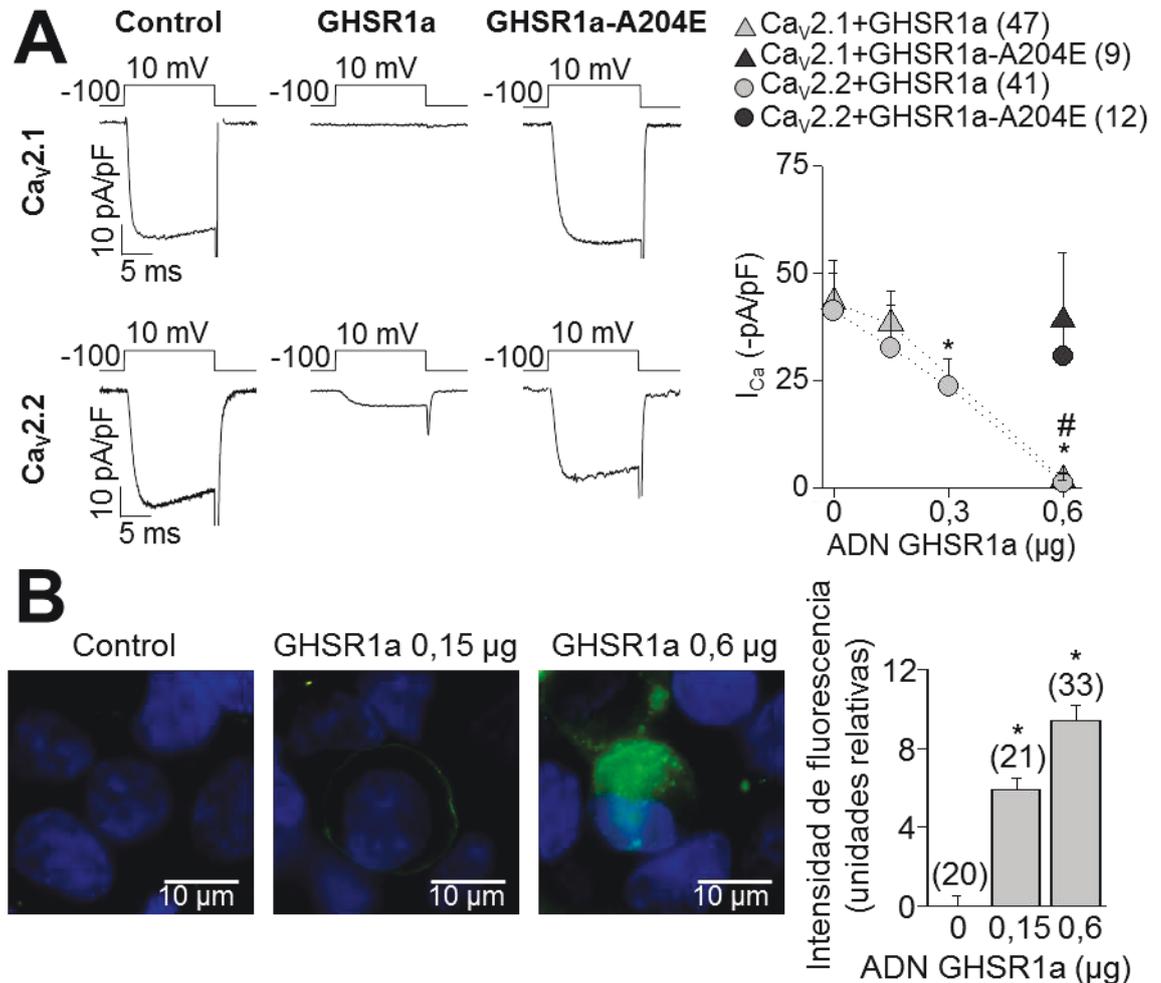


Figura 8. La co-expresión de GHSR1a reduce las corrientes Ca_v2 . **(A)** Trazos representativos de corrientes de Ca_v2 evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando $Ca_v2.1$ (arriba) y $Ca_v2.2$ (abajo) y, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y pcDNA3.1+ (control), GHSR1a o GHSR1a-A204E; y valores promedio de la densidad de corriente Ca_v2 versus las concentraciones de plásmido GHSR1a o GHSR1a-A204E transfectado en células expresando $Ca_v2.1$ (triángulos) y $Ca_v2.2$ (círculos) y, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$. ANOVA post-test de Dunnett, # y * $p < 0,05$ con respecto al control para $Ca_v2.1$ y para $Ca_v2.2$, respectivamente **(B)** Microfotografías (izquierda) y valores promedio de la intensidad de fluorescencia (derecha) de la señal verde correspondiente a FLUO-ghrelina unida a células transfectadas con distintas concentraciones del plásmido GHSR1a, la señal azul corresponde a la tinción nuclear con DAPI. ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto a la condición sin ADN.

Otra estrategia disponible para evaluar si la activación independiente de ligando está involucrada en la reducción de las corrientes Ca_v2 observada es la utilización de un agonista inverso del GHSR1a: el SPA (del inglés *substance P analog*, $[D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]-substance P$) (Holst et al., 2003). Esta droga se une al GHSR1a bloqueando su actividad constitutiva, aunque también actúa como antagonista de la actividad evocada por agonista. Para evaluar el efecto del SPA sobre la reducción basal de las corrientes Ca_v2 por GHSR1a medimos las corrientes de Ca^{2+} en células que expresaban los Ca_v2 y GHSR1a en igual proporción molar, pre-incubadas o no con 1 μM de SPA durante 16 horas. En este caso utilizamos como condición control células co-expresando GHSR1a-A204E. Encontramos que los niveles de corrientes Ca_v2 en las células expresando GHSR1a pre-incubadas con SPA, no fueron significativamente diferentes de los de las corrientes control (figura 9). Por otro lado, en células expresando GHSR1a medimos el efecto de la aplicación aguda de SPA sobre los niveles de corriente $Ca_v2.2$ y encontramos que los mismos no se vieron alterados ($-1,65 \pm 1,44$ % de variación de la corriente $Ca_v2.2$, $n = 3$; no significativamente distinto de 0, test de Student, $p > 0,05$). De esta manera, estos experimentos demuestran que la actividad constitutiva de GHSR1a produce una reducción basal de las corrientes de Ca^{2+} de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ que no puede ser revertida en el corto plazo.

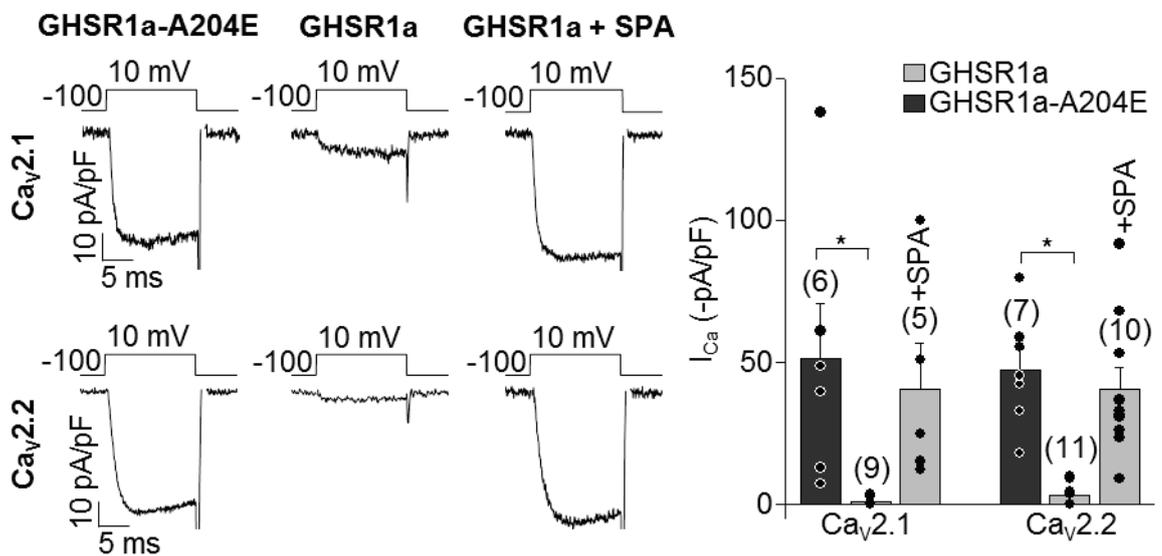


Figura 9. La actividad constitutiva de GHSR1a reduce las corrientes Ca_v2 . Trazos representativos de corrientes Ca_v2 (izquierda), y valores promedios de densidad de corriente (derecha) evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando $Ca_v2.1$ (arriba) o $Ca_v2.2$ (abajo) y, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E o GHSR1a pre-incubadas o no con 1 μM de SPA (+SPA). El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Dunnett * $p < 0,05$ con respecto a la condición control.

Si bien GHSR1a posee altos niveles de actividad constitutiva puede además ser activado por la unión de agonistas, actuando como un GPCR convencional. Como mencionamos en la introducción, el ligando endógeno de GHSR1a es la hormona ghrelina cuya unión a GHSR1a genera la activación de cascadas de señalización intracelular que impactan sobre múltiples efectores. Para evaluar la acción de la activación de GHSR1a por ghrelina sobre las corrientes Ca_v2 utilizamos el mutante GHSR1a-A204E, el cual nos permitió evaluar con altos niveles de corriente únicamente la actividad de GHSR1a dependiente de agonista. En estas condiciones realizamos registros de corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ encontrando que la aplicación aguda de una concentración saturante de ghrelina (500 nM(Holst et al., 2003)) inhibió ambos subtipos de corrientes Ca_v2 , pero con mayor eficacia a las corrientes $Ca_v2.2$ en comparación con las de $Ca_v2.1$ ($44,5 \pm 6,9$ % $n = 8$, versus $15,4 \pm 3,9$ %, $n = 5$, respectivamente; test t de Student, $p = 0,010$, figura 10). Así mismo, para determinar el efecto de la activación por ghrelina de GHSR1a salvaje sobre las corrientes Ca_v2 y posteriormente compararlo con el efecto observado con GHSR1a-A204E, aplicamos ghrelina a las células que co-expresaban GHSR1a y los Ca_v2 . Dado que GHSR1a reduce drásticamente las corrientes de Ca^{2+} cuando está expresado en altos niveles resulta dificultoso evaluar el efecto inhibitorio de ghrelina en células con muy poca corriente basal. Entonces, decidimos evaluar este efecto en células expresando niveles decrecientes del receptor. En el caso de la mayor concentración de plásmido GHSR1a, solo pudimos evaluar el efecto de ghrelina en aquellas pocas células que presentaban niveles detectables de corriente. En este experimento encontramos que el porcentaje de inhibición por ghrelina de las corrientes de Ca^{2+} fue de ~ 15 % para $Ca_v2.1$ y un ~ 45 % para $Ca_v2.2$. Estos valores porcentuales de inhibición fueron independientes del nivel de expresión de GHSR1a como así también de la presencia de la mutación A204E ($Ca_v2.1$: ANOVA, $p > 0,05$ y $Ca_v2.2$: ANOVA $p > 0,05$; figura 10).

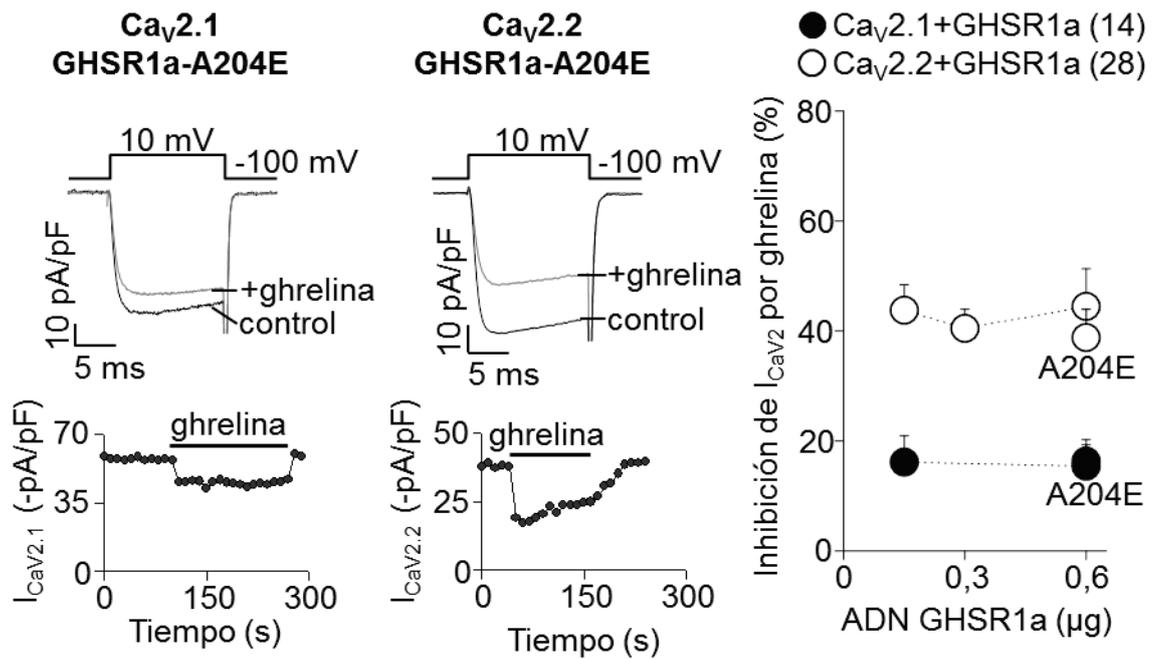


Figura 10. La activación de GHSR1a o GHSR1a-A204E por ghrelin inhibe las corrientes Ca_v2. Trazos representativos de corrientes (arriba) y cursos temporales de los picos de corriente Ca_v2 (abajo) evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando Ca_v2.1 (izquierda) y Ca_v2.2 (derecha) y, Ca_vβ₃, Ca_vα₂δ₁ y GHSR1a-A204E antes (control) y después de la aplicación de 500 nM de ghrelin (+ghrelina); y valores promedio del % de inhibición de las corrientes de Ca_v2.1 (círculos negros) y Ca_v2.2 (círculos blancos) versus concentraciones crecientes de plásmido GHSR1a o GHSR1a-A204E transfectado. El n se detalla entre paréntesis.

Para conocer la dependencia de inhibición de los canales con la concentración de ghrelin realizamos una curva concentración de ghrelin versus inhibición de Ca_v2.2. Utilizamos células HEK 293T expresando Ca_v2.2 junto con sus subunidad auxiliares y GHSR1a en una relación molar 1:0,25 (lo que corresponde a 0,15 μg de plásmido GHSR1a transfectado), dado que a esta concentración de plásmido de GHSR1a observábamos niveles de corrientes detectables. Ajustamos la ecuación de Hill a los valores de relación concentración-inhibición obtenidos y encontramos que concentraciones de ghrelin iguales o mayores a 500 nM alcanzaban un E_{max} de 51,05 ± 5,27 % y que el valor de EC₅₀ para esta curva fue de 169,9 ± 31,8 nM (figura 11). De esta manera, hallamos que existe una dependencia de la concentración de ghrelin en el efecto inhibitorio mediado por GHSR1a sobre los Ca_v2.2, como se espera para la acción de la unión de un ligando a su GPCR. Por otro lado, confirmamos que 500 nM de ghrelin, nuestra concentración de trabajo en esta tesis, es saturante en nuestro sistema experimental.

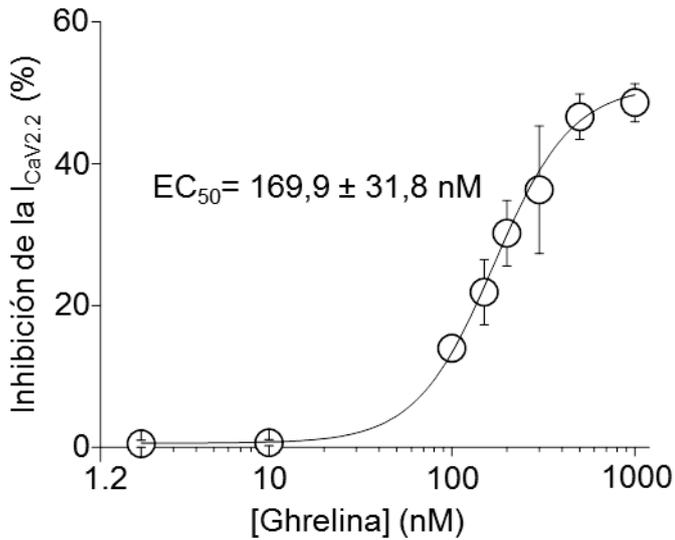


Figura 11. El efecto inhibitorio de la activación de GHSR1a por ghrelina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ es dependiente de la concentración de ghrelina. Curva concentración de ghrelina - inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ en células expresando $Ca_v2.2$ y GHSR1a en una proporción molar 1:0,25. La línea continua representa el ajuste de la ecuación de Hill ($r^2 = 0,79$, $n = 44$ células).

Vías de señalización involucradas en la inhibición de los Ca_v2 por la actividad de GHSR1a dependiente de ghrelina

Los Ca_v2 son blancos de numerosas vías de señalización de los GPCRs (Zamponi y Currie, 2013), las cuales determinan el grado y velocidad de la inhibición de estas corrientes. Es importante entonces determinar precisamente cuales son las moléculas responsables del efecto inhibitorio de GHSR1a sobre los Ca_v2 . En este caso, además, es crítico entender si los dos modos de activación del receptor utilizan el mismo tipo de proteína G y qué vías están involucradas en cada caso. Para esto, existen herramientas experimentales que permiten anular el efecto de los distintos subtipos de proteínas G. Para determinar qué proteínas G intervienen en la inhibición de los Ca_v2 por la activación de GHSR1a dependiente de ghrelina, evaluamos su eficacia en inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ con distintos inhibidores específicos de las principales proteínas G. Utilizamos células HEK 293T transfectadas con proporciones equimolares de $Ca_v2.2$, sus subunidades auxiliares y GHSR1a-A204E pre-incubadas con la toxina del cólera (ChTX, 500 ng / ml) que inhibe Gs o con la toxina Pertussis (PTx, 500 ng / ml) que inhibe Gi/o. Adicionalmente, en otros experimentos co-transfectamos el plásmido de una proteína Gq mutada (Gaq-Q209L/D277N9), la cual hidroliza nucleótidos de xantina, en vez de nucleótidos de guanina para su activación. La expresión de esta variante mutada de Gq ejerce una actividad dominante negativa sobre las proteínas Gq nativas de las células (Yu y Simon, 1998; Lauckner et al., 2005). En todas estas condiciones experimentales registramos las corrientes de Ca^{2+} , y observamos que ni ChTX, ni PTx modificaron el efecto inhibitorio de ghrelina sobre

las corrientes $Ca_v2.2$ (figura 12); sin embargo, la co-expresión de G α q-Q209L/D277N9 ocluyó completamente sus acciones inhibitorias (figura 12). De esta manera, podemos concluir que la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la activación de GHSR1a por ghrelina es mediada por la actividad de la proteína Gq.

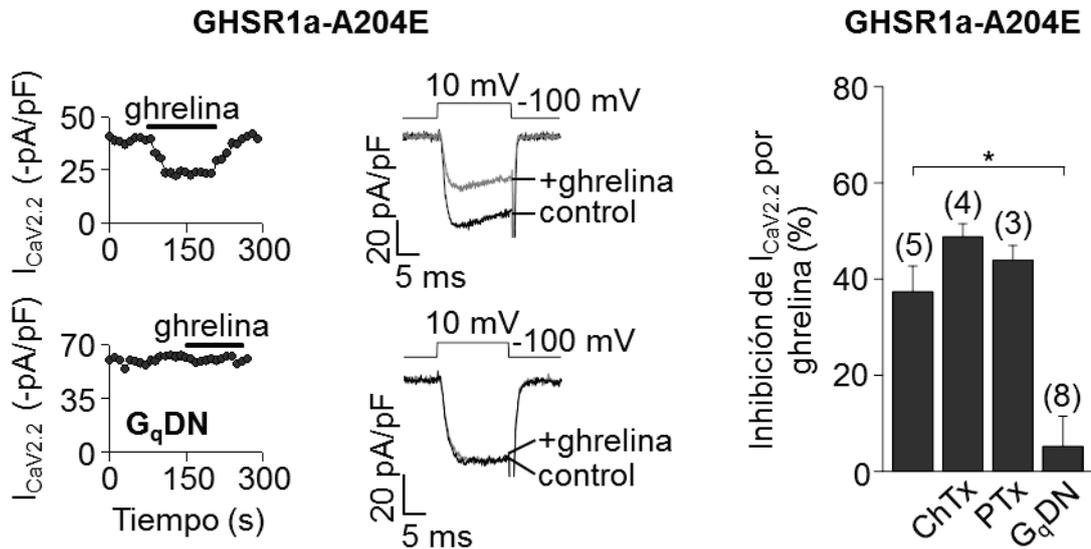


Figura 12. La proteína Gq media la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la activación de GHSR1a dependiente de ghrelina. Cursos temporales de los picos de corriente $Ca_v2.2$ (izquierda) y trazos representativos de corrientes de $Ca_v2.2$ (medio) evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E antes (control) y después de la aplicación de 500 nM de ghrelina (+ghrelina) co-transfectadas o no con el plásmido con la secuencia de G α q Q209L/D277N (G α DN). Valores promedio del % de inhibición de las corrientes de $Ca_v2.2$ por la aplicación de 500 nM de ghrelina, en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E (control), incubadas con 500 ng / ml ChTx, 500 ng / ml de PTx o co-transfectadas con G α DN. El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto a la condición control.

Reportes anteriores muestran que el mecanismo de inhibición por Gq es independiente del voltaje, por lo tanto decidimos determinar si la inhibición de los $Ca_v2.2$ provocada por la activación de GHSR1a por ghrelina era removible por pulsos a potenciales muy positivos, utilizamos el protocolo de pre-pulsos despolarizantes descrito en el capítulo 1. Registramos las corrientes de Ca^{2+} en células HEK 293T transfectadas con $Ca_v2.2$, sus subunidades auxiliares y GHSR1a-A204E, y observamos que la inhibición de los canales $Ca_v2.2$ no se atenúa con la aplicación del pre-pulso a +80 mV en presencia de ghrelina, lo que es consistente con un mecanismo puramente independiente del voltaje (figura 13).

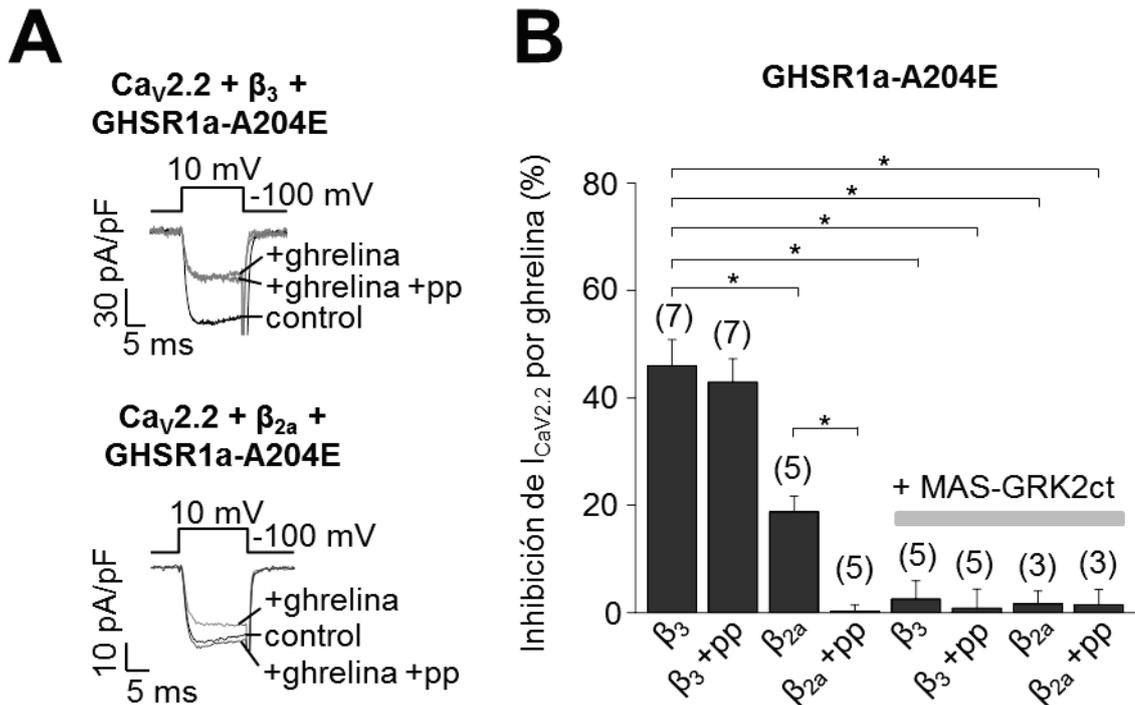


Figura 13. La activación de GHSR1a dependiente de ghrelina reduce las corrientes $Ca_v2.2$ de manera dependiente de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ y del hetero-dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G. **(A)** Trazos representativos de corrientes de $Ca_v2.2$ evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ (arriba) o $Ca_v\beta_{2a}$ (abajo), $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E antes (control) y después de la aplicación de 500 nM de ghrelina (+ghrelina) sin o con la aplicación del protocolo de pre-pulso (+pp). **(B)** Valores promedio de los % de inhibición de las corrientes de $Ca_v2.2$ por la aplicación de 500 nM de ghrelina, en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ (β_3) o $Ca_v\beta_{2a}$ (β_{2a}), $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E sin o con la aplicación del protocolo de pre-pulso (+pp) y en algunos casos co-expresando MAS-GRK2ct (+ MAS-GRK2ct). El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Tukey, * $p < 0,05$ entre grupos tomados de a pares.

La independencia del voltaje de la inhibición de los Ca_v2 por los GqPCR es observada cuando el complejo del canal incluye al subtipo $Ca_v\beta_3$ de esta subunidad auxiliar. Sin embargo, se ha descrito que este efecto cambia dramáticamente cuando otra subunidad $Ca_v\beta$ ($Ca_v\beta_{2a}$) está incluida en el complejo, reduciéndose y volviéndose completamente removible por despolarización. Por esta razón, determinamos si el cambio de subtipo de $Ca_v\beta$ incidía en las propiedades de la inhibición de los $Ca_v2.2$ por la actividad dependiente de ghrelina de GHSR1a. Para esto transfectamos células HEK 293T con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_{2a}$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E, y registramos las corrientes de Ca^{2+} . Aplicamos ghrelina de manera aguda y encontramos que la inhibición de los $Ca_v2.2$ se reducía significativamente del 45 % con $Ca_v\beta_3$ a un ~ 20 %

(figura 13). Utilizamos nuevamente el protocolo de pre-prepulso para estudiar la dependencia del voltaje de esta inhibición, y encontramos que la inhibición fue completamente revertida por el mismo (figura 13). Por último, y dado que la inhibición dependiente del voltaje es mediada por una interacción directa de la subunidad $G\beta\gamma$ de la proteína G con el Cav2.2, decidimos indagar la participación de esta subunidad en el efecto inhibitorio sobre los canales incluyendo ambos subtipos de $Ca_v\beta$. Para esto, co-transfectamos las células con el plásmido del péptido MAS-GRK2-ct. MAS-GRK2-ct es un segmento corto de la proteína quinasa de GPCRs que posee un dominio de alta homología con la subunidad $G\beta\gamma$, permitiendo su unión a $G\beta\gamma$ impidiendo que actúe sobre sus efectores (Penela et al., 2010). Nuestros resultados mostraron que este péptido ocluyó tanto la inhibición dependiente del voltaje de los canales incluyendo $Ca_v\beta_{2a}$ como así también la inhibición independiente del voltaje de los canales conteniendo $Ca_v\beta_3$ (figura 13). En la discusión de esta tesis comentaremos sobre la concordancia de nuestros resultados con un mecanismo mediado por la depleción de PIP2 o la generación de ácido araquidónico.

Vías de señalización involucradas en la inhibición de los Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR1a

Una vez determinada la proteína G que participaba de la inhibición aguda de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad evocada por ghrelina de GHSR1a indagamos si está misma vía intracelular u otra es la que media la acción inhibitoria crónica sobre corrientes $Ca_v2.2$ de la actividad constitutiva de GHSR1a. Utilizando las mismas estrategias para bloquear específicamente las proteínas G antes descritas, encontramos que ni la co-expresión de $Gaq-Q209L/D277N$ ni el pre-tratamiento con ChTx afectaba la reducción de la amplitud de corriente $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de GHSR1a (figura 14). Por otro lado, las corrientes $Ca_v2.2$ de células pre-tratadas con PTx fueron más grandes y no significativamente diferentes de las corrientes de las células que expresaban GHSR1a-A204E (figura 14). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la proteína Gi/o estaría mediando el efecto inhibitorio constitutivo de GHSR1a sobre los $Ca_v2.2$. Como experimento control evaluamos que PTx no incrementara la corriente *per se* en células co-expresando el canal y GHSR1a-A204E (densidad de corriente: $45,78 \pm 6,28$ pA/pF). Adicionalmente, la aplicación de pre-pulsos a +80 mV no fue efectivo para reducir la inhibición basal de las corrientes $Ca_v2.2$ por GHSR1a, como así tampoco modificó la amplitud de las corrientes en células co-expresando GHSR1a-A204E. Del mismo modo, el subtipo de $Ca_v\beta$ ($Ca_v\beta_3$ o

$Ca_v\beta_{2a}$) y el secuestro de $G\beta\gamma$ por la co-expresión de MAS-GRK2-ct no modificaron el efecto de la actividad constitutiva de GHSR1a sobre las densidades de corriente $Ca_v2.2$ (figura 15). Nuestros resultados sugieren en conjunto que la inhibición de los canales $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de GHSR1a es independiente del voltaje y mediada por la proteína Gi/o , a diferencia de la actividad dependiente de ghrelina de GHSR1a mediada por la proteína Gq .

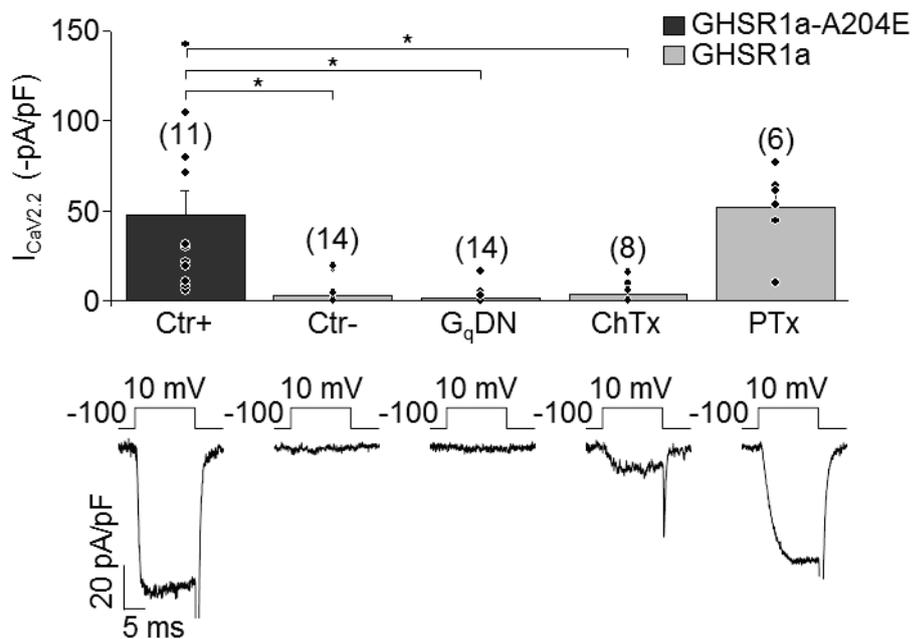


Figura 14. La proteína Gi/o media la reducción de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de GHSR1a. Valores promedio (arriba) y trazos representativos de corrientes $Ca_v2.2$ (abajo) evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a-A204E (Ctr+) o GHSR1a (Ctr-) co-transfectadas o no con $G\alpha_q$ -Q209L/D277N (G_qDN), o incubadas con 500 ng / ml ChTx, o 500 ng / ml de PTx. El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto a la condición Ctr+.

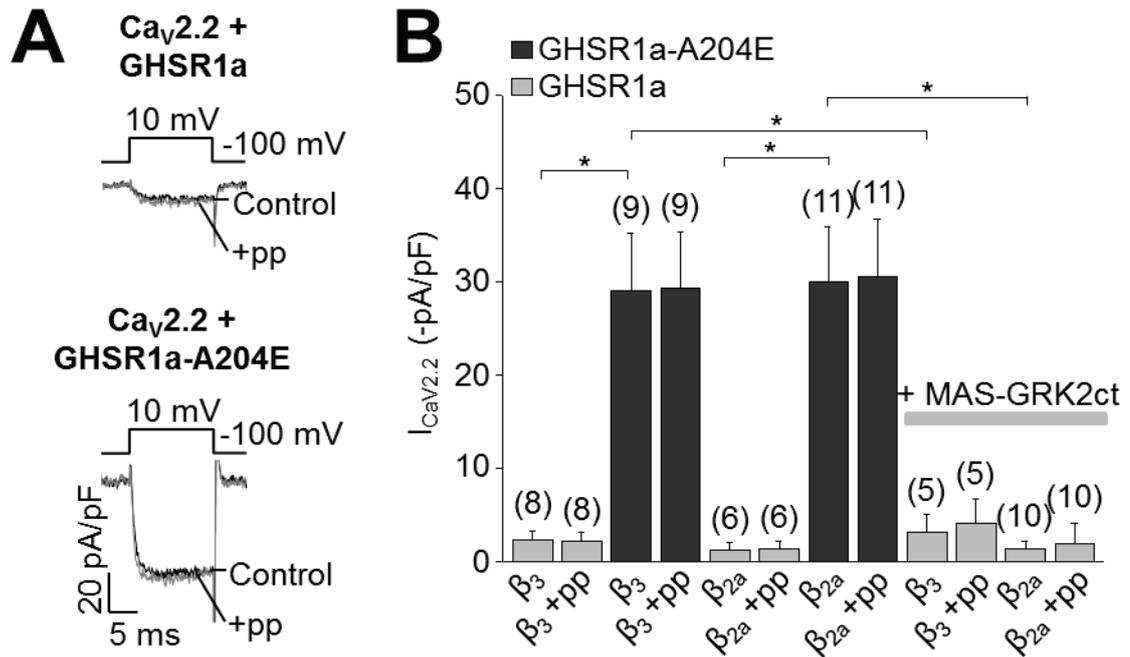


Figura 15. La activación constitutiva de GHSR1a reduce las corrientes $Ca_v2.2$ por mecanismos independientes del voltaje, del subtipo de subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ y del hetero-dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G. **(A)** Trazos representativos de corrientes de $Ca_v2.2$ evocadas por pulsos a +10 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV, en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a o GHSR1a-A204E antes (control) y después de la aplicación del protocolo de pre-pulso (+pp). **(B)** Valores promedio de la densidad de corriente de $Ca_v2.2$ en células expresando $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ (β_3) o $Ca_v\beta_{2a}$ (β_{2a}), $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR1a o GHSR1a-A204E sin o con la aplicación del protocolo de pre-pulso (+pp), y en algunos casos co-expresando MAS-GRK2ct (+ MAS-GRK2ct). El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Tukey, * $p < 0,05$ entre grupos tomados de a pares.

Dado que GHSR1a produce una reducción basal y crónica de las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ ya que la aplicación del agonista inverso de manera aguda no revierte esta inhibición, evaluamos si este efecto se debe a una reducción de la densidad de Ca_v2 en la membrana plasmática mediante experimentos de bioquímica en colaboración con el Laboratorio de Ricardo Félix en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para ello, utilizamos células transfectadas con $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$, sus subunidades auxiliares y GHSR1a, GHSR1a-A204 o pcDNA3.1+ (como condición control) en iguales proporciones molares. Así, mediante la realización de fraccionamientos celulares, extrajimos las proteínas provenientes de la membrana plasmática y del citoplasma, las mismas se separaron por *western blot* y realizamos inmuno-reacciones utilizando anticuerpos específicos para $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$, como así también para Hsp90 (del inglés *heat shock protein 90*), AKT y cadherina. Para

cuantificar los niveles de expresión de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ realizamos una normalización utilizando los niveles de expresión de cadherina, una proteína característica de membrana. Las señales de Hsp90 y AKT las utilizamos para evaluar la ausencia de posibles contaminaciones con proteínas citoplasmáticas en la fracción correspondiente a membrana (Gandini et al., 2014). Así, en estos experimentos encontramos que los niveles de expresión de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ fueron significativamente menores cuando estaba expresado GHSR1a en comparación con la condición control (pcDNA3.1+), mientras que la expresión de GHSR1a-A204E no modificó los niveles de expresión de ambos canales (figura 16). De esta manera, nuestros resultados demuestran que la actividad constitutiva de GHSR1a reduce drásticamente la densidad de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática.

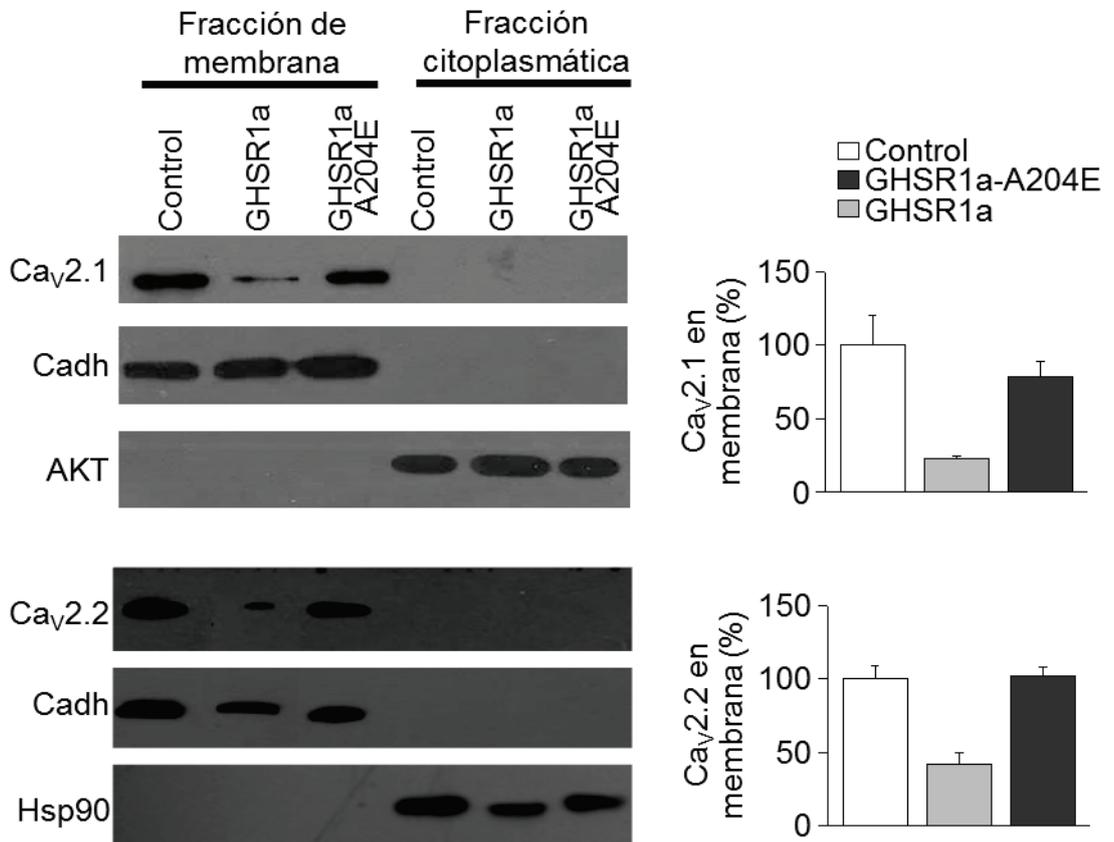


Figura 16. La actividad constitutiva de GHSR1a reduce la expresión en membrana plasmática de los Ca_v2 . *Western blots* (izquierda) representativos conteniendo las bandas correspondientes a la expresión de las proteínas Ca_v2 junto con las proteínas cadherina (Cadh) y AKT o Hsp90 en ambos casos, para las fracciones de membrana y citoplasmática de células expresando $Ca_v2.1$ (arriba) o $Ca_v2.2$ (abajo), $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y pcDNA3.1+ (control), GHSR1a-A204E o GHSR1a. Valores promedio normalizados de la cuantificación de la expresión de $Ca_v2.1$ (arriba) y $Ca_v2.2$ (abajo) en las mismas condiciones descritas previamente. Datos obtenidos de 2 cultivos independientes por condición.

Detección de la mutación A204E de GHSR1a en una muestra de una población argentina

Debido al impacto que tiene en su función biológica evaluamos si la mutación A204E de GHSR1a se encontraba representada en la muestra de la población de CTES descrita en el capítulo 1. Para esto utilizamos la técnica PCR alelo-específica. Diseñamos un trio de cebadores alelo-específicos que consistieron en dos cebadores *forwards*, uno que hibrida en la secuencia de GHSR1a salvaje y el otro en la secuencia de GHSR1a-A204E, y un cebador *reverse*. Posteriormente, para cada muestra de ADN a genotipificar realizamos dos PCR, una con el cebador *forward* para la secuencia salvaje y el cebador *reverse*, y otra con el cebador *forward* para la secuencia mutante y el mismo primer *reverse*. Ambas hibridaciones dan un producto de PCR de 213 pb. Mediante la visualización del patrón de bandas en geles de agarosa, genotificamos cada muestra por ausencia o presencia de la banda de 235 pb en cada reacción de PCRs. Utilizamos como controles los fragmentos producto de la amplificación de los plásmidos GHSR1a salvaje y GHSR1a-A204E con los mismos cebadores (figura 17.A). Adicionalmente enviamos a secuenciar 5 muestras al azar, para controlar que, específicamente, se amplificaba el fragmento de interés y que el genotificado por PCR-alelo específico era el correcto (figura 17.B).

En estas condiciones genotificamos 90 muestras de la población de CTES y encontramos que el alelo E, correspondiente a la mutación A204E, no estaba presente en ninguna de las muestras analizadas. De esta manera, el alelo A fue el único representado en esta población (figura 17.C). Nuestros resultados, demuestran de esta manera que el locus 204 constituye un sitio monomórfico al menos en la muestra analizada.

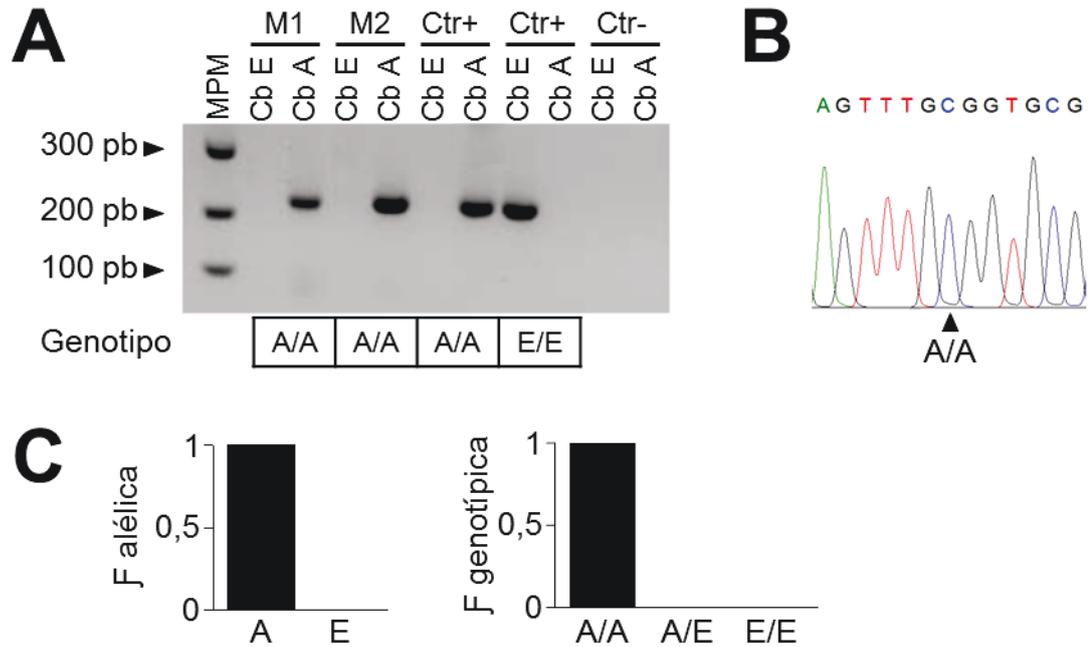


Figura 17. A204E del gen GHSR constituye un locus monomórfico en la población de CTES. **(A)** Gel de agarosa al 1,5 % con el marcador de peso molecular de 100 pb (MPM) y los productos de las dos PCR-alelo específicas por muestra, conteniendo los cebadores para amplificar el alelo E (Cb E) y el alelo A (Cb A), en 2 muestras representativas (M1 y M2), los controles positivos para cada reacción (Ctr+), el control negativo (Ctr-). En el tabla se detallan los genotipos correspondientes a cada muestra. **(B)** Electroferograma de la secuenciación del producto de PCR de la región de ADN que contiene el locus A204E (flecha). **(C)** Frecuencias (F) alélicas y genotípicas observadas en la muestra de CTES (n = 90 individuos).

Impacto de la actividad de GHSR1a sobre los Ca_v2 nativos en neuronas hipotalámicas

Los cultivos primarios de neuronas constituyen modelos de estudio ampliamente utilizados para estudios de mecanismos celulares en neurociencia, dado que las neuronas en cultivo pueden presentar propiedades muy similares a las que poseen en su contexto natural, con la ventaja de estar en un medio controlado y manipulable. En el caso de estudios de electrofisiología, este modelo constituye una buena estrategia para analizar diferentes conductancias nativas debido a que las neuronas pueden alcanzar un desarrollo morfológico más restringido que formando parte de estructuras cerebrales, posibilitando una mejor fijación del voltaje durante los registros de patch-clamp. Es por ello que, para determinar si el efecto de la actividad de GHSR1a tiene un impacto en las corrientes Ca_v2 nativas en neuronas, realizamos cultivos primarios enriquecidos en neuronas hipotalámicas de rata.

Utilizamos como material de partida el hipotálamo debido a que es el área del cerebro con mayor expresión de GHSR1a (Howard et al., 1996; Zigman et al., 2006), por lo que permitiría evaluar un posible efecto del receptor sobre los canales Ca_v nativos. Dado que la mayor parte de las poblaciones neuronales hipotalámicas no expresan GHSR1a, en primer lugar determinamos el porcentaje de neuronas que expresaban GHSR1a en nuestros cultivos primarios para determinar si era factible trabajar en este preparado con los receptores nativos. Realizamos ensayos de *binding* con FLUO-ghrelina, y encontramos que un 6 ± 2 % de las neuronas mostraban señal fluorescente (3 cultivos independientes), indicando que la cantidad de neuronas que expresaban GHSR1a es muy baja. De acuerdo con esto, era muy poco probable realizar un registro de patch-clamp en neuronas que expresen nativamente el receptor debido a que no teníamos manera de identificarlas antes de realizar el experimento. Es así que decidimos realizar transfecciones transitorias de las neuronas con los plásmidos de GHSR1a o GHSR1a-A204E unidos a la proteína amarilla fluorescente (YFP, del inglés *yellow fluorescent protein*) (GHSR1a-YFP y GHSR1a-A204E-YFP) con la técnica de fosfato de calcio (Jiang y Chen, 2006). Esta técnica tiene un mayor rendimiento de transfección en células post-mitóticas en comparación con la técnica de liposomas catiónicos. Aun así nos permitió obtener un número bajo de neuronas transfectadas, pero suficiente para identificarlas y estudiar el comportamiento de la actividad de los receptores sobre-expresados sobre los Ca_v nativos.

De esta manera realizamos registros de patch-clamp con una solución externa alta en Ba^{2+} (10 mM), que amplifica las corrientes mediadas por los Ca_v , en neuronas hipotalámicas transfectadas con GHSR1a-YFP o GHSR1a-A204E-YFP, o no transfectadas y transfectadas con eGFP como condiciones control. Encontramos que las corrientes Ca_v totales de las neuronas que expresaban GHSR1a-YFP fueron significativamente más pequeñas que las que expresaban GHSR1a-A204E-YFP, y las condiciones control (figura 18). Adicionalmente, aplicamos ghrelina de manera aguda para evaluar la actividad de GHSR1a evocada por agonista, y además porque constituía un importante control de la funcionalidad de los receptores sobre-expresados. Para evaluar y visualizar el efecto del agonista, normalizamos los trazos de corriente por el máximo de corriente en cada caso, y observamos que ghrelina inhibió en igual proporción las corrientes Ca_v en las neuronas que expresaban GHSR1a-YFP y GHSR1a-A204E-YFP (figura 19), mientras que su aplicación no tuvo efecto sobre las condiciones control. Aplicamos 100 μ M de $CdCl_2$, un bloqueador general de los Ca_v , para determinar si las corrientes de Ba^{2+} eran mediadas efectivamente por los Ca_v y encontramos que las corrientes observadas fueron completamente inhibidas por $CdCl_2$ en todas las condiciones (% de inhibición:

neuronas transfectadas con GHSR1a-YFP = $99,81 \pm 3,72$, $n = 5$; con GHSR1a-A204E-YFP = $100,48 \pm 2,38$, $n = 5$; eGFP = $98,98 \pm 4,12$, $n = 7$; y neuronas no transfectadas = $105,89 \pm 7,12$, prueba t de Student, $p > 0,05$). Así mismo, evaluamos la amplitud de las corrientes de Na^{2+} sensibles a $1 \mu\text{M}$ de tetrodotoxina (TTX), una toxina inhibidora específica de los canales Na_v , y encontramos que los niveles de corriente de Na^{2+} fueron similares en las cuatro condiciones (figura 20). De acuerdo con los resultados obtenidos, tanto la actividad constitutiva como la dependiente de agonista de GHSR1a inhiben específicamente los canales Ca_v nativos de neuronas hipotalámicas.

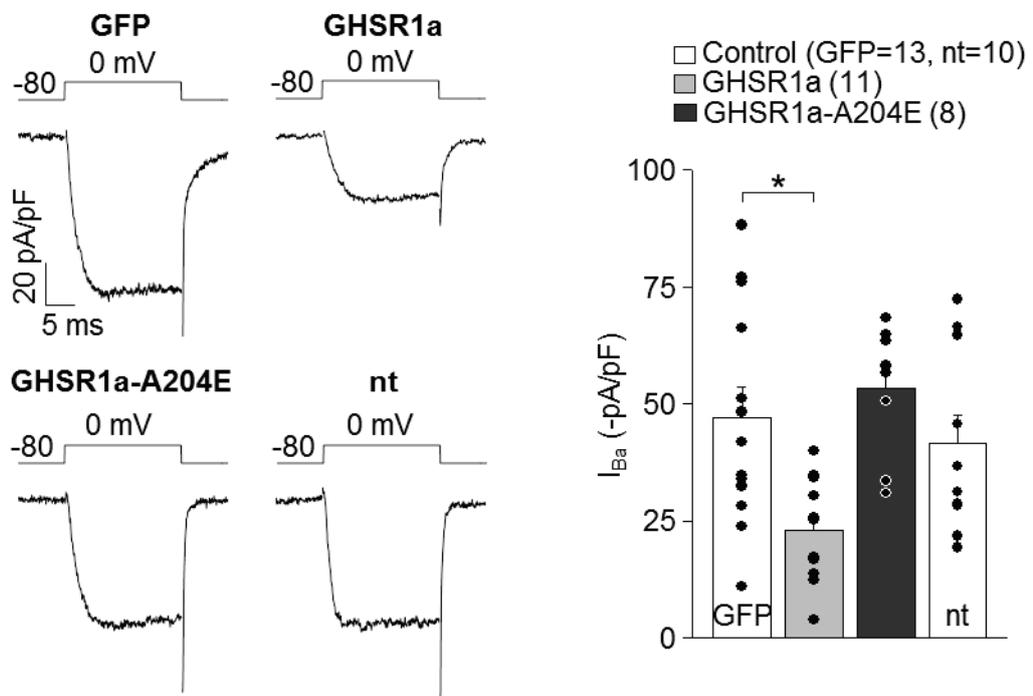


Figura 18. La actividad constitutiva de GHSR1a reduce las corrientes Ca_v nativas en neuronas hipotalámicas. Trazos representativos de corrientes de Ba^{2+} (izquierda) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en neuronas hipotalámicas de rata transfectadas con GFP, GHSR1a, GHSR1a-A204E o no transfectadas (nt); y valores promedio de la amplitud de corrientes de Ba^{2+} en las mismas condiciones. El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto a la condición control (GFP).

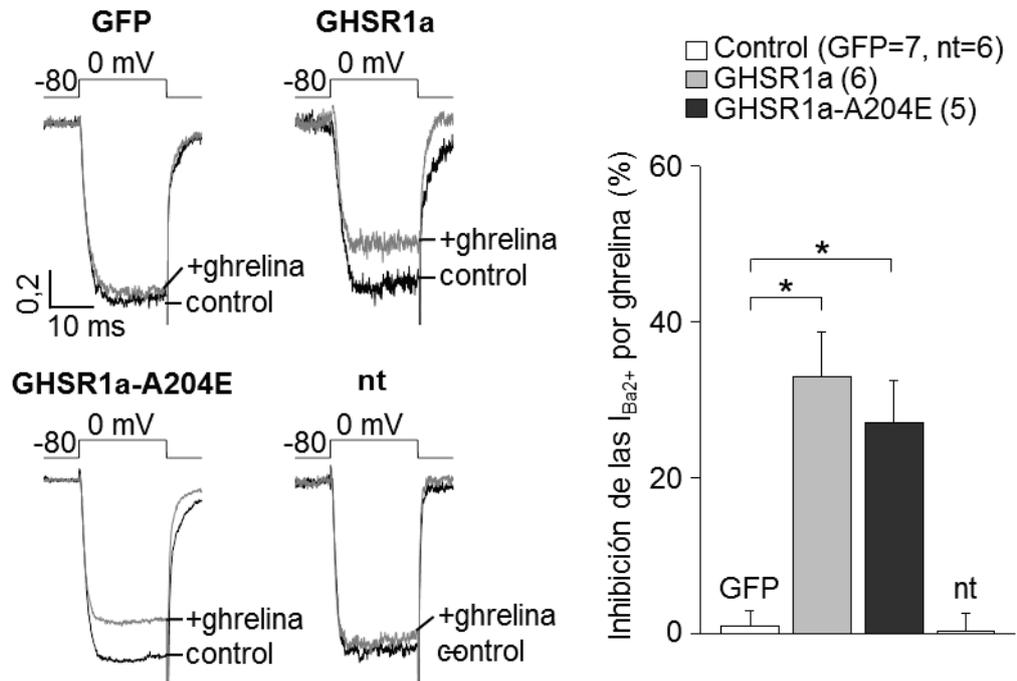


Figura 19. La actividad de GHSR1a dependiente de ghrelina inhibe las corrientes Ca_v nativas en neuronas hipotalámicas. Trazos representativos de corrientes de Ba^{2+} (izquierda) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en neuronas hipotalámicas de rata transfectadas con GFP, GHSR1a, GHSR1a-A204E o no transfectadas (nt) antes (control) y después (+ghrelina) de la aplicación de 500 nM de ghrelina; y valores promedio de los % de inhibición de la aplicación de ghrelina en las mismas en las mismas condiciones. El n se detalla entre paréntesis, ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto a la condición control (GFP).

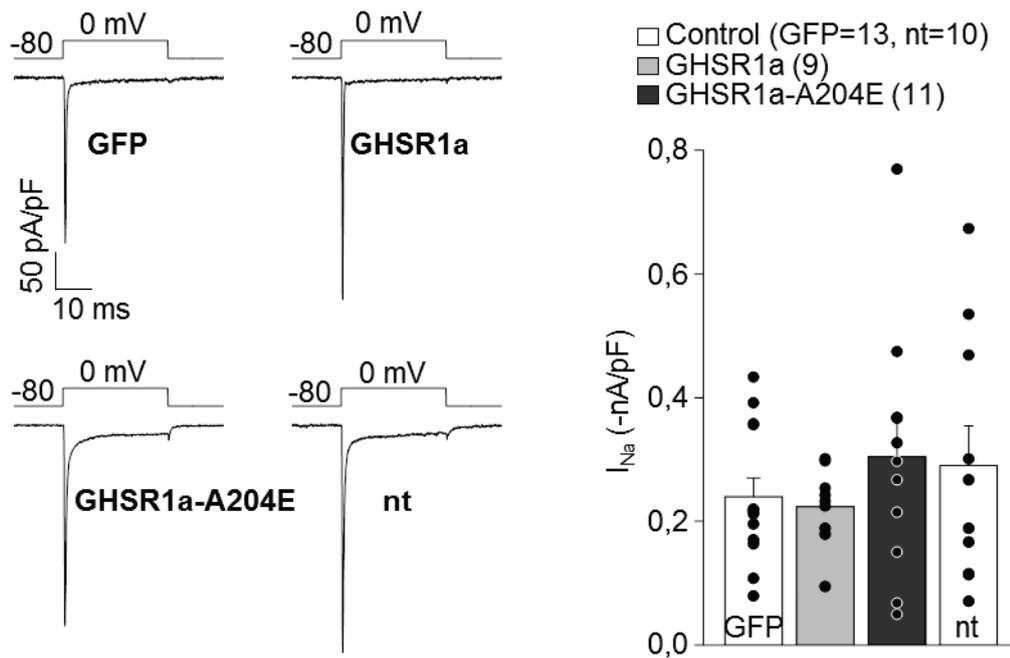


Figura 20. La expresión de GHSR1a no modifica las corrientes de Na^{2+} nativas sensibles a TTX en neuronas hipotálamicas. Trazos representativos de corrientes de Na^{2+} (izquierda) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en neuronas hipotálamicas de rata transfectadas con GFP, GHSR1a, GHSR1a-A204E o no transfectadas (nt); y valores promedio de la amplitud de corriente de Na^{2+} de las mismas en las mismas condiciones. El n se detalla entre paréntesis.

Dado que encontramos que la actividad de GHSR1a impacta negativamente sobre los principales Ca_v pre-sinápticos: $Ca_v2.1$ (que median las corrientes de tipo P/Q) y $Ca_v2.2$ (que median las corrientes de tipo N), determinamos la contribución de estas corrientes a la corriente Ca_v total de las neuronas que expresaban GHSR1a-YFP o GHSR1a-A204E-YFP. Para ello, utilizamos toxinas bloqueantes específicas de las corrientes de tipo P/Q y N: ω -agatoxina-IVA y ω -conotoxina-GVIA, respectivamente. Realizamos los registros de las corrientes Ca_v y aplicamos secuencialmente 0,2 μ M ω -agatoxina-IVA y 1 μ M ω -conotoxina-GVIA. Adicionalmente, en algunos casos aplicamos ghrelina para evaluar el impacto de la activación de GHSR1a dependiente de agonista sobre las distintas corrientes Ca_v . En estos experimentos encontramos que las neuronas que expresaban GHSR1a-YFP mostraban un porcentaje menor de bloqueo de las corrientes por ω -conotoxina-GVIA y ω -agatoxina-IVA en comparación con las que expresaban GHSR1a-YFP-A204E y las condiciones control (figura 21). Además, tras la aplicación de ghrelina las neuronas que expresaban los receptores también demostraron un porcentaje menor de bloqueo de las corrientes por ω -conotoxina-GVIA y ω -agatoxina-IVA (figura 21). De acuerdo

con estos resultados, la actividad constitutiva y la dependiente de ghrelina del GHSR1a inhiben las corrientes nativas Ca_v2 de tipo N ($Ca_v2.2$) y P/Q ($Ca_v2.1$) de neuronas hipotalámicas de rata.

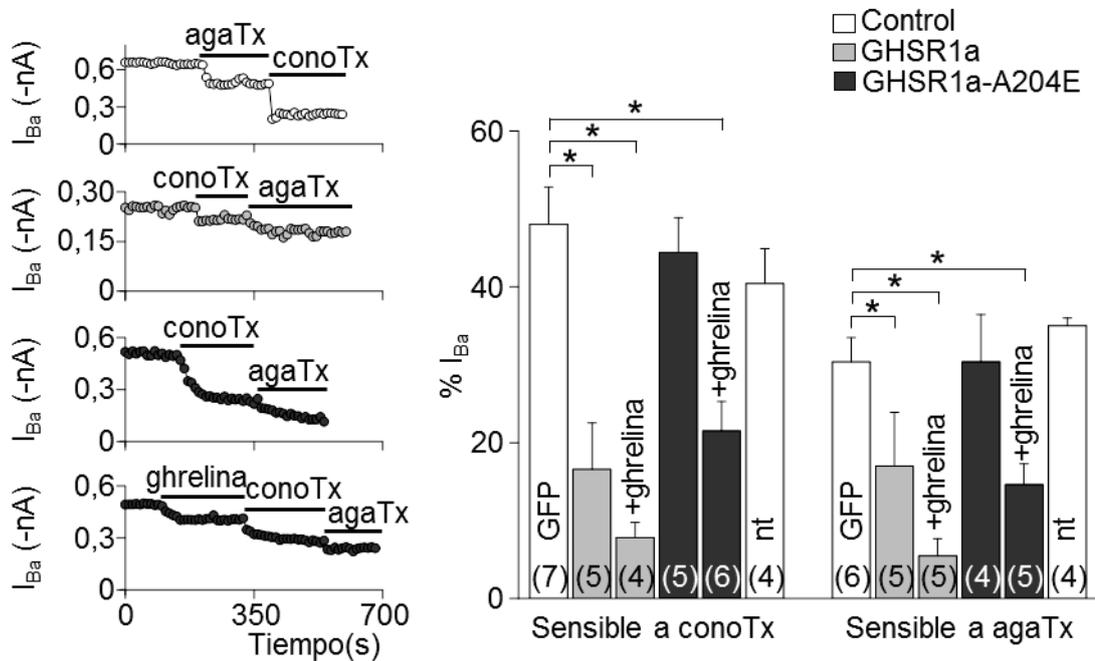


Figura 21. La actividad constitutiva y la dependiente de ghrelina de GHSR1a inhiben las corrientes N y P/Q nativas en neuronas hipotalámicas. Curso temporal de los picos de corriente Ba^{2+} (izquierda) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en neuronas hipotalámicas de rata transfectadas con GFP, GHSR1a, GHSR1a-A204E o no transfectadas (nt) con la aplicación o no de 500 nM de ghrelina, 0,2 μ M de agatoxina (agaTx) y 1 μ M conotoxina (conoTx); y valores promedio de los % de corriente Ba^{2+} (derecha) sensibles a la aplicación de 1 μ M conotoxina (conoTx) o 0,2 μ M de agatoxina (agaTx) sin o con la aplicación de 500 nM de ghrelina en las mismas condiciones descritas previamente. El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (GFP).

Dado que GHSR1a se expresa solamente en algunas poblaciones neuronales específicas dentro de determinados núcleos hipotalámicos, la identificación de las neuronas que nativamente expresan GHSR1a es fundamental para poder entender como su actividad modifica sus efectores naturales. Es así, que en colaboración con el grupo del Dr. Jeffrey Zigman (Universidad de Texas, Estados Unidos) participamos de la validación de una línea de ratón reportero de GHSR originada en el *Mouse Mutant Regional Resource Center* (STOCK Tg(Ghsh-EGFP)KZ65Gsat/Mmucd, #030942-UCD, Universidad de California, Estados Unidos) (Mani et al., 2014). Estos ratones transgénicos expresan la proteína eGFP (del inglés, *enhanced green fluorescent*

protein) bajo el control del promotor del gen GHSR (ratones GHSR-eGFP), lo que permite identificar directamente las células que expresan GHSR1a por medio de la visualización de la fluorescencia verde producida por la excitación de la proteína eGFP con luz UV. Este modelo fue generado en el marco del proyecto “Atlas de la expresión génica del sistema nervioso” (*Gene Expression Nervous System Atlas-GENSAT*) de la Universidad de Rockefeller (Nueva York, Estados Unidos). En algunas regiones del cerebro como en el hipocampo, la amígdala, el bulbo olfatorio y la corteza cerebral este ratón GHSR-eGFP presentó una alta señal de eGFP pero sin niveles detectables de señal de GHSR1a por hibridación *in situ* (Mani et al., 2014). Nosotros elegimos, entre esos sitios, el hipocampo para analizar funcionalmente, y así validar o no, la señal de eGFP como reportera de la expresión de GHSR1a utilizando registros electrofisiológicos. Para ello, evaluamos un efecto conocido de la activación de GHSR1a por ghrelina: la inhibición de las corrientes de los canales de K^+ $K_v7/KCNQ$. Los $K_v7/KCNQ$ son canales activados por voltaje que median las corrientes neuronales M, corrientes sub-umbrales de K^+ responsables de modular la frecuencia de disparos de potenciales de acción (Brown y Passmore, 2009). Recientemente, se han identificado a los $K_v7/KCNQ$ como blancos de la actividad de GHSR1a inducida por ghrelina en distintos tipos neuronales, incluidas las neuronas piramidales del hipocampo (Shi et al., 2013). La activación de GHSR1a por ghrelina modula negativamente las corrientes M, por lo que constituyen una manera de evaluar la presencia y funcionalidad de GHSR1a en las neuronas hipocámpales con señal eGFP positiva del ratón GHSR-eGFP. Mediante la técnica de patch-clamp en la configuración célula entera con fijación del voltaje, registramos las corrientes M con la solución de mantenimiento. Para realizar los registros utilizamos un protocolo de voltaje de desactivación estándar (figura 22) (Brown y Adams, 1980; Passmore et al., 2003; Koyama y Appel, 2006). Este protocolo consiste en aplicar un pulso cuadrado a -30 mV de larga duración (500 ms), desde un potencial de mantenimiento de -20 mV, en el cual los canales $K_v7/KCNQ$ se encuentran abiertos y, se minimiza por inactivación la contribución de otras conductancias (como las corrientes de K^+ tipo A o las corrientes de Na^+). De esta manera, se pueden identificar las corrientes M por su cinética lenta de desactivación durante la aplicación del pulso hiperpolarizado, y por una cinética lenta de activación durante el retorno al potencial de mantenimiento. Realizamos los registros en neuronas de hipocampo sin o con señal verde fluorescente (eGFP - y eGFP +) de cultivos primarios del ratón GHSR-eGFP, y encontramos que todas las neuronas eGFP + respondieron a la aplicación de ghrelina (500 nM) con una inhibición de las corrientes M (figura 22).

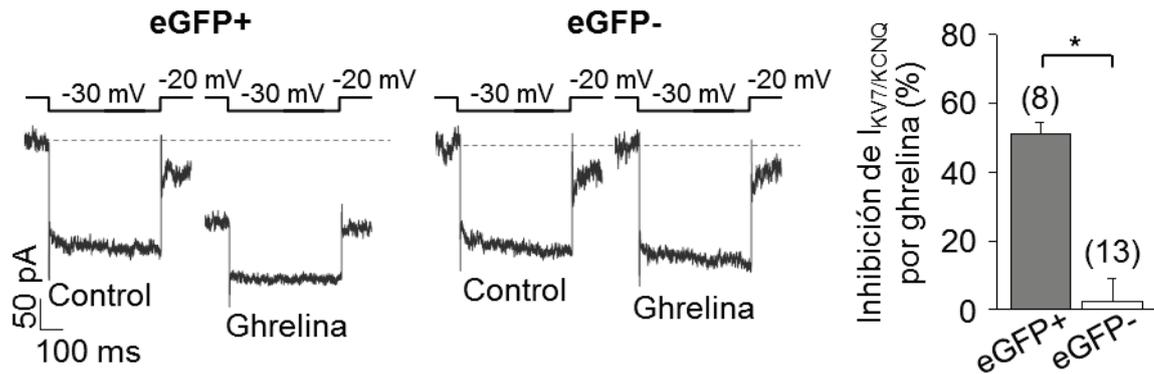


Figura 22. Ghrelina inhibe las corrientes $K_v7/KCNQ$ en neuronas del hipocampo del ratón GHSR1a-GFP. Trazos representativos (izquierda) y valores promedio de la amplitud de corrientes $K_v7/KCNQ$ (derecha) evocadas por pulsos de -30 mV de 500 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -20 mV de neuronas del hipocampo eGFP+ o eGFP- del ratón GHSR-GFP antes (Control) y después (Ghrelin) de la aplicación de 500 nM de ghrelin. El n se detalla entre paréntesis. Test t de Student, * $p < 0,05$.

Adicionalmente, el grupo de trabajo del Dr. Zigman demostró que existe una alta correspondencia entre los niveles de expresión de eGFP y de GHSR1a en regiones del cerebro como el hipotálamo, sustancia nigra y el área tegmental ventral en el ratón GHSR-eGFP (Mani et al., 2014). De este modo, nuestros experimentos muestran que aún en áreas, como el hipocampo, donde no hay una fuerte correlación entre señal de eGFP y GHSR1a, el ratón GHSR-eGFP constituye un modelo adecuado para evaluar la identificación de neuronas que expresan GHSR1a y poder así estudiar sus propiedades electrofisiológicas, funciones y respuestas.

Una vez validado el modelo de ratón GHSR-eGFP (Mani et al., 2014), evaluamos el efecto de la actividad de GHSR1a sobre los Ca_v2 pre-sinápticos en las neuronas hipotalámicas donde naturalmente se expresan. Para esto utilizamos el mismo paradigma experimental que para el estudio de las corrientes Ca_v2 en las neuronas de rata transfectadas: comparamos las corrientes Ca_v registradas con 10 mM de Ba^{2+} como ion de carga en la solución externa en neuronas GHSR1a positivas (eGFP +) y GHSR1a negativas (eGFP -). Aplicamos 100 μ M de $CdCl_2$, para determinar que las corrientes de Ba^{2+} eran mediadas por los Ca_v , y encontramos que las corrientes de Ba^{2+} fueron completamente inhibidas en ambos tipos de neuronas (porcentaje de inhibición: eGFP + = $99,91 \pm 2,51$, n = 5, ns del 100 %; eGFP - = $99,28 \pm 0,98$, n = 5, ns del 100 %, prueba t de Student, $p > 0,05$). Posteriormente comparamos las corrientes entre neuronas eGFP + y eGFP -, y observamos que las neuronas eGFP + mostraron corrientes de Ba^{2+} significativamente más pequeñas que

las eGFP - (figura 23), mientras que la dependencia del voltaje de las curvas IV no fue diferente entre las corrientes de las neuronas eGFP + y de las eGFP - (figura 23). Por otro lado, aplicamos ghrelina, y observamos una inhibición del ~ 20 % únicamente en las corrientes de Ba^{2+} de neuronas eGFP + (figura 23). Posteriormente, utilizamos ω -conotoxina-GVIA y ω -agatoxina-IVA para estimar las contribuciones de las corrientes N ($Ca_v2.2$) y P/Q ($Ca_v2.1$), respectivamente. Encontramos que las corrientes de Ba^{2+} fueron bloqueadas en menor medida por ω -conotoxina-GVIA y ω -agatoxina-IVA en neuronas eGFP + que en neuronas eGFP - tanto en el caso de existir una aplicación previa o no de ghrelina (figura 24). Sin embargo, las corrientes Na_v sensibles a TTX de las neuronas eGFP + y eGFP - no fueron diferentes ($p = 0,487$, prueba t de Student; figura 25). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la actividad nativa de GHSR1a en neuronas hipotalámicas modula negativamente las corrientes de Ca^{2+} tipo N y P/Q.

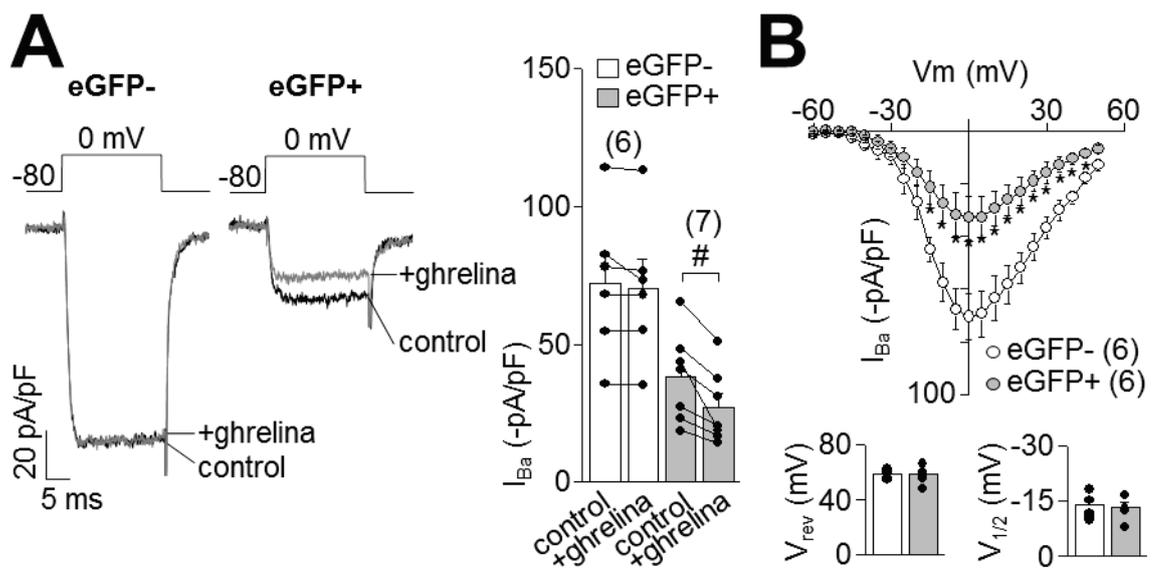


Figura 23. La actividad de GHSR1a nativo reduce las corrientes Ca_v nativas en neuronas hipotalámicas. **(A)** Trazos representativos (izquierda) y valores promedio de la amplitud de las corrientes de Ba^{2+} (derecha) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en neuronas hipotalámicas del ratón GHSR-GFP expresando (eGFP+) o no (eGFP-) GHSR, antes (control) y después (+ghrelina) de la aplicación de 500 nM de ghrelina. **(B)** Curvas IV de las corrientes de Ba^{2+} evocadas por el protocolo de IV, y los parámetros V_{rev} y $V_{1/2}$. El n se detalla entre paréntesis. Tests t de Student, # (test con muestras apareadas) y * (test con muestras independientes) $p < 0,05$.

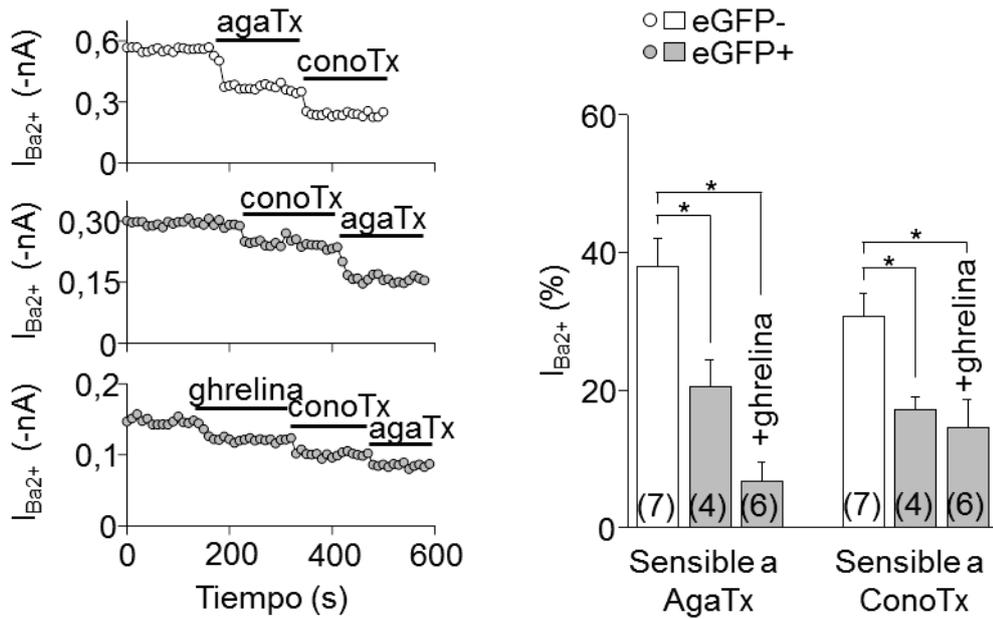


Figura 24. La actividad de GHSR1a nativo inhibe las corrientes N y P/Q nativas en neuronas hipotalámicas. Curso temporal de los picos de corriente de Ba^{2+} (izquierda) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, de neuronas hipotalámicas del ratón GHSR-GFP expresando (eGFP+) o no (eGFP-) GHSR1a con la aplicación o no de 500 nM de ghrelina, 0,2 μ M de agatoxina (agaTx) y 1 μ M conotoxina (conoTx); y valores promedio de los % corriente de Ba^{2+} (derecha) sensibles a 0,2 μ M de agatoxina (agaTx) y 1 μ M conotoxina (conoTx) sin o con la aplicación de 500 nM de ghrelina en las mismas condiciones descritas previamente. El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Dunnett, * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (eGFP-).

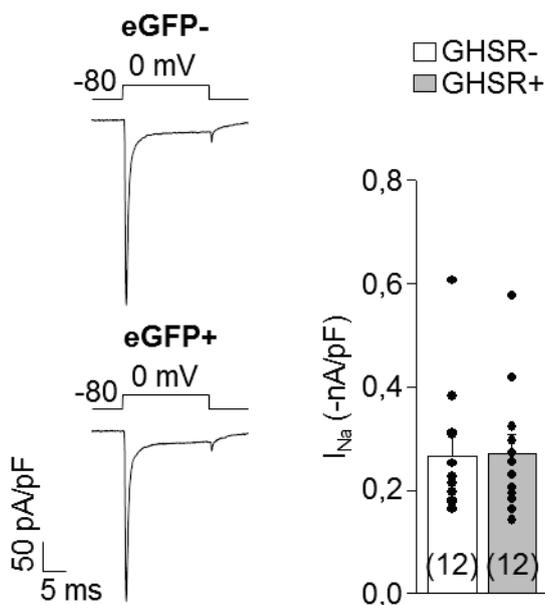


Figura 25. La expresión nativa de GHSR1a no modifica las corrientes nativas de Na^+ sensibles a TTX en neuronas hipotalámicas. Trazos representativos de corrientes de Na^+ (izquierda) evocadas por pulsos a 0 mV de 15 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en neuronas hipotalámicas del ratón GHSR-GFP expresando (eGFP+) o no (eGFP-) GHSR; y valores promedio de la amplitud de corriente de Na^+ . El n se detalla entre paréntesis.

Impacto fisiológico de la actividad constitutiva de GHSR1a en neuronas del hipotálamo

Cuando ghrelina se une a su receptor GHSR1a en el soma o las dendritas proximales de neuronas hipotalámicas, provoca un aumento tanto de la actividad transcripcional como de la actividad eléctrica, mediando respuestas fisiológicas complejas y específicas como el aumento de apetito y la ingesta de alimento (Cowley et al., 2003; Aponte et al., 2011). Por otro lado, GHSR1a posee también una localización pre-sináptica en el hipotálamo (Cowley et al., 2003), cuya activación podría contribuir a la activación neuronal. Los Ca_v2 pre-sinápticos son los principales mediadores de la liberación de neurotransmisores tras la llegada de potenciales de acción, y constituyen blancos muy sensibles a la modulación por GPCRs (Zamponi y Currie, 2013). Dado que encontramos que la actividad constitutiva y la dependiente de agonista de GHSR1a inhiben los Ca_v2 pre-sinápticos, evaluamos el impacto de este efecto sobre la neurotransmisión.

Más de la mitad de los contactos sinápticos que inervan determinados núcleos hipotalámicos como el paraventricular, el arcuato o el supra-óptico son producidos por terminales GABAérgicas (Decavel y Van den Pol, 1990). Esto genera que la actividad de poblaciones neuronales dentro de esos núcleos esté controlada por un tono GABAérgico inhibitorio constante. Así, reducciones en el nivel de liberación de GABA tónico en estas terminales desencadenaría un aumento de la actividad de algunas poblaciones neuronales. Estudios previos sugieren que la actividad de GHSR1a por ghrelina utilizaría este mecanismo de reducción del tono GABAérgico en neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato, generando de manera indirecta una activación neuronal (Cabral et al., 2012). En este contexto, estudiamos si cambios en la liberación de GABA ocurren como consecuencia de la regulación de la actividad constitutiva de GHSR1a sobre los Ca_v2 pre-sinápticos en el hipotálamo.

Primeramente, realizamos experimentos de liberación de [H3]-GABA de explantes del núcleo arcuato controlando la expresión de GHSR1a de manera fisiológica. Dado que los niveles de ARNm de GHSR1a aumentan considerablemente en condiciones de ayuno en el hipotálamo (Petersen et al., 2009), utilizamos un protocolo de 48 horas de ayuno en ratones para incrementar la expresión de GHSR1a y consecuentemente los niveles de actividad constitutiva. Para corroborar que efectivamente nuestro protocolo modificaba la expresión de GHSR1a en el hipotálamo, medimos ARNm por RT-PCR, y encontramos que los ratones expuestos a un ayuno prolongado tenían niveles de ARNm de GHSR1a 1,5 veces más altos que los ratones alimentados *ad libitum* (condición control) (figura 26.A). Evaluamos, en ambas

condiciones la liberación de [3H]-GABA de explantes del núcleo arcuato, un núcleo hipotalámico con alta expresión de GHSR1a y donde la neurotransmisión GABAérgica es esencial para la regulación de la ingesta de alimento (Wu et al., 2009), evocando la liberación de neurotransmisores con la aplicación de una solución despolarizante con altas concentraciones de K^+ (56 mM). Observamos en estos experimentos, una reducción en la liberación de [3H]-GABA de los explantes de los ratones ayunados en comparación con los alimentados *ad libitum* (figura 26.B). Así, nuestros resultados sugieren que la reducción en la liberación de GABA inducida por ayuno depende de la actividad constitutiva de GHSR1a.

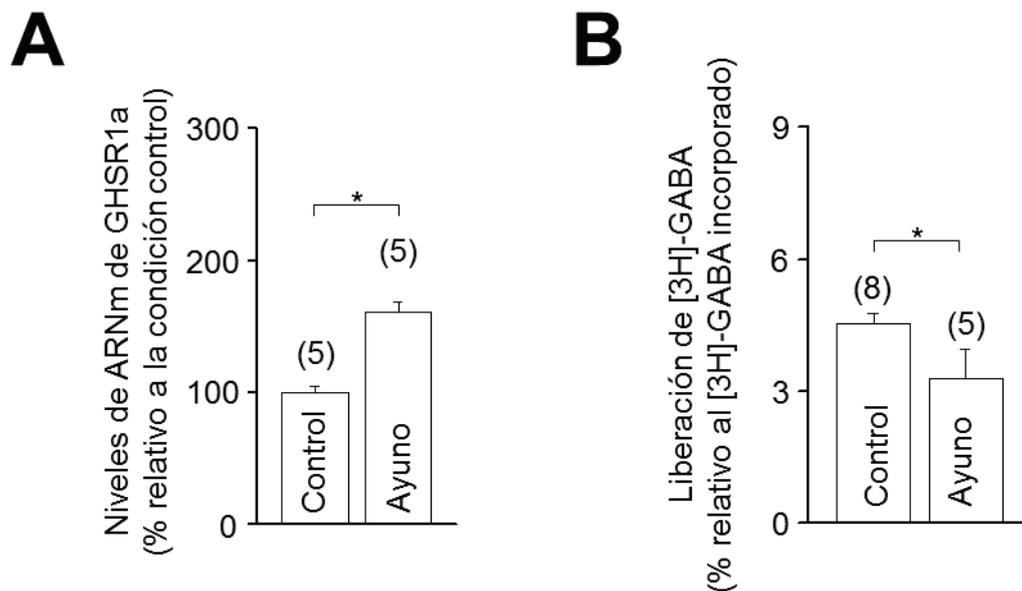


Figura 26. La liberación de GABA es reducida por ayuno, y probablemente inducida por el aumento de la expresión de GHSR1a en el núcleo arcuato hipotalámico. **(A)** Niveles de ARNm de GHSR1a (expresados como % relativos a la condición control) de hipotálamos de ratones alimentados *ad libitum* (Control) y animales ayunados durante 48 horas (Ayuno). **(B)** Liberación de [3H]-GABA de explantes del núcleo arcuato hipotalámico (expresado como % relativo al [3H]-GABA incorporado en cada caso) en las mismas condiciones descritas previamente. El n se detalla entre paréntesis. Test t de Student, * p < 0,05.

Dado que la actividad constitutiva de GHSR1a inhibe de manera drástica las corrientes Ca_v2 pre-sinápticas y posiblemente la liberación de GABA en explantes, evaluamos si estos efectos estaban relacionados midiendo el impacto de la actividad GHSR1a sobre la neurotransmisión GABAérgica en cultivos hipotalámicos. Para ello, realizamos patch-clamp en configuración de célula entera con fijación de voltaje y registramos, primeramente corrientes post-sinápticas inhibitorias (IPSCs, del inglés

inhibitory postsynaptic currents) evocadas por potenciales de campo que provocan potenciales de acción en todas las neuronas localizadas entre los electrodos paralelos. Como modelo de estudio utilizamos neuronas hipotalámicas de cultivos primarios de ratones nulos para GHSR (ratones GHSR-KO). Estos ratones, poseen el gen GHSR modificado por la inserción de un TBC (del inglés *transcriptional blocking cassette*) que bloquea la transcripción, flanqueado por secuencias loxP, ubicadas corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción y corriente arriba del sitio de comienzo de la traducción del gen GHSR murino. De esta manera, este modelo no estándar de ratón “*knockout*” carece completamente de la expresión de GHSR1a (Zigman et al., 2005). Adicionalmente, para evaluar la actividad de GHSR1a transdujimos los cultivos primarios con vectores lentivirales conteniendo la secuencia de GHSR1a-YFP o GHSR1a-A204E-YFP. Los vectores de transferencia GHSR1a-YFP y GHSR1a-A204E-YFP fueron sub-clonados en nuestro laboratorio y contienen una secuencia promotora de expresión débil (ver materiales y métodos). Esta estrategia de expresión heteróloga, nos permitió obtener cultivos neuronales primarios con un porcentaje alto de neuronas expresando el receptor, para poder estudiar de esta manera un posible efecto pre-sináptico modulador de la liberación de GABA.

En estas condiciones analizamos los IPSC en cultivos neuronales del ratón GHSR-KO transducidos o no con los vectores lentivirales anteriormente descritos. Encontramos que la amplitud de las IPSCs eran significativamente menores en neuronas de cultivos que expresaban GHSR1a-YFP en comparación con las que expresaban GHSR1a-A204E-YFP o las de los cultivos no transducidos (figura 27.A). Por otro lado, aplicamos ghrelina de manera aguda en las tres condiciones, y encontramos que la amplitud de las IPSCs se redujeron ~ 20 % sólo en los cultivos que expresaban los receptores (figura 27.B), confirmando además que ambas variantes eran funcionales. Con la finalidad de distinguir si la inhibición de las IPSC estimuladas por potenciales de acción ocurre en forma dependiente de la inhibición de los Ca_v pre-sinápticos por GHSR1a decidimos a continuación realizar una maniobra experimental que permite liberar GABA de las terminales sinápticas en forma independiente de la acción de los Ca_v . Así, registramos las respuestas post-sinápticas inhibitorias estimuladas por la aplicación de una solución hiperosmótica (0,5 M de sacarosa) en presencia de 1 μ M de TTX. Esta estrategia permite evocar una liberación masiva de neurotransmisor de una manera completamente independiente de la entrada de Ca^{2+} por los Ca_v2 pre-sinápticos (Rosenmund y Stevens, 1996; Raingo et al., 2012). Cuando comparamos las respuestas evocadas por sacarosa no encontramos diferencias significativas entre las tres condiciones analizadas (carga transferida: $6,17 \pm 2,07$, $n = 4$; $7,28 \pm 1,95$, $n = 9$; y $6,47 \pm 1,74$ nC, $n = 7$;

respectivamente; ANOVA, Dunnet's post-test, $p > 0,05$). Por último, para determinar una posible contribución de mecanismos post-sinápticos en los efectos que observamos, examinamos la amplitud de las IPSCs miniaturas y espontáneas (mIPSCs). La amplitud de las mIPSCs es una medida que refleja la eficacia sináptica por disponibilidad de receptores ionotrópicos en la membrana post-sináptica, en este caso receptores de tipo GABA_A, bajo condiciones farmacológicas que bloqueen los potenciales de acción, y por extensión la actividad en red de las neuronas (en presencia de 1 μ M de TTX). Así, medimos y comparamos las amplitudes de las mIPSCs, y encontramos que los cultivos que expresaban GHSR1a-YFP tenían mIPSCs levemente mayores a la de los cultivos que expresaban GHSR-A204E-YFP y a los no transducidos ($-36,29 \pm 0,53$ pA, $n = 11$; $-33,27 \pm 0,96$ pA, $n = 4$ y $-32,31 \pm 0,57$ pA, $n = 3$, respectivamente; ANOVA, Tukey's post-test $p < 0,05$), indicando la ausencia de un efecto post-sináptico en la reducción del tamaño de las IPSC por la actividad de GHSR1a.

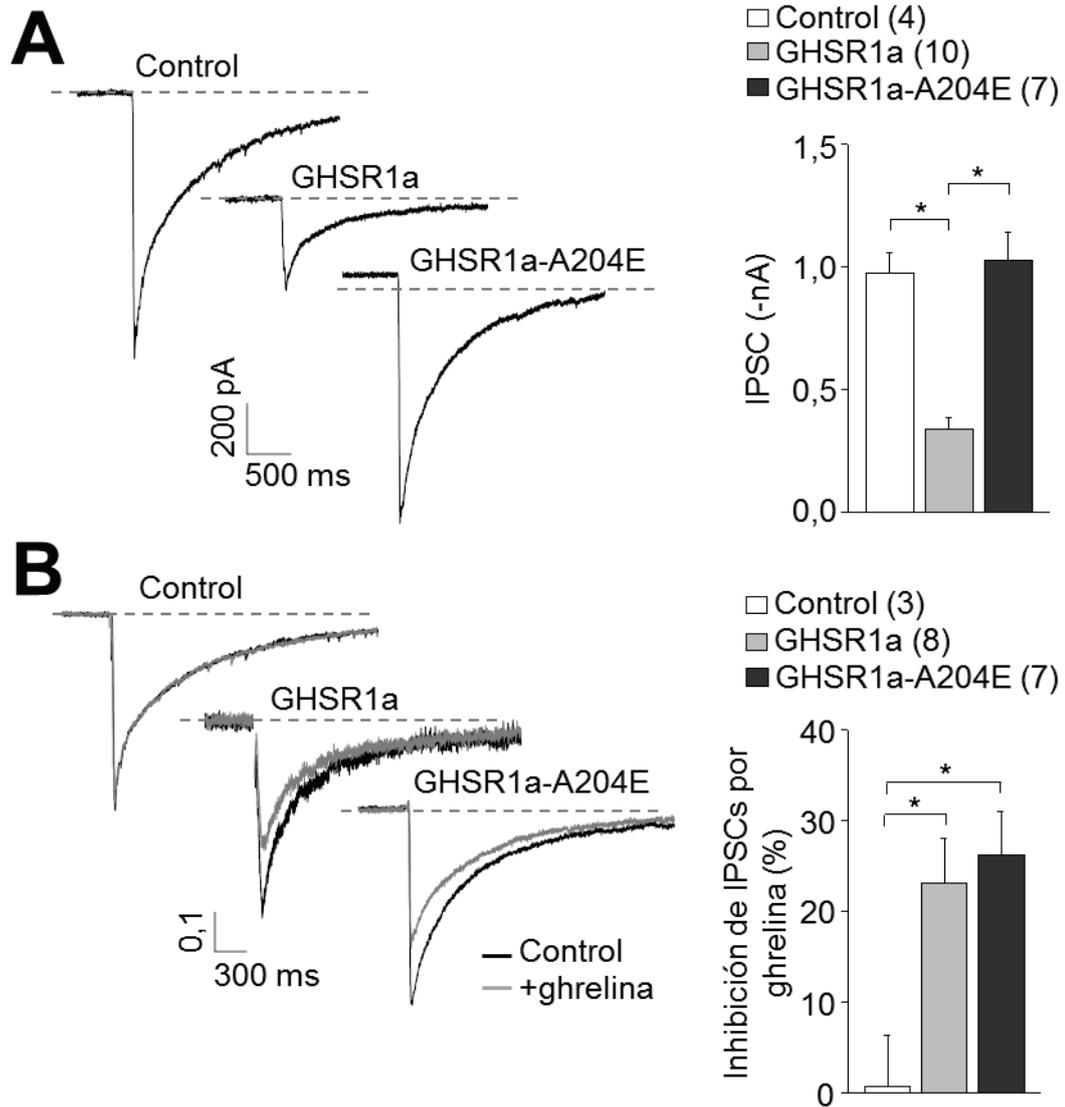


Figura 27. La actividad constitutiva y la dependiente de ghrelina de GHSR1a reducen las respuestas inhibitorias post-sinápticas en neuronas hipotálamicas mediadas por mecanismos dependientes de la apertura de los Ca_v . **(A)** Trazos representativos de IPSCs evocados por estimulación de campo en cultivos de neuronas hipotálamicas transducidos con vectores lentivirales conteniendo la secuencia de GHSR1a-YFP (GHSR1a) o GHSR1a-A204E-YFP (GHSR1a-A204E) o no (Control); y valores promedio de la amplitud de los IPSCs en las mismas condiciones. **(B)** Trazos representativos de IPSCs normalizados en las mismas condiciones descritas previamente, antes (Control) y después de la aplicación de 500 nM de ghrelina (+ghrelin); y valores promedio de la inhibición de los IPSCs por 500 nM de ghrelina. El n se detalla entre paréntesis. ANOVA post-test de Tukey, * $p < 0,05$.

De esta manera nuestros resultados sugieren que la liberación de GABA mediada por potenciales de acción y por el ingreso de Ca^{2+} a través los Ca_v2 es sensible de ser modulada negativamente por la actividad constitutiva de GHSR1a.

Cap II: Discusión



Como ya explicamos previamente, los Ca_v2 pre-sinápticos son uno de los principales blancos de la actividad de muchos GPCRs. La activación de estos receptores puede modular la actividad de los Ca_v2 , inhibiéndolos en la mayoría de los casos (Zamponi y Currie, 2013). Los Ca_v2 inician el mecanismo de liberación de neurotransmisores en las terminales neuronales tras la llegada de potenciales de acción, por lo que su regulación tiene una poderosa influencia en la eficacia sináptica. En el capítulo II de esta tesis describimos cómo el receptor de ghrelina, el GPCR conocido con mayor actividad constitutiva, impacta modulando negativamente los Ca_v2 pre-sinápticos, y sus posibles implicancias en la neurotransmisión inhibitoria en el hipotálamo.

GHSR1a pertenece a la súper-familia de los GPCR, y hasta el momento constituye el único receptor conocido de la hormona ghrelina. GHSR1a posee la peculiaridad de poder alcanzar un estado activado sin la unión de ligandos. Esta actividad conocida como actividad constitutiva compone más del 50 % de la actividad máxima del receptor en experimentos de acumulación de inositol fosfato, un producto de las vías de señalización de Gq a través de fosfolipasa C, en un sistema heterólogo de expresión (Holst et al., 2003). La activación de GHSR1a tiene múltiples efectores, entre ellos canales iónicos y diversas enzimas. Nosotros describimos por primera vez que los Ca_v son blancos tanto de la actividad constitutiva de GHSR1a como de su actividad dependiente de ghrelina.

En esta tesis demostramos que tanto la activación de GHSR1a constitutiva como la dependiente de ghrelina inhiben drásticamente las corrientes de Ca^{2+} de los Ca_v2 pre-sinápticos. La inhibición de Ca_v2 por ambos tipos de activación de GHSR1a presenta diferencias fundamentales, sugiriendo que existen mecanismos o vías de señalización intracelulares específicas para cada uno de ellas. Estas diferencias incluyen una reducción tónica de las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ de manera directamente proporcional a los niveles de expresión cuando el receptor está activo constitutivamente, mientras que la inhibición mediada por la unión de ghrelina fue aguda, reversible e independiente de los niveles de expresión de GHSR1a. Por otro lado, la pre-incubación con su agonista inverso, el SPA, ocluye completamente el efecto de la actividad constitutiva de GHSR1a aunque sólo cuando se pre-incuba durante gran parte del tiempo de expresión de los canales, siendo totalmente inefectiva su aplicación aguda. Además, el mutante GHSR1a-A204E, que carece de actividad constitutiva, no modifica las corrientes Ca_v2 de manera basal aunque es capaz de inhibirlas cuando se activa por unión de ghrelina. Así, este conjunto de evidencias nos sugieren que las vías que median el efecto constitutivo y agudo de GHSR1a sobre los Ca_v2 son diferentes.

Desde su descubrimiento, GHSR1a ha sido identificado como un GPCR acoplado a proteína Gq (GqPCR) (Howard et al., 1996). Tanto su activación constitutiva como dependiente de ghrelina producen incrementos transitorios en las concentraciones intracelulares de inositol trifosfato, de Ca^{2+} , y de la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Howard et al., 1996; Holst et al., 2003; Malagon et al., 2003; Holst et al., 2005; Shi et al., 2013). Todos estos eventos celulares son atribuidos a la activación específica de la proteína Gq (Lyon et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la co-expresión de Gαq Q209L/D277N9 (Yu y Simon, 1998), no bloquea la inhibición de los Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR1a. Gαq Q209L/D277N9 antagoniza efectivamente las acciones de otros GqPCR en células HEK 293T y en neuronas (Lauckner et al., 2005; Kumar et al., 2008; Rangel et al., 2010). Inesperadamente encontramos que el efecto inhibitorio de GHSR1a sobre las corrientes Ca_v2 es bloqueado sólo por pre-incubaciones con PTx, una toxina bacteriana que cataliza la ribosilación de ADP específicamente en las proteínas Gα de las familias Gi y Go imposibilitando que alcancen una conformación del estado activo (Locht et al., 2011). En este sentido, existen antecedentes demostrando un acoplamiento de GHSR1a a Gi/o. Así, se ha demostrado en experimentos *in vivo* e *in vitro* en células β-pancreáticas de rata, que ghrelina disminuye tanto la liberación de insulina como el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} estimulada por glucosa por mecanismos sensibles a PTx (Dezaki et al., 2007). En otro estudio, se ha confirmado por ensayos de *binding* de [35 S]-GTPγS en células HEK 293T que GHSR1a puede activar Gαo1, tanto de manera constitutiva como evocada por ghrelina, y que la activación basal de Gαo1 por GHSR1a puede ser revertida por la aplicación de SPA (Bennett et al., 2009). Por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con dichas observaciones anteriores, y demuestran que la activación de Gi/o por la actividad constitutiva de GHSR1a media la reducción de las corrientes Ca_v2 .

Alrededor del 15 % de los GPCRs despliegan actividad en ausencia de ligando (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002), siendo el receptor de ghrelina el que posee mayor actividad constitutiva entre ellos (Holst et al., 2003). Si bien los Ca_v2 son muy sensibles a la activación de GPCRs, se conoce muy poco sobre el impacto que tiene la actividad constitutiva sobre los Ca_v s. Estudios previos demuestran que la expresión del receptor de nociceptina, ORL1 (del inglés *opioid receptor-like 1*), inhibe corrientes Ca_v tanto en sistemas heterólogos de expresión como en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Beedle et al., 2004). Este efecto, al igual que nuestros resultados sobre el GHSR1a, es dependiente de los niveles de expresión del receptor. Sin embargo, a diferencia de nuestros hallazgos, el efecto basal de ORL1 es específico para las corrientes $Ca_v2.2$. Adicionalmente, la reducción de las corrientes $Ca_v2.2$ por ORL1 es

completamente ocluida por incubaciones con PTx, indicando que este mecanismo es dependiente de la activación de Gi/o al igual que en el caso de GHSR1a. Sin embargo, otros estudios muestran que este GPCR alcanza niveles muy bajos de activación basal (Kam et al., 2002), por lo que no hay observaciones concluyentes de que la actividad constitutiva de ORL1 module a los $Ca_v2.2$, siendo una posibilidad que este efecto se deba a la activación de ORL1. Por otro lado, se ha descrito que el receptor de glutamato, mGluR1 (del inglés *metabotropic glutamate receptor subtype 1*), un GqPCR, disminuye significativamente las corrientes $Ca_v2.1$ en células HEK 293T y en neuronas de Purkinje (Kitano et al., 2003). Esta reducción atribuida a una activación constitutiva de mGluR1, a diferencia de GHSR1a y de ORL1, no es atenuada por PTx ni por inhibidores de las vías de señalización dependientes de Gq. Así mismo, se ha demostrado que mGluR1 y ORL1 se asocian físicamente a $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ respectivamente, formando complejos GPCR- Ca_v (Kitano et al., 2003; Beedle et al., 2004) lo que explicaría espacialmente una actividad independiente de ligando. Si bien este impacto negativo sobre la actividad de los Ca_v2 es atribuido a la actividad constitutiva de ORL1 y mGluR1, en ningún caso se utilizaron herramientas que lo demuestren directamente. En nuestros estudios sobre la actividad constitutiva de GHSR1a realizados en esta tesis demostramos por primera vez que la activación constitutiva de un GPCR reduce drásticamente las corrientes Ca_v pre-sinápticas, utilizando tanto herramientas farmacológicas (uso de un agonista inverso) como genéticas (uso del subtipo GHR1a-A204E). Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar si GHSR1a interacciona físicamente con los Ca_v2 , y si este mecanismo es requisito para producir la modulación independiente de agonista.

También abordamos aspectos mecanísticos de la reducción de las corrientes Ca_v2 por la activación constitutiva de Gi/o por GHSR1a. Evaluamos si el efecto era mediado por la actividad de la subunidad G α i/o, G β γ o ambas. Dado que el tratamiento con PTx no permite distinguir la contribución de cada subunidad de la proteína trimérica Gi/o, utilizamos dos estrategias diferentes para determinar la participación de G β γ . La primera consistió en evaluar el efecto de la aplicación de un pre-pulso despolarizante sobre las corrientes $Ca_v2.2$ inhibidas crónicamente por la actividad constitutiva de GHSR1a. Esta estrategia se basa, como explicamos antes, en que la inhibición de las corrientes Ca_v2 mediada por G β γ es removible por despolarización. De este modo, la aplicación de pulsos a voltajes altos permite evaluar su contribución. Por otro lado, la segunda estrategia consistió en la co-expresión de MAS-GRK2-ct, un péptido que impide que G β γ actúe sobre sus efectores (Penela et al., 2010). En estos experimentos observamos que ni la aplicación del pre-pulso ni la co-expresión de MAS-GRK2-ct eliminaban la inhibición de los $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de

GHSR1a. En reportes previos se demostró que, para el caso de ORL1, la inhibición de los $Ca_v2.2$ es atenuada por la aplicación del pre-pulso y por el bloqueo de $G\beta\gamma$ (Beedle et al., 2004), por lo que GHSR1a reduciría las corrientes $Ca_v2.2$ por un mecanismo diferente al utilizado por ORL1. De este modo, nuestros resultados descartan que la activación basal de GHSR1a inhiba los $Ca_v2.2$ por un mecanismo mediado únicamente por la subunidad $G\beta\gamma$, sugiriendo por otro lado la participación de $G\alpha_i$ o una combinación de ambas.

Varias evidencias nos permitieron plantear que la reducción de las corrientes basales de los Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR1a se debía a una menor densidad de canales en la membrana plasmática, a saber: (1) durante los registros de patch-clamp en experimentos donde los canales estaban inhibidos constitutivamente por GHSR1a no observábamos corrientes de *gating*, (2) ni la aplicación de pre-pulsos ni la co-expresión de MAS-GRK2-ct redujeron la inhibición, (3) la aplicación aguda de SPA no tuvo efecto sobre la inhibición, y (4) cuando ocluíamos el efecto de la actividad constitutiva con SPA, su lavado no volvía a inhibir las corrientes. Consistentemente con estas evidencias, al realizar experimentos de *western blot* encontramos una reducción drástica de la cantidad de Ca_v2 en membrana sólo cuando GHSR1a estaba co-expresado. De esta manera, encontramos que la inhibición de las corrientes Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR1a es producto de una reducción de la densidad de canales en membrana plasmática. Entender qué mecanismos lentos relacionados al tráfico del canal están implicados en este efecto es el objetivo de los próximos proyectos de nuestro laboratorio.

En esta tesis describimos por primera vez que la activación de GHSR1a por ghrelina inhibe los canales Ca_v pre-sinápticos. Trabajos previos demuestran que entre los blancos moleculares de la activación de GHSR1a por ghrelina existen numerosos canales iónicos. Por ejemplo, ghrelina actúa en células β -pancreáticas activando canales específicos de K^+ dependientes del voltaje, los $K_v2.1$ (Dezaki et al., 2007), activa corrientes de cloruro activadas por Ca^{2+} en ovocitos (Howard et al., 1996), e inhibe corrientes M mediadas por los canales de K^+ $K_v7/KCNQ$ en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, neuronas del ganglio de la raíz dorsal y neuronas piramidales CA1 del hipocampo (Shi et al., 2013). La familia de los Ca_v2 constituye el blanco más sensible a la modulación por agonistas de GPCRs entre todos los Ca_v , especialmente los $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, encargados de mediar la neurotransmisión en la mayoría de las sinapsis químicas (Zamponi y Currie, 2013). Si bien en algunos casos los $Ca_v2.3$ también pueden ser modulados, siempre es en menor medida que los $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (Qin et al., 1997; Shekter et al., 1997), y sus mecanismos están fuertemente sujetos a las variantes de *splicing* del canal (Page et

al., 1998; Zamponi y Currie, 2013). De esta manera, la modulación pre-sináptica de los Ca_v2 por la unión de agonistas a sus GPCRs se considera un mecanismo clave en la regulación de la actividad sináptica.

Algunos estudios previos han indagado en la modulación de los Ca_v por la acción de ghrelina sobre GHSR1a. Se ha descrito que la activación de GHSR1a por ghrelina activa directamente corrientes de Ca^{2+} de tipo L en células somatotrofas hipofisarias (Malagon et al., 2003), y tipo N en neuronas del núcleo arcuato hipotalámico (Kohno et al., 2003). En ambos casos se postula a este mecanismo como responsable del incremento del Ca^{2+} intracelular generado por ghrelina en dichos tipos celulares. Para inferir la participación de las corrientes mediadas por los Ca_v (Ca_v1 mediadores de las corrientes tipo L y $Ca_v2.2$ mediadores de las corrientes tipo N) se cuantificaron, en ambos casos, las fluctuaciones del Ca^{2+} citoplasmático sin fijación del voltaje, lo que genera serias limitaciones a la hora de interpretar la contribución de estos canales al efecto generado por ghrelina. En primer lugar, la actividad de los Ca_v no es evaluada directamente, y por consiguiente no es posible descartar que el efecto observado sea una consecuencia indirecta del impacto de la actividad de GHSR1a dependiente de ghrelina sobre otras conductancias. Así, cualquier conductancia que se modifique despolarizando y aumentando, por ende, la actividad eléctrica neuronal podría, indirectamente estimular la apertura de los Ca_v . Y en segundo lugar, si bien la actividad de los canales Ca_v1 justifica un incremento del Ca^{2+} intracelular somático, pudiendo en muchos casos disparar procesos de expresión génica, la actividad de los $Ca_v2.2$ está asociada a un incremento del Ca^{2+} a menor escala, a nivel del nano y micro-dominio en una localización pre-sináptica (Thayer y Miller, 1990; Lipscombe et al., 2004; Wheeler et al., 2012). Nuestros resultados demuestran, evaluando directamente la actividad de los Ca_v , que ghrelina inhibe las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ pre-sinápticas mediante la activación de GHSR1a tanto en un sistema de expresión heterólogo como en neuronas hipotalámicas y que esta inhibición es capaz de modificar la neurotransmisión GABAérgica.

A continuación indagamos los detalles del mecanismo de acción de la inhibición de Ca_v2 por GHSR1a cuando es activado por ghrelina. Los mecanismos probables involucrados en la activación de los GPCRs por agonistas y su impacto en la actividad de los Ca_v es un proceso más sencillo de estudiar que el de la activación constitutiva debido a que varias de estas vías se conocen en detalle hace mucho tiempo. Se sabe así que, aunque la modulación de los subtipos de la familia Ca_v2 por GPCRs comparte sus mecanismos básicos, existen sutiles diferencias entre la inhibición de los $Ca_v2.1$ y la de los $Ca_v2.2$. La inhibición producto de la interacción con la proteína $G\beta\gamma$ reduce las corrientes mediadas por los $Ca_v2.2$ en mayor grado que las

mediadas por los $Ca_v2.1$ ya sea por activación de GPCRs o por sobre-expresión de $G\beta\gamma$ (Bourinet et al., 1996; Zhang et al., 1996; Currie y Fox, 1997; Beedle et al., 2004). Estas diferencias parecen deberse a una mayor afinidad de $G\beta\gamma$ por los $Ca_v2.2$ (Colecraft et al., 2000; Zamponi y Currie, 2013). Por otro lado, la activación de GPCRs acoplados a Gq inhibe más a los canales $Ca_v2.2$ que los $Ca_v2.1$ (Suh et al., 2010), si bien las causas que subyacen estas diferencias se desconoce en la actualidad. Consistentemente, nuestros resultados demuestran que la activación de GHSR1a por ghrelina inhibe en mayor proporción los canales $Ca_v2.2$ que los $Ca_v2.1$ (~ 40 % versus ~ 20 %), siendo esta inhibición sensible a la co-expresión de Gq Q209L/D277N9 por lo que estaría mediada por la proteína Gq. La mayor inhibición de $Ca_v2.2$ con respecto a $Ca_v2.1$ mediada por GqPCRs podría contribuir a una modulación célula-específica e inclusive, sinapsis-específica, ya que se ha demostrado una distribución diferencial de estos subtipos de Ca_v2 dependiente del tipo neuronal, estado de desarrollo e inclusive en diferentes terminales sinápticas de la misma neurona (Iwasaki et al., 2000; Cao y Tsien, 2010; Ariel et al., 2012).

Siendo que $Ca_v2.2$ resultó muy sensible a la inhibición por GHSR1a mediada por ghrelina, indagamos en los posibles mecanismos responsables de este efecto, encontrando que este efecto está mediado por Gq. La modulación de los $Ca_v2.2$ mediada por la activación de los GqPCRs incluye distintas vías potenciales de señalización insensibles al voltaje. Nuestros datos revelan que la inhibición de los $Ca_v2.2$ por la actividad de GHSR1a dependiente de ghrelina, es resistente a la aplicación de un pulso despolarizante, indicando que GHSR1a activa mecanismos independientes del voltaje. Dentro de los mediadores de esta inhibición se encuentran distintos eventos y moléculas de señalización corriente abajo de la activación de fosfolipasa C β : la depleción de PIP2 de la membrana plasmática (Wu et al., 2002; Suh et al., 2010) y la generación de ácido araquidónico (Liu y Rittenhouse, 2000, 2003) o una combinación de ambas (Zamponi y Currie, 2013). En cualquiera de los casos, esta inhibición es atenuada o bloqueada cuando el complejo hetero-trimérico del Ca_v incluye la variante $Ca_v\beta_{2a}$ de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ del canal (Heneghan et al., 2009; Mitra-Ganguli et al., 2009; Suh et al., 2012). En nuestros experimentos, encontramos que, cuando medimos las corrientes $Ca_v2.2$ con la subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ formando parte del canal, la aplicación de ghrelina inhibió un 50 % menos que cuando la subunidad $Ca_v\beta_3$ formaba parte del canal. La subunidad $Ca_v\beta_{2a}$, a diferencia de la subunidad citosólica $Ca_v\beta_3$, se encuentra palmitoilada en dos residuos dentro de su extremo N-terminal (Chien et al., 1995), lo que le permite anclarse a la membrana plasmática aún en ausencia de la subunidad principal $Ca_v\alpha$ (Chien et al., 1996; Chien et al., 1998). Así, se postula que $Ca_v\beta_{2a}$ interactúa con los sitios del Ca_v2 en lo que se

una PIP2, y/o con el sitio unión del ácido araquidónico, estabilizando al canal en el primero de los casos, o bloqueando su unión al ácido araquidónico en el segundo, pero siempre atenuando la inhibición de las corrientes Ca_v2 producida por la activación de un GqPCR (Heneghan et al., 2009; Mitra-Ganguli et al., 2009; Suh et al., 2012). Así, nuestros datos concuerdan con los mecanismos postulados anteriormente. Al mismo tiempo que se desarrolló esta tesis, otro grupo ha descrito que la activación de un GqPCR cuando $Ca_v\beta_{2a}$ forma parte del canal, genera una inhibición completamente dependiente del voltaje mediada por $G\beta\gamma$ (Keum et al., 2014). Consistentemente, nuestros resultados demuestran que cuando $Ca_v\beta_{2a}$ conforma el canal, la inhibición por la activación dependiente de ghrelina de GHSR1a es completamente revertida tanto por la aplicación del pulso despolarizante como por la co-expresión de un *buffer* de $G\beta\gamma$ (MAS-GRK2-ct). De este modo cuando un GqPCR se activa y $Ca_v\beta_{2a}$ forma parte del $Ca_v2.2$, se previene una modalidad de inhibición independiente del voltaje, desenmascarando una inhibición completamente dependiente del voltaje y de la clásica acción de $G\beta\gamma$. Así, nuestros datos son consistentes con una mayor eficiencia de la activación de un GqPCR cuando forman parte del canal isoformas de $Ca_v\beta$ de tipo citosólicas, originando una inhibición resistente a períodos de alta despolarización.

Por otro lado, se han descrito otros mecanismos que pueden ser activados por GqPCRs. Cuando un agonista se une a un GqPCR, genera un cambio de conformación que no sólo activa $G\alpha_q$, sino que también habilita a la proteína $G\beta\gamma$ a unirse a diferentes efectores. Cuando activamos GHSR1a con ghrelina co-expresando MAS-GRK2-ct (tanto con $Ca_v\beta_{2a}$ como con $Ca_v\beta_3$ formando parte del canal) se bloquea completamente la inhibición de los $Ca_v2.2$. En este sentido, se ha descrito para el receptor de acetilcolina muscarínico M1 y para el receptor de neuroquinina tipo 1, ambos GqPCRs, que tras su activación por agonistas generan una inhibición independiente del voltaje de los $Ca_v2.2$ que requiere la unión de $G\beta\gamma$ (Kammermeier et al., 2000). Si bien se desconocen las bases que subyacen esta modulación dependiente de $G\beta\gamma$ e insensible al voltaje, se propone que $G\alpha_q$ y/o $G\beta\gamma$ pueden activar otras proteínas que establezcan un complejo $G\beta\gamma-Ca_v$ resistente a la despolarización. De esta manera, $G\beta\gamma$ podría participar mediando mecanismos inhibitorios insensibles al voltaje sobre Ca_v2 , una propiedad atribuida convencionalmente a la actividad de la subunidad $G\alpha$.

De nuestros experimentos planteados para comprender el mecanismo de acción de GHSR1a se deduce que las vías de señalización involucradas en los dos modos de activación de este receptor que impactan sobre los Ca_v2 son diferentes. Así mientras la actividad constitutiva de GHSR1a reduce las corrientes Ca_v2 disminuyendo

la densidad de canales en membrana mediada por un mecanismo dependiente de proteína Gi/o, la actividad dependiente de ghrelina inhibe las corrientes $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.1$ en diferente medida y de manera reversible y dependiente de $G_{\alpha q}$ y $G_{\beta\gamma}$. Ambos tipos de inhibición difieren además en su dependencia del subtipo de subunidad $Ca_v\beta$ que conforma el canal. Con respecto a esto, se sabe que los subtipos de $Ca_v\beta$ están distribuidos diferencialmente en el sistema nervioso (Buraei y Yang, 2013). De esta manera el impacto a nivel sinápticos de la actividad constitutiva de GHSR1a y de su actividad dependiente de ghrelina dependerá de la disponibilidad de las proteínas G en la terminal pre-sináptica, de los subtipos de $Ca_v\alpha$ y de $Ca_v\beta$. Así, la actividad constitutiva tendría un impacto que dependería, en principio, sólo de la expresión del receptor en la membrana pre-sináptica, mientras que la activación dependiente de ghrelina tendría un mayor impacto en aquellas sinapsis gobernadas por $Ca_v2.2$ y sus características serían muy distintas dependiendo de cuál subtipo de $Ca_v\beta$ participa en la formación del complejo canal.

En este trabajo hemos utilizado como herramienta genética una versión mutante de GHSR1a que carece completamente de actividad constitutiva (GHSR1aA204E). Esta variante es una de las numerosas variaciones de un nucleótido que se han identificado dentro del gen GHSR. Diversos estudios de asociación han descrito que determinados polimorfismos o mutaciones dentro de regiones codificantes y no codificantes de GHSR que están asociados a desórdenes del balance energético, del crecimiento, de la ingesta de alimento o la regulación del peso corporal en humanos (Wang et al., 2004; Pantel et al., 2006; Mager et al., 2008; Inoue et al., 2011). Si bien los estudios que determinan asociaciones entre los polimorfismos y dichas características son controvertidos hasta el momento (Garcia et al., 2008), algunos estudios señalan consistentemente que determinadas mutaciones, de muy baja frecuencia y que alteran la región codificante del gen GHSR, están asociadas a fenotipos de baja estatura (Pantel et al., 2006; Inoue et al., 2011). Llamativamente, estas mutaciones generan, en ensayos de expresión *in vitro*, una reducción drástica de la actividad constitutiva de GHSR1a, evidenciando así un rol fundamental de la actividad de GHSR1a independiente de ligando durante el crecimiento. Entre estas mutaciones, se encuentra A204E. En nuestro análisis poblacional encontramos que esta mutación no contribuye a la variabilidad genética de GHSR en la población de Corrientes, constituyendo 204 un locus probablemente monomórfico en la población general de nuestra región.

Nuestros datos demostrando la acción inhibitoria de GHSR1a sobre los Ca_v pre-sinápticos en un sistema heterólogo de expresión nos sirvieron como una base sólida para plantear que este mecanismo podría tener impacto en la actividad

neuronal. Utilizando un modelo reportero de la expresión de GHSR1a, ratones GHSR1a-eGFP (Mani et al., 2014), pudimos confirmar que la actividad de GHSR1a inhibía las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ nativas en un contexto donde naturalmente ocurren. Obtuvimos además el mismo resultado cuando sobre-expresamos GHSR1a-YFP o GHSR1a-A204E-YFP en neuronas hipotalámicas de rata. Si bien este modelo de estudio tenía la desventaja de que los niveles de receptor no eran los nativos, nos permitió confirmar mediante la sobre-expresión de la variante mutada de GHSR1a (GHSR1a-A204E-YFP) que era, específicamente, la actividad constitutiva la responsable del efecto inhibitorio basal sobre las corrientes Ca_v nativas. Cabe aclarar que en neuronas no es factible la aplicación de SPA como herramienta farmacológica válida para comprobar la participación de la actividad constitutiva de GHSR1a. Esto se debe a que este agonista inverso de GHSR1a es un compuesto de amplio espectro que actúa tanto como antagonista, agonista y agonista sesgado de distintos receptores, algunos de los cuales tienen amplia expresión en neuronas hipotalámicas (Woll y Rozengurt, 1988; Jarpe et al., 1998; MacKinnon et al., 2001; MacKinnon et al., 2005). De esta manera la utilidad del SPA queda restringida a modelos controlados como los sistemas de expresión heteróloga. Por otro lado, la selectividad del efecto de GHSR1a sobre los Ca_v2 quedó demostrada por la falta de inhibición de las corrientes de sodio sensibles a TTX. De esta manera, demostramos que las actividades constitutiva y evocada por ghrelina de GHSR1a inhiben las corrientes Ca_v2 nativas en presencia de toda la maquinaria molecular presente en las neuronas donde naturalmente se expresa este receptor, sugiriendo un rol en la fisiología sináptica del hipotálamo.

El sistema ghrelina/GHSR1a regula la actividad neuronal incrementando tanto la actividad eléctrica como transcripcional en diversos tipos neuronales en el sistema nervioso central (Cowley et al., 2003; Holst et al., 2003; Andrews et al., 2009; Shi et al., 2013). El mecanismo más estudiado es de origen post-sináptico, e incluye la unión de ghrelina a sus receptores en el soma o las dendritas proximales produciendo la activación de Gq y una subsecuente activación de fosfolipasa $C\beta$ y de PKC. Estas vías inhiben canales de K^+ $Kv7/KCNQ$, aumentando así la frecuencia de disparos de potencial de acción (Cowley et al., 2003; Shi et al., 2013). Adicionalmente, aumenta el Ca^{2+} intracelular por la liberación desde reservorios intracelulares sensibles a rianodina (Yang et al., 2011), generando también un aumento de la actividad transcripcional (Cowley et al., 2003; Holst et al., 2003; Holst et al., 2005; Andrews et al., 2008). Ambos procesos actúan en conjunto en los somas de las neuronas que expresan neuropéptido Y y el péptido relacionado a agouti en el núcleo arcuato del hipotálamo desencadenando los potentes efectos orexigénicos de ghrelina (Nakazato et al., 2001;

Cowley et al., 2003; Yang et al., 2011).

Más recientemente han surgido estudios que demuestran que, tanto en neuronas hipotalámicas como extra-hipotalámicas, GHSR1a se expresa en terminales pre-sinápticas, sugiriendo un rol modulador de la liberación de neurotransmisor (Cowley et al., 2003; Cui et al., 2011; Yang et al., 2011; Ribeiro et al., 2014). En base a los resultados de esta tesis, nosotros postulamos un nuevo mecanismo por el cual ghrelina/GHSR1a promueven la activación indirecta de neuronas mediante la modulación de los terminales pre-sinápticos que las inervan. El ingreso de Ca^{2+} a la terminal por los Ca_v pre-sinápticos es el principal evento que inicia la neurotransmisión y su regulación es fundamental en procesos de plasticidad neuronal (Dunlap et al., 1995; Catterall y Few, 2008). Incluso el Ca^{2+} que ingresa por un solo canal Ca_v puede desencadenar la liberación de neurotransmisores (Stanley, 1993). Múltiples mecanismos modulan directa o indirectamente la función de estos Ca_v pre-sinápticos, regulando consecuentemente la transmisión sináptica. Esta modulación puede modificar el número de Ca_v2 en la membrana pre-sináptica (Davydova et al., 2014; Ferron et al., 2014) o su capacidad de abrirse, cerrarse o inactivarse en respuesta a la despolarización generada tras la llegada de un potencial de acción (Burgoyne y Weiss, 2001; Catterall y Few, 2008). Múltiples GPCRs intervienen en estos procesos modulando la densidad y el comportamiento de Ca_v2 en membrana (Williams et al., 1997; Currie y Fox, 2002; Altier et al., 2006; Raingo et al., 2007; Andrade et al., 2010). De acuerdo a nuestros resultados, GHSR1a modula la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos en el hipotálamo tanto disminuyendo la densidad de canales en membrana -por su actividad constitutiva- como regulando la apertura del canal -por su actividad dependiente de ghrelina-, constituyendo así un mecanismo de gran versatilidad. De esta manera el impacto negativo de GHSR1a sobre la actividad de los Ca_v2 en la pre-sinapsis jugaría un rol fundamental en la liberación de neurotransmisores en el hipotálamo.

Para determinar si nuestro mecanismo de regulación pre-sináptica de los Ca_v2 por GHSR1a es coherente con resultados previos que muestran que GHSR1a activa neuronas hipotalámicas, decidimos abordar la siguiente hipótesis: la inhibición de Ca_v2 pre-sinápticos modula negativamente la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA en neuronas hipotalámicas. La neurotransmisión GABAérgica comprende más del 50 % de la actividad sináptica hipotalámica (Decavel y Van den Pol, 1990). Este neurotransmisor dominante en el hipotálamo, genera un tono inhibitorio cuya regulación es imprescindible para el control del apetito (Wu et al., 2009; Delgado, 2013). En este contexto, una inhibición de los Ca_v2 por la actividad de GHSR1a podría contribuir a una activación neuronal, disminuyendo la liberación de GABA. Nuestros

experimentos sugieren que un aumento del nivel de expresión de GHSR1a inducido de manera fisiológica (por ayuno prolongado), reduce la liberación de GABA en explantes de núcleo arcuato hipotalámico de ratón. Así mismo, las actividades constitutiva y dependiente de ghrelina de GHSR1a redujeron significativamente la amplitud de las respuestas post-sinápticas mediadas por receptores GABA_A en neuronas hipotalámicas transducidas con GHSR1a, por mecanismos dependientes del ingreso de Ca²⁺ en las terminales neuronales. Descartamos la participación de mecanismos post-sinápticos en este efecto dado que la amplitud de los mIPSCs fue levemente mayor en aquellos cultivos expresando GHSR1a, y dado a que las respuestas mediadas por los receptores GABA_A ante la aplicación de una solución hiperosmótica, que provoca la liberación masiva de neurotransmisores de manera independiente de la apertura de los Ca_v pre-sinápticos, fueron similares en los cultivos que expresaban GHSR1a, GHSR1a-A204E, y cultivos control. De esta manera, nuestros datos sugieren un rol modulador pre-sináptico de las actividades constitutiva y dependiente de ghrelina de GHSR1a en neuronas hipotalámicas, por una modulación negativa de los Ca_v2, que potencialmente podría contribuir al efecto activador neuronal de ghrelina/GHSR1a, por des-inhibición del tono GABAérgico.

El estudio de la actividad constitutiva de GHSR1a *in vivo* ha sido abordado escasamente hasta el momento. Ghrelina, sintetizada en células endócrinas del estómago, incrementa drásticamente la ingesta de alimento (Nakazato et al., 2001). La ghrelina plasmática accede casi exclusivamente al núcleo arcuato hipotalámico, el cual expresa altos niveles de GHSR1a, y es requerido para los efectos orexigénicos de ghrelina (Zigman et al., 2006; Schaeffer et al., 2013; Cabral et al., 2014). Así, la inhibición de los Ca_v2 por la actividad de GHSR1a podría modificar la actividad sináptica, y como consecuencia, modificar comportamientos relacionados con la ingesta de alimento. Se ha demostrado que los niveles de ARNm de GHSR1a son alterados por las condiciones energéticas (Kim et al., 2003; Kineman y Luque, 2007; Petersen et al., 2009) y existen evidencias que la activación basal de GHSR1a participa en el control del apetito en ratas (Petersen et al., 2009). Adicionalmente, los ratones deficientes de GHSR1a muestran un fenotipo más severo comparado a los ratones deficientes de ghrelina (Uchida et al., 2013), poniendo en evidencia una alta relevancia fisiológica de la actividad constitutiva de GHSR1a. Llamativamente, GHSR1a también se expresa en otras áreas del cerebro alejadas de órganos circum-ventriculares (Zigman et al., 2006) a los cuales ghrelina plasmática tiene un acceso muy restringido (Cabral et al., 2013; Cabral et al., 2014). Se ha propuesto que la modulación del receptor localizado en estas áreas cerebrales podría producirse por ghrelina sintetizada en el cerebro, sin embargo, hasta el momento esta hipótesis ha

sido muy difícil de confirmar (Cowley et al., 2003; Sakata et al., 2009; Furness et al., 2011). En este contexto, la actividad constitutiva de GHSR1a podría afectar la actividad neuronal de una manera independiente de ghrelina, siendo este efecto el único posible en aquellos sectores a los cuales la ghrelina plasmática no tiene acceso.

Entender el impacto neuronal de la actividad de GHSR1a y su mecanismo de acción radica en una comprensión global de su participación en procesos homeostáticos. Esto es de suma relevancia dado que este receptor constituye un posible blanco para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de desórdenes alimenticios. Por otro lado, nuestros resultados demuestran un rol fisiológico importante de los altos niveles de actividad constitutiva de GHSR1a, planteando una pregunta sumamente relevante: ¿existe un agonista inverso endógeno que regule su nivel de actividad constitutiva? Así mismo, para algunos sistemas podría ser más favorable regular la actividad constitutiva del receptor modificando sus niveles de expresión, que por la acción de ligandos que tengan efectos opuestos y que activen vías diferentes del mismo receptor. Nosotros proponemos que los niveles de GHSR1a en las terminales pre-sinápticas son un factor crítico que regula la actividad sináptica por inhibición de los Ca_v2 .

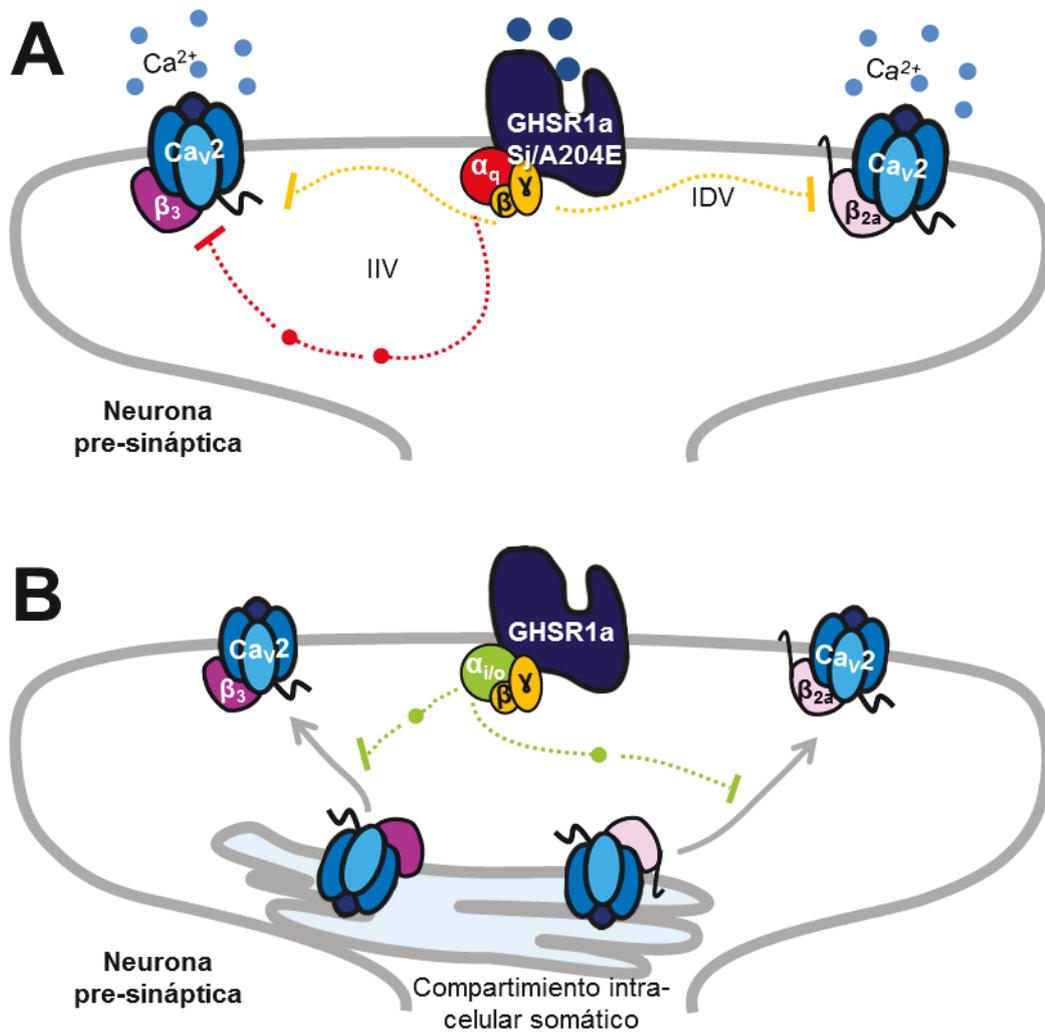
Cap II: Conclusiones



Nuestros resultados demuestran que la activación constitutiva de GHSR1a inhibe las corrientes $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ por una disminución crónica de la densidad de canales en la membrana plasmática, dependiendo de los niveles de expresión del receptor y por un mecanismo mediado por la proteína Gi/o (esquema 6). Por otro lado, la actividad de GHSR1a evocada por ghrelina modula negativamente la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos, de manera independiente de los niveles de expresión del receptor, siendo más sensibles a esta inhibición los $Ca_v2.2$ que los $Ca_v2.1$. Adicionalmente, esta modulación es reversible y requiere de la participación de $G\beta\gamma$. La inhibición de $Ca_v2.2$ por GHSR1a está mediada por la activación de la proteína Gq, provocando una inhibición independiente del voltaje cuando la subunidad auxiliar citoplasmática $Ca_v\beta3$ forma parte del canal. Sin embargo, cuando la subunidad auxiliar $Ca_v\beta2a$, anclada a membrana, es la que forma parte del canal, la inhibición es completamente dependiente del voltaje y exclusivamente mediada por el heterodímero $G\beta\gamma$ (esquema 6). Así, GHSR1a modula drásticamente las corrientes Ca_v2 pre-sinápticas por mecanismos completamente distintos dependiendo de su modo de activación.

La mutación A204E humana de GHSR1a impacta en la modulación de los Ca_v2 pre-sinápticos por GHSR1a. A204E provoca la pérdida de la actividad constitutiva, eliminando el impacto de la misma sobre la actividad de los Ca_v2 . Aun así, GHSR1aA204E conserva la capacidad de ser activado por ghrelina que inhibe a los Ca_v2 de manera independiente de los niveles de expresión del receptor (esquema 6). Adicionalmente, A204E no constituye un sitio de variación genético-poblacional al menos en la muestra humana analizada. De esta manera, A204E, con un impacto poblacional muy bajo, provoca una pérdida de función del rol modulador de GHSR1a sobre las corrientes Ca_v2 .

Nuestros resultados demuestran que la activación de GHSR1a en neuronas hipotalámicas inhibe las corrientes Ca_v pre-sinápticas nativas tanto por su actividad constitutiva como dependiente de ghrelina (esquema 6). Así mismo, ambos modos de activación de GHSR1a regulan negativamente la liberación de GABA en neuronas hipotalámicas, solo cuando está mediada por mecanismos dependientes del ingreso de Ca^{2+} a través de los Ca_v a las terminales axonales. Este mecanismo podría cobrar relevancia fisiológica en situaciones de ayuno, cuando la expresión de GHSR1a se encuentra aumentada, contribuyendo a la activación neuronal descrita en estas condiciones fisiológicas.



Esquema 6. Impacto de la activación constitutiva y evocada por ghrelina de GHSR1a y de su mutación A204E sobre la actividad de los Ca_v2 pre-sinápticos. (A) La activación evocada por ghrelina de GHSR1a, tanto salvaje (Sj) como mutante (A204E) inhibe de manera independiente del voltaje (IIV) los Ca_v2 por un mecanismo mediado por las subunidades α_q y $\beta\gamma$ cuando la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_3$ forma parte del canal; mientras que los inhibe de manera dependiente del voltaje (IDV), por un mecanismo mediado por las subunidades $\beta\gamma$ cuando la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_{2a}$ forma parte del canal. (B) La activación constitutiva de GHSR1a inhibe las corrientes Ca_v2 por un mecanismo mediado por la proteína $\alpha_{i/o}$. Este mecanismo involucra una disminución de la cantidad de canales en la membrana plasmática por reducción del tráfico de los Ca_v2 desde compartimentos intra-celulares somáticos (retículo endoplasmático, aparato de Golgi) hacia la membrana plasmática. Las líneas de punto indican vías de inhibición que potencialmente pueden involucrar diferentes componentes, las líneas continuas indican el tráfico de los Ca_v2 .

Nuestros datos demuestran por primera vez que GHSR1a modula la actividad de los Ca_v pre-sinápticos tanto por vías convencionales de inhibición de los Ca_v (activación de GPCRs dependiente de agonistas), como por vías no convencionales (activación constitutiva de GPCRs), sugiriendo un rol fundamental de la actividad constitutiva de GHSR1a en la fisiología sináptica de las neuronas hipotalámicas.

Anexo



- Extracción de ADN de tejido de ratón: Incubamos 2 mm de cola de ratón 1 hora a 98 °C con 75 µl de solución de extracción (en mM: 25 NaOH y EDTA 0,2), y luego adicionamos 75 µl de solución de TRIS (en mM: 40 TRIS, pH 5,5).

- Genotipificación de ratones GHSR-eGFP: Luego de la extracción de ADN, determinamos el genotipo de los ratones mediante las técnicas de PCR y electroforesis en geles de agarosa. Realizamos dos PCR por individuos: (1) con los pares de cebadores "Fw promotor GHSR" 5'- GGACCTCCTCAGGGGACCAGAT-3' y "Rev eGFP" 5'-GGTCGGGGTAGCGGCTGAA-3' que amplifican una banda de 300 pb y (2) con los pares de cebadores "Fw ghrelina" 5'- GGTCAGCCTAATTAGCTCTGTCAT -3' y "Rv ghrelina" 5'- GATCTCCAGCTCCTCCTCTGTCT -3' que amplifican una banda de 600 pb. Utilizamos para cada reacción de PCR 10 µl finales con: 1 % buffer (en mM: 50 Tris-HCl pH 8, 100 ClNa, 0,1 EDTA, 1 DTT, 50 % glicerol y 1 % de Tritón®X-100), 2 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 pmol de cebadores, 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, USA) y 30 ng de la solución de ADN. Realizamos los ciclos de temperatura en un termociclador Biometra (Professional Trio Thermocycler, Goettingen Germany). Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, un *annealing* a 60 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de reacción de PCR, posteriormente se sembraron y revelaron en geles de agarosa al 2 % con 0,2 µl / ml de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain.

- Genotipificación de ratones GHSR-KO. Para determinar el genotipo de estos ratones se realizaban dos PCR por individuo: (1) con los pares de cebadores "Fw WT" 5'- CGGTCTCCACCCTTCATTACTTTA -3' y "Rv común" 5'- CCACTGCACGTCTCTCCCTATTT -3' que amplifican una banda de 354 pb y (2) con los pares de cebadores "Fw TBC" 5'- AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA-3' y "Rv común" que amplifican una banda de 175 pb. Utilizamos para cada reacción de PCR 10 µl finales con: 1 % buffer (en mM: 50 Tris-HCl pH 8, 100 ClNa, 0,1 EDTA, 1 DTT, 50 % glicerol y 1 % de Tritón®X-100), 2 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 pmol de cebadores, 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, USA) y 3 µl de la solución de ADN. Realizamos los ciclos de temperatura en un termociclador Biometra (Professional Trio Thermocycler, Goettingen, Germany). Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos

con una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, un *annealing* a 60 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de reacción de PCR, posteriormente se sembraron y revelaron en geles de agarosa al 2 % teñida con con 0,2 µl / ml de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain .

- Solución cítrico salina (en mM): 171.2 KCl y 17 Na₃C₆H₅O₇.
- DMEM / F12 1:1 suplementado: DMEM / F12 1:1 suplementado con 10 % de FBS, 0,25 % de glucosa, 2 mM de glutamina (GIBCO, cat#21051-016, Massachusetts, Estados Unidos), 3,3 µg / ml de insulina (Nordisk Pharm Ind, Inc, Carolina del Norte, Estados Unidos), 5 U / ml de penicilina sódica (Richet, Buenos Aires, Argentina), 5 µg / ml de estreptomina (Richet, cat#NC), 40 µg / ml de sulfato de gentamicina (Richet) y 1 % de solución de vitaminas (Microvet, cat#L2112-100).
- Medio Luria Bertani (LB) (en %): 1 de triptona, 0,5 de extracto de levadura y 1 de NaCl en H₂O-miliQ. Esterilizar en autoclave.
- Solución de competencia (en mM): 55 de MnCl₂-4H₂O, 15 de CaCl₂-2H₂O, 250 de KCl, 10 de PIPES, pH 6,7 en H₂O-miliQ estéril.
- Buffer TE (TRIS-EDTA) (en mM): 10 de Tris-HCl y 1 de EDTA-Na₂.
- Buffer de *binding* (en mM): 50 mM de HEPES, 5 de MgCl₂, 1 de CaCl₂ y 0,2 % de BSA, pH 7.4, filtrado con un filtro de 0,45 µm de diámetro.
- Buffer fosfato salino (PBS) (en mM): 137 de NaCl, 2,7 de KCl, 10 Na₂HPO₄ y 2 de KH₂PO₄, pH 7,4 con HCl.
- Buffer de carga: 1,7 % de SDS, 0,0001 mM de 2-mercaptoetanol, 5 % de glicerol, 58 mM de Tris-HCl, 0,002 % de azul de bromofenol, pH 6,8.
- Tween 20 salino con Tris bufereado (TBST): 100 mM de Tris-HCl, 0.9 % (p/v) de NaCl, y 0.2 % de Tween 20, pH 7,5.
- Solución interna para registro de corrientes de sodio y calcio (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 4 MgATP, pH 7,2 con CsOH.

-
- Solución externa alta en sodio (en mM): 135 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, pH 7,4 con NaOH.
 - Solución externa alta en barrio (en mM): 10 BaCl₂, 110 cloruro de colina, 20 cloruro de tetraetil-amonio, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa y 0,001 tetrodotoxina, pH 7,4 con CsOH.
 - Solución externa de calcio (en mM): 2 CaCl₂, 140 cloruro de colina, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,4 con CsOH.
 - Solución interna para registro de corrientes de potasio (en mM): 140 K-gluconato, 5 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.6 EGTA, 4 MgCl₂, 3 Na₂ATP, 0.3 Na₂GTP (pH 7.3 con KOH).
 - Solución externa para registro de corrientes de potasio (en mM): 135 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, pH 7,3 con NaOH.
 - Solución interna para registro de las IPSCs (en mM): 115 Cs-metasulfonato, 10 CsCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 20 tetra-etil-amonio, 4 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 0,6 EGTA y 10 lidocaína N-eti -bromuro (QX314).
 - Solución externa para registros de las IPSCs (en mM): 135 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, 10 IM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (Alomone Labs), pH 7,4 con NaOH.
 - Buffer Krebs-Ringer Bicarbonato (en mg / l): 100 Na₂HPO₄, 16,8 MgCl₂, 340 KCl, 7000 NaCl; 1800 glucosa, 280 CaCl₂, 10 ascórbico, 100 NaHCO₃.
 - Buffer Krebs-Ringer-bicarbonato alto en K⁺ (en mg / l): 100 Na₂HPO₄, 16,8 MgCl₂, 340 KCl, 4000 NaCl; 1800 glucosa, 280 CaCl₂, 10 ascórbico, 100 NaHCO₃ y 4171 KCl.
 - Buffer A (en mM): 320 de sacarosa, 10 de Tris-HCl pH 7,6, 5 de Cl₂Mg y 1 % de Tritón X-100.

- Buffer B (en mM): 10 de Tris-HCl pH 7,4, 10 de EDTA pH 8, 10 de NaCl y 1 % de Tritón X-100, pH 7,6.

- Genotipificación de N40D de MOR: Se realizó una reacción de PCR por muestra. Utilizamos para cada reacción de PCR 10 µl finales con: 1 % buffer (en mM: 50 Tris-HCl pH 8, 100 ClNa, 0,1 EDTA, 1 DTT, 50 % glicerol y 1 % de Tritón®X-100), 2 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de dNTPs, 2 pmol de cebadores, 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, USA) y 30 ng de ADN. Los cebadores utilizados fueron los descritos en (Gelernter et al., 1999): “Fw N40D” 5'-CCGTCAGTACCATGGACAGCAGCGGTG-3' y “Rv N40D”: 5'-GTTCCGACCCGCATGGGTCGGACAGAT-3'. Realizamos los ciclos de temperatura en un termociclador Biometra (Professional Trio Thermocycler, Goettingen, Germany). Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C de 3 minutos, seguido de 38 ciclos con una desnaturalización a 94 °C de 12 segundos, un *annealing* a 60 - 57 °C de 25 segundos y una extensión a 72 °C de 30 segundos, seguidos de una extensión final a 72 °C de 5 minutos. En los ciclos de PCR, se realizó un descenso gradual de la temperatura de *annealing* denominado “*touch-down*”, que tiene por objeto establecer condiciones más estrictas de amplificación durante los primeros ciclos, a fin de obtener un producto amplificado de alta especificidad y luego, en los ciclos posteriores, las condiciones de hibridación se relajan gradualmente para obtener una cantidad abundante del producto, utilizando como molde al amplificado específico obtenido durante los primeros ciclos.

- TAE 50 X (en mM): 40 de Tris, 20 de ácido acético, 1 de EDTA, pH 8,4.

- Genotipificación de A204E de GHSR: Se realizaron dos reacciones de PCR por muestra. Utilizamos para cada reacción de PCR 10 µl finales con: 1 % buffer (en mM: 50 Tris-HCl pH 8, 100 ClNa, 0,1 EDTA, 1 DTT, 50 % glicerol y 1 % de Tritón®X-100), 2 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 pmol de cebadores, 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, USA) y 30 ng de ADN. Los cebadores diseñados fueron: “Fw A204” 5'- CCICCCCACCGAGTTTGC -3', “Fw 204E” 5'- CCACCCCACCGAGTTTGA -3', y “Rv A204E: 5'- TGAGACCCACCCAGCATTTT -3'. Las bases subrayadas corresponden a los *mismatch* introducidos con el fin de aumentar la temperatura de *melting* y las bases en negrita a aquellas que hibridan específicamente en cada alelo. Realizamos los ciclos de temperatura en un termociclador Biometra (Professional Trio Thermocycler, Goettingen, Germany). Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C de 5 minutos,

seguido de 35 ciclos con una desnaturalización a 94 °C de 30 segundos, un *annealing* a 65 °C de 30 segundos y una extensión a 72 °C de 30 segundos, seguidos de una extensión final a 72 °C de 5 minutos.

**Carta de información para los participantes del
“Estudio de genes asociados a la sensibilidad al dolor”**

Las personas poseen rasgos genéticos distintivos que permiten diferenciarlas unas de otras, y que se transmiten de generación en generación. Algunos tienen consecuencias que se pueden ver a simple vista como los que determinan el color de ojos; mientras otros, en cambio, tienen un efecto que no es visible directamente, y para visualizarlos se requiere análisis de laboratorio.

En el Laboratorio de Genética Molecular del IMBICE (CICPBA/CONICET) estudiamos los procesos genéticos que determinan la sensibilidad al dolor. Si reunimos un grupo de personas y aplicamos a cada una el mismo estímulo doloroso (por ejemplo un pinchazo) es probable que el dolor percibido por cada una sea distinto. Esto se debe a que existen múltiples factores que afectan al dolor. Los genes pueden presentar variaciones internas que influyen en estas diferencias en la sensibilidad al dolor, sin embargo en la población Argentina se desconocen cuáles son estas variaciones. Por dicho motivo, lo invitamos a participar en una investigación que tiene por objetivo estudiar un conjunto de genes relacionados con la percepción del dolor, que pueden ser variables en la población a la cual Ud. pertenece. Para ello, le solicitamos su consentimiento para donar una pequeña muestra de sangre que tomaremos con elementos estériles y descartables.

Es importante destacar que, salvo una pequeña molestia durante la extracción de sangre, su participación no implica riesgos físicos ni morales para su persona, y que el tratamiento de las muestras es completamente anónimo. Este estudio no le aporta beneficios directos a Ud., pero contribuye al conocimiento de la variación genética de su población.

Su participación es absolutamente confidencial, voluntaria y sin retribución monetaria; pudiendo abandonar el estudio en cualquier momento si la investigación no concuerda con sus intereses o preferencias. Si Ud. acepta participar, tenga a bien completar y firmar el Formulario de Consentimiento Informado que figura al pie de la presente. La persona responsable de tomar su muestra, le informará sobre el proyecto y aclarará todas sus dudas respondiendo a todas sus preguntas.

Formulario de consentimiento informado

Yo..... (nombre y apellido completo), de.....años (edad), en calidad de donante de muestra biológica, he leído la Carta de Información “Estudio de genes asociados a la sensibilidad al dolor” y he podido hacer preguntas sobre la investigación a (Responsable de la toma de muestra). Declaro haber entendido la carta precedente, comprendiendo que mi participación es voluntaria, gratuita, anónima y confidencial. Comprendo también, que puedo retirarme de la investigación cuando quiera sin tener que dar explicaciones, y que puedo contar con los datos obtenidos si así lo requiero. Por ello, presto libre conformidad a efectos de que se tome una muestra de sangre de mi persona, y que la misma sea destinada a estudiar los rasgos genéticos que contribuyen a la sensibilidad al dolor.

Marque lo que corresponda:

- Al término del proyecto,

SI		NO	
----	--	----	--

 autorizo a que se almacene la muestra de ADN para estudios futuros que cuenten con el aval de un Comité de Ética.

Lugar y fecha:

Firma y aclaración del donante adulto:.....

Firma y aclaración del responsable de la toma de muestra:.....

Firma y aclaración del investigador responsable del proyecto:.....

Bibliografía



- Agosti F, Lopez Soto EJ, Cabral A, Castrogiovanni D, Schioth HB, Perello M, Raingo J (2014) Melanocortin 4 receptor activation inhibits presynaptic N-type calcium channels in amygdaloid complex neurons. *Eur J Neurosci* 40:2755-2765.
- Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, Chen L, Beedle AM, Ferguson SS, Mezghrani A, Dubel SJ, Bourinet E, McRory JE, Zamponi GW (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci* 9:31-40.
- Andrade A, Denome S, Jiang YQ, Marangoudakis S, Lipscombe D (2010) Opioid inhibition of N-type Ca²⁺ channels and spinal analgesia couple to alternative splicing. *Nat Neurosci* 13:1249-1256.
- Andrews ZB, Erion D, Beiler R, Liu ZW, Abizaid A, Zigman J, Elsworth JD, Savitt JM, DiMarchi R, Tschoep M, Roth RH, Gao XB, Horvath TL (2009) Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *J Neurosci* 29:14057-14065.
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschoep MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454:846-851.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14:351-355.
- Ariel P, Hoppa MB, Ryan TA (2012) Intrinsic variability in Pv, RRP size, Ca(2+) channel repertoire, and presynaptic potentiation in individual synaptic boutons. *Front Synaptic Neurosci* 4:9.
- Avena S et al. (2012) Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PLoS One* 7:e34695–34704.
- Bachiocco V, Scesi M, Morselli AM, Carli G (1993) Individual pain history and familial pain tolerance models: relationships to post-surgical pain. *Clin J Pain* 9:266-271.
- Beaudry H, Dubois D, Gendron L (2011) Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. *J Neurosci* 31:13068-13077.
- Beedle AM, McRory JE, Poirot O, Doering CJ, Altier C, Barrere C, Hamid J, Nargeot J, Bourinet E, Zamponi GW (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* 7:118-125.

- Befort K, Filliol D, Decailot FM, Gaveriaux-Ruff C, Hoehe MR, Kieffer BL (2001) A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling. *J Biol Chem* 276:3130-3137.
- Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D (2004) Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* 41:127-138.
- Bennett KA, Langmead CJ, Wise A, Milligan G (2009) Growth hormone secretagogues and growth hormone releasing peptides act as orthosteric super-agonists but not allosteric regulators for activation of the G protein Galpha(o1) by the Ghrelin receptor. *Mol Pharmacol* 76:802-811.
- Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D (1997) Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 2:490-494.
- Beyer A, Koch T, Schroder H, Schulz S, Holtt V (2004) Effect of the A118G polymorphism on binding affinity, potency and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human mu-opioid receptor. *J Neurochem* 89:553-560.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, et al. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13:505-506.
- Bodnar RJ (2014) Endogenous opiates and behavior: 2013. *Peptides*.
- Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L (1998) Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9608-9613.
- Bourinet E, Zamponi GW (2005) Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Curr Top Med Chem* 5:539-546.
- Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP (1996) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1486-1491.
- Brittain JM, Wang Y, Wilson SM, Khanna R (2012) Regulation of CREB signaling through L-type Ca²⁺ channels by Nipsnap-2. *Channels (Austin)* 6:94-102.
- Brown DA, Adams PR (1980) Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283:673-676.
- Brown DA, Passmore GM (2009) Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 156:1185-1195.

- Brownstein MJ (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5391-5393.
- Bruehl S, Chung OY, Burns JW (2008) The mu opioid receptor A118G gene polymorphism moderates effects of trait anger-out on acute pain sensitivity. *Pain* 139:406-415.
- Bruehl S, Burns JW, Chung OY, Chont M (2009) Pain-related effects of trait anger expression: neural substrates and the role of endogenous opioid mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 33:475-491.
- Bruijnzeel AW (2009) kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. *Brain Res Rev* 62:127-146.
- Buraei Z, Yang J (2013) Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca(2)(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1530-1540.
- Burgoyne RD, Weiss JL (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J* 353:1-12.
- Buskila D (2007) Genetics of chronic pain states. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21:535-547.
- Cabral A, Fernandez G, Perello M (2013) Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* 253:406-415.
- Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* 7:e31462.
- Cabral A, Valdivia S, Fernandez G, Reynaldo M, Perello M (2014) Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *J Neuroendocrinol*.
- Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P, Barale R (2008) Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clin Pharmacol Ther* 83:559-566.
- Cao YQ, Tsien RW (2010) Different relationship of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels to channel-interacting slots in controlling neurotransmission at cultured hippocampal synapses. *J Neurosci* 30:4536-4546.
- Carbone E, Giacippoli A, Marcantoni A, Guido D, Carabelli V (2006) A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium* 40:147-154.
- Castiglioni AJ, Raingo J, Lipscombe D (2006) Alternative splicing in the C-terminus of CaV2.2 controls expression and gating of N-type calcium channels. *J Physiol* 576:119-134.
- Catterall WA (1991) Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* 64:871-874.

- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall WA (2010) Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67:915-928.
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
- Catterall WA, Few AP (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59:882-901.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.
- Colecraft HM, Patil PG, Yue DT (2000) Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J Gen Physiol* 115:175-192.
- Colquhoun D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125:924-947.
- Consortium IH (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426:789-796.
- Cowley MA et al. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661.
- Cui RJ, Li X, Appleyard SM (2011) Ghrelin inhibits visceral afferent activation of catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J Neurosci* 31:3484-3492.
- Currie KP, Fox AP (1997) Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J Neurosci* 17:4570-4579.
- Currie KP, Fox AP (2002) Differential facilitation of N- and P/Q-type calcium channels during trains of action potential-like waveforms. *J Physiol* 539:419-431.
- Curtis BM, Catterall WA (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23:2113-2118.
- Chandy KG (1991) Simplified gene nomenclature. *Nature* 352:26.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44:8-12.
- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L (1994) Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett* 347:279-283.

- Chien AJ, Gao T, Perez-Reyes E, Hosey MM (1998) Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the beta2a subunit. *J Biol Chem* 273:23590-23597.
- Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM (1996) Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem* 271:26465-26468.
- Chien AJ, Zhao X, Shirokov RE, Puri TS, Chang CF, Sun D, Rios E, Hosey MM (1995) Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 270:30036-30044.
- Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C, Prinssen EP (2007) Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets* 8:117-135.
- Chou WY, Wang CH, Liu PH, Liu CC, Tseng CC, Jawan B (2006a) Human opioid receptor A118G polymorphism affects intravenous patient-controlled analgesia morphine consumption after total abdominal hysterectomy. *Anesthesiology* 105:334-337.
- Chou WY, Yang LC, Lu HF, Ko JY, Wang CH, Lin SH, Lee TH, Concejero A, Hsu CJ (2006b) Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 50:787-792.
- Chu Sin Chung P, Kieffer BL (2013) Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Ther* 140:112-120.
- Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Schroder MS, Altmann WD, Henneberger C, Rusakov DA, Gundelfinger ED, Fejtova A (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca²⁺ channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82:181-194.
- De Gregori M, Garbin G, De Gregori S, Minella CE, Bugada D, Lisa A, Govoni S, Regazzi M, Allegri M, Ranzani GN (2013) Genetic variability at COMT but not at OPRM1 and UGT2B7 loci modulates morphine analgesic response in acute postoperative pain. *Eur J Clin Pharmacol* 69:1651-1658.
- De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A (2005) How do G proteins directly control neuronal Ca²⁺ channel function? *Trends Pharmacol Sci* 26:427-436.
- Deb I, Chakraborty J, Gangopadhyay PK, Choudhury SR, Das S (2010) Single-nucleotide polymorphism (A118G) in exon 1 of OPRM1 gene causes alteration in downstream signaling by mu-opioid receptor and may contribute to the genetic risk for addiction. *J Neurochem* 112:486-496.

- Decavel C, Van den Pol AN (1990) GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 302:1019-1037.
- Delgado TC (2013) Glutamate and GABA in Appetite Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:103.
- Delmas P, Brown DA (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6:850-862.
- Dezaki K, Kakei M, Yada T (2007) Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* 56:2319-2327.
- Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, Gaskin FS, Nonaka N, Jaeger LB, Banks WA, Morley JE, Pinto S, Sherwin RS, Xu L, Yamada KA, Sleeman MW, Tschop MH, Horvath TL (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 9:381-388.
- Diaz-Lacava A, Walier M, Penacino G, Wienker TF, Baur MP (2011) Spatial assessment of Argentinean genetic admixture with geographical information systems. *Forensic Sci Int Genet* 5:297-302.
- Dickson SL, Luckman SM (1997) Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 138:771-777.
- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294:333-339.
- Dubinsky JM, Rothman SM (1991) Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J Neurosci* 11:2545-2551.
- Dunlap K, Fischbach GD (1978) Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature* 276:837-839.
- Dunlap K, Fischbach GD (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317:519-535.
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89-98.
- Elmslie KS (2003) Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:477-489.
- Ellinor PT, Yang J, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW (1995) Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron* 15:1121-1132.

- Ermolyuk YS, Alder FG, Surges R, Pavlov IY, Timofeeva Y, Kullmann DM, Volynski KE (2013) Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* 16:1754-1763.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952-1955.
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Ferron L, Nieto-Rostro M, Cassidy JS, Dolphin AC (2014) Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat Commun* 5:3628.
- Filligim RB (2005) Individual differences in pain responses. *Curr Rheumatol Rep* 7:342-347.
- Filligim RB, Kaplan L, Staud R, Ness TJ, Glover TL, Campbell CM, Mogil JS, Wallace MR (2005) The A118G single nucleotide polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans. *J Pain* 6:159-167.
- Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:563-590.
- Flores-Alfaro E, Burguete-Garcia AI, Salazar-Martinez E (2012) [Genetic epidemiology research designs]. *Rev Panam Salud Publica* 31:88-94.
- Furness JB, Hunne B, Matsuda N, Yin L, Russo D, Kato I, Fujimiya M, Patterson M, McLeod J, Andrews ZB, Bron R (2011) Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse. *Neuroscience* 193:1-9.
- Gandini MA, Henriquez DR, Grimaldo L, Sandoval A, Altier C, Zamponi GW, Felix R, Gonzalez-Billault C (2014) Ca_v2.2 channel cell surface expression is regulated by the light chain 1 (LC1) of the microtubule-associated protein B (MAP1B) via UBE2L3-mediated ubiquitination and degradation. *Pflugers Arch*.
- Garcia EA, Heude B, Petry CJ, Gueorguiev M, Hassan-Smith ZK, Spanou A, Ring SM, Dunger DB, Wareham N, Sandhu MS, Ong KK, Korbonits M (2008) Ghrelin

- receptor gene polymorphisms and body size in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4158-4161.
- Gelernter J, Kranzler H, Cubells J (1999) Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 4:476-483.
- Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J* 90:1830-1841.
- Ginosar Y, Birnbach DJ, Shirov TT, Arheart K, Caraco Y, Davidson EM (2013) Duration of analgesia and pruritus following intrathecal fentanyl for labour analgesia: no significant effect of A118G mu-opioid receptor polymorphism, but a marked effect of ethnically distinct hospital populations. *Br J Anaesth* 111:433-444.
- Giuliani S, Lecci A, Maggi CA (2000) Nociceptin and neurotransmitter release in the periphery. *Peptides* 21:977-984.
- Glesmann LA, Martina PF, Catanesi CI (2013) Genetic Variation of X-STRs in the Wichí Population from Chaco Province, Argentina. *Hum Biol* 85:687-698.
- Gong XD, Wang JY, Liu F, Yuan HH, Zhang WY, Guo YH, Jiang B (2013) Gene polymorphisms of OPRM1 A118G and ABCB1 C3435T may influence opioid requirements in Chinese patients with cancer pain. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:2937-2943.
- Gourlay GK (2005) Advances in opioid pharmacology. *Support Care Cancer* 13:153-159.
- Goutelle S, Maurin M, Rougier F, Barbaut X, Bourguignon L, Ducher M, Maire P (2008) The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol* 22:633-648.
- Gray AC, Raingo J, Lipscombe D (2007) Neuronal calcium channels: splicing for optimal performance. *Cell Calcium* 42:409-417.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Hanahan D, Meselson M (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* 100:333-342.
- Hartrick CT, Dobritt DW, Eckstein L (1986) Clinical impression that familial models are an important influence in the development and expression of chronic pain and pain behavior. *Pain* 25:279-280.
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahlijanian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (1993) Identification and differential subcellular localization of

- the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* 123:949-962.
- Heneghan JF, Mitra-Ganguli T, Stanish LF, Liu L, Zhao R, Rittenhouse AR (2009) The Ca²⁺ channel beta subunit determines whether stimulation of Gq-coupled receptors enhances or inhibits N current. *J Gen Physiol* 134:369-384.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258-262.
- Hille B, Dickson EJ, Kruse M, Vivas O, Suh BC (2014) Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim Biophys Acta*.
- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 17:2201-2210.
- Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, Schwartz TW (2005) Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol Endocrinol* 19:2400-2411.
- Hosey MM, Barhanin J, Schmid A, Vandaele S, Ptasienski J, O'Callahan C, Cooper C, Lazdunski M (1987) Photoaffinity labelling and phosphorylation of a 165 kilodalton peptide associated with dihydropyridine and phenylalkylamine-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1137-1145.
- Howard AD et al. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977.
- Hu D, Ziv E (2008) Confounding in genetic association studies and its solutions. *Methods Mol Biol* 448:31-39.
- Huang P, Chen C, Mague SD, Blendy JA, Liu-Chen LY (2012) A common single nucleotide polymorphism A118G of the mu opioid receptor alters its N-glycosylation and protein stability. *Biochem J* 441:379-386.
- Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, Niki H (2002) Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci Res* 44:121-131.
- Ikeda SR (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 439:181-214.
- Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255-258.
- Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K (2011) Identification and functional analysis of

- novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E373-378.
- Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T (2000) Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20:59-65.
- Jalink K, Adjobo-Hermans MJ (2014) GqPCR-Mediated Signalling in the Spotlight: From Visualization Towards Dissection and Quantification. *Curr Pharm Biotechnol*.
- Janicki PK, Schuler G, Francis D, Bohr A, Gordin V, Jarzembowski T, Ruiz-Velasco V, Mets B (2006) A genetic association study of the functional A118G polymorphism of the human mu-opioid receptor gene in patients with acute and chronic pain. *Anesth Analg* 103:1011-1017.
- Jarpe MB, Knall C, Mitchell FM, Buhl AM, Duzic E, Johnson GL (1998) [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]Substance P acts as a biased agonist toward neuropeptide and chemokine receptors. *J Biol Chem* 273:3097-3104.
- Jiang M, Chen G (2006) High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc* 1:695-700.
- Jiang YQ, Andrade A, Lipscombe D (2013) Spinal morphine but not ziconotide or gabapentin analgesia is affected by alternative splicing of voltage-gated calcium channel CaV2.2 pre-mRNA. *Mol Pain* 9:67.
- Kam KW, New DC, Wong YH (2002) Constitutive activation of the opioid receptor-like (ORL1) receptor by mutation of Asn133 to tryptophan in the third transmembrane region. *J Neurochem* 83:1461-1470.
- Kammermeier PJ, Ikeda SR (1999) Expression of RGS2 alters the coupling of metabotropic glutamate receptor 1a to M-type K⁺ and N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 22:819-829.
- Kammermeier PJ, Ruiz-Velasco V, Ikeda SR (2000) A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. *J Neurosci* 20:5623-5629.
- Kawabe T, Kawabe K, Sapru HN (2013) Tonic gamma-aminobutyric acid-ergic activity in the hypothalamic arcuate nucleus is attenuated in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 62:281-287.
- Keum D, Baek C, Kim DI, Kweon HJ, Suh BC (2014) Voltage-dependent regulation of CaV2.2 channels by Gq-coupled receptor is facilitated by membrane-localized beta subunit. *J Gen Physiol* 144:297-309.

- Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park KS, Kim SY, Cho BY, Lee HK (2003) Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 14:1317-1320.
- Kineman RD, Luque RM (2007) Evidence that ghrelin is as potent as growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) in releasing GH from primary pituitary cell cultures of a nonhuman primate (*Papio anubis*), acting through intracellular signaling pathways distinct from GHRH. *Endocrinology* 148:4440-4449.
- Kitano J, Nishida M, Itsukaichi Y, Minami I, Ogawa M, Hirano T, Mori Y, Nakanishi S (2003) Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive Cav2.1 Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 278:25101-25108.
- Klabunde T, Hessler G (2002) Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* 3:928-944.
- Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, Baar C, Vikan T, Krokan HE, Skorpen F (2004) The 118 A > G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 48:1232-1239.
- Knapp RJ, Malatynska E, Collins N, Fang L, Wang JY, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI (1995) Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB J* 9:516-525.
- Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52:948-956.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
- Koyama S, Appel SB (2006) Characterization of M-current in ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* 96:535-543.
- Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev* 57:1-26.
- Kumar V, Jong YJ, O'Malley KL (2008) Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear Gq/11 proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca²⁺ release. *J Biol Chem* 283:14072-14083.
- Kurrasch DM, Huang J, Wilkie TM, Repa JJ (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction measurement of regulators of G-protein signaling mRNA levels in mouse tissues. *Methods Enzymol* 389:3-15.

- Landau R, Kern C, Columb MO, Smiley RM, Blouin JL (2008) Genetic variability of the mu-opioid receptor influences intrathecal fentanyl analgesia requirements in laboring women. *Pain* 139:5–14.
- Lauckner JE, Hille B, Mackie K (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19144-19149.
- Lercher MJ, Hurst LD (2002) Human SNP variability and mutation rate are higher in regions of high recombination. *Trends Genet* 18:337-340.
- Levrán O, Awolesi O, Linzy S, Adelson M, Kreek MJ (2011) Haplotype block structure of the genomic region of the mu opioid receptor gene. *J Hum Genet* 56:147-155.
- Lipscombe D (2005) Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol* 15:358-363.
- Lipscombe D, Helton TD, Xu W (2004) L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 92:2633-2641.
- Liu L, Rittenhouse AR (2000) Effects of arachidonic acid on unitary calcium currents in rat sympathetic neurons. *J Physiol* 525 Pt 2:391-404.
- Liu L, Rittenhouse AR (2003) Arachidonic acid mediates muscarinic inhibition and enhancement of N-type Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:295-300.
- Locht C, Coutte L, Mielcarek N (2011) The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J* 278:4668-4682.
- Lopez Soto EJ, Raingo J (2012) A118G Mu Opioid Receptor polymorphism increases inhibitory effects on CaV2.2 channels. *Neurosci Lett* 523:190-194.
- Lopez Soto EJ, Agosti F, Catanesi CI, Raingo J (2013) Impact of A118G Polymorphism on the Mu Opioid Receptor Function in Pain. *Journal of Pain & Relief* 02:2–6.
- Lyon AM, Taylor VG, Tesmer JJ (2014) Strike a pose: Galphaq complexes at the membrane. *Trends Pharmacol Sci* 35:23-30.
- MacKinnon AC, Waters C, Jodrell D, Haslett C, Sethi T (2001) Bombesin and substance P analogues differentially regulate G-protein coupling to the bombesin receptor. Direct evidence for biased agonism. *J Biol Chem* 276:28083-28091.
- MacKinnon AC, Tufail-Hanif U, Lucas CD, Jodrell D, Haslett C, Sethi T (2005) Expression of V1A and GRP receptors leads to cellular transformation and increased sensitivity to substance-P analogue-induced growth inhibition. *Br J Cancer* 92:522-531.

- Mager U, Degenhardt T, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Tolppanen AM, Lindstrom J, Eriksson JG, Carlberg C, Tuomilehto J, Uusitupa M (2008) Variations in the ghrelin receptor gene associate with obesity and glucose metabolism in individuals with impaired glucose tolerance. *PLoS One* 3:e2941.
- Mague SD, Isiegas C, Huang P, Liu-Chen LY, Lerman C, Blendy JA (2009) Mouse model of OPRM1 (A118G) polymorphism has sex-specific effects on drug-mediated behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10847-10852.
- Mahmoud S, Thorsell A, Sommer WH, Heilig M, Holgate JK, Bartlett SE, Ruiz-Velasco V (2011) Pharmacological consequence of the A118G mu opioid receptor polymorphism on morphine- and fentanyl-mediated modulation of Ca(2)(+) channels in humanized mouse sensory neurons. *Anesthesiology* 115:1054-1062.
- Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castano JP (2003) Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 144:5372-5380.
- Mani BK, Walker AK, LopezSoto EJ, Raingo J, Lee CE, Perello M, Andrews ZB, Zigman JM (2014) Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. *J Comp Neurol*.
- Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmao L, Carvalho EF (2013) Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol* 40:94-98.
- Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschon HN, Demontis D, Torres-Espanol M, Marin-Padron LC, Gomez-Cabezas EJ, Alvarez-Iglesias V, Mosquera-Miguel A, Martinez-Fuentes A, Carracedo A, Borglum AD, Mors O (2014) Cuba: exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. *PLoS Genet* 10:e1004488.
- Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P (2004) The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet* 36:512-517.
- Margas W, Zubkoff I, Schuler HG, Janicki PK, Ruiz-Velasco V (2007) Modulation of Ca2+ channels by heterologously expressed wild-type and mutant human micro-opioid receptors (hMORs) containing the A118G single-nucleotide polymorphism. *J Neurophysiol* 97:1058-1067.
- Mason BL, Wang Q, Zigman JM (2014) The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annu Rev Physiol* 76:519-533.

- Mayer P, Holtt V (2001) Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans. *Pharmacol Ther* 91:167-177.
- Mayer P, Holtt V (2006) Pharmacogenetics of opioid receptors and addiction. *Pharmacogenet Genomics* 16:1-7.
- McGirr R, McFarland MS, McTavish J, Luyt LG, Dhanvantari S (2011) Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a. *Regul Pept* 172:69-76.
- McKay BE, McRory JE, Molineux ML, Hamid J, Snutch TP, Zamponi GW, Turner RW (2006) Ca(V)₃ T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci* 24:2581-2594.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD (1997) Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11:415-423.
- Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, Liu J, Schulman H, Yu L (1995) The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Neurosci* 15:2396-2406.
- Meunier JC (2003) Utilizing functional genomics to identify new pain treatments : the example of nociceptin. *Am J Pharmacogenomics* 3:117-130.
- Minami M, Satoh M (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23:121-145.
- Mitra-Ganguli T, Vitko I, Perez-Reyes E, Rittenhouse AR (2009) Orientation of palmitoylated CaVbeta2a relative to CaV2.2 is critical for slow pathway modulation of N-type Ca²⁺ current by tachykinin receptor activation. *J Gen Physiol* 134:385-396.
- Mogil JS (1999) The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7744-7751.
- Molineux ML, McRory JE, McKay BE, Hamid J, Mehaffey WH, Rehak R, Snutch TP, Zamponi GW, Turner RW (2006) Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5555-5560.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341:33-38.

- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
- Nicholson C, Bruggencate GT, Steinberg R, Stockle H (1977) Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1287-1290.
- Noguera MC, Schwegler A, Gomes V, Briceno I, Alvarez L, Uriceochea D, Amorim A, Benavides E, Silvera C, Charris M, Bernal JE, Gusmao L (2014) Colombia's racial crucible: Y chromosome evidence from six admixed communities in the Department of Bolivar. *Ann Hum Biol* 41:453-459.
- Onogi T, Minami M, Katao Y, Nakagawa T, Aoki Y, Toya T, Katsumata S, Satoh M (1995) DAMGO, a mu-opioid receptor selective agonist, distinguishes between mu- and delta-opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett* 357:93-97.
- Ortega VE, Meyers DA (2014) Pharmacogenetics: implications of race and ethnicity on defining genetic profiles for personalized medicine. *J Allergy Clin Immunol* 133:16-26.
- Page KM, Canti C, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC (1998) Identification of the amino terminus of neuronal Ca²⁺ channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation. *J Neurosci* 18:4815-4824.
- Pan B, Zucker RS (2009) A general model of synaptic transmission and short-term plasticity. *Neuron* 62:539-554.
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiri A, Epelbaum J, Le Bouc Y, Amselem S (2006) Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116:760-768.
- Park D, Dunlap K (1998) Dynamic regulation of calcium influx by G-proteins, action potential waveform, and neuronal firing frequency. *J Neurosci* 18:6757-6766.
- Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al-Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, Burbidge SA, Main M, Brown DA (2003) KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 23:7227-7236.
- Pasternak GW (2004) Multiple opiate receptors: deja vu all over again. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:312-323.
- Pasternak GW (2010) Molecular insights into mu opioid pharmacology: From the clinic to the bench. *Clin J Pain* 26 Suppl 10:S3-9.

- Pasternak GW (2012) Preclinical pharmacology and opioid combinations. *Pain Med* 13 Suppl 1:S4-11.
- Pasternak GW (2014) Opiate pharmacology and relief of pain. *J Clin Oncol* 32:1655-1661.
- Pasternak GW, Pan YX (2013) Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol Rev* 65:1257-1317.
- Pecina M, Love T, Stohler CS, Goldman D, Zubieta JK (2014) Effects of the Mu Opioid Receptor Polymorphism (OPRM1 A118G) on Pain Regulation, Placebo Effects and Associated Personality Trait Measures. *Neuropsychopharmacology*.
- Penela P, Murga C, Ribas C, Lafarga V, Mayor F, Jr. (2010) The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br J Pharmacol* 160:821-832.
- Perello M, Dickson SL (2014) Ghrelin signaling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system. *J Neuroendocrinol*.
- Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry* 67:880-886.
- Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Petersen PS, Woldbye DP, Madsen AN, Egerod KL, Jin C, Lang M, Rasmussen M, Beck-Sickinger AG, Holst B (2009) In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology* 150:4920-4930.
- Pettersson FD, Gronbladh A, Nyberg F, Sundstrom-Poromaa I, Akerud H (2012) The A118G single-nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene and use of labor analgesia. *Reprod Sci* 19:962-967.
- Polo-Parada L, Pilar G (1999) kappa- and mu-opioids reverse the somatostatin inhibition of Ca²⁺ currents in ciliary and dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 19:5213-5227.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8866-8871.
- Rachinger-Adam B, Conzen P, Azad SC (2011) Pharmacology of peripheral opioid receptors. *Curr Opin Anaesthesiol* 24:408-413.

- Raino J, Castiglioni AJ, Lipscombe D (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci* 10:285-292.
- Raino J, Khvotchev M, Liu P, Darios F, Li YC, Ramirez DM, Adachi M, Lemieux P, Toth K, Davletov B, Kavalali ET (2012) VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci* 15:738-745.
- Ramchandani VA, Umhau J, Pavon FJ, Ruiz-Velasco V, Margas W, Sun H, Damadzic R, Eskay R, Schoor M, Thorsell A, Schwandt ML, Sommer WH, George DT, Parsons LH, Herscovitch P, Hommer D, Heilig M (2011) A genetic determinant of the striatal dopamine response to alcohol in men. *Mol Psychiatry* 16:809-817.
- Rana BK, Shiina T, Insel PA (2001) Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:593-624.
- Rangel A, Sanchez-Armass S, Meza U (2010) Protein kinase C-mediated inhibition of recombinant T-type Cav3.2 channels by neurokinin 1 receptors. *Mol Pharmacol* 77:202-210.
- Reid CA, Bekkers JM, Clements JD (2003) Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci* 26:683-687.
- Reuter H (1979) Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* 41:413-424.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767-779.
- Ribeiro LF, Catarino T, Santos SD, Benoist M, van Leeuwen JF, Esteban JA, Carvalho AL (2014) Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E149-158.
- Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16:1197-1207.
- Ross JR, Riley J, Quigley C, Welsh KI (2006) Clinical pharmacology and pharmacotherapy of opioid switching in cancer patients. *Oncologist* 11:765-773.
- Ruiz-Linares A (2014) How Genes Have Illuminated the History of Early Americans and Latino Americans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Sakata I, Nakano Y, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Lee CE, Perello M, Anderson JG, Coppari R, Xiao G, Lowell BB, Elmquist JK, Zigman JM (2009) Characterization of a novel ghrelin cell reporter mouse. *Regul Pept* 155:91-98.
- Sather WA, McCleskey EW (2003) Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* 65:133-159.

- Sawyer SL, Mukherjee N, Pakstis AJ, Feuk L, Kidd JR, Brookes AJ, Kidd KK (2005) Linkage disequilibrium patterns vary substantially among populations. *Eur J Hum Genet* 13:677-686.
- Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdie P, Bourrier E, Dehouck B, Baneres JL, Martinez J, Mery PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prevot V, Mollard P (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1512-1517.
- Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:381-416.
- Seward E, Hammond C, Henderson G (1991) Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proc Biol Sci* 244:129-135.
- Shastry BS (2002) SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 47:561-566.
- Shekter LR, Taussig R, Gillard SE, Miller RJ (1997) Regulation of human neuronal calcium channels by G protein betagamma subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 52:282-291.
- Shi L, Bian X, Qu Z, Ma Z, Zhou Y, Wang K, Jiang H, Xie J (2013) Peptide hormone ghrelin enhances neuronal excitability by inhibition of Kv7/KCNQ channels. *Nat Commun* 4:1435.
- Sia AT, Lim Y, Lim EC, Goh RW, Law HY, Landau R, Teo YY, Tan EC (2008) A118G single nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia. *Anesthesiology* 109:520-526.
- Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Matthes H, Nappey V, Lannes B, Micheletti G, Kieffer B (1994) The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol* 46:1015-1021.
- Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, Matthes H, Lannes B, Micheletti G, Mattei MG, Charron G, Bloch B, Kieffer B (1995) kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7006-7010.
- Solak O, Erdogan MO, Yildiz H, Ulasli AM, Yaman F, Terzi ES, Ulu S, Dundar U, Solak M (2014) Assessment of opioid receptor mu1 gene A118G polymorphism and

- its association with pain intensity in patients with fibromyalgia. *Rheumatol Int* 34:1257-1261.
- Song Z, Du B, Wang K, Shi X (2013) Effects of OPRM1 A118G polymorphism on epidural analgesia with fentanyl during labor: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 17:743-749.
- Stanley EF (1993) Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron* 11:1007-1011.
- Strachan RT, Sun JP, Rominger DH, Violin JD, Ahn S, Rojas Bie Thomsen A, Zhu X, Kleist A, Costa T, Lefkowitz RJ (2014) Divergent transducer-specific molecular efficacies generate biased agonism at a G protein-coupled receptor (GPCR). *J Biol Chem* 289:14211-14224.
- Suh BC, Leal K, Hille B (2010) Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron* 67:224-238.
- Suh BC, Kim DI, Falkenburger BH, Hille B (2012) Membrane-localized beta-subunits alter the PIP2 regulation of high-voltage activated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3161-3166.
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482.
- Tan EC, Lim EC, Teo YY, Lim Y, Law HY, Sia AT (2009) Ethnicity and OPRM variant independently predict pain perception and patient-controlled analgesia usage for post-operative pain. *Mol Pain* 5:32.
- Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S (1988) Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336:134-139.
- Tang L, Gamal El-Din TM, Payandeh J, Martinez GQ, Heard TM, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2014) Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature* 505:56-61.
- Tao YX (2008) Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther* 120:129-148.
- Thayer SA, Miller RJ (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J Physiol* 425:85-115.
- Thomas P, Smart TG (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:187-200.
- Thompson GL, Kelly E, Christopoulos A, Canals M (2014) Novel GPCR paradigms at the mu-opioid receptor. *Br J Pharmacol*.

- Tiscornia G, Singer O, Verma IM (2006) Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 1:241-245.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11:S133-153.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.
- Tsien RW (1983) Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45:341-358.
- Uchida A, Zigman JM, Perello M (2013) Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Front Neurosci* 7:121.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115.
- Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494:185-194.
- Venter JC et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Verdu P, Pemberton TJ, Laurent R, Kemp BM, Gonzalez-Oliver A, Gorodezky C, Hughes CE, Shattuck MR, Petzelt B, Mitchell J, Harry H, William T, Worl R, Cybulski JS, Rosenberg NA, Malhi RS (2014) Patterns of admixture and population structure in native populations of Northwest North America. *PLoS Genet* 10:e1004530.
- Violon A, Giurgea D (1984) Familial models for chronic pain. *Pain* 18:199-203.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- Wang D, Sun X, Bohn LM, Sadee W (2005) Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* 67:2173-2184.
- Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schauble N, Friedel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Renschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schafer H, Hebebrand J, Hinney A (2004) Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab* 89:157-162.
- Weir BS, Cardon LR, Anderson AD, Nielsen DM, Hill WG (2005) Measures of human population structure show heterogeneity among genomic regions. *Genome Res* 15:1468-1476.
- Weiss JN (1997) The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J* 11:835-841.

- Weiss N, Hameed S, Fernandez-Fernandez JM, Fablet K, Karmazinova M, Poillot C, Proft J, Chen L, Bidaud I, Monteil A, Huc-Brandt S, Lacinova L, Lory P, Zamponi GW, De Waard M (2012) A Ca(v)3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J Biol Chem* 287:2810-2818.
- Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18:6319-6330.
- Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9:1099-1115.
- Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* 15:6403-6418.
- Wheeler DG, Barrett CF, Groth RD, Safa P, Tsien RW (2008) CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J Cell Biol* 183:849-863.
- Wheeler DG, Groth RD, Ma H, Barrett CF, Owen SF, Safa P, Tsien RW (2012) Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell* 149:1112-1124.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306-316.
- Williams S, Serafin M, Muhlethaler M, Bernheim L (1997) Facilitation of N-type calcium current is dependent on the frequency of action potential-like depolarizations in dissociated cholinergic basal forebrain neurons of the guinea pig. *J Neurosci* 17:1625-1632.
- Wisler JW, Xiao K, Thomsen AR, Lefkowitz RJ (2014) Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol* 27:18-24.
- Woll PJ, Rozengurt E (1988) [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]substance P, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1859-1863.
- Wu L, Bauer CS, Zhen XG, Xie C, Yang J (2002) Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature* 419:947-952.
- Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD (2009) Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell* 137:1225-1234.

- Xu G, Gao M, Sheng Q, Liu X, Gu E (2014) Opioid receptor A118G polymorphism does not affect the consumption of sufentanil and ropivacaine by patient-controlled epidural analgesia after cesarean section. *Ther Drug Monit*.
- Xu H, Wang X, Partilla JS, Bishop-Mathis K, Benaderet TS, Dersch CM, Simpson DS, Prisinzano TE, Rothman RB (2008) Differential effects of opioid agonists on G protein expression in CHO cells expressing cloned human opioid receptors. *Brain Res Bull* 77:49-54.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396.
- Yang SN, Berggren PO (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:621-676.
- Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM (2011) Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146:992-1003.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6736-6740.
- Yu B, Simon MI (1998) Interaction of the xanthine nucleotide binding G α mutant with G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 273:30183-30188.
- Zamponi GW, Snutch TP (1998) Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single G β subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4035-4039.
- Zamponi GW, Currie KP (2013) Regulation of Ca(V)₂ calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1828:1629-1643.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW (1996) Multiple structural elements in voltage-dependent Ca²⁺ channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* 17:991-1003.
- Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W (2005) Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem* 280:32618-32624.
- Zheng H, Loh HH, Law PY (2010) Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. *IUBMB Life* 62:112-119.
- Zhou J, Shapiro MS, Hille B (1997) Speed of Ca²⁺ channel modulation by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 77:2040-2048.
- Zhou L, Bohn LM (2014) Functional selectivity of GPCR signaling in animals. *Curr Opin Cell Biol* 27:102-108.

- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494:528-548.
- Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:3564-3572.
- Ziv E, Burchard EG (2003) Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics* 4:431–441.
- Zorrilla de San Martin J, Pyott S, Ballesteros J, Katz E (2010) Ca(2+) and Ca(2+)-activated K(+) channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *J Neurosci* 30:12157-12167.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.