



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral: “Estudio del efecto del receptor de ghrelina (GHSR) sobre la densidad en membrana de canales de calcio operados por voltaje (Cav) y sobre las propiedades biofísicas del sub-tipo $Cav3$ ”.

Tesista: Lic. Emilio Román Mustafá

Directora: Dra. Jesica Raingo

Año: 2019

Agradecimientos

Mi tesis doctoral fue uno de los mejores períodos de mi vida profesional y personal, y eso se lo debo a muchas de las personas que transitaron conmigo esta etapa.

En primer lugar quiero agradecerle a Jesica, mi directora en esta tesis y mentora en mi carrera profesional. Gracias por permitirme ser parte de tu grupo de laboratorio cuando aún no tenía claro lo que significaba hacer un doctorado. Gracias por motivarme a hacer ciencia buena y de calidad, y sobretodo ciencia rigurosa y reproducible. Gracias por darnos a tus becarios y becarias la libertad de probar nuestras hipótesis cuando las pudimos generar. Gracias por despertar en nosotros el cuestionamiento a nuestros resultados y ajenos. Gracias por tu paciencia infinita cuando mil veces te he dicho “no entiendo”, gracias por exponerme a nuevos desafíos, y gracias por incentivar me a trabajar en equipo y entender lo valioso de hacer ciencia colectiva. Jesica es una investigadora a la que admiro, y sobre todo a la que le agradezco por ponderar de la misma manera hacer ciencia y formar buenos recursos humanos.

También me gustaría agradecer a otras personas importantes en el laboratorio de Electrofisiología. Una de esas personas es Silvia, fue la primera que me enseñó lo que es trabajar en la mesada de un laboratorio realmente, teniendo mucha paciencia conmigo y con cualquier nuevo integrante. Gracias por preguntarnos siempre cómo nos está funcionando un experimento aunque no sepas qué estamos haciendo, y gracias por clonarnos todo lo que te pedimos siempre. Gracias por tu completa disposición hacia tus compañeros. También quiero darle las gracias a Javier, hoy un amigo, Él fue quien me enseñó la técnica del patch pasando horas atrás mío para que pudiera irme con al menos un registro. Gracias por contagiarme la vocación de hacer ciencia, leyendo papers a las siete de la tarde después de haber trabajado todo el día, llevándome al laboratorio un sábado para que te acompañe mientras vos patcheabas en neuronas y muchas otras hazañas. Asimismo le quiero agradecer a Francina que me acompañó en muchos de esos días en que las cosas no funcionan al hacer experimentos. Gracias a Valentina por los días largos de laboratorio acompañándonos en “el patch” con un mate, con música, o con discusiones increíbles y muy valiosas de nuestros propios resultados. Gracias a Santi por ayudarme a entender lo valioso de trabajar a la par de un compañero de laboratorio, y gracias por darme una mano las innumerables veces que te he pedido ayuda con cosas que no podía resolver, y por hacerme perder el medio a arreglar lo que sea. También gracias a Clara.

Algunos resultados de mi tesis los pude conseguir realizando una estadía en el laboratorio de Diane Lipscombe, es por ello que también le agradezco a ella por permitirme

realizar esa experiencia importante para mi formación. También a Sylvia y a Dan, dos integrantes de su laboratorio que me ayudaron en ese momento, y también a Javier, que hizo que mi estadía fuese muy placentera y divertida.

Asimismo siento necesario agradecer a Verónica y su grupo de laboratorio por las enriquecedoras discusiones sobre algunos de mis resultados.

Son muchas las horas que pasamos en el laboratorio y los chicos y las chicas de becarios 1 del IMBICE hicieron que ese tiempo y ambiente fuesen agradables, y que nos divirtiésemos muchas veces y que nos contengamos cuando las cosas no salían como esperábamos. Gracias a Ale, Nacho, Clara, Lau, Eli, Dani, Guille y Belén. Y también gracias a los chicos y las chicas de becarios 2: Flor, Franco y Ezequiel. Y también a esas personas del IMBICE que me he cruzado en el pasillo y me han sacado una risa o carcajada muchas veces. Gracias a Anita, a Mirta, a Majo, a Vero, a Rita, a Bamba, a Mariela, a Amanda y a Betty.

Gracias a mis compañeras de la facultad que el IMBICE transformó hoy en amigas. Gracias Andre, Pau y Mai. Gracias por las charlas, los mates, las salidas, y por bancarnos siempre que alguno necesitaba hacer catarsis con temas de diversa índole.

Como dije al principio son muchas las personas que me acompañaron en mi tesis, entre ellas muchos integrantes del IMBICE que me han ayudado y colaborado de diversas formas. Gracias a los chicos de Cultivos, Daniel y Julieta; a Majo; a Mario; a Guadalupe; a Nico; y a Josefina.

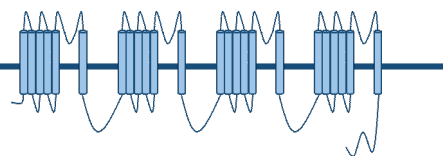
Gracias a mis amigos y amigas de siempre. A Ruth que me bancaste toda mi carrera y los primeros tres años del doctorado, y me viste transitar por todos los estados emocionales posibles y siempre estuviste ahí. También a Danisa, Mario, Josefina y Nacho les quiero decir gracias.

Gracias a mi familia. Gracias a Mamá, Papá, Romi, Yami, Valen y Paz, por confiar siempre en mí, y creer en mí incluso más que yo mismo. Gracias por el increíble esfuerzo que hicieron para que logre estudiar una carrera universitaria que hoy además me permitió hacer mi posgrado. Gracias por ayudarme siempre que los necesite y por apoyarme en todas mis decisiones. Los amo.

Finalmente, y no por eso menos importante, gracias a la educación pública de nuestro país que gratuitamente me permitió no sólo realizar mi carrera de grado sino que también me permitió realizar mi doctorado. Creo firmemente en que la educación y la ciencia públicas hacen a un país soberano.

Gracias a todos.

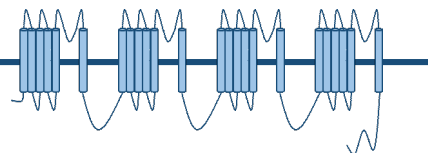
Resumen



Los canales de calcio dependientes del voltaje (Ca_v) acoplan la despolarización de la membrana al influjo de calcio, desencadenando una diversidad de procesos celulares dependientes del calcio. Los Ca_v son, por lo tanto, críticos en la configuración de la actividad y función neuronal. Existen al menos diez genes que codifican para distintos subtipos de Ca_v , los cuales poseen características biofísicas particulares que les permiten cumplir funciones muy diversas como el control de la excitabilidad neuronal (Ca_v3), la liberación de neurotransmisores (Ca_v2) y la transcripción (Ca_v1). Muchos neurotransmisores y fármacos que actúan a través de receptores acoplados a proteína G (GPCR) modulan la actividad neuronal al alterar la expresión, el tráfico o la función de los Ca_v . Los mecanismos dependientes de GPCR que regulan la densidad de los Ca_v en la superficie celular se observan en muchas neuronas pero están menos estudiados que otros efectos celulares de los GPCR. En el primer capítulo de esta tesis mostramos que la actividad constitutiva del receptor de la hormona ghrelina (GHSR) puede inhibir el tráfico hacia la membrana plasmática de varios subtipos de Ca_v ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.2$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) en ausencia de ghrelina utilizando como sistema experimental células HEK293T transfectadas en forma transitoria. Además mostramos que las corrientes Ca_v1 nativas en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas son moduladas por la actividad constitutiva de GHSR. Esta forma basal de inhibición de los Ca_v depende de la presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$. Dicha proteína promueve que la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$ sea exportada desde el retículo endoplásmico hacia la superficie celular. De este modo, las acciones de GHSR en el tráfico de los Ca_v sugieren un nuevo papel para esta vía de señalización en áreas del cerebro que controlan la ingesta de alimentos, la recompensa, el aprendizaje y la memoria. Por otro lado, observamos que la aplicación aguda de ghrelina a células coexpresando GHSR y $Ca_v3.3$ inhibía la corriente macroscópica registrada, efecto que no se observaba al coexpresar el subtipo $Ca_v3.2$. Este hallazgo originó el segundo capítulo de esta tesis donde exploramos el efecto de ghrelina en los tres subtipos de Ca_v3 de expresión neuronal. Pudimos demostrar que ghrelina inhibe las corrientes T nativas en neuronas hipotalámicas y mediante la expresión heteróloga en células HEK293T determinamos que el subtipo $Ca_v3.3$ resultó ser el único sensible a dicha modulación. La modulación de $Ca_v3.3$ por ghrelina comprende una reducción en la conductancia máxima, un desplazamiento a voltajes hiperpolarizados de la curva corriente voltaje (curva I-V) y de la curva del estado estacionario de inactivación, y una aceleración de la cinética de activación e inactivación. Además nuestra predicción basada en modelado indica que la inhibición de $Ca_v3.3$ atenuaría la estimulación de los disparos de potenciales de acción originados por la inhibición de las corrientes de

potasio por parte de ghrelina. En resumen, descubrimos un nuevo blanco de ghrelina en las neuronas: los $Ca_v3.3$. Este mecanismo implicaría una regulación negativa de la activación neuronal ejercida por la ghrelina. En conjunto nuestro trabajo contribuye al conocimiento de la amplia gama de acciones de GHSR, un receptor potencialmente útil para el desarrollo de fármacos para tratar desórdenes alimenticios.

Resumen en Inglés



Voltage-gated calcium (Ca_v) channels couple membrane depolarization to calcium influx, triggering a range of calcium-dependent cellular processes. Ca_v channels are therefore critical in shaping neuronal activity and function. There are at least ten genes that code for different subtypes of Ca_v , which have particular biophysical characteristics that allow them to fulfill very diverse functions such as neuronal excitability control (Ca_v3), neurotransmitter release (Ca_v2) and transcription (Ca_v1). Furthermore, many neurotransmitters and drugs that act through G protein-coupled receptors (GPCRs), modulate neuronal activity by altering the expression, trafficking, or function of Ca_v channels. GPCR-dependent mechanisms that down regulate Ca_v channel surface expression levels are observed in many neurons but are, by comparison, less studied. In the first chapter of this thesis, by using transiently transfected HEK293T cells we discovered that growth hormone secretagogue receptor (GHSR), a GPCR, can inhibit the forward trafficking of several Ca_v subtypes ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.2$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) even in the absence of agonist. We also show that native Ca_v1 currents in hypothalamic neuronal primary cultures are modulated by GHSR constitutive activity. This constitutive form of GPCR-mediated Ca_v inhibition depends on the presence of a $Ca_v\beta$ subunit. $Ca_v\beta$ subunits enhances $Ca_v\alpha_1$ subunits traffic from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. The actions of GHSR on Ca_v channels trafficking suggest a role for this signaling pathway in brain areas that control food intake, reward, learning and memory. On the other hand we observed that the acute application of ghrelin on cells coexpressing GHSR and $Ca_v3.3$ inhibits macroscopic current, which is not observed for $Ca_v3.2$ subtype. This observation originated the second chapter of this thesis where we explored the effect of ghrelin in the three Ca_v3 neuronal subtypes. We demonstrated that ghrelin inhibits native Ca_v3 currents in hypothalamic neurons and in a heterologous expression system we determined that $Ca_v3.3$ subtype is the only one sensitive to the mentioned modulation. The effect of ghrelin on $Ca_v3.3$ comprises a reduction in maximum conductance, a shift to hyperpolarized voltages of the I-V and steady-state inactivation curves, and an acceleration of the activation and inactivation kinetics. Our model-based prediction indicates that the inhibition of $Ca_v3.3$ would attenuate the stimulation of firing originated from the inhibition of potassium currents by ghrelin. In summary, we discovered a new target of ghrelin in neurons: the $Ca_v3.3$. This mechanism would imply a negative feed-forward regulation of the neuronal activation exerted by ghrelin. In summary our work expands the knowledge of the wide range of actions of GHSR, a potentially useful receptor for the development of drugs to treat eating disorders.

Publicaciones

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

- **Mustafá ER**; López Soto EJ; Martínez Damonte V; Rodríguez S; Lipscombe D; Raingo J. "*Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca(2+) channels in a Ca_v beta-dependent manner*". JOURNAL OF CELL SCIENCE; DOI:10.1242/jcs.207886; Año: 2017.
- **Mustafá ER**; Cordisco Gonzalez S; Raingo J. "*Ghrelin selectively inhibits Cav3.3 subtype of low-voltage-gated calcium channels*". MOLECULAR NEUROBIOLOGY; doi.org/10.1007/s12035-019-01738-y; Año: 2019.

Otros trabajos publicados relacionados a esta tesis doctoral:

- López Soto EJ; Agosti F; Cabral A; **Mustafá ER**; Martínez Damonte V; Gandini, MA; Rodríguez S, Castrogiovanni D; Félix R; Perelló M; Raingo J. "*Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs Cav2.1 and Cav2.2 currents in hypothalamic neurons*". JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY; doi: 10.1085/jgp.201511383; Año: 2015.
- Franco Barrile; Celine M'Kadmi; Pablo N De Francesco; Agustina Cabral; Guadalupe García Romero; **Emilio Román Mustafá**; Sonia Cantel; Marjorie Damian; Sophie Mary; Séverine Denoyelle; Jean-Louis Banères; Jacky Marie; Jesica Raingo; Jean-Alain Fehrentz; Mario Perello. "*Development of a novel fluorescent ligand of growth hormone secretagogue receptor based on the N-terminal LEAP2 region*". MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY. DOI:10.1016/j.mce.2019.110573; Año: 2019.

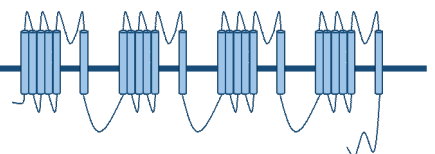
Listado de Abreviaturas

AC.....	adenilato ciclasa
AID.....	<i>Alpha Interaction Domain</i>
ATB.....	antibiótico
ADN.....	ácido desoxirribonucleico
ADNc.....	ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm.....	ARN mensajero
BDNF.....	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
Ca _v	canales de calcio operados por voltaje
CACHD1.....	<i>cache (Ca²⁺ channel and chemotaxis receptor) domain containing 1</i>
CGRP.....	<i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>
CNQX.....	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CRE.....	<i>cAMP Response Element</i>
CRF-1.....	<i>Corticotropin Releasing Factor receptor 1</i>
D1R.....	<i>Dopamine Receptor type 1</i>
D2R.....	<i>Dopamine Receptor type 2</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRG.....	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
EDTA.....	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA.....	etilenglicol-bis (β-aminoetil éter) -N, N, N', N'-ácido tetraacético
FRET.....	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GABA.....	<i>γ-aminobutyric acid B</i>
GDP.....	guanosín difosfato
GFP.....	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GHRP-6.....	<i>Growth Hormone-Releasing Hexapeptide</i>
GHSR.....	receptor de ghrelina (<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i>)
GK.....	<i>Guanylate Kinase</i>
GMP.....	guanosín monofosfato
GPCR.....	receptor acoplado a proteína G
GRK.....	<i>G protein-coupled Receptor Kinases</i>
GTP.....	guanosín trifosfato
h.....	hora
HEK293T.....	<i>Human Embryonic Kidney 293T</i>
HVA.....	<i>High Voltage-Activated</i>

I-V.....	corriente-voltaje
IDV.....	Inhibición Dependiente del Voltaje
IIV.....	Inhibición Independiente del Voltaje
K _v	canales de potasio activados por voltaje
LB.....	Luria Bertani
LEAP2.....	<i>Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2</i>
M.....	molar
mA.....	miliamperio
Mas-GRK2-ct.....	<i>Myristoylated Gβγ-binding domain of the GPCR kinase2 C-terminus</i>
μg.....	microgramo
μM.....	micromolar
μs.....	microsegundo
μl.....	microlitro
ml.....	mililitro
mm.....	milímetro
mM.....	milimolar
ms.....	milisegundo
mV.....	milivoltio
MΩ.....	megaohm
ng.....	nanogramo
NK1R.....	<i>Neurokinin 1 Receptor</i>
nm.....	nanómetro
ORL1.....	<i>Opiod Receptor-Like type 1</i>
pb.....	pares de bases
PBS.....	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR.....	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PLC.....	<i>Phospholipase C</i>
PKC.....	<i>Protein Kinase C</i>
RGS2.....	<i>Regulator of G-protein signaling 2</i>
r.p.m.....	revoluciones por minuto
s.....	segundo
SER.....	<i>Serum Element Response</i>
SFB.....	suero fetal bovino
SH3.....	<i>Src Homology 3</i>

SPA.....	<i>Substance-P Analog</i>
SV40.....	<i>Simian Virus 40</i>
TBC.....	<i>transcription blocking cassette</i>
TrkB.....	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
TRPV1.....	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid type 1</i>
TTX.....	<i>tetrodotoxina</i>
YFP.....	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Indice



Introducción	17
1- Canales de calcio operados por voltaje (Ca _v)	18
2- Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)	21
3- Modulación de Ca _v por GPCRs	23
4- Receptor de ghrelina (GHSR).....	25
5- Efecto del sistema GHSR-ghrelina sobre las corrientes de calcio y la actividad neuronal.....	27
Objetivos.....	29
Materiales y métodos.....	31
1- Modelos experimentales.....	32
1.1- Cultivo celular.....	32
1.2- Animales.....	32
1.2.1- Extracción de ADN.....	32
1.2.2- Genotipificación de ratones salvajes y deficientes en GHSR.....	33
2- Cultivos celulares.....	33
2.1- Línea celular HEK293T.....	33
2.2- Cultivo neuronal primario de hipotálamo.....	34
3- Expresión heteróloga.....	35
3.1- Transfecciones transientes.....	35
3.2- Clones utilizados.....	35
4- Biología molecular.....	37
4.1 Amplificación de clones para transfección.....	37
4.1.1 Cepa bacteriana.....	37
4.1.2 Obtención de bacterias competentes.....	38
4.1.3 Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico.....	38
4.1.4 Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep).....	38
4.1.5 Cuantificación de ADN.....	39
5- Electrofisiología.....	39
5.1- Corrientes de calcio en células HEK293T transfectadas transientemente.....	39
5.2- Corrientes de calcio y bario en cultivos neuronales primarios.....	40
6- Imágenes.....	40
7- Modelado.....	41
8- Ecuaciones.....	42

9- Drogas43

10- Estadística44

Capítulo I: “Estudio del efecto de la actividad constitutiva del receptor de ghrelina (GHSR) sobre la densidad en membrana de canales de calcio operados por voltaje (Ca_v)”45

Resultados I.....45

Discusión I65

Conclusiones I73

Capítulo II: “Estudio del efecto de la actividad evocada del receptor de ghrelina (GHSR) sobre las propiedades biofísicas del subtipo Ca_v3”76

Resultados II.....76

Discusión II93

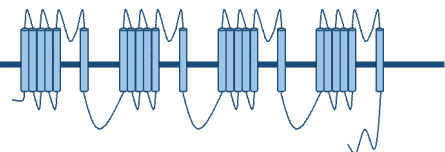
Conclusiones II100

Conclusiones103

Generales103

Bibliografía.....105

Introducción



1- Canales de calcio operados por voltaje (Ca_v)

Los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v) son proteínas tipo canal iónico selectivas a calcio fundamentales para la actividad neuronal debido a que acoplan la despolarización de la membrana plasmática con aumentos de calcio intracelular, traduciendo información eléctrica en una señal química universal (Tsien, 1983).

Estructuralmente los Ca_v son complejos hetero-oligoméricos de cuatro o cinco subunidades proteicas diferentes codificadas por múltiples genes. La subunidad principal Ca_vα₁ incluye en su estructura el poro de conductividad iónica, el sensor de voltaje y la compuerta de activación. Dicha subunidad se organiza en cuatro dominios homólogos, con seis segmentos transmembrana cada uno. Los segmentos S4 cargados positivamente conforman el sensor de voltaje. Los segmentos S5 y S6 y el bucle que los conecta forman el poro y determinan la selectividad y conductancia iónica (Catterall, 2000). Una subunidad auxiliar intracelular Ca_vβ y una transmembrana Ca_vα₂δ, de las cuales existen varias isoformas, son componentes de la mayoría de los subtipos de Ca_v. También se ha encontrado una subunidad auxiliar Ca_vγ en los Ca_v del músculo esquelético. Aunque estas subunidades accesorias modulan ciertas propiedades del complejo canal, la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los Ca_v surge principalmente de la existencia de múltiples subunidades Ca_vα₁ (Hofmann *et al.*, 1994).

En el año 2000, se adoptó la bien definida nomenclatura para los canales de potasio para nombrar y clasificar a los Ca_v (Ertel *et al.*, 2000). Así, la subfamilia Ca_v1 (Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3 y Ca_v1.4) incluye los canales que contienen Ca_vα_{1S}, Ca_vα_{1C}, Ca_vα_{1D} y Ca_vα_{1F}, que median las corrientes de calcio tipo L. La subfamilia Ca_v2 (Ca_v2.1, Ca_v2.2 y Ca_v2.3) incluye canales que contienen Ca_vα_{1A}, Ca_vα_{1B} y Ca_vα_{1E}, que median las corrientes tipo P/Q, N y R respectivamente. La subfamilia de Ca_v3 (Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3) incluye los canales que contienen Ca_vα_{1G}, Ca_vα_{1H} y Ca_vα_{1I}, que median las corrientes tipo T.

La denominación de corrientes tipo L se debe a sus corrientes entrantes de larga duración o *Long-lasting*. La sensibilidad a dihidropiridinas permitió diferenciarlas de las corrientes rápidas tipo T, denominadas así por ser transientes (*Transient*) (Nowycky *et al.*, 1985). Las L se caracterizan por ser activadas a altos voltajes, una conductancia de canal único elevada, inactivación dependiente de voltaje lenta y una marcada regulación por fosforilación (Reuter, 1983). Por su parte, las corrientes tipo T se activan a potenciales de membrana más negativos, inactivan rápidamente, deactivan lentamente, poseen conductancia de canal único pequeña y son insensibles a los fármacos que bloquean los Ca_v1

(Carbone & Lux, 1984). Adicionalmente, el registro en neuronas disociadas de la raíz del ganglio dorsal (DRG, del inglés *Dorsal Root Ganglia*) permitió definir a las corrientes hoy denominadas tipo Cav2.2 como las corrientes tipo N para distinguirlas del comportamiento de las corrientes tipo L (N del inglés *Non long-lasting*). Dichas corrientes se activan a potenciales más negativos que las corrientes tipo L pero más positivos que las corrientes tipo T, además de poseer una cinética de inactivación intermedia entre estos dos subtipos (Nowycky *et al.*, 1985). Las corrientes tipo N se identifican por ser altamente sensibles al bloqueo con la toxina ω -conotoxina GVIA (Tsien *et al.*, 1988). Posteriormente, el hallazgo de toxinas específicas permitió la identificación de otros tres tipos de corrientes de calcio. Las corrientes tipo P, registradas por primera vez en neuronas de Purkinje (origen de su denominación) fueron distinguidas por su elevada sensibilidad a la toxina ω -agatoxina IVA (Llinas *et al.*, 1989; Mintz *et al.*, 1992). Las corrientes tipo Q, registradas inicialmente en neuronas granulares de cerebelo también eran bloqueadas con ω -agatoxina IVA pero con menor afinidad (Zhang *et al.*, 1993; Randall & Tsien, 1995). Aunque inicialmente se creyó que las corrientes P y Q estaban codificadas por genes diferentes, Stea y colaboradores, en el año 1994, ya postulaban que en realidad estaban codificadas por el mismo gen y proponían que las diferencias cinéticas y de sensibilidad a ω -agatoxina IVA se debían a variantes putativas de *splicing* del mismo gen, y/o a diferentes complejos entre $Ca_v\alpha_1$ y las diversas isoformas de $Ca_v\beta$ (Stea *et al.*, 1994). En el año 1999, gracias a los aportes de Bourinet y colaboradores se confirmó dicha hipótesis (Bourinet *et al.*, 1999). Este subtipo de corrientes se activa a potenciales similares a las corrientes tipo N, pero presentan una cinética de inactivación más rápida. Por último, también en cerebelo, se identificó un subtipo de corriente insensible a todos los bloqueadores antes mencionados que se denominó tipo R (del inglés *Resistant*) (Randall & Tsien, 1995).

La distribución asimétrica de los subtipos de Ca_v en los compartimientos dendríticos, somáticos y presinápticos de las neuronas centrales contribuye a la funcionalidad diferencial de estos canales. Los Ca_v1 se localizan en somas y dendritas, donde el influjo de calcio a través de los mismos acopla la excitación neuronal a la transcripción de genes dependiente de calcio en forma muy específica (Dolmetsch *et al.*, 2001). Los $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ presentes en las terminales presinápticas, están íntimamente conectados a maquinaria de fusión de vesículas en la zona activa donde son actores necesarios para la liberación de neurotransmisores (Takahashi & Momiyama, 1993; Wu *et al.*, 1999; Cao & Tsien, 2010). En muchas neuronas, los Ca_v3 están presentes en las dendritas, donde participan en las oscilaciones del potencial de membrana regulando el patrón de disparo de potenciales de

acción de bajo umbral (Perez-Reyes, 2003a). Los Ca_v3 tendrían además un rol presináptico en algunas sinapsis de neuronas corticales (Huang *et al.*, 2011). Los Ca_v3 también regulan la excitabilidad en algunos subtipos de neuronas sensoriales que no poseen dendritas (Dolphin, 2012). Si bien no existen drogas específicas que bloqueen selectivamente a los tres subtipos de Ca_v3 ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) Chemin y colaboradores han contribuido a entender el rol diferencial de cada subtipo de Ca_v3 en la excitabilidad neuronal a través de simulaciones de la participación de las corrientes de estos tres subtipos en la actividad de neuronas reticulares y de retransmisión talamocorticales. Sus resultados indican que la corriente $Ca_v3.3$ puede contribuir a un patrón de disparos de potenciales de acción sostenido en el tiempo, mientras que $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ generarían ráfagas cortas de disparo de potenciales de acción (Chemin *et al.*, 2002). Este conjunto de observaciones demuestra que la sub-localización de los Ca_v resulta crítica para su funcionalidad. Una pregunta fundamental en este contexto es ¿cómo se dirigen los diferentes subtipos de Ca_v a compartimentos espaciales distintos en las neuronas?

Aunque las subunidades $Ca_v\alpha_1$ dictan las principales propiedades biofísicas y farmacológicas de estos canales, su expresión se incrementa y sus propiedades se modifican por las subunidades auxiliares (Dolphin, 2012; Felix *et al.*, 2013). De este modo las subunidades $Ca_v\alpha_2\delta$ y $Ca_v\beta$ desempeñan funciones importantes en el plegamiento de los canales y su posterior transporte hacia la superficie celular en dominios particulares de las neuronas. Los subtipos Ca_v1 y Ca_v2 pueden formar un complejo heteromérico, que se ensambla con alguno de los subtipos de subunidades $Ca_v\beta$, y alguno de los subtipos de subunidades $Ca_v\alpha_2\delta$. En el caso de los Ca_v3 , las subunidades $Ca_v\alpha_1$ pueden formar canales funcionales asociados o no con las subunidades auxiliares (De Waard *et al.*, 1994; Bichet *et al.*, 2000; Fang & Colecraft, 2011; Dolphin, 2016).

Las proteínas $Ca_v\alpha_2$ y $Ca_v\delta$ se expresan a partir del mismo gen, que codifica para una pre-proteína (De Jongh *et al.*, 1990) la cual se escinde para luego unirse a través de un puente disulfuro (Jay *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 2010; Dolphin, 2012). Funcionalmente, la coexpresión de las subunidades $Ca_v\alpha_2\delta$ aumentan la amplitud de la corriente Ca_v1 y Ca_v2 (Dolphin, 2003b). $Ca_v\alpha_2\delta$ también afecta las propiedades biofísicas de estos canales, al aumentar su velocidad de inactivación en diferentes grados dependiendo de la isoforma de $Ca_v\alpha_2\delta$ expresada. La expresión de subunidades $Ca_v\alpha_2\delta$ particulares también desplaza el potencial medio de inactivación del estado estacionario de los Ca_v2 hacia valores más hiperpolarizados (Richards *et al.*, 2007). El mecanismo subyacente más probable al aumento en la amplitud de corriente inducido por la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta$ es un aumento del

tráfico hacia la membrana plasmática de los complejos Ca_v1 y Ca_v2 , junto con una disminución en su internalización (Canti *et al.*, 2005; Bernstein & Jones, 2007).

Las subunidades $Ca_v\beta$ son proteínas citoplasmáticas que se unen a la parte proximal del bucle intracelular entre los dominios I y II de las subunidades $Ca_v\alpha_1$ de Ca_v1 y Ca_v2 . Las isoformas $Ca_v\beta_{2a}$ y $Ca_v\beta_{2e}$ son las únicas ancladas *per-se* a la membrana plasmática, la primera a través de una palmitoilación y la segunda a través de una interacción electrostática e hidrofóbica con la membrana plasmática (Olcese *et al.*, 1994; Chien *et al.*, 1996; Miranda-Laferte *et al.*, 2014). El motivo de unión de $Ca_v\beta$ con $Ca_v\alpha_1$ se denomina dominio de interacción α (AID del inglés *Alpha Interaction Domain*) (Pragnell *et al.*, 1994). Asimismo, cuando $Ca_v\beta$ se asocia a la región AID interactúa con otras regiones del canal involucradas en las propiedades de compuerta incluyendo los segmentos transmembrana que forman el poro (Van Petegem *et al.*, 2004). Además todos los subtipos de $Ca_v\beta$ constan de un dominio conservado homólogo Src 3 (SH3 del inglés *Src Homology 3*) y un dominio tipo guanilato quinasa (GK del inglés *Guanylate Kinase*) (Hanlon *et al.*, 1999). La presencia de la subunidad $Ca_v\beta$ en el complejo canal de Ca_v1 y Ca_v2 incrementa la expresión funcional y ejerce una fuerte influencia en sus propiedades biofísicas. Para el incremento en la corriente se plantea que $Ca_v\beta$ regula la activación del canal e incrementa el número de canales insertos en la membrana (Josephson & Varadi, 1996; Brice *et al.*, 1997; Bichet *et al.*, 2000). Uno de los mecanismos propuestos para el aumento del tráfico es que la unión de $Ca_v\beta$ al bucle I-II de $Ca_v\alpha_1$ enmascara un sitio putativo de retención en retículo endoplásmico (Cornet *et al.*, 2002). En relación a ello se ha propuesto que la carencia de interacción entre $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_1$ resulta en la poliubiquitinación de la subunidad principal y la consecuente degradación proteasomal, más que promover una retención de los Ca_v1 y Ca_v2 en el retículo endoplásmico (Bichet *et al.*, 2000; Altier *et al.*, 2011; Waithe *et al.*, 2011). En este sentido se demostró que el aminoácido triptófano en la posición 391 del subtipo $Ca_v2.2$ es crucial para la correcta interacción entre $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_1$, y su sustitución por una alanina ($Ca_v2.2W391A$) acorta la vida media del canal y aumenta su degradación proteasomal (Waithe *et al.*, 2011).

2- Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) son una superfamilia de receptores de siete dominios hélice transmembrana capaces de activarse por un amplia gama de estímulos. Ese intercambio de nucleótidos favorece la disociación en $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$,

cada uno de los cuales, dependiendo de su subtipo, actuará sobre efectores específicos en forma dependiente del tipo celular (Tedford & Zamponi, 2006). Muchos de los GPCRs estudiados poseen mecanismos intrínsecos de desensibilización que permiten interrumpir su actividad cuando la presencia del agonista es prolongada. En los modelos clásicos, la señal iniciada por el ligando cesa tras la fosforilación del receptor por quinasas específicas de GPCRs, GRK (del inglés *G protein coupled Receptor Kinase*), la posterior unión de arrestina al receptor fosforilado que permite el desacople de la proteína G y la consecuente desensibilización, para finalmente internalizarse en vesículas recubiertas de clatrina (Gainetdinov *et al.*, 2004).

En los modelos clásicos de activación de los GPCRs se plantean dos estados en equilibrio del receptor: un estado inactivo, en ausencia de agonista, y otro activo, en presencia de agonista (Gether, 2000; Oldham & Hamm, 2008). En los sucesivos años, se han reportado evidencias que apoyan un modelo de múltiples estados en el cual los GPCRs adoptarían diversas conformaciones activas e inactivas (Makita & Iiri, 2014). En este nuevo modelo cada ligando reconoce y estabiliza conformaciones específicas de cada GPCR, otorgando así efectos biológicos únicos y específicos para cada interacción, proceso conocido como selección conformacional (Kenakin, 2012). Además establece que algunos GPCRs pueden existir en estados activos en ausencia de agonistas. En esta nueva perspectiva, el concepto de antagonista neutral debe ser ampliado ya que algunos pueden actuar como agonistas parciales y/o agonistas inversos. En el caso de GPCRs que tengan un nivel alto de actividad basal espontánea, el uso de antagonistas pierde relevancia respecto de los agonistas inversos que al unirse al GPCR lo estabilizan en el estado activo (Strange, 2002). La activación espontánea basal ha sido puesta en evidencia para múltiples GPCRs mediante la obtención de mutantes que poseen su equilibrio desplazado hacia las formas espontáneas inactivas (GPCR inactivo constitutivamente) o activas (GPCR constitutivamente activo) (Vassart & Costagliola, 2011) como así también por la regulación de su actividad a través de modificaciones en su expresión o a través de la unión de agonistas inversos endógenos. Recientemente se ha demostrado que la activación constitutiva de los GPCRs también se puede originar por la interacción con otras proteínas, incluyendo la dimerización de GPCRs. Este mecanismo alostérico incrementa aún más la complejidad de los GPCRs (Sato *et al.*, 2016).

Los GPCRs se acoplan a diferentes subtipos de proteínas G con consecuencias funcionales muy diversas. (McCudden *et al.*, 2005). Entre las vías que derivan de la acción de las G α se encuentran la activación de adenilato ciclasa (AC) por G α_s (McCudden *et al.*,

2005) y su inhibición por $G\alpha_{i/o}$ (McCudden *et al.*, 2005). Además, la proteína $G\alpha_q$ activa de fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*) (Rhee, 2001), mientras que $G\alpha_t$ (grupo que incluye a $G\alpha_{gust}$), implicada en las vías sensitivas, promueve la actividad fosfodiesterasa de GMP cíclico (Arshavsky *et al.*, 2002) y $G\alpha_{12}$ promueve la translocación de RhoGEF desde el citosol a la membrana y la posterior activación de RhoA (Siehler, 2009). Por otro lado, los dímeros de $G\beta\gamma$ son altamente variables debido a que existen cinco subtipos de proteínas $G\beta$ y doce de proteínas $G\gamma$ con la posibilidad de variantes de *splicing* alternativo (Ray *et al.*, 1995; Clapham & Neer, 1997; Fletcher *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999). Las proteínas $G\beta\gamma$ pueden ejercer su acción a través de la interacción física con sus proteínas blanco ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, quinasas 1 y 2 de GPCRs, diferentes subtipos de AC, dinamina, entre otras), o de manera indirecta a través de mediadores que regulan otras proteínas como MAP quinasas, fosfolipasa A2, entre otras (Smrcka, 2008). A pesar de la gran variedad de $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, la combinación de subunidades presentes en la naturaleza está limitada por patrones específicos de expresión celular y sub-celular, y por uniones termodinámicamente desfavorables (Tedford & Zamponi, 2006). En los últimos años son bastas las evidencias que demuestran que los GPCRs se pueden acoplar a múltiples proteínas G y activar múltiples cascadas celulares (Eason *et al.*, 1992; Neve, 2009). Sumado a ello, la contribución parcial de vías paralelas puede diferir dependiendo del ligando utilizado para estimular el GPCR, lo que resulta en una respuesta *biased* (Rajagopal *et al.*, 2010). Otra cualidad ya mencionada que suma complejidad a la biología de los GPCRs es la capacidad de formar dímeros u oligómeros, un proceso que afecta, además de la actividad constitutiva, el tráfico intracelular, el reconocimiento de ligandos, la señalización intracelular y la regulación. De hecho, la potencia de muchos agonistas es afectada cuando el receptor se halla dimerizado. A su vez, se ha demostrado el *cross-talk* entre diferentes GPCRs, conduciendo a una modulación negativa o positiva en las respuestas funcionales por los agonistas de ambos receptores, y se sugiere que dicho efecto en algunos casos resulta de la heterodimerización de los GPCRs (Hermans, 2003).

3- Modulación de Ca_v por GPCRs

Los Ca_v cumplen roles fisiológicos especializados, y tanto su actividad como su expresión en la superficie celular están finamente controlados por una gran variedad de mecanismos celulares, entre estos, la activación de GPCRs. En este sentido, la primera evidencia de modulación de los Ca_v por proteínas G fue descripta hace 40 años por Dunlap

y Fischbach en dos artículos (Dunlap & Fischbach, 1978; 1981). Ellos demostraron que la contribución de los Ca_v a los potenciales de acción somáticos en neuronas de DRG estaba reducida en respuesta a la activación de los receptores de GABA, serotonina y adrenérgicos, resultando en una disminución en la duración del potencial de acción (Dunlap & Fischbach, 1978). Luego estos autores mostraron que la activación de GPCRs inhibía las corrientes de calcio activadas a voltajes altos (Dunlap & Fischbach, 1981).

En la actualidad el mecanismo de esta inhibición está mejor comprendido. Cuando los GPCRs son activados, la disociación de $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$ puede activar una gran variedad de cascadas intracelulares, incluyendo la activación por $G\alpha$ -GTP de proteínas quinasas que fosforilan a una forma específica de *splicing* de $Ca_v2.2$, enriquecida en nociceptores, generando un tipo de inhibición denominada independiente del voltaje (IIV) (Raingo *et al.*, 2007). Por su parte, el dímero $G\beta\gamma$ interacciona directamente con $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en forma dependiente del potencial (inhibición dependiente del voltaje, IDV) (Herlitze *et al.*, 1996; Ikeda, 1996; Arnot *et al.*, 2000; Berecki *et al.*, 2016). La interacción del dímero $G\beta\gamma$ con la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$ estabiliza el estado cerrado del canal, lo que se manifiesta como un desplazamiento hacia potenciales despolarizados de la curva de activación del canal. Además, como este efecto inhibitorio puede ser liberado por despolarización, la corriente muestra una cinética lenta de activación producto de la desinhibición a lo largo del pulso despolarizante de estimulación (Zamponi & Currie, 2013).

Varios reportes demuestran que los $Ca_v2.2$ forman complejos con GPCRs (Altier, 2012). En este sentido, se ha reportado la interacción física entre $Ca_v2.2$ y cuatro de los miembros de la familia de los receptores de opioides (Beedle *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2010), los receptores de dopamina de tipo 1 y 2 (D1R y D2R del inglés *Dopamine Receptor type 1 and 2*) (Kisilevsky *et al.*, 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008) y con el receptor de melatonina 1 (Benleulmi-Chaachoua *et al.*, 2016) entre otros. Al menos en el caso de D1R y de un receptor de la familia opioide, ORL1 (del inglés *Opioid Receptor Like-1*), las interacciones con $Ca_v2.2$ se producen a través de la unión directa de las regiones intracelulares de los receptores con la región proximal del extremo C-terminal del Ca_v (Beedle *et al.*, 2004; Kisilevsky *et al.*, 2008). Tales complejos Ca_v -GPCR parecen cumplir una serie de funciones específicas como optimizar el acople entre el receptor y el canal; incrementar el tráfico desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática de los canales de manera independiente del agonista -quizás por enmascarar un señal de retención en el retículo en el canal, o por exponer un motivo de exporte desde el retículo hacia la superficie celular- y

promover la internalización dependiente de agonista del complejo como una forma de regular la densidad de canal en la membrana plasmática. Este último fenómeno se ha demostrado para los receptores ORL1 (Altier *et al.*, 2006), D1R y D2R (Kisilevsky *et al.*, 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008).

Dentro de la subfamilia Ca_v3 , la regulación del subtipo $Ca_v3.2$ por la actividad de GPCRs es la más reportada. Este canal es inhibido por acción directa de $G\beta_2\gamma_2$, por mecanismos independientes de $G\beta\gamma$ aún no esclarecidos y por mecanismos canónicos de fosforilación por quinasas (Wolfe *et al.*, 2003; DePuy *et al.*, 2006). Uno de estos mecanismos es el mediado por receptor de neuroquinina, NK1R (del inglés *Neurokinin 1 Receptor*) que consiste en una inhibición reversible, independiente del voltaje y dependiente de la activación de $G_{q/11}$, con la subsiguiente activación de PLC y proteína-quinasa C (PKC del inglés *Protein Kinase C*) (Rangel *et al.*, 2010). De manera diferente, la modulación de $Ca_v3.2$ por activación de D1R es mediada por la interacción directa del dímero $G\beta_2\gamma_2$ con el canal (Wolfe *et al.*, 2003). Además, se ha reportado la inhibición selectiva de $Ca_v3.2$ por activación del receptor 1 del factor liberador de corticotropina (CRF-1 del inglés *Corticotropin Releasing Factor receptor 1*) a través de un mecanismo acoplado a la proteína G_s (Tao *et al.*, 2008). Por otro lado, la regulación de $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ ha sido menos estudiada. Existe un reporte que demuestra la regulación de $Ca_v3.3$ por los receptores muscarínicos tipo 1 a través de activación de G_q (Hildebrand *et al.*, 2007).

Por último, en una amplia variedad de células excitables, los GPCRs modulan positivamente la apertura de los Ca_v1 a través del control del estado de fosforilación del canal (Surmeier *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1997). En el mismo sentido, en neuronas del estriado los receptores D2R y M1R reducen las corriente tipo L a través de la activación de calcineurina, fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina (Howe & Surmeier, 1995; Hernandez-Lopez *et al.*, 2000).

4- Receptor de ghrelina (GHSR)

En la década del 80', Bowers y colaboradores descubrieron que ciertas moléculas mostraban la capacidad de inducir la liberación de la hormona de crecimiento en células de pituitaria aisladas (Bowers *et al.*, 1980). En esta línea, GHRP-6 (del inglés *Growth Hormone-Releasing Hexapeptide*) fue uno de los primeros péptidos identificados como inductor de la liberación de dicha hormona. Desde ese momento se iniciaron investigaciones para desarrollar ligandos análogos, generándose una serie de compuestos peptídicos y no peptídicos

(Bowers *et al.*, 1984). Estos nuevos compuestos actuaban a través de un receptor huérfano en pituitaria e hipotálamo y no fue hasta 1990 cuando se clonó y denominó a dicho receptor como receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR, del inglés *Growth Hormone Secretagogue Receptor*) (Howard *et al.*, 1996; McKee *et al.*, 1997). Estos hechos sugerían la existencia de un ligando endógeno aún no identificado. En el año 1999 se lo identificó y denominó ghrelina (Kojima *et al.*, 1999). La hormona ghrelina es un péptido compuesto por 28 aminoácidos con un ácido N-octanoico unido covalentemente. Dicha proteína se sintetiza en células endócrinas del estómago, accede al torrente sanguíneo desde donde se distribuye para ejercer acciones centrales y periféricas, tales como promover la liberación de la hormona de crecimiento, regular la homeostasis energética, la reproducción, ejercer acciones cardiovasculares y regular el sueño, entre otras (Nakazato *et al.*, 2001). Asimismo, la acción más notoria de ghrelina es el incremento de la ingesta de alimentos y del peso corporal (Tschop *et al.*, 2000; Nakazato *et al.*, 2001).

El gen de GHSR codifica para dos isoformas de ARN mensajero (ARNm) generadas a través de *splicing* alternativo, denominadas GHSR1a y GHSR1b (McKee *et al.*, 1997). La isoforma GHSR1a está codificada por los exones 1 y 2, sin el intrón 1, que tras su traducción genera una proteína de 366 aminoácidos con siete dominios transmembrana (Petersenn *et al.*, 2001). En contraste, la isoforma GHSR1b está codificada por únicamente el exón 1 y el intrón 1, cuya traducción produce una proteína de 289 aminoácidos con sólo cinco dominios transmembrana y el agregado de 24 aminoácidos diferentes en la región C-terminal de la proteína (Howard *et al.*, 1996; McKee *et al.*, 1997). El GHSR1a es miembro de la familia de receptores de hormona peptídicas y neuropéptidos, que incluye el receptor de motilina y los receptores 1 y 2 de neurotensina, entre otros (Pazos *et al.*, 2007). En cuanto a la expresión de GHSR1a, ésta es relevante en dos áreas cerebrales: la glándula pituitaria donde GHSR1a está principalmente expresado en células pituitarias somatotropas, consistente con el rol de ghrelina regulando la liberación de la hormona de crecimiento; y el hipotálamo donde el receptor está altamente expresado, particularmente en el núcleo arcuato, crucial para la actividad neuroendocrina y estimulante del apetito de ghrelina (Shuto *et al.*, 2002; Korbonits *et al.*, 2004).

A partir de aquí en esta tesis al nombrar “GHSR” me estaré refiriendo a la isoforma GHSR1a. Una de las características sobresalientes de GHSR, es su actividad constitutiva, la cual resulta en una elevada señalización intracelular asociada al GPCR y un alto grado de internalización del receptor. La actividad constitutiva de GHSR se confirmó en base a experimentos de dosificación de genes donde se evaluó la producción de inositol trifosfato

y la actividad transcripcional sensible a elementos de respuesta a AMPc (CRE, del inglés *cAMP Response Element*) y elementos de respuesta sérica (SER, del inglés *Serum Element Response*) demostrándose una correlación entre la señalización basal y la expresión del GHSR (Holst *et al.*, 2003; Holst *et al.*, 2004). En cuanto a la producción de inositol trifosfato, la cascada activada por la proteína G_q seguida de activación de PLC representó un 50 % de la máxima capacidad de activación del receptor por ghrelina. Por último, la relevancia fisiológica de esta actividad constitutiva, ha resultado difícil de distinguir respecto de los efectos generados por ligandos endógenos *in vivo*. No obstante, se ha sugerido que la actividad constitutiva de GHSR desempeña un rol importante en la modulación de las señales orexigénicas en las vías que integran señales anorexigénicas como leptina e insulina. La regulación positiva observada para la expresión de GHSR en el hipotálamo durante el ayuno provocaría un aumento en el tono de señalización basal asociado al receptor (Holst *et al.*, 2004). Además, Pantel y colaboradores hallaron una mutación sin sentido (Ala204Glu, denominando al receptor mutante GHSRA204E) en dos individuos con baja estatura. A nivel celular dicha variante mutada carece de actividad constitutiva, posee reducida expresión en la superficie celular y conserva la capacidad de ser activada por ghrelina (Pantel *et al.*, 2006).

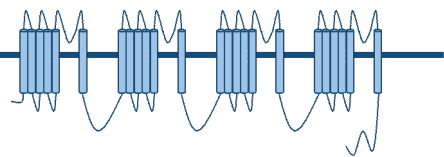
5- Efecto del sistema GHSR-ghrelina sobre las corrientes de calcio y la actividad neuronal

Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la actividad constitutiva de GHSR modula negativamente los Ca_v2 en neuronas hipotalámicas y en un sistema de expresión heterólogo (Lopez Soto *et al.*, 2015). Hallamos que la sola coexpresión de GHSR con $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$ reduce la amplitud de la corriente macroscópica a niveles muy bajos. Dicho efecto es causado por la actividad constitutiva de GHSR dado que utilizando un agonista inverso de GHSR, denominado análogo de la sustancia P (SPA, de sus siglas en inglés *Substance-P Analog*), o el mutante puntual GHSRA204E previamente presentado (carente de actividad constitutiva) (Pantel *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2011) reestablecimos la amplitud de la corriente de los Ca_v2 . Además, GHSR expresado a niveles nativos es suficiente para disminuir la amplitud de las corrientes de calcio nativas en neuronas hipotalámicas. Encontramos que la disminución de las corrientes Ca_v2 por la actividad constitutiva, efecto crónico y sólo ocluido por incubaciones prolongadas con SPA, se acompaña de una reducción de la densidad de Ca_v2 en la membrana plasmática (Lopez Soto *et al.*, 2015). En base a estos antecedentes y a los presentados en la introducción en esta tesis

hipotetizamos que **la actividad constitutiva de GHSR impide el tráfico de los Ca_v hacia la membrana desde el retículo endoplásmico**, en este efecto probablemente esté involucrada la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ dado su rol fundamental en el tráfico de Ca_v , y/o **la actividad constitutiva de GHSR promueve la internalización de los Ca_v desde la membrana plasmática hacia el sistema de endosomas**. Evaluaremos, además, si este efecto es extensivo a otros subtipos de Ca_v .

Además, hemos reportado que la inhibición crónica sobre los Ca_v2 presinápticos impacta negativamente en la liberación del neurotransmisor GABA en cultivos y explantos de hipotálamo, efecto que contribuiría a la activación del circuito hipotalámico. Asimismo, demostramos que la actividad constitutiva de GHSR modula selectivamente las corrientes postsinápticas inhibitorias sin afectar las corrientes excitatorias en cultivos primarios de hipocampo y en rebanadas intactas de cerebro conteniendo esta región, área con restringido acceso a ghrelina (Martinez Damonte *et al.*, 2018). Sumado a dichos efectos, se ha descrito que la activación de GHSR por ghrelina despolariza las neuronas como consecuencia de la inhibición de canales de potasio activados por voltaje tipo K_v7 a través de la proteína $G_{q/11}$ en diferentes tipos neuronales incluyendo neuronas dopaminérgicas de sustancia nigra, neuronas de DRG y neuronas piramidales de CA1 en hipocampo (Shi *et al.*, 2013). En esta tesis nos enfocamos en los canales de calcio activados por bajos voltajes (Ca_v3) que, como mencionamos antes, contribuyen a la excitabilidad y al disparo de potenciales de acción y están regulados por cascadas de señalización intracelular, muchas de las cuales surgen de la activación de GPCR por señales químicas extracelulares (Chemin *et al.*, 2002; Cain & Snutch, 2010). En este contexto, proponemos evaluar la siguiente hipótesis: **la actividad evocada por ghrelina de GHSR impacta sobre las corrientes mediadas por Ca_v3** .

Objetivos



Objetivo general: *Estudiar el impacto y el mecanismo de acción de dos modos de actividad de un GPCR (el receptor de ghrelina, GHSR) sobre la funcionalidad de los canales de calcio operados por voltaje (Cav) neuronales.*

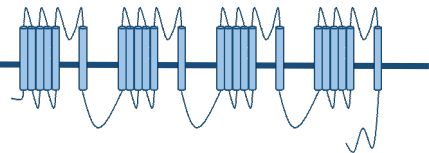
Esta tesis es parte de un proyecto global del laboratorio de Electrofisiología que estudia la regulación de los Cav por la actividad de GPCRs. Como desarrollé en la introducción, resultados previos de nuestro grupo muestran una disminución de la densidad de canales Cav2.1 y Cav2.2 en la membrana plasmática por acción de la actividad constitutiva de GHSR. Por otro lado, hemos observado que la activación de GHSR por ghrelina inhibe en forma aguda a varios subtipos de Cav y hemos indagado parcialmente en estos mecanismos. En este trabajo de tesis doctoral nos enfocamos en las siguientes **metas parciales:**

1- *Estudiar si la actividad constitutiva de GHSR disminuye el tráfico de los Cav desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática* e indagar en el rol de la subunidad auxiliar Cav β y la subunidad auxiliar Cav $\alpha 2\delta$ en este proceso. Por otro lado, también proponemos ensayar este efecto para otros complejos de Cav como Cav1.2, Cav1.3, Cav3.2 y Cav3.3.

2- *Estudiar si la actividad constitutiva de GHSR aumenta el tráfico de los Cav desde la membrana plasmática hacia compartimentos intracelulares.* Aquí evaluamos si factores implicados en la internalización de los Cav también están involucrados en el mecanismo a través del cual la actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad de canales en la membrana. Ensayamos en particular el efecto de las proteínas GTPasas pequeñas tipo Rab y la participación de RhoA.

3- *Evaluar si la actividad evocada por ghrelina de GHSR impacta sobre los canales del subtipo Cav3.* En esta última meta evaluamos si ghrelina a través de la activación de GHSR es capaz de modular agudamente los diferentes subtipos de Cav3 (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3), cuáles son las vías de señalización implicadas y los parámetros biofísicos alterados para finalmente predecir a través del modelado el impacto de dicho efecto en la actividad neuronal.

Materiales y métodos



1- Modelos experimentales.

1.1- Cultivo celular.

Utilizamos la línea celular HEK293T como modelo de estudio en esta tesis. Dicha línea deriva de la línea HEK293 (del inglés *Human Embryonic Kidney 293*) y fue generada mediante la transformación mediada por fosfato de calcio con ADN adenoviral de un cultivo de células de riñón humano embrionario. Además, las células HEK293T poseen el alelo sensible a la temperatura del gen del antígeno T grande del virus SV40 (del inglés *Simian Virus 40*) y constituye una línea celular altamente transfectable y de frecuente uso para la expresión de proteínas heterólogas (Lin *et al.*, 2014).

1.2- Animales.

Para realizar los experimentos en neuronas utilizamos ratones de laboratorio, que fueron manipulados rutinariamente en forma semejante a la mayoría de los laboratorios nacionales e internacionales que abordan una temática de estudio similar. El presente estudio fue realizado con la previa autorización del comité de ética del IMBICE, en conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud, USA, e intentando minimizar el sufrimiento animal en cuanto fuera posible. (Expediente del Comité de Ética: 03-09-16 - “Caracterización de la modulación de los canales de calcio por receptores acoplados a proteína G”).

Utilizamos ratones C57BL/6 salvajes y deficientes en el receptor de ghrelina (Zigman *et al.*, 2005) que derivan de cruzas entre animales heterocigotas retrocruzados por más de diez generaciones. Criamos ratones de ambos sexos bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas en una sala con temperatura constante (22 ± 2 °C) con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Realizamos la identificación genotípica de los ratones mediante una amplificación por la reacción de la polimerasa en cadena (del inglés *polymerase chain reaction*, PCR) de secuencias específicas utilizando como molde ADN extraído de la cola de los ratones.

1.2.1- Extracción de ADN.

Para la extracción del ADN cortamos las colas de los embriones a genotipificar en fragmentos de ~2 mm y las colocamos en tubos eppendorf de 0,2 ml. En dicho tubo añadimos una solución de NaOH 25 mM/ EDTA 0,2 mM. Los tubos fueron colocados en un ciclador BioRad (*T100™ Thermal Cycler, Tecolab, Buenos Aires, Argentina*), y sometidos a un ciclo de 1 h (95 °C 45 min, 4°C 15 min). Finalizado este tiempo, en cada tubo añadimos 75 µl de una solución de Tris/HCl 40 mM pH 5,5. Trasvasamos el contenido de cada tubo a otro nuevo

para eliminar restos de tejido, y los conservamos a -20 °C hasta ser utilizados para la genotipificación.

1.2.2- Genotipificación de ratones salvajes y deficientes en GHSR.

Para cada embrión realizamos dos PCRs, una para amplificar el gen de GHSR y otra para amplificar el *cassette* TBC (del inglés *transcription blocking cassette*), que interrumpe el gen GHSR en los animales deficientes en GHSR. La amplificación de una banda en la primera PCR y ninguna en la segunda, indica que el ratón es homocigota para el genotipo salvaje; en oposición, la amplificación de una banda en cada PCR indica que el ratón es heterocigota para GHSR; mientras que una banda sólo en la segunda PCR indica que el ratón es homocigota deficiente en GHSR. A continuación detallamos los cebadores utilizados y el tamaño de banda que esperamos para cada reacción:

-PCR1: banda de 184 pb

“Forward Wt” 5’- GAGTGACAGGTAAGTGAGTGCG -3’

“Reverse Wt” 5’- GTGCGAACATTAGCGATGAAAGG -3’

-PCR2: banda de 175 pb

“Forward TBC” 5’- AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA -3’

“Reverse TBC” 5’- CCACTGCACGTCTCTCCCTATTT -3’

Para cada reacción de PCR utilizamos 12,5 µl finales conteniendo: 1 µl de ADN molde, 1,25 µl de 10X; 0,625 µl de MgCl₂ 50 mM, 2 µl de seroalbúmina bovina, 0,25 µl de dNTPs 10 mM, 0,625 µl de cebadores *forward* y *reverse*, 0,0625 µl de TaqADN polimerasa (*Pro-mega, Madison, USA*) y agua milliQ c.s.p. Las condiciones de ciclado para la amplificación del ADN que utilizamos fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94 °C 4 min, seguido de 35 ciclos con una desnaturalización a 94 °C 30 s, un *annealing* a 60 °C 30 s y una extensión a 72 °C 45 s, seguidos de una extensión final a 72 °C 7 min. Finalmente sembramos y revelamos los productos de reacción de PCR en geles de agarosa al 2 % teñida con 0,1 µl/ml de GelRed™ (*Nucleic Acid Gel Stain, Biotium*).

2- Cultivos celulares.

2.1- Línea celular HEK293T.

Realizamos el mantenimiento de las células HEK293T en botellas T25 (*NEST Biotechnology Co., cat# 707003, Jiangsu, China*) utilizando como medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Gibco, cat# 12800017, 3175 Staley Rd., Grand Island, New York 14072, United States*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, *cat# 1650-01, Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina*). Conservamos las botellas en una estufa de cultivo a 37 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂ y 95 % de aire. Realizamos el repique y los subcultivos al alcanzar las células un 80 % de confluencia, retiramos el medio de cultivo de las botellas y agregamos 3 ml de solución cítrico salina (171.2 mM KCl y 17 mM citrato de sodio). Luego incubamos 10 min en estufa hasta lograr el desprendimiento de la monocapa celular y las disgregamos mecánicamente por pipeteo. Seguidamente conservamos 0,5 ml de dicha suspensión en un volumen final de DMEM suplementado de 5 ml. Para algunos subcultivos en placas de 12 pocillos agregamos 0,1 ml de la suspensión celular en un volumen final de 1 ml de DMEM suplementado. Dichas placas fueron mantenidas en iguales condiciones que las botellas T25.

2.2- Cultivo neuronal primario de hipotálamo.

Realizamos los cultivos neuronales a partir de embriones de ratones salvajes y de ratones deficientes para GHSR de 16-18 días. El protocolo que utilizamos fue similar a uno descrito en (Raingo *et al.*, 2012). De manera resumida, anestesiamos las ratonas preñadas con isoflurano al 2% y luego removimos rápidamente los embriones. De manera inmediata, los colocamos en medio Hank estéril y frío (*Microvet, cat# L2005-500, Buenos Aires, Argentina*) para la posterior extracción de los cerebros. Los siguientes procedimientos fueron realizados en un flujo laminar para mantener la esterilidad durante todo el procedimiento. Disecamos el tejido correspondiente al hipotálamo y lo colocamos en medio Hank estéril. Posteriormente realizamos el enjuague de los mismos dos veces, para luego disociar las células con tripsina 0,25 mg/ml (*Microvet, cat# L2700-100, Buenos Aires, Argentina*) a 37 °C por 20 min. Seguidamente, añadimos 300 µl de SFB para detener la digestión enzimática y 50 µl de 0,28 mg/ml desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (*Sigma Aldrich, cat# D5025, Buenos Aires, Argentina*). A continuación, disgregamos mecánicamente las células usando diferentes pipetas de vidrio con puntas de diámetros sucesivamente más pequeños. Sembramos ~ 70.000 células en vidrios de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina. Incubamos las células a 37 °C en una atmósfera controlada de 5 % CO₂ y 95 % aire con medio de cultivo DMEM (*Microvet, Buenos Aires, Argentina*)/F12 1:1 suplementado con B27 (1:50, *GIBCO, cat# 17504-044, Thermo Fisher Scientific, Buenos*

Aires, Argentina), 10 % SFB, 0,25 % glucosa, 2 mM glutamina (*GIBCO*), 3,3 µg/ml insulina (*Novo Nordisk Pharmaceutical Industries, Inc., Buenos Aires, Argentina*), 40 µg/ml sulfato de gentamicina (*Richet, Buenos Aires, Argentina*), y 1 % de solución de vitaminas (*Microvet, Buenos Aires, Argentina*). Al cuarto día de cultivo *in vitro* reemplazamos la mitad del medio de crecimiento por medio fresco conteniendo Ara-C (β-d-arabifuranósido citosina, *Sigma Aldrich, cat# C1768, Buenos Aires, Argentina*), para lograr una concentración final de 5 µM en cada pocillo.

3- Expresión heteróloga.

3.1- Transfecciones transientes.

Realizamos la transfección transitoria de los distintos plásmidos descritos en las tablas 1 y 2 en las condiciones detalladas en la sección de resultados utilizando el método de los liposomas catiónicos (*Lipofectamine 2000, Invitrogen® cat# 11668-019, Massachusetts, USA*) en células HEK293T crecidas al 80 % de confluencia en placas de cultivo. Seguimos las instrucciones del proveedor para preparar la mezcla de transfección utilizando una relación ADN/reactivo de transfección 1:2. Para la correcta expresión de los diferentes clones incubamos las células por 24-48 h según el subtipo de canal de calcio expresado en los experimentos de *patch clamp*. Para dichos ensayos, posteriormente, disgregamos las células con tripsina, lavamos con DMEM libre de SFB y las mantuvimos a temperatura ambiente durante el día de experimento de *patch*.

3.2- Clones utilizados.

A continuación detallo en la tabla 1 la lista de clones codificantes para las diferentes subunidades de los canales de calcio que utilicé en esta tesis:

Nombre completo oficial	Símbolo oficial	Número de acceso GenBank	Mutación	Tag	Nombre en esta tesis
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1C</i>	Cacna1c	AY728090	-	-	Ca _v 1.2
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1D</i>	Cacna1d	AF370009	-	-	Ca _v 1.3
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1B</i>	Cacna1b	AF055477	-	-	Ca _v 2.2
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1G</i>	Cacna1g	AF190860	-	-	Ca _v 3.1
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1H</i>	Cacna1h	NM_021098	-	-GFP	Ca _v 3.2
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1I</i>	Cacna1i	NM_021096	-	-	Ca _v 3.3
<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta3</i>	Cacnb3	M88751	-	-	Ca _v β ₃
<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta3</i>	Cacnb3	M88751	-	GFP	Ca _v β ₃ -GFP
<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta2</i>	Cacnb2	M80545	-	-	Ca _v β _{2a}
<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta2</i>	Cacnb2	M80545	-	GFP	Ca _v β _{2a} -GFP
<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta</i>	Cacna2d1	AF286488	-	-	Ca _v α ₂ δ ₁
<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1B</i>	Cacna1b	D14157 Addgene 58734	W391A	-	Ca _v 2.2W391A

En la tabla 2 detallo la lista de clones codificantes para otras proteínas que utilicé en esta tesis:

Nombre completo oficial	Símbolo oficial	Número de acceso GenBank	Mutación	Nombre en esta tesis
<i>growth hormone secretagogue receptor type 1a</i>	GHSR1a	AY429112	-	GHSR o GHSR1a
<i>growth hormone secretagogue receptor type 1b</i>	GHSR1b	AY429112	-	GHSR1b
<i>growth hormone secretagogue receptor1a</i>	GHSR1a	AY429112	A204E	A204E
<i>pPalmitoyl-mTurquoise2</i>		Addgene 36209		Marcador de membrana plasmática.
<i>mCh-Sec61 beta</i>		Addgene 49155		Marcador de retículo endo-plasmático
<i>pmTurquoise2-Golgi</i>		Addgene 36205		Marcador de aparato de Golgi
<i>DsRed-rab11WT</i>		Addgene 12679		Marcador de endosomas de reciclaje
<i>Rab11bS25N (Rab11bGDP)</i>				Rab11bGDP
<i>pCDNA3-C3-toxin</i>				toxina-C3
<i>Myristoylated C-terminal Gβγ-binding domain of the G protein-coupled receptor kinase 2</i>				(MAS-GRK2-ct)
<i>G_q dominant-negative mutant</i>		cDNA-Resource Center GNA0Q000X0	Q209L/D277N	G _q DN
<i>Regulator of G-protein signaling 2</i>				RGS2
<i>pcDNA3.1 (+)</i>		Invitrogen V79020		Plásmido vacío

4- Biología molecular.

4.1 Amplificación de clones para transfección.

4.1.1 Cepa bacteriana.

Utilizamos la cepa bacteriana DH5α de la bacteria *Escherichia coli* para la amplificación de plásmidos. Esta cepa se caracteriza por su eficiencia de transformación con ADN no metilado (hdsR), la ausencia de actividad de endonucleasa inespecífica I (endA1) (permitiendo preparaciones de plásmidos de buena calidad), la resistencia a los fagos T1 (fhuA2) y la actividad de recombinación disminuida (recA1) (incrementando la estabilidad

de los insertos). Además, dicha cepa es sensible a los antibióticos (ATB) ampicilina y kanamicina.

4.1.2 Obtención de bacterias competentes.

Para obtener bacterias competentes seguimos los pasos del método Inoue, para lo cual partimos de un stock de la cepa DH5 α de *E. coli*, sembrando una anizada en forma estéril sobre una placa de medio Luria Bertani (LB, en %: 1,5 agar-agar, 1 triptona, 0,5 extracto de levadura y 1 NaCl en agua milliQ) sin ATB, que incubamos a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, por la mañana, picamos una colonia y la transferimos a 5 ml de medio LB, e incubamos entre 6-8 h a 37 °C con agitación. Con este cultivo inoculamos tres Erlenmeyers con medio, cada uno conteniendo 100 ml de LB sin ATB. El primero recibió 4 ml de cultivo, el segundo 1,6 ml y el tercero 0,8 ml. Incubamos los Erlenmeyers toda la noche a 18 °C. Al día siguiente realizamos lecturas de densidad óptica a 600 nm hasta la obtención de un valor de 0,55 de absorbancia en alguno de los tres cultivos. Transferimos este último a un baño de hielo durante 10 min, y descartamos los otros dos cultivos. Transcurridos los 10 min, realizamos una centrifugación a 4000 r.p.m. por 10 min a 4 °C para precipitar las células, descartamos el sobrenadante, dejamos secar el *pellet* durante 2 min y luego resuspendimos las células en 32 ml del *buffer* Inoue (en mM: 55 MnCl₂.4 H₂O, 15 CaCl₂.2H₂O, 250 KCl, 10 PIPES pH 6,7) previamente enfriado. Repetimos la centrifugación y el secado para luego resuspender las células en 8 ml *buffer* Inoue al que añadimos 0,64 ml de dimetilsulfóxido. Finalmente, separamos esta suspensión en alícuotas de 200 μ l y las conservamos a -80 °C hasta su uso.

4.1.3 Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico.

Seguimos el protocolo descrito por (Cohen, 1974) para transformar las bacterias competentes. Resumidamente, adicionamos 50 ng de ADN plasmídico a 200 μ l de la suspensión de bacterias competentes e incubamos la mezcla en hielo durante 30 min. Posteriormente, la transferimos a un baño de agua termostatzado a 42 °C para realizar un choque térmico de 45 s de duración. Inmediatamente después colocamos el tubo en hielo, incubamos 10 min y le agregamos 800 μ l de medio SOC (*QIAGEN*) e incubamos 40 min a 37 °C con agitación. Luego, sembramos las bacterias en placas con agar LB con el antibiótico de selección adecuado e incubamos a 37 °C durante una noche para permitir el crecimiento de colonias transformadas.

4.1.4 Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep).

Inoculamos un volumen de 0,5 ml de un cultivo primario de las bacterias conteniendo el plásmido de interés en 200 ml de medio LB con la concentración adecuada del antibiótico de selección correspondiente, e incubamos por 12-16 h a 37 °C con agitación enérgica. Transcurrido dicho tiempo, centrifugamos el cultivo durante 30 min a 4000 r.p.m. a 4 °C para separar las bacterias. Realizamos la obtención del ADN plasmídico utilizando un *kit* comercial (*QIAfilter® Plasmid Midi Kit cat# 12145, Massachusetts, USA*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.5 Cuantificación de ADN.

Para la cuantificación de muestras de ADNc medimos la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., Delaware, USA)*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Como parámetro de calidad del ADN utilizamos las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

5- Electrofisiología.

Registramos las corrientes iónicas con un amplificador Axopatch 200 (*Molecular Devices*). Recolectamos los datos a 20 kHz y los filtramos a 10 kHz (-3dB) utilizando el software PCLAMP8.2 (*Molecular Devices*). Utilizamos micropipetas de vidrios (*King Precision Glass, Inc., California, USA*) con resistencia de 2-4 M Ω conteniendo la solución interna (ver más abajo). Admitimos una resistencia en serie menor que 6 M Ω y la compensamos en 80% con una constante de tiempo de 10 μ s; sustrajimos la corriente de fuga en tiempo real utilizando un protocolo P/-4. Obtuvimos todos nuestros registros a temperatura ambiente (~ 23 °C). El potencial de unión líquida entre la solución interna y la externa que contenía CaCl₂ 5 mM (ver más abajo) fue ~ 5,5 mV y entre la solución interna y la externa que contenía una solución 10 mM de BaCl₂ (ver más abajo) fue ~ 6,5 mV. Medimos estos valores antes de los experimentos y no los corregimos, por lo que todos los voltajes mostrados fueron ligeramente más negativos.

5.1- Corrientes de calcio en células HEK293T transfectadas transientemente.

Realizamos los registros de *patch clamp* en configuración célula entera con fijación del voltaje en células identificadas como transfectadas, es decir, aquellas que expresaban la proteína reportera GFP, observándolas tras exposición con luz ultravioleta en el microscopio invertido de la unidad de registro. La solución interna contenía (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES y 4 MgATP (pH 7,2 con CsOH). La solución externa contenía (en mM): 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES y 140 cloruro de colina (pH 7,4 con CsOH). En

algunos experimentos utilizamos como ion permeante bario (BaCl_2 , 10 mM o 20 mM) en reemplazo de calcio para amplificar la amplitud de las corrientes. En nuestros protocolos utilizamos un potencial de reposo de -100 mV para remover los canales de su estado estacionario de inactivación (Thaler *et al.*, 2004).

Los protocolos que utilizamos para el registro consistieron en pulsos cuadrados desde -100 mV a +10 mV para $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v2.2$, y desde -100 mV a -10 mV para $\text{Ca}_v1.3$, por 15 o 25 ms cada 10 s. En experimentos utilizando el $\text{Ca}_v2.2$ y bario (20 mM) como ion permeante el protocolo consistió en pulsos cuadrados desde -100 mV a +20 mV. Para $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$, utilizamos pulsos cuadrados desde -100 mV, a -20 mV o -30 mV por 200 ms cada 10 s. Los protocolos particulares que ensayamos en el capítulo II de esta tesis se detallan en la figura correspondiente al experimento.

5.2- Corrientes de calcio y bario en cultivos neuronales primarios.

Registramos corrientes de calcio o corrientes de bario sobre neuronas cultivadas *in vitro* por 10-16 días en configuración de célula entera con fijación del voltaje desde un potencial de reposo de -80 mV aplicando un pulso cuadrado a -20 mV o 0 mV por 20 o 200 ms cada 10 s. Llenamos las micropipetas con una solución interna que contenía (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, y 4 MgATP (pH 7,2 con CsOH). Mantuvimos las neuronas inicialmente en una solución de alto contenido en sodio conteniendo (en mM): 135 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgCl_2 , 2,5 CaCl_2 , 10 HEPES, y 10 glucosa, pH 7,4 con NaOH. Luego de obtener el gigasello, y evidenciar las corrientes de sodio registramos las corrientes de bario en una solución conteniendo (en mM): 10 BaCl_2 , 110 cloruro de colina, 20 cloruro de TEA, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 10 glucosa, and 0,001 tetrodotoxina (TTX; *Sigma-Aldrich*), pH 7,4 con CsOH. En algunos experimentos la solución externa que utilizamos contenía (en mM): 5 CaCl_2 , 135 cloruro de colina, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 10 glucosa, and 0,001 tetrodotoxina (TTX; *Sigma-Aldrich*), pH 7,4 con CsOH. Colocamos el electrodo de referencia en un compartimiento separado que contenía KCl 2 M conectado con la cámara de registro que contenía la solución de baño mediante un puente salino de agar KCl 2 M para evitar cambios en los potenciales de junta líquida debido al cambio de soluciones durante los registros.

6- Imágenes.

Cultivamos las células HEK293T en vidrios redondos tratados previamente con poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*) y dispuestas sobre placas de 12-24 pocillos. 24 horas después, co-

transfectamos con Lipofectamina 2000 las células con $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP o $Ca_v\beta_3$ -GFP y diferentes combinaciones de otros plásmidos detallados en la sección de resultados. Transcurridas 24 h, lavamos las células con PBS 1X. Luego fijamos las células con paraformaldehído al 4 % en PBS 1X durante 20 min. Posteriormente, lavamos las células dos veces con PBS 1X y las montamos sobre vidrios usando el medio de montaje VECTASHIELD®.

Obtuvimos las microfotografías usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con el software ZEN. Realizamos la cuantificación de la co-localización de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP, $Ca_v\beta_3$ -GFP, GHSR-YFP o A204E-YFP con los diferentes marcadores de compartimentos intracelulares utilizando la herramienta *Just another Colocalization Plugin (JaCoP)* del software de acceso libre FIJI (Schindelin *et al.*, 2012), que nos permitió calcular los coeficientes de solapamiento de *Mander* para cada marcador: $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP/marcador *overlap*, $Ca_v\beta_3$ -GFP/marcador *overlap*, GHSR-YFP/marcador *overlap* y A204E-YFP/marcador *overlap*.

7- Modelado.

Realizamos las simulaciones utilizando el software de libre acceso *NEURON* (Hines & Carnevale, 1997). Usamos el modelo de tres compartimentos en configuración de *burst* o ráfagas de potenciales de acción según lo descrito por (Destexhe *et al.*, 1996). Reemplazamos la corriente T nativa del modelo por la sumatoria de las corrientes de $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. Sustituimos los parámetros electrofisiológicos de $Ca_v3.3$ para las condiciones control y con ghrelina en el modelo (constantes temporales dependientes de voltaje de activación e inactivación, y los parámetros de activación e inactivación) por nuestros datos experimentales. Por otro lado, extrajimos los valores de los parámetros $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ de un estudio anterior (Chemin *et al.*, 2002) y los mantuvimos constantes en ausencia o presencia de ghrelina. Utilizamos las siguientes ecuaciones: ecuaciones de Boltzmann para las curvas de activación (m_∞) (1) e inactivación del estado estacionario (h_∞) (2) y ecuaciones exponenciales de decaimiento de una fase para la dependencia de la constante temporal de activación (Tau_m) (3) y de inactivación (Tau_h) (4) con el voltaje:

$$m_\infty(V) = I_0 + (I_{max} - I_0)/(1 + e^{((V_{50}-V)/slope)}) \quad (1)$$

$$h_\infty(V) = I_0 + (I_{max} - I_0)/(1 + e^{((V_{50}-V)/slope)}) \quad (2)$$

$$Tau_m(V) = (Tau_{(0)} - Tau_{(\infty)}) * e^{(-k*V)} + Tau_{(\infty)} \quad (3)$$

$$Tau_h(V) = (Tau_{(0)} - Tau_{(\infty)}) * e^{(-k*V)} + Tau_{(\infty)} \quad (4)$$

Donde I_0 es la mínima amplitud de corriente, I_{max} es la máxima amplitud de corriente, V es el potencial de membrana ensayado, V_{50} es el potencial donde la corriente disminuye a

la mitad su amplitud máxima, y *slope* es la constante de activación en (1) y la constante del estado estacionario de inactivación en (2). En (3) y (4) $\tau_{(0)}$ es el valor de la constante temporal a 0 mV, $\tau_{(\infty)}$ es el valor al que tiende τ a potenciales muy despolarizantes y k representa la sensibilidad al potencial de la activación (3) o de inactivación en (4).

Como describimos en la sección de resultados redujimos el 40 % de la conductancia de $Ca_v3.3$ en presencia de ghrelina al multiplicar por 0,6 la fracción de corriente I_T correspondiente a este subtipo de Ca_v3 . Además, para simular el efecto reportado de ghrelina sobre las corrientes de potasio (Shi *et al.*, 2013), redujimos en un 50 % esta corriente en la condición en presencia de ghrelina al multiplicar por 0,5 la ecuación de esta conductancia denominada I_K en el modelo. La frecuencia de disparo y el tiempo de latencia se determinaron utilizando el software PCLAMP10.7 (*Molecular Devices*). Registramos el potencial de membrana en el soma virtual por 200 ms inyectando una corriente de 0,8 nA. Realizamos la simulación a 36 °C.

8- Ecuaciones.

En el capítulo II de la presente tesis en diversos análisis de los datos obtenidos utilizamos diferentes ecuaciones para ajustar su comportamiento:

✓ En la figura correspondiente al análisis de la dosis de ghrelina en relación a la inhibición de la corriente mediada por $Ca_v3.3$ hemos utilizado la ecuación de Hill:

$$Inh = Inh_0 + (Inh_{max} - Inh_0) / (1 + 10^{((\log EC_{50} - x) * Hill_{factor})}) \quad (5)$$

donde Inh indica la inhibición a una determinada concentración de agonista empleada (x) en porcentaje, Inh_0 indica la mínima inhibición, Inh_{max} la máxima inhibición mediada por una dosis saturante de agonista, EC_{50} la dosis necesaria para obtener la mitad de la máxima inhibición y el $Hill_{factor}$ indica cuan sigmoidea es la curva.

✓ Obtuvimos las curvas de corriente en función del voltaje para células individuales, ajustando los datos con la ecuación de Boltzmann-lineal:

$$I(V) = G(V) (V_m - V_{rev}) (I_{max} / (1 + \exp [(V_m - V_{1/2}) / k])) \quad (6)$$

donde $I(V)$ es la corriente registrada, $G(V)$ es la conductancia dependiente del potencial, V_m es el potencial de membrana, V_{rev} es el potencial de reversión, I_{max} es la máxima amplitud de corriente, $V_{1/2}$ es el potencial medio de activación y k es la constante de activación.

✓ Ajustamos la dependencia de la activación de la corriente con el potencial (m_∞) con la ecuación de Boltzmann mostrada en la sección de Modelado e indicada como ecuación (1).

✓ Determinamos la constante temporal de activación (τ_m) a partir de ajustar el trazo de corriente macroscópica con la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_m \exp(-t/\tau_m) \quad (7)$$

donde I_m es un factor de normalización.

✓ Ajustamos la dependencia de τ_m con el voltaje con la ecuación exponencial mostrada en la sección de modelado e indicada como ecuación (3).

✓ Ajustamos la dependencia del estado estacionario de inactivación con el voltaje (h^∞) con la ecuación de Boltzmann mostrada en la sección de Modelado e indicada como ecuación (2).

✓ Determinamos la constante temporal de inactivación (τ_h) a partir de ajustar el trazo de corriente con la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_m \exp(t/\tau_h) \quad (8)$$

donde I_m es un factor de normalización.

✓ Ajustamos la dependencia de τ_h con el voltaje con la ecuación exponencial mostrada en la sección de modelado e indicada como ecuación (4).

✓ Determinamos la constante temporal de deactivación (τ_{deact}) a partir de ajustar el trazo de corriente con la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_m \exp(t/\tau_{deact}) \quad (9)$$

donde I_m es un factor de normalización.

✓ Ajustamos la dependencia de τ_{deact} con el voltaje con la siguiente ecuación exponencial:

$$\tau(V) = \exp(-(V-V_{\tau})/Stau) + \tau(\infty) \quad (10)$$

donde V_{τ} es el potencial al cual τ es igual a $1 + \tau(\infty)$, $Stau$ representa la sensibilidad al potencial de la deactivación, y $\tau(\infty)$ es el valor de la asíntota a potenciales positivos.

✓ Ajustamos la recuperación de la inactivación en función del tiempo con la siguiente ecuación exponencial:

$$I = I_0 + A(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (11)$$

donde I_0 es la amplitud de corriente inicial al tiempo cero de recuperación, A es el intervalo, t es el tiempo de recuperación y τ es la constante temporal de recuperación.

9- Drogas.

Para los experimentos de *patch clamp* y de imágenes en las células HEK293T, usamos el agonista inverso de GHSR, [*d-Arg1,d-Phe5,d-Trp7,9,Leu11*]-*substance P* (SPA; *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). Para el bloqueo de las corrientes de sodio empleamos tetrodotoxina, TTX (*Sigma-Aldrich*). Para los experimentos de *patch clamp* en los cultivos neuronales primarios utilizamos el agonista de Ca_v1 BayK-8644 (*Sigma-Aldrich*). Para los experimentos de *patch clamp* en las células HEK293T utilizamos ghrelina (*Global Peptide, cat# PI-G-03*).

10- Estadística.

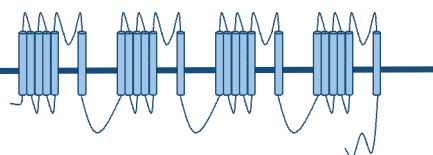
Analizamos nuestros datos estadísticamente con el software GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software Inc., California, USA*). Evaluamos si nuestros datos se ajustaban una distribución normal con el test de *Kolmogorov-Smirnov*, y la homogeneidad de varianzas con los tests de *Bartlett* (datos con distribución normal) o de *Brown-Forsythe* (datos con distribución no normal). Obtuvimos los valores de *p* a partir del test *t* de *Student* o del test de comparación múltiple de varianzas de una vía ANOVA con el post test de *Tukey* (datos con distribución normal); o a partir del test de *Mann-Whitney* o el test de comparación múltiple de varianzas no paramétrico *Kruskal-Wallis* test con el post test de *Dunn* (datos con distribución no normal). En la leyenda de las figuras señalamos el test específico usado y el tamaño de la muestra para cada conjunto de datos. Consideramos que una diferencia es estadísticamente significativa para valores de $p < 0,05$, informando el valor exacto de *p* en cada caso. Expresamos los datos como la media \pm el error estándar de la media.

La comparación estadística realizada en el capítulo II de esta tesis entre dos ajustes a la ecuación de Boltzmann fue ensayada utilizando *extra-sum-of-squares F test*. Al graficar los datos en la condición control y en presencia de ghrelina, la hipótesis nula considera que todos los datos pertenecen a un mismo ajuste y la hipótesis alternativa es que más de una curva se ajusta a los datos presentados. En cada figura se expresa el *p* y *F* (DFn, DFd) obtenidos.

Para comparar las cinéticas de activación e inactivación de $Ca_v3.3$ en ausencia y en presencia de ghrelina, utilizamos la correlación de *Pearson*. En este tratamiento estadístico un valor de $r=1$ indica correlación perfecta entre las dos variables, un valor de *r* entre 0 y 1 indica que ambas variables aumentan o disminuyen en paralelo. Para descartar que esos cambios se deban a una distribución aleatoria de las variables y confirmar la presencia de correlación significativa consideramos un $p < 0,05$.

Capítulo I: “Estudio del efecto de la actividad constitutiva del receptor de ghrelina (GHSR) sobre la densidad en membrana de canales de calcio operados por voltaje (Cav)”

Resultados I



La primera hipótesis que evaluamos es que las subunidades auxiliares de Ca_v son el blanco de la actividad constitutiva de GHSR. Primero evaluamos la $Ca_v\beta$ sobre la que existen reportes previos demostrando que impide la retención de los Ca_v2 en el retículo endoplásmico y reduce su entrada en las vías de degradación proteasomal, estabilizando el canal en la membrana plasmática con el consecuente aumento de la corriente macroscópica (Altier *et al.*, 2011; Fang & Colecraft, 2011). Para ello, registramos corrientes de calcio mediante la técnica de *patch clamp* en configuración célula entera con fijación del voltaje en células HEK293T coexpresando la subunidad principal $Ca_v2.2$ junto a $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en ausencia de $Ca_v\beta_3$ con y sin GHSR. Como en ausencia de $Ca_v\beta$ esperábamos que la amplitud de corriente fuese baja reemplazamos el calcio por bario como ion permeante en la solución externa (Hille, 2001). En dichas condiciones, la corriente macroscópica registrada fue de pequeña amplitud pero medible, y observamos que la coexpresión de GHSR no modificó el nivel de corriente al compararlo con células que no lo expresaban, y en su lugar expresaban un plásmido vacío (**figura 1A**). En contraposición, al coexpresar GHSR junto a $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$, observamos nuestro ya reportado efecto de disminución de la amplitud de corriente macroscópica mediada por $Ca_v2.2$ (**figura 1B**).

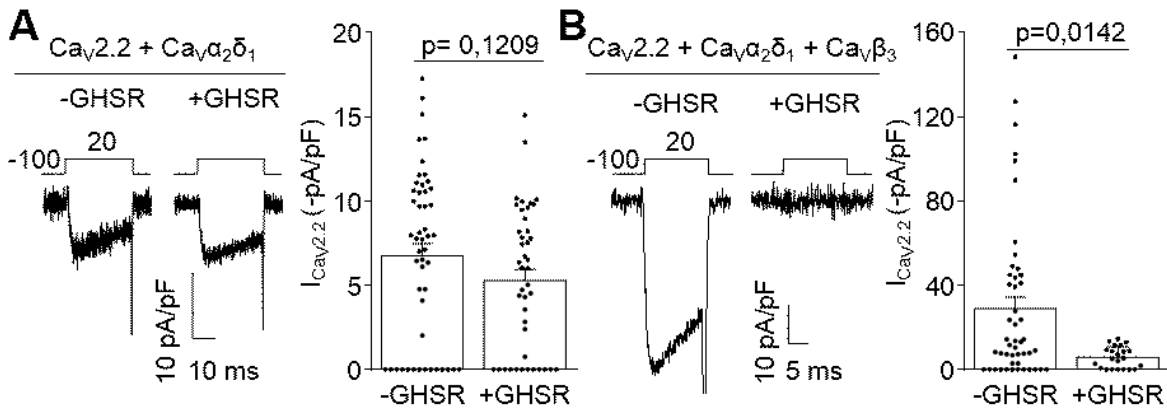


Figura 1. La presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_3$ es necesaria para observar el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes $Ca_v2.2$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente ($I_{Ca_v2.2}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR (+GHSR, $n=43$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=50$) evocadas a +20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. **B.** Trazos representativos y valores promedio de $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR (+GHSR, $n=22$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=48$) evocadas a +20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Test de Mann-Whitney.

Además del análisis de la corriente macroscópica, en paralelo, Valentina Martínez Damonte (recientemente doctorada en nuestro laboratorio) realizó el análisis de la densidad de proteína canal localizado en la membrana plasmática utilizando una versión del canal $Ca_v2.2$ fusionada a GPF (del inglés *Green Fluorescent Protein*) y un marcador comercial

de la membrana plasmática. En las mismas condiciones a las ensayadas en la figura 1, observamos que la señal verde fluorescente en la membrana no se modifica en aquellos experimentos en ausencia de $\text{Ca}_v\beta$ (estos resultados fueron presentados en la tesis doctoral de Valentina Martínez Damonte y corresponden a la figura 4C de (Mustafa *et al.*, 2017)). En conjunto estos datos confirman que $\text{Ca}_v\beta$ es necesaria para el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR. A continuación dado que la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ también es capaz de incrementar la expresión en superficie de diferentes isoformas de $\text{Ca}_v\alpha_1$ y disminuye la internalización de los Ca_v (Canti *et al.*, 2005; Bernstein & Jones, 2007), intentamos realizar un experimento análogo al anterior pero en este caso en ausencia de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$. En dicho experimento los niveles de corriente de $\text{Ca}_v2.2$ no fueron significativamente diferentes de cero ($3,33 \pm 1,50$ pA/pF, $n=5$, $p = 0,091$, test *t* de *Student* versus cero), confirmando la importancia de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ para el correcto transporte del complejo canal hacia la membrana plasmática. Realizamos entonces experimentos de imágenes utilizando la quimera del canal $\text{Ca}_v2.2$ fusionado a GFP y si bien observamos una baja densidad de canal en la membrana plasmática en ausencia de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$, pudimos determinar una disminución de estos valores por la actividad constitutiva de GHSR (datos presentados en la tesis doctoral de Valentina Martínez Damonte y corresponden a la figura 4C de (Mustafa *et al.*, 2017)). Los resultados presentados hasta aquí sugieren que la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$, pero no la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$, es requerida para la acción inhibitoria de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v , y que esta acción de GHSR involucra una disminución de la densidad de canal $\text{Ca}_v2.2$ en la membrana plasmática.

Paralelamente, ensayamos si $\text{Ca}_v\beta$ se requiere para la inhibición de la corriente de $\text{Ca}_v2.2$ por la aplicación aguda de ghrelina (500 nM). Utilizamos células coexpresando GHSR junto a $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ con y sin $\text{Ca}_v\beta_3$ con amplitud de corrientes detectable y observamos que ghrelina provocó una inhibición de la corriente sólo en presencia de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_3$ (**figura 2**). Estos resultados demuestran que la presencia de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$ no solo sería necesaria para observar el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR sobre el canal $\text{Ca}_v2.2$, sino que también sería fundamental en la actividad evocada por la hormona ghrelina.

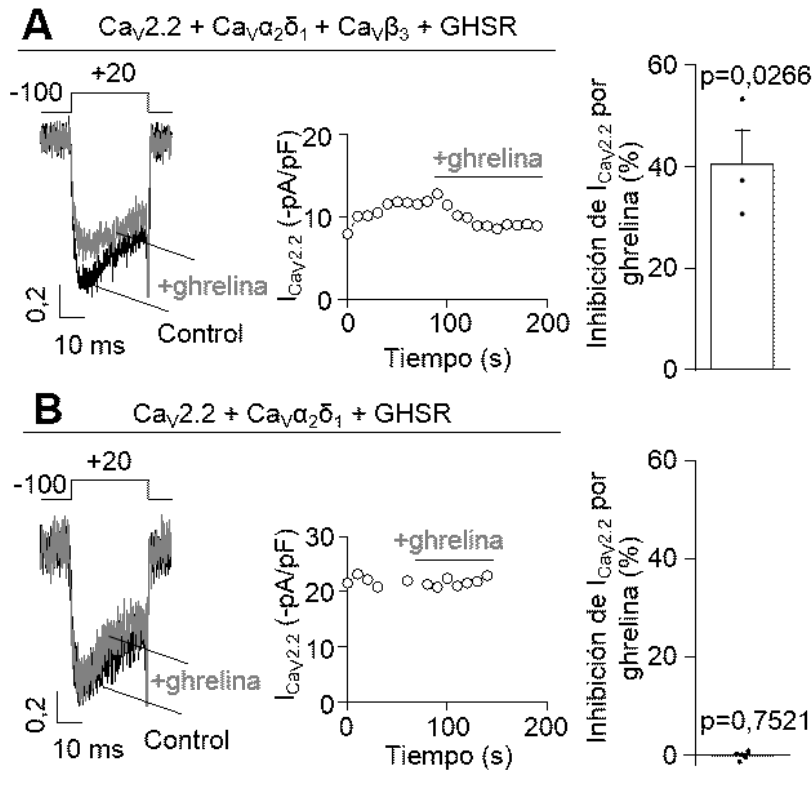


Figura 2. El efecto inhibitorio de la actividad evocada por ghrelina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ depende de la presencia de la subunidad $Ca_v\beta_3$. Trazos representativos normalizados al máximo de corriente y cursos temporales de niveles de corriente ($I_{Ca_v2.2}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, y GHSR en ausencia (Control) y presencia de ghrelina (500 nM, +ghrelina) con $Ca_v\beta_3$ (A, n=3) o plásmido vacío evocadas a +20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. (B, n=4). Valores promedio del porcentaje de inhibición de $I_{Ca_v2.2}$ por ghrelina en ambas condiciones. Test t de Student versus cero.

Teniendo presente los resultados mostrados hasta aquí, evaluamos si la actividad constitutiva de GHSR se extendía a otros subtipos de Ca_v donde $Ca_v\beta$ es parte del complejo canal, como son los Ca_v1 neuronales. Para ello registramos corrientes de calcio en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v1.2$ o $Ca_v1.3$, junto a las subunidades auxiliares, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y $Ca_v\beta_3$, y con GHSR o plásmido vacío. Encontramos una significativa disminución en los niveles de la corriente macroscópica mediada por $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ en las células coexpresando GHSR en comparación con el control. Además, para el $Ca_v1.3$ ensayamos el efecto de la preincubación con el agonista inverso de GHSR, SPA, observando que es suficiente para ocluir el efecto inhibitorio de GHSR (figura 3). Estos resultados indican que los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ expresados heterológamente también son sensibles a la acción inhibitoria de la actividad constitutiva de GHSR.

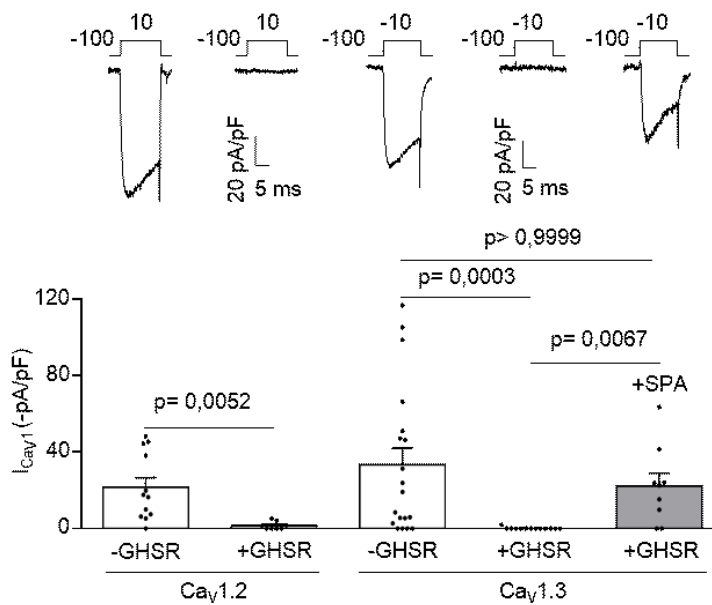


Figura 3. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes Ca_v1.2 y Ca_v1.3. Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente (I_{CaV1}) de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v1.2, Ca_vα₂δ₁, Ca_vβ₃ y GHSR (+GHSR, n=8) o plásmido vacío (-GHSR, n= 12) evocadas a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Trazos representativos y valores promedio de I_{CaV1} de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v1.3, Ca_vα₂δ₁, Ca_vβ₃ y GHSR (+GHSR, n= 13) preincubadas o no con SPA (1 μM, +SPA, n=9), o plásmido vacío (-GHSR, n=19) evocadas a -10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Kruskal-Wallis y post-test de Dunn (Ca_v1.3). Test de Mann-Whitney (Ca_v1.2).

A continuación, ensayamos si el efecto de la actividad constitutiva de GHSR se extiende a canales Ca_v1 endógenos de neuronas hipotalámicas. Para esto comparamos la amplitud de corriente Ca_v1 en cultivos neuronales primarios de hipotálamo derivados de ratones salvajes (*Wild type*) y de ratones deficientes para GHSR (GHSR def). En este caso utilizamos bario como ion permeante para incrementar las corrientes nativas en neuronas (Hille, 2001). Al realizar los registros electrofisiológicos, observamos que los niveles de corriente total de bario obtenidos en neuronas derivadas de animales salvajes eran menores en comparación con los obtenidos de animales deficientes, en concordancia con datos previos del laboratorio (Lopez Soto *et al.*, 2015). Para ensayar aisladamente la amplitud de las corrientes endógenas Ca_v1 en neuronas hipotalámicas utilizamos Bay-K 8644, una dihidropiridina que aumenta selectivamente el tiempo del estado abierto de los canales Ca_v1 (Hess *et al.*, 1984; Thomas *et al.*, 1985). Ensayamos esta droga en cultivos neuronales salvajes, que expresan cantidades nativas de GHSR, y deficientes de GHSR. Observamos que se duplicó el incremento de la amplitud de la corriente de bario por Bay-K 8644 en neuronas derivadas de animales deficientes para GHSR en comparación con las neuronas derivadas de animales salvajes (**figura 4**). Estos resultados sugieren que la actividad constitutiva de GHSR disminuye las corrientes macroscópicas Ca_v1 nativas de neuronas hipotalámicas.

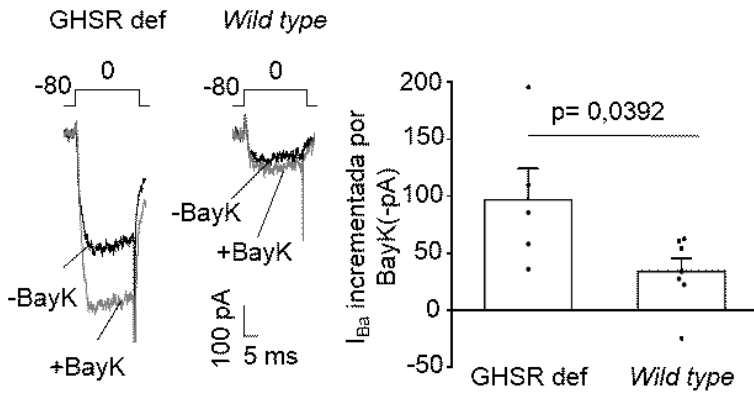


Figura 4. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes Ca_v1 nativas en neuronas hipotalámicas. Trazos representativos del efecto de Bay-K 8644 ($5 \mu\text{M}$) en corrientes de bario registradas en neuronas de ratones deficientes de GHSR (GHSR- def, $n=5$) o de ratones salvajes (Wild type, $n=7$) evocadas a 0 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV , y valores promedio del incremento de I_{Ba} . Test t de Student.

Seguidamente evaluamos si la actividad constitutiva de GHSR modula la actividad de los Ca_v3 que son funcional y estructuralmente muy diferentes a los ya presentados Ca_v1 y Ca_v2 . Una característica muy importante en el contexto de nuestros datos es que los Ca_v3 trafican hacia la membrana plasmática en ausencia de subunidades auxiliares. En la **figura 5** mostramos que tanto los niveles de corriente macroscópica de $Ca_v3.2$ como los de $Ca_v3.3$, expresados en ausencia de las subunidades auxiliares, no se modifican significativamente por la coexpresión de GHSR en células HEK293T. Asimismo, la distribución en la superficie celular de una quimera de $Ca_v3.2$ con GFP no se modificó por la expresión de GHSR (datos presentados en la tesis doctoral de Valentina Martínez Damonte y corresponden a la figura 2B de (Mustafa *et al.*, 2017)). De manera similar a lo presentado en la figura 2, ensayamos el posible efecto de la activación de GHSR por ghrelina las corrientes macroscópicas mediadas por $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. Encontramos que $Ca_v3.2$ no es susceptible a

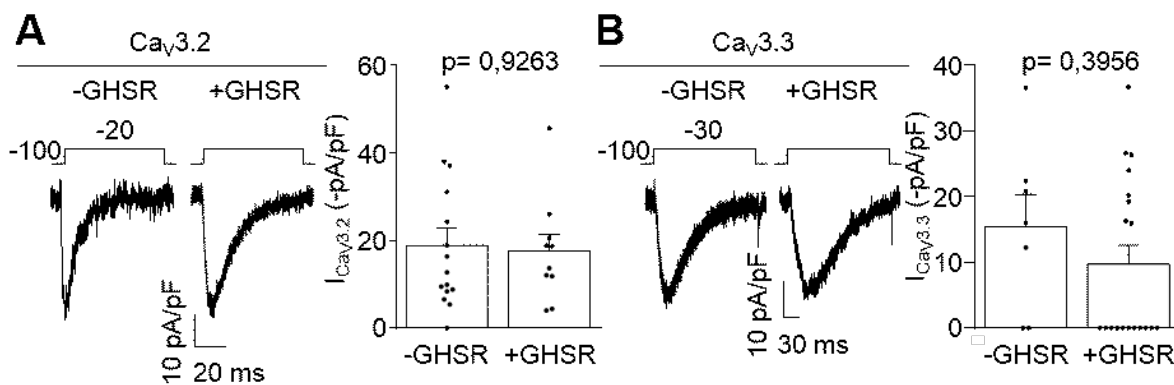


Figura 5. La actividad constitutiva de GHSR no reduce las corrientes $Ca_v3.2$ ni las $Ca_v3.3$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente ($I_{Ca_v3.2}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.2$ y GHSR (+GHSR, $n=10$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=15$) evocadas a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV . **B.** Trazos representativos y valores promedio de corriente ($I_{Ca_v3.3}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR (+GHSR, $n=19$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=7$) evocadas a -30 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV . Test de Mann-Whitney.

la aplicación aguda de ghrelina (inhibición por ghrelina (%) = $4,98 \pm 2,05$, $p = 0,0716$, test *t* de *Student* versus cero); sin embargo, las corrientes mediadas por $Ca_v3.3$ si lo son (inhibición por ghrelina (%) = $26,67 \pm 4,48$, $p < 0,0001$, test *t* de *Student* versus cero). Este efecto diferencial de ghrelina sobre el subtipo $Ca_v3.3$ es estudiado en detalle en el capítulo II de la presente tesis.

Dado que varios reportes proponen que el tráfico de Ca_v3 se incrementa por la coexpresión con las subunidades auxiliares $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_2\delta$ (Wyatt *et al.*, 1998; Dolphin *et al.*, 1999; Dubel *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005) ensayamos el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v3 en presencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y $Ca_v\beta$. Primero comparamos los niveles de corriente de $Ca_v3.2$ versus $Ca_v3.2$ coexpresado con $Ca_v\alpha_2\delta_1$ a igual relación molar sin observar un aumento significativo de la corriente ($Ca_v3.2 = 18,79 \pm 3,78$ pA/pF ($n=10$) vs $Ca_v3.2 + Ca_v\alpha_2\delta_1 = 20,63 \pm 4,21$ ($n=5$), $p = 0,7695$, test *t* de *Student*), y tampoco observamos aumento de la corriente $Ca_v3.3$ al coexpresar $Ca_v\alpha_2\delta_1$ ($Ca_v3.3 = 15,62 \pm 3,23$ ($n=15$) pA/pF vs $Ca_v3.3 + Ca_v\alpha_2\delta_1 = 9,00 \pm 3,67$ ($n=11$), $p = 0,2174$, test de *Mann-Whitney*). Luego ensayamos el efecto de la coexpresión de GHSR en presencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$ sobre $Ca_v3.2$ o de $Ca_v3.3$ y encontramos que no se modifica el nivel de corriente respecto del control (**figura 6**).

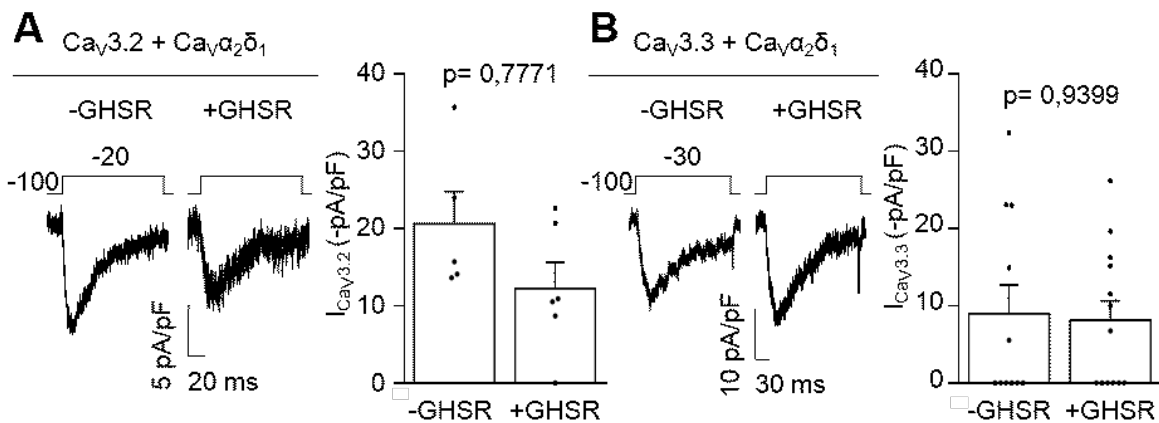


Figure 6. La actividad constitutiva de GHSR no modifica las corrientes $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ en presencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente ($I_{Ca_v3.2}$) células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR (+GHSR, $n=6$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=5$) evocadas a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. **B.** Trazos representativos y valores promedio de corriente ($I_{Ca_v3.3}$) células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR (+GHSR, $n=13$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=11$) evocadas a -30 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Test *t* de *Student* (A) y test de *Mann-Whitney* (B).

A continuación ensayamos el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v3 en presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_3$. De manera similar a lo descrito para $Ca_v\alpha_2\delta_1$, evaluamos primero el efecto de coexpresión de $Ca_v\beta_3$ junto a $Ca_v3.2$ en idéntica

relación molar sin observar un incremento significativo en la corriente basal mediada por el canal ($Ca_v3.2 = 19,54 \pm 2,87$ (n=14) pA/pF vs $Ca_v3.2 + Ca_v\beta_3 = 19,30 \pm 3,38$ (n=26), $p = 0,5418$, test de *Mann Whitney*). En paralelo observamos que la coexpresión de $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v3.3$ en iguales relaciones molares provoca un leve aumento de la corriente sin ser estadísticamente significativo ($Ca_v3.3 = 15,62 \pm 3,23$ pA/pF (n=15) vs $Ca_v3.3 + Ca_v\beta_3 = 24,57 \pm 8,95$ (n=11), $p = 0,3028$, test *t* de *Student*). Una vez establecido el efecto de $Ca_v\beta$ sobre las corrientes $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ ensayamos el efecto de la actividad constitutiva de GHSR en estas condiciones. La **figura 7** muestra que la coexpresión de $Ca_v3.2$ o de $Ca_v3.3$ y GHSR reduce las corrientes macroscópicas registradas en células HEK293T y que este efecto es proporcional a la cantidad de plásmido conteniendo $Ca_v\beta_3$. Para corroborar que dicho efecto era debido a la actividad constitutiva de GHSR preincubamos células coexpresando $Ca_v3.2$ o $Ca_v3.3$ junto a $Ca_v\beta_3$ y GHSR con SPA y observamos que esta maniobra revierte el efecto inhibitorio del receptor. Asimismo, encontramos niveles reducidos de fluorescencia de $Ca_v3.2$ -GFP en la superficie celular sólo cuando GHSR se coexpresa con $Ca_v\beta_3$, y este

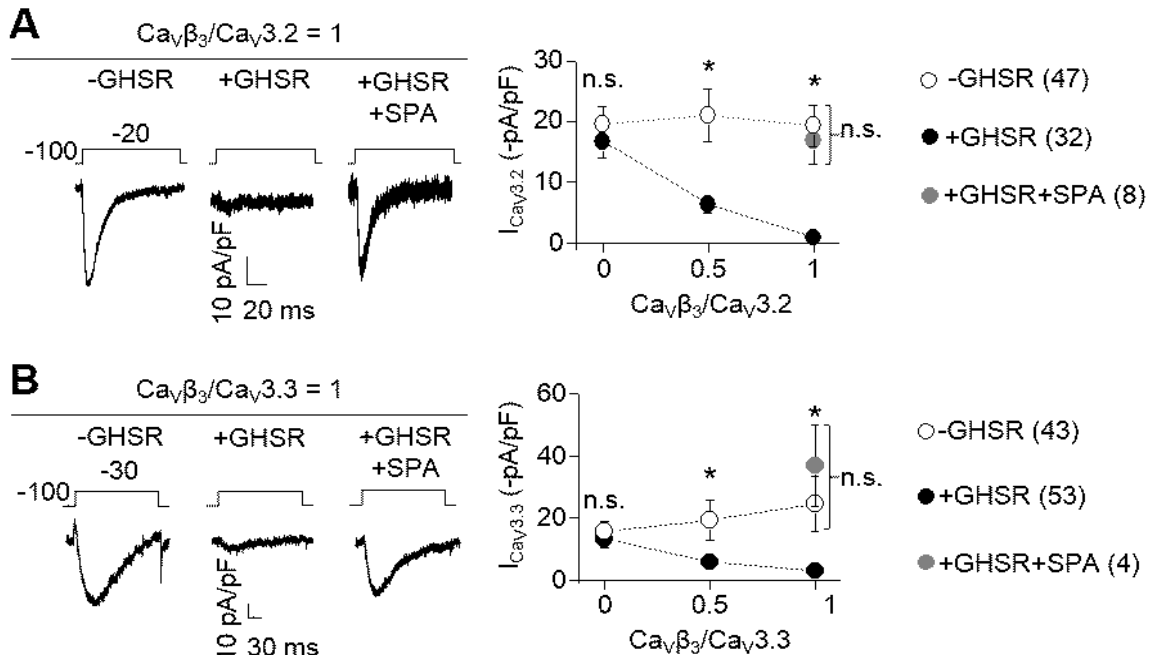


Figure 7. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ de manera dependiente de $Ca_v\beta_3$. **A.** Trazos representativos de corriente ($I_{Ca_v3.2}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.2$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR (+GHSR) preincubadas o no con SPA (1 μM , +GHSR+SPA), o plásmido vacío (-GHSR) y valores promedio de niveles de $I_{Ca_v3.2}$ en presencia de relaciones molares $Ca_v\beta_3/Ca_v3.2$ crecientes evocadas a -20 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. **B.** Trazos representativos de corriente ($I_{Ca_v3.3}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR (+GHSR) preincubadas o no con SPA (1 μM , +GHSR+SPA), o plásmido vacío (-GHSR) y valores promedio de niveles de $I_{Ca_v3.3}$ en presencia de relaciones molares $Ca_v\beta_3/Ca_v3.3$ crecientes evocadas a -30 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Test de *Mann Whitney* y *Kruskal-Wallis* con post-test de *Dunn*.

efecto fue bloqueado por la preincubación con SPA (datos presentados en la tesis doctoral de Valentina Martínez Damonte y corresponden a la figura 3B de (Mustafa *et al.*, 2017)). De acuerdo con estos datos, los Ca_v3 ensayados también serían blanco de la actividad constitutiva de GHSR, con la sola condición de que $Ca_v\beta$ esté coexpresada en la célula.

Como se planteó en la hipótesis, la disminución de canales en la membrana plasmática podría involucrar una disminución en el tráfico desde el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática y/o un incremento en la internalización desde la membrana plasmática hacia el sistema de endosomas. Para ensayar dichas posibilidades, analizamos la sub-localización celular de la subunidad $Ca_v\beta$ en presencia o no de GHSR utilizando versiones de $Ca_v\beta$ fusionadas con GFP y marcadores comerciales de diferentes compartimentos intracelulares: membrana plasmática (*pPalmitoyl-mTurquoise2*, (Goedhart *et al.*, 2012)), retículo endoplásmico (*mCh-Sec61 beta*, (Zurek *et al.*, 2011)), aparato de Golgi (*pmTurquoise2-Golgi*, (Goedhart *et al.*, 2012)) y endosoma de reciclaje (*DsRed-rab11 WT*, (Choudhury *et al.*, 2002)). El marcador *pPalmitoyl-mTurquoise2* consiste en un plásmido conteniendo una secuencia de palmitoilación que ancla a la proteína mTurquoise2 a la membrana plasmática mientras que el *mCh-Sec61 beta* consiste en un plásmido codificante para la subunidad β del complejo proteico de la secretasa 61 (complejo transmembrana del retículo endoplásmico responsable de la translocación cotraduccional de los polipéptidos). Por su parte, *pmTurquoise2-Golgi* codifica para la secuencia señal de retención en el aparato de Golgi de la enzima β -1,4-galactosiltransferasa 1 y el plásmido *DsRed-rab11 WT* codifica para la pequeña Rab GTPasa Rab11A cuya función es regular el reciclaje endocítico. Por datos previos de nuestro laboratorio sabíamos que el efecto de la actividad constitutiva de GHSR se observa en células expresando dos subtipos diferentes de $Ca_v\beta$: $Ca_v\beta_3$ (proteína soluble que al interactuar con la subunidad $Ca_v\alpha_1$ se localiza en la membrana plasmática (Bichet *et al.*, 2000)) y $Ca_v\beta_{2a}$ (proteína palmitoilada que se localiza en membrana plasmática aun en ausencia de $Ca_v\alpha_1$ (Chien *et al.*, 1995; Chien *et al.*, 1996; Chien *et al.*, 1998)). En nuestros ensayos utilizamos microscopía confocal para registrar la sublocalización de las proteínas y el coeficiente de *Manders* como medida de co-localización de dichas proteínas. En una primera serie experimental utilizamos células HEK293T coexpresando marcadores de retículo endoplásmico y membrana plasmática junto con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP con y sin GHSR. Observamos que en ausencia de GHSR la subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP se sublocaliza mayoritariamente en la membrana plasmática como estaba reportado (Yeon *et al.*, 2018) mientras que en presencia de GHSR, la localización de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP disminuye en la membrana plasmática y se incrementa en el

retículo endoplásmico (**figura 8**). Para confirmar que dicho efecto se debe a la actividad constitutiva de GHSR preincubamos en paralelo células con SPA y el patrón de sub-localización de $Ca_v\beta_{2a}$ en presencia de GHSR fue revertido, restableciéndose los niveles de $Ca_v\beta_{2a}$ en la superficie celular y en el retículo endoplásmico (**figura 8**).

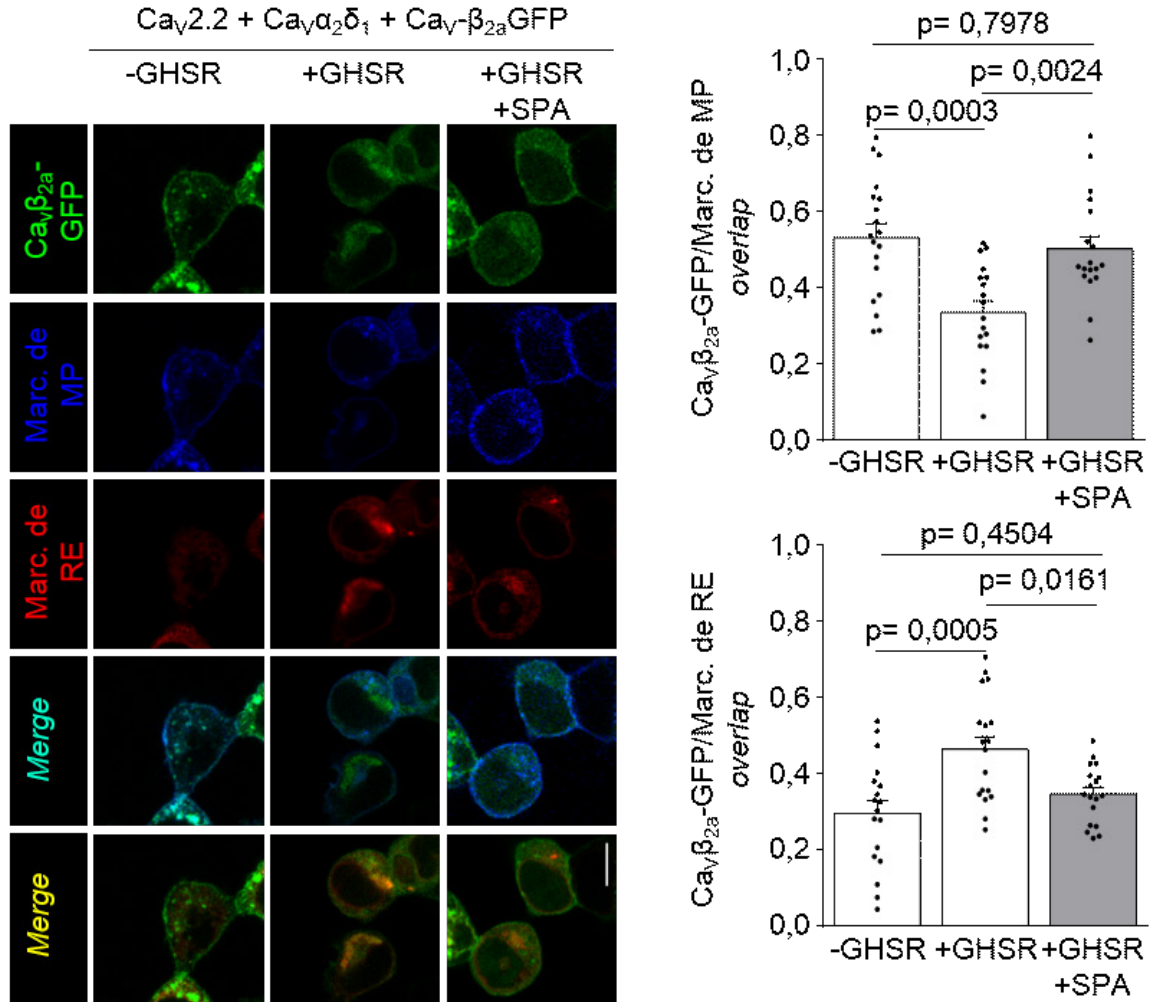


Figura 8. La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad en membrana plasmática de $Ca_v\beta_{2a}$ mientras que la incrementa en el retículo endoplásmico. Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR preincubadas con SPA ($1\mu M$, +GHSR+SPA, $n=18$) o no (+GHSR, $n=18$), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, $n=19$). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP con la señal azul proveniente del marcador de MP, o con la señal roja proveniente del marcador de RE. La escala indica $10\mu m$. ANOVA de una vía y post test de Tukey.

Por otro lado ensayamos la sub-localización de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP en las mismas condiciones pero utilizando el marcador del aparato de Golgi. Como se muestra en la **figura 9**, la

coexpresión de GHSR disminuye los niveles de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP en el aparato de Golgi, lo que se podría explicar si el canal es retenido en el retículo endoplásmico –como sugiere el resultado anterior- recordando que el tráfico del complejo canal sería desde el retículo hacia el aparato de Golgi para finalmente llegar a la membrana plasmática. Dicho fenómeno es revertido por la preincubación con SPA, lo que confirma la participación de la actividad constitutiva de GHSR.

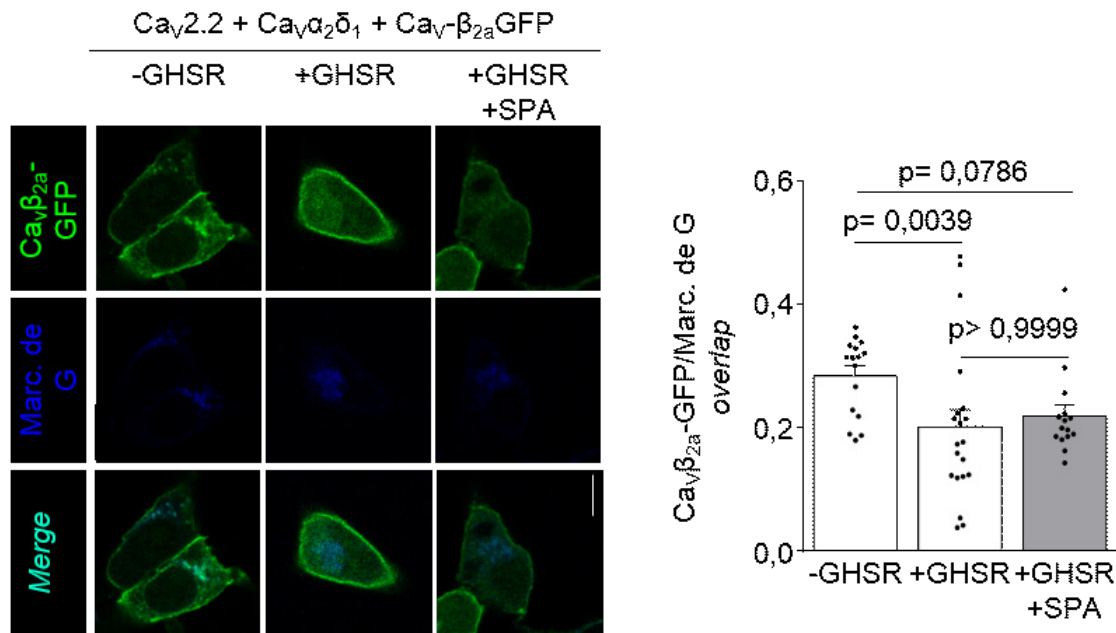


Figura 9. La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad en aparato de Golgi de $Ca_v\beta_{2a}$. Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de aparato de Golgi (marc. de G) y GHSR preincubadas con SPA ($1\mu M$, +GHSR+SPA, $n=15$) o no (+GHSR, $n=20$), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, $n=16$). Las barras indican la colocalización entre la señal verde proveniente de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP con la señal azul proveniente del marcador de G. La barra de escala indica $10\mu m$. Kruskal–Wallis y post test de Dunn.

Al realizar los experimentos en presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_3$ en células coexpresando $Ca_v2.2$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en ausencia del receptor observamos una menor localización en membrana plasmática en comparación con la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_{2a}$ lo que coincide con lo reportado en la bibliografía (Yeon *et al.*, 2018). Por otro lado, al coexpresar GHSR, observamos que al igual que $Ca_v\beta_{2a}$, la localización subcelular de $Ca_v\beta_3$ -GFP está disminuida en la membrana plasmática, y esto se acompaña con un incremento en el retículo endoplásmico (**figura 10**). Además el patrón de distribución es revertido por la preincubación de las células con el agonista inverso, SPA.

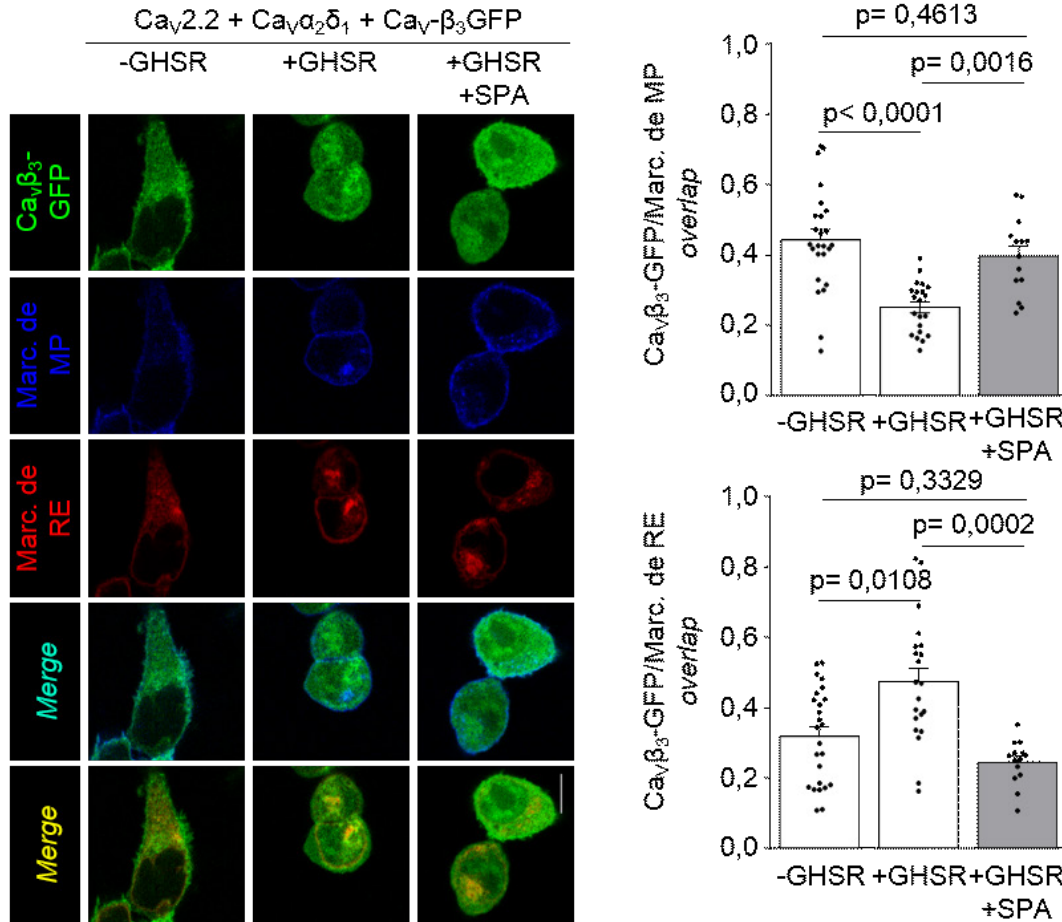


Figura 10. La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad en membrana plasmática de Ca_vβ₃ mientras que la incrementa en el retículo endoplásmico. Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2, Ca_vβ₃-GFP, Ca_vα₂δ₁, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR pre-incubadas con SPA (1μM, +GHSR+SPA) o no (+GHSR), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de Ca_vβ₃-GFP con la señal azul proveniente del marcador de MP, o con la señal roja proveniente del marcador de RE. Las barras representan la media ± error. La barra de escala indica 10 μm. ANOVA de una vía y post test de Tukey.

Seguidamente evaluamos la sublocalización de Ca_vβ₃-GFP en el aparato de Golgi y no se observaron cambios significativos generados por la actividad constitutiva de GHSR (figura 11) a diferencia de lo observado para Ca_vβ_{2a}-GFP.

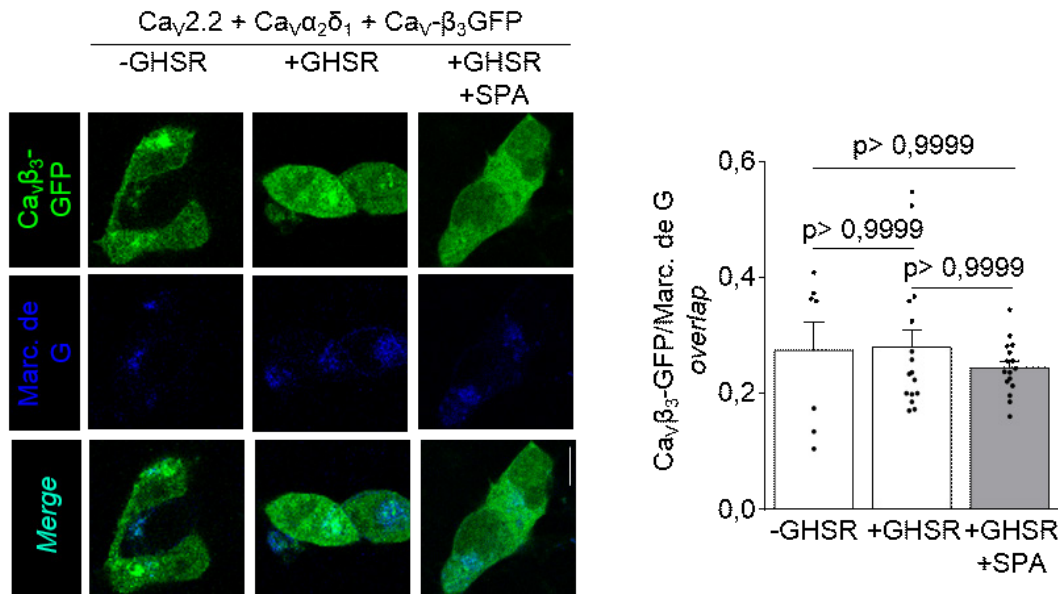


Figura 11. La actividad constitutiva de GHSR no modifica la densidad en apareado de Golgi de Ca_vβ₃. Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2, Ca_vβ₃-GFP, Ca_vα₂δ₁, marcador de aparato de Golgi (marc. de G) y GHSR preincubadas con SPA (1μM, +GHSR+SPA, n=16) o no (+GHSR, n=16), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, n=7). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de Ca_vβ₃-GFP con la señal azul proveniente del marcador de G. La escala indica 10 μm. Kruskal–Wallis y post test de Dunn.

Finalmente ensayamos la participación de las vías endocíticas con un marcador de endosomas de reciclaje. En este caso no observamos cambios en la sublocalización de la subunidad auxiliar Ca_vβ_{2a} (**figura 12A**) ni de Ca_vβ₃ (**figura 12B**) en los endosomas de reciclaje cuando coexpresamos GHSR. En concordancia con este resultado, observamos que al coexpresar un dominante negativo (Rab11bGDP) de una proteína que media la internalización de Ca_v1.2 hacia los endosomas, Rab11b, no altera el efecto de la actividad constitutiva sobre los niveles de corriente de Ca_v2.2 (**figura 13A**). Además, hallamos un resultado en la misma dirección al ensayar la participación de una pequeña GTPasa: RhoA. Dicha proteína disminuye la densidad en superficie de los canales Ca_v2.2 y Ca_v2.3 por un mecanismo dependiente de internalización (Rousset *et al.*, 2015). Al coexpresar un inhibidor de RhoA (toxina C3, plásmido previamente utilizado (Notcovich *et al.*, 2010)) en presencia de Ca_v2.2, junto a sus subunidades auxiliares y GHSR, observamos una significativa reducción de la corriente en comparación con células transfectadas con plásmido vacío (**figura 13B**). Estos datos confirman que las vías endocíticas mediadas por Rab11b y RhoA no estarían involucradas en el mecanismo de acción de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v2.

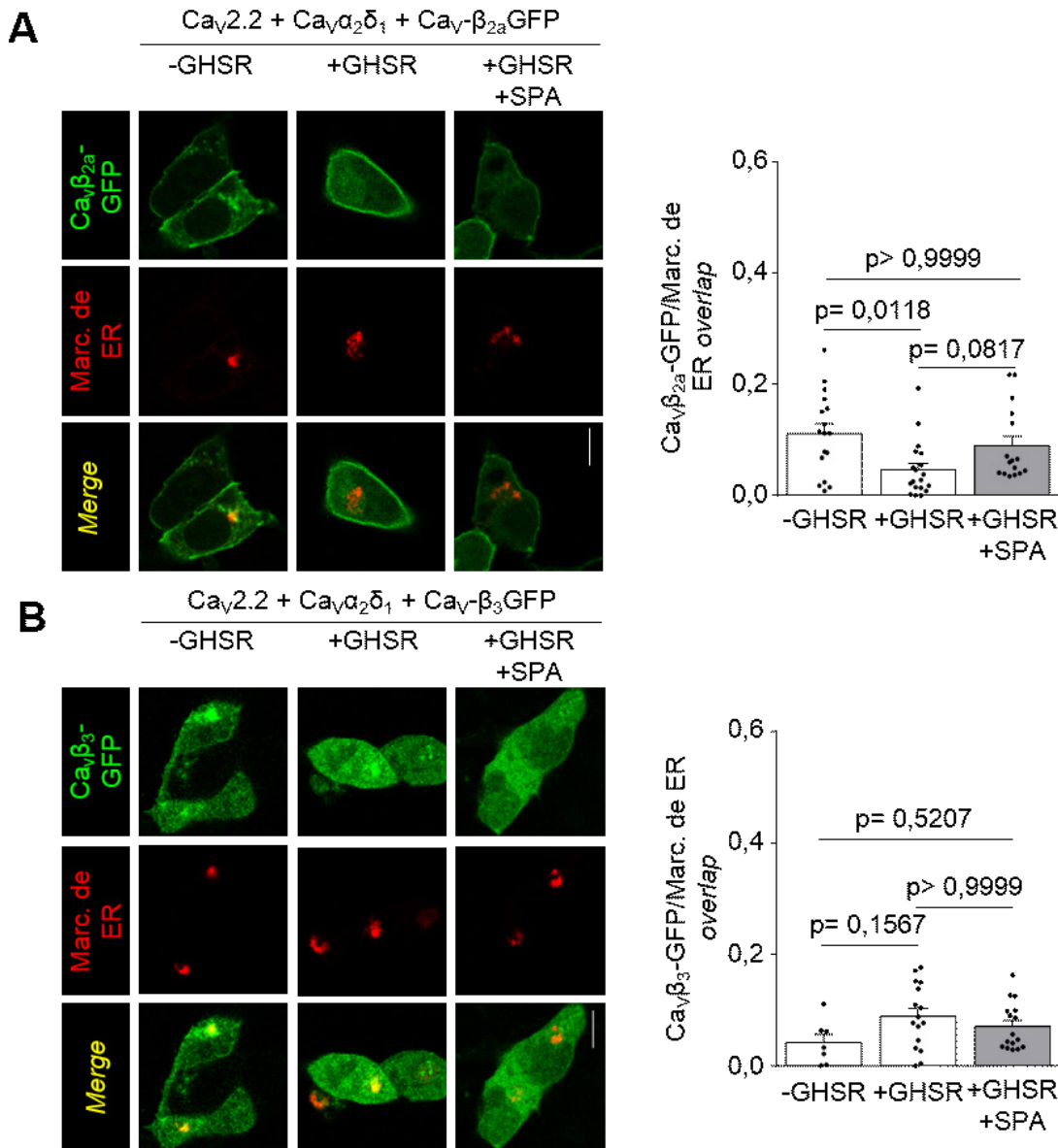


Figura 12. La actividad constitutiva de GHSR no modifica la densidad de Ca_vβ_{2a} ni de Ca_vβ_{3a} en los endosomas de reciclaje. **A.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2, Ca_vβ_{2a}-GFP, Ca_vα₂δ₁, marcador de endosomas de reciclaje (marc.de ER), y GHSR pre-incubadas con SPA (1μM, +GHSR+SPA, n=18) o no (+GHSR, n=20), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, n=18). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de Ca_vβ_{2a}-GFP con la señal roja proveniente del marcador de ER. Las barras representan la media ± error. La barra de escala indica 10 μm. Kruskal–Wallis y post test de Dunn. **B.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2, Ca_vβ₃-GFP, Ca_vα₂δ₁, marcador de endosomas de reciclaje (marc. de ER), y GHSR pre-incubadas con SPA (1μM, +GHSR+SPA, n=16) o no (+GHSR, n=16), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, n=8). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de Ca_vβ₃-GFP con la señal roja proveniente del marcador de ER. Las barras representan la media ± error. La barra de escala indica 10 μm. Kruskal–Wallis y post test de Dunn.

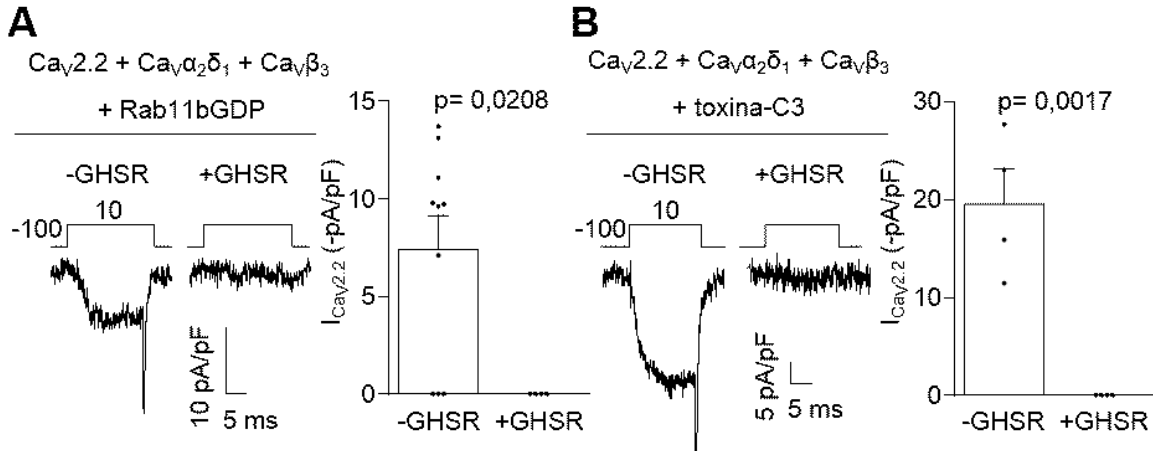


Figura 13. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes $Ca_{v2.2}$ de manera independiente de Rab11b y RhoA. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente ($I_{Ca_{v2.2}}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_{v2.2}$, $Ca_{v\alpha_2\delta_1}$, $Ca_{v\beta_3}$, Rab11GDP y GHSR (+GHSR, $n=4$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=10$) evocadas a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. **B.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de $I_{Ca_{v2.2}}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_{v2.2}$, $Ca_{v\alpha_2\delta_1}$, $Ca_{v\beta_3}$, toxina-C3 y GHSR (+GHSR, $n=4$) o plásmido vacío (-GHSR, $n=4$) evocadas a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Test t de Student.

Nuestros resultados hasta aquí indican que la actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad de corriente de los Ca_v sólo en presencia de $Ca_{v\beta}$ y modifica la sub-localización de $Ca_{v\beta}$, incrementando su densidad en retículo endoplásmico. Para confirmar que estos eventos están relacionados y que GHSR impacta sobre el complejo canal decidimos ensayar si GHSR modula la sublocalización de $Ca_{v\beta}$ de manera dependiente de la subunidad principal $Ca_{v\alpha_1}$. Para esto realizamos la misma serie de experimentos que los presentados en las figuras 8 y 10 pero en ausencia de $Ca_{v\alpha_1}$. Nuestra primera observación fue que la subunidad $Ca_{v\beta_3}$ disminuye la localización en la membrana plasmática en ausencia de $Ca_{v\alpha_1}$ en comparación con lo observado en la figura 10 y lo reportado previamente (Bichet *et al.*, 2000) (**figura 14B**), mientras que la $Ca_{v\beta_{2a}}$ sigue anclada a membrana gracias a su modificación post-traduccional (Yeon *et al.*, 2018) (**figura 14A**). En estas condiciones experimentales hallamos que la coexpresión de GHSR no modifica la distribución de $Ca_{v\beta_3}$ ni de $Ca_{v\beta_{2a}}$ en la membrana plasmática ni en el retículo endoplásmico (**figura 14**). Así, podemos postular que el efecto de la actividad constitutiva de GHSR actúa modificando la localización sub-celular del complejo canal en forma dependiente de la subunidad auxiliar $Ca_{v\beta}$.

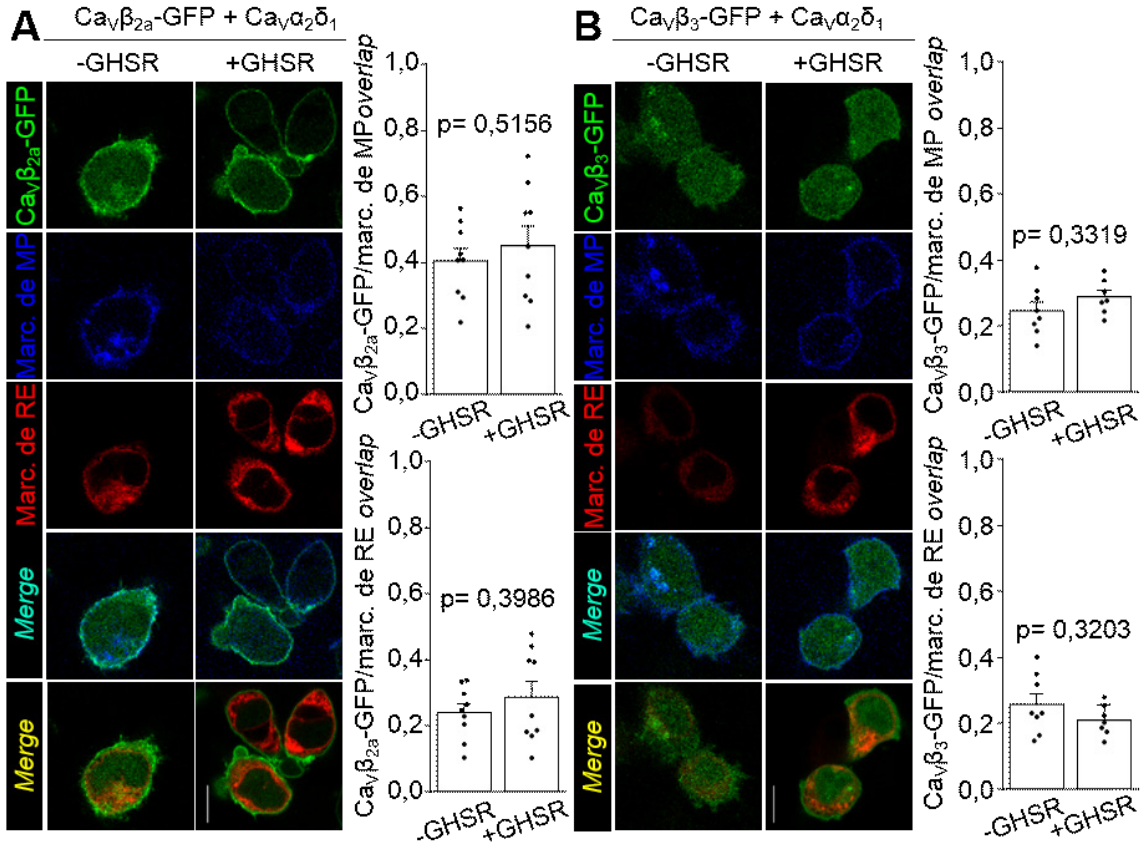


Figura 14. La actividad constitutiva de GHSR no reduce la densidad en membrana plasmática de $Ca_V\beta$ en ausencia de $Ca_V\alpha_1$. **A.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_V\beta_{2a}$ -GFP, $Ca_V\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR (+GHSR, n=9), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, n=9). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de $Ca_V\beta_{2a}$ -GFP con la señal azul proveniente del marc. de MP, o con la señal roja proveniente del marc. de RE. Test de t de Student (A). **B.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_V\beta_3$ -GFP, $Ca_V\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR (+GHSR, n=7), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR, n=8). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de $Ca_V\beta_3$ -GFP con la señal azul proveniente del marc. de MP, o con la señal roja proveniente del marc. de RE. Test de Mann Whitney. La escala indica 10 μ m.

A continuación utilizamos un mutante puntual de $Ca_V2.2$ ($Ca_V2.2W391A$) que interacciona débilmente con $Ca_V\beta$ (Leroy *et al.*, 2005; Van Petegem *et al.*, 2008) para intentar ocluir el efecto de GHSR. Primero realizamos medidas control de la densidad de corriente con este mutante y encontramos que registros a 24 horas post-transfección no mostraban corrientes de calcio medibles aun en presencia de bario 10 mM ($Ca_V2.2 + Ca_V\beta_3 + Ca_V\alpha_2\delta_1 = 322,39 \pm 9,25$ pA/pF (n=3) vs $Ca_V2.2W391A + Ca_V\beta_3 + Ca_V\alpha_2\delta_1 = 0,00 + 0,00$ pA/pF (n=3), $p < 0,0001$, test t de Student). Realizamos entonces los registros a las 48 horas post-transfección y en presencia de bario 10 mM donde logramos resolver corrientes pequeñas pero diferentes de cero para $Ca_V2.2W391A$ ($Ca_V2.2W391A + Ca_V\beta_3 + Ca_V\alpha_2\delta_1 = 11,29 + 4,12$

pA/pF (n=7), p=0,0336, test *t* de *Student* versus cero). En estas condiciones los niveles de corriente macroscópica para Ca_v2.2W391A fueron no detectables en el conjunto de células coexpresando GHSR, tanto al coexpresar la subunidad Ca_vβ₃ como la Ca_vβ_{2a}, en comparación con los controles sin GHSR, indicando que la mutación W391A no es suficiente para ocultar el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR sobre el complejo canal (**figura 15**).

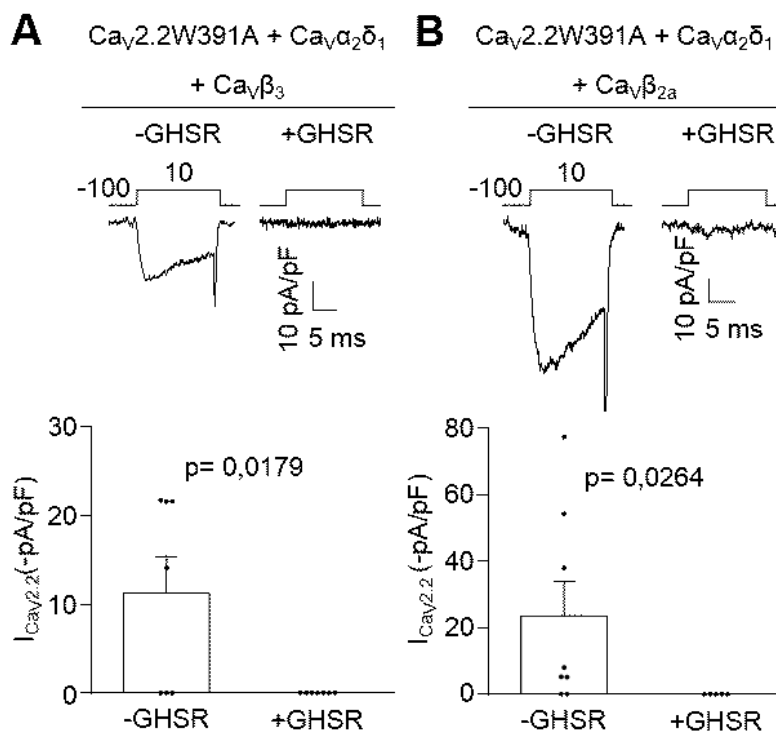


Figura 15. La mutación W391A en Ca_vα₁ no es suficiente para bloquear el efecto inhibitorio de GHSR sobre la actividad de Ca_v2.2. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente I_{CaV2.2} de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2W391A, Ca_vα₂δ₁, Ca_vβ₃ y GHSR (+GHSR, n=7) o plásmido vacío (-GHSR, n=7). **B.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente I_{CaV2.2} de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2W391A, Ca_vα₂δ₁, Ca_vβ_{2a} y GHSR (+GHSR, n=5) o plásmido vacío (-GHSR, n=8). Test de Mann-Whitney.

A continuación decidimos indagar si la distribución de GHSR *per-se* se ve modificada por la coexpresión de Ca_vα₁. Como puede observarse en la **figura 16** se observa que la expresión del receptor GHSR-YFP, proteína fusionada a *yellow fluorescent protein*, está disminuida en la membrana plasmática, al mismo tiempo que su expresión aumenta significativamente en el retículo endoplásmico cuando la subunidad Ca_vα₁ esta coexpresada en la célula. Este resultado indica que GHSR presenta un patrón de distribución similar al complejo canal. Por otro lado, dicho fenómeno no se observa al utilizar una versión mutante del receptor (A204E-YFP), que carece de actividad constitutiva. En este caso, el receptor se expresa en la membrana plasmática en forma similar en presencia o ausencia de la subunidad Ca_vα₁, al mismo tiempo que su localización en el retículo endoplásmico disminuye levemente en presencia de dicha subunidad. Estos resultados se podrían explicar si pensamos que la actividad constitutiva de GHSR utiliza un mecanismo que implica la

interacción física entre el GHSR y el complejo canal, que retenga a ambos en el retículo endoplásmico impidiendo su correcto tráfico hacia la membrana plasmática.

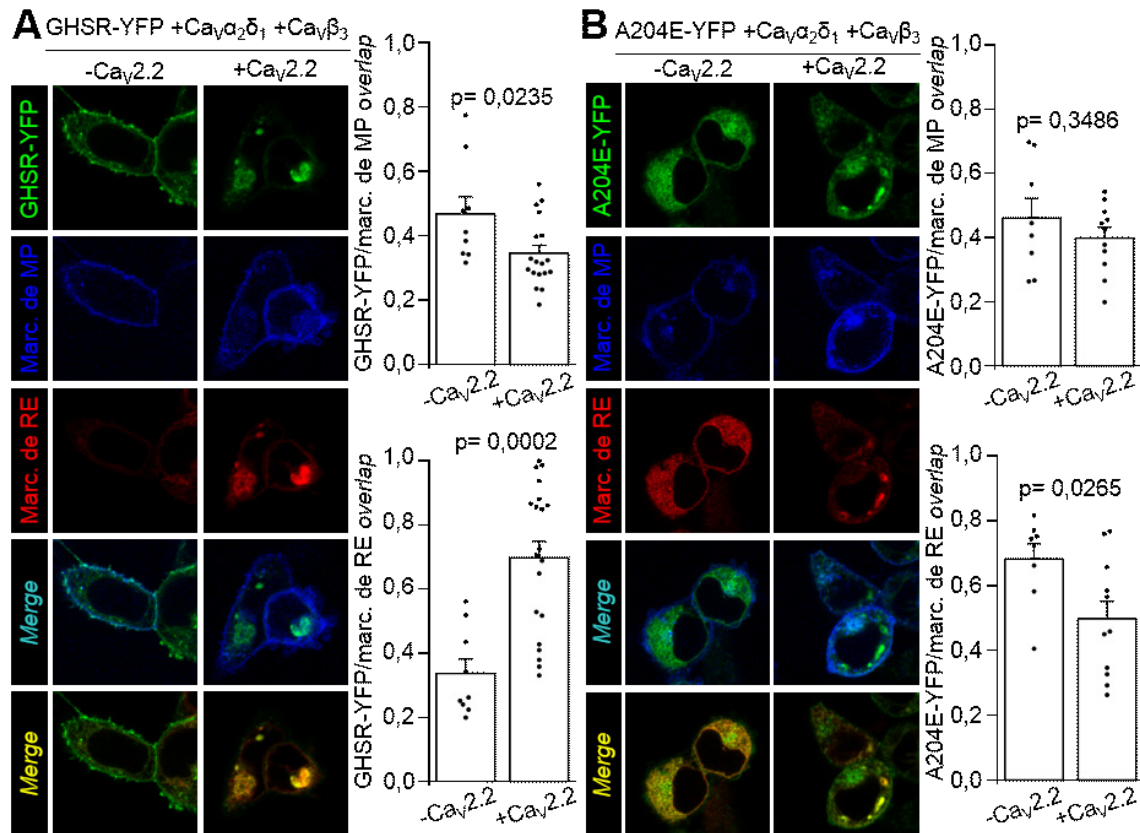


Figura 16. La densidad de GHSR disminuye en la membrana plasmática al mismo tiempo que se incrementa en el retículo endoplásmico sólo en presencia de $Ca_v\alpha_1$. **A.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con GHSR-YFP, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y $Ca_v2.2$ (+ $Ca_v2.2$, n=18), y una condición control expresando plásmido vacío (- $Ca_v2.2$, n=9). **B.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con A204E-YFP, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y $Ca_v2.2$ (+ $Ca_v2.2$, n=11), y una condición control expresando plásmido vacío (- $Ca_v2.2$, n=8). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de GHSR/A204E-YFP con la señal azul proveniente del marc. de MP, o con la señal roja proveniente del marc. de RE. La barra de escala indica 10 μ m. Test t de Student.

Siendo que encontramos que el complejo canal es retenido en el retículo endoplásmico por acción de la actividad constitutiva de GHSR (figuras 8 y 10) y que además el propio GHSR aumenta su localización en retículo endoplásmico y disminuye en la superficie celular cuando la subunidad principal de $Ca_v2.2$ esta coexpresada (**figura 16**) decidimos realizar una serie de experimentos coexpresando, junto a GHSR y el canal, dos versiones de GHSR que no poseen actividad constitutiva, que están sub-localizadas mayoritariamente en retículo endoplásmico y que son capaces de interactuar con GHSR salvaje (Damian *et al.*, 2015). Estas proteínas son GHSRA204E, el mutante puntual (Pantel *et al.*, 2006) y

GHSR1b, la versión truncada de *splicing* alternativo (Chow *et al.*, 2012). Los resultados se muestran en las **figuras 17 y 18**. La base racional de estos experimentos es que nuestros datos previos (Lopez Soto *et al.*, 2015) muestran que una relación molar GHSR:Ca_v2.2 = 0,6 es suficiente para disminuir significativamente la corriente Ca_v2.2 mientras que una relación molar de 0,1 no lo es. En la serie experimental de la **figura 17** incluimos una condición donde GHSRA204E en relación molar 0,6 con Ca_v2.2 no modifica la corriente como se espera si no posee actividad constitutiva. Sorprendentemente, la combinación de GHSR salvaje a 0,1 y GHSRA204E a 0,5 reduce la corriente al mismo nivel que GHSR salvaje a 0,6 y ese efecto es ocluido por la preincubación con SPA, confirmando la participación de la actividad constitutiva del GHSR salvaje.

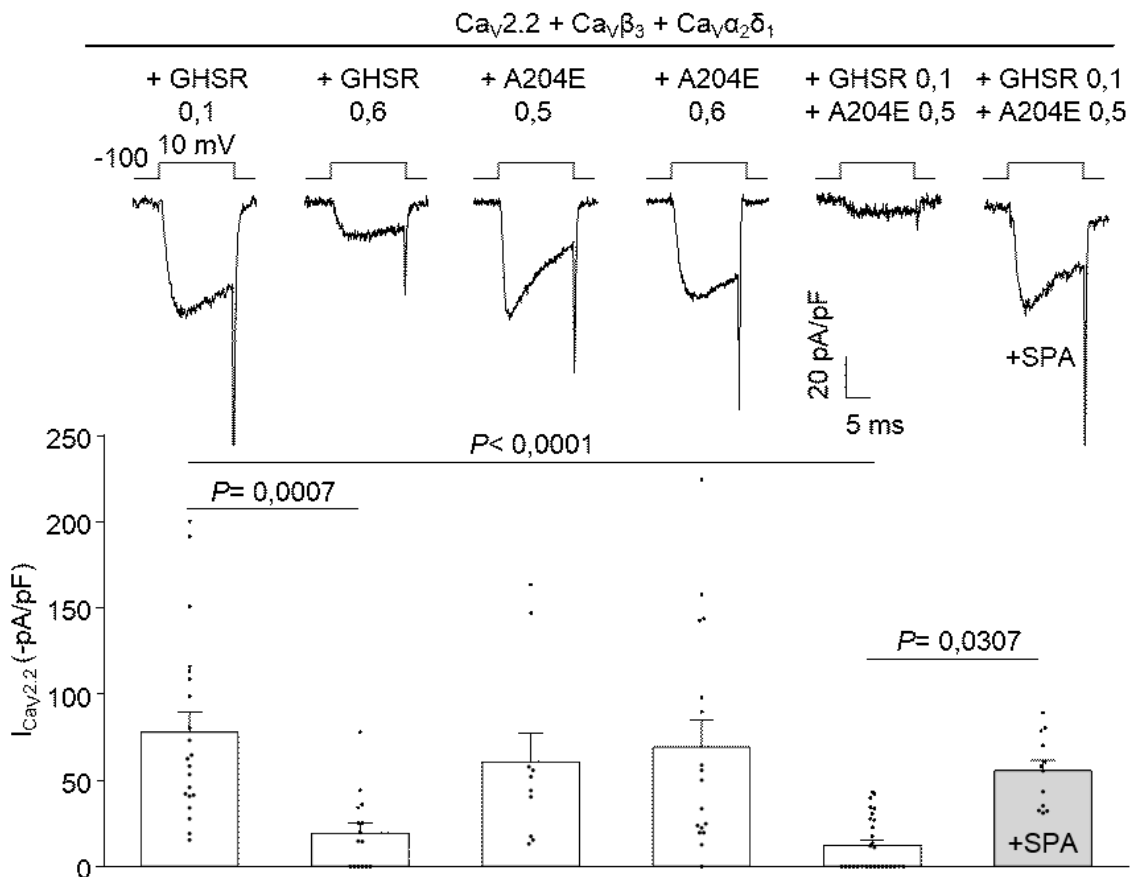


Figura 17. La coexpresión de GHSR junto a su versión mutada (A204E) reduce las corrientes mediadas por Ca_v2.2. Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con Ca_v2.2, Ca_v $\alpha_2\delta_1$, Ca_v β_3 y GHSR en diferentes relaciones molares respecto al canal (+GHSR (0,1), n=24; (+GHSR (0,6), n=17), o junto a A204E (+A204E (0,5), n=11; (+A204E (0,6), n=18), o ambos preincubados (+GHSR (0,1) + A204E (0,5) + SPA, n=16) o no (+GHSR (0,1) + A204E (0,5), n=33) con SPA evocadas a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Kruskal–Wallis y post test de Dunn.

En forma similar, en la **figura 18** ensayamos combinar cantidades pequeñas de GHSR salvaje (relación molar con $Ca_v2.2=0,1$) con cantidades altas de GHSR1b (relación molar con $Ca_v2.2=0,5$) la cual no afecta la corriente por si sola. Encontramos nuevamente que la combinación de estas dos proteínas modula negativamente la corriente en forma similar a la concentración alta de GHSR salvaje.

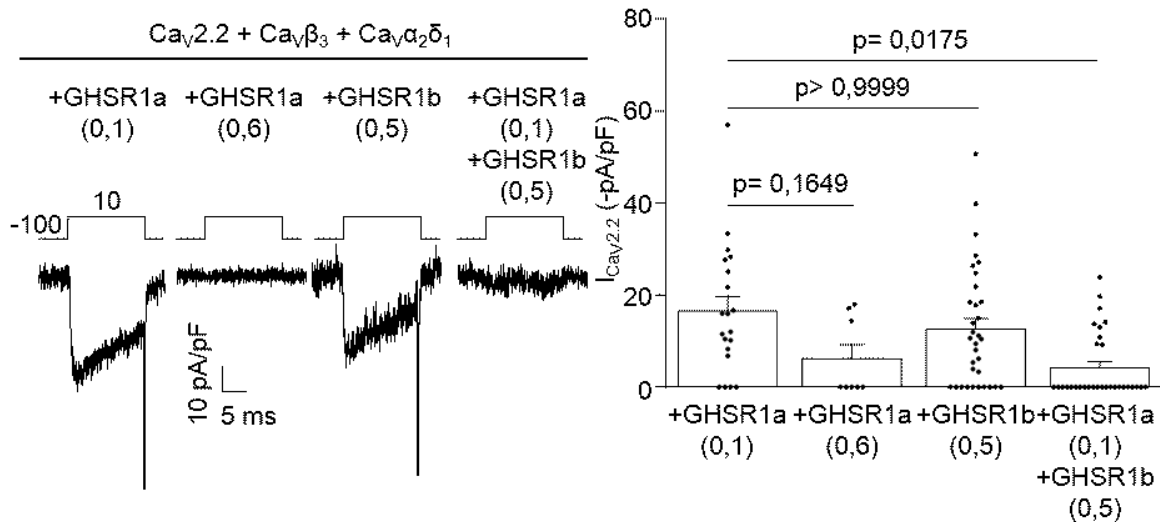
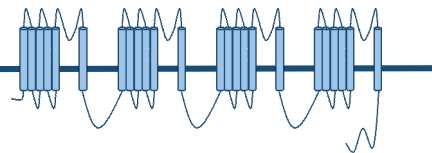


Figura 18. La coexpresión de GHSR1a junto a su versión truncada, GHSR1b, reduce las corrientes mediadas por $Ca_v2.2$. Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente ($I_{Ca_v2.2}$) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR1a en diferentes relaciones molares respecto al canal (+GHSR1a (0,1), $n=21$; (+GHSR1a (0,6)), $n=8$; o GHSR1b (+GHSR1b (0,5), $n=39$) o ambos (+GHSR1a (0,1) + GHSR1b (0,5), $n=35$) evocadas a +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Kruskal-Wallis y post test de Dunn.

Creemos que estos resultados pueden interpretarse de dos maneras: por un lado, GHSR podría formar un complejo con $Ca_v2.2$ que retiene a ambas proteínas en el retículo endoplásmico, y tanto GHSRA204E como GHSR1b, al interactuar con GHSR salvaje, aumentarían la retención de GHSR salvaje y, por lo tanto de $Ca_v2.2$ en el retículo endoplásmico; por otro lado, es posible que las cascadas corrientes abajo de $G_{i/o}$ activadas basalmente por GHSR pudieran modular a $Ca_v2.2$ o a GHSR (o a la porción análoga en GHSR1b o GHSRA204E) y esto estimular la interacción entre el canal y el receptor y/o la retención del complejo en el retículo endoplásmico.

Discusión I



GHSR es importante para la regulación del apetito, el peso corporal, el aprendizaje y la memoria (Nakazato *et al.*, 2001; Diano *et al.*, 2006; Jerlhag *et al.*, 2006). En esta tesis extendimos estudios previos de nuestro grupo acerca de la actividad constitutiva de GHSR sobre los canales Ca_v2 para demostrar que dicha actividad también puede regular la actividad de los canales Ca_v1 y Ca_v3 . La actividad constitutiva de GHSR previene el tráfico desde el retículo endoplásmico de $Ca_v\alpha_1$, sólo en presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$, resultando en una reducción de la densidad de complejo canal en la superficie celular.

La modulación de Ca_v dependiente de GPCR altera en muchos casos el tráfico de los canales, incluidos el receptor opioide μ , el receptor tipo opioide 1 (ORL1, por sus siglas en inglés *opioid receptor like-1*), los receptores de dopamina (DR, por sus siglas en inglés *dopamine receptor*) y receptores de GABA ($GABA_B$, por sus en inglés *γ -aminobutyric acid B receptor*). Estas son modulaciones a largo plazo e independientes del nivel de actividad neuronal (Gray *et al.*, 2007). Varios de estos receptores reducen la densidad en superficie de Ca_v por internalización del canal o co-internalización del complejo GPCR- Ca_v . El ORL1 reduce la densidad del Ca_v en la membrana plasmática luego de largas exposiciones a su agonista y dicho proceso implica un tráfico incrementado hacia los endosomas tempranos o hacia los lisosomas (Altier *et al.*, 2006). La remoción de los Ca_v de la membrana plasmática no parece ser un mecanismo en el que participa la actividad constitutiva de GHSR dado que en nuestros experimentos de imágenes no observamos un incremento de la localización subcelular del complejo canal en el sistema de endosomas. Por otro lado, así como lo reportado para GHSR, otros GPCRs regulan la actividad de los Ca_v y su densidad en superficie de manera independiente de la presencia de su agonista. En este sentido, ORL1 ejerce una modulación negativa sobre la actividad del canal $Ca_v2.2$ en ausencia de nociceptina, formando un complejo ORL1- $Ca_v2.2$ (Beedle *et al.*, 2004). Además, los receptores de dopamina D1R y D2R interactúan directamente con el canal $Ca_v2.2$ para incrementar los niveles de expresión en superficie celular en condiciones basales, mientras que al ser activados por dopamina, el complejo $Ca_v2.2$ -DR co-internaliza (Kisilevsky *et al.*, 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008). Estos reportes muestran que los GPCRs son capaces de impactar en el tráfico de los canales por interacción directa. En el caso de GHSR, el hecho de que la actividad constitutiva dependa de la cantidad de receptor expresada (Lopez Soto *et al.*, 2015), y que dependa de la cantidad de subunidad auxiliar $Ca_v\beta$, abre la posibilidad de que la inhibición crónica en el tráfico de los Ca_v requiera de una interacción directa entre el GPCR y el canal. En ese sentido, nuestro experimento de tráfico de GHSR-YFP, demostraría indirectamente la factibilidad del mecanismo, dado que

su expresión en membrana plasmática en concomitancia con su aumento en el retículo endoplásmico, sólo se observa en presencia de la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$, fenómeno que no se visualiza al realizar el ensayo con la versión carente de actividad constitutiva de GHSR (GHSR-A204E). Asimismo nuestros experimentos usando combinaciones de GHSR1a y A204E o de GHSR1a y GHSR1b, sugerirían que forzar la retención de GHSR1a en el retículo endoplásmico, a través de la formación de dímeros GHSR-A204E o GHSR-GHSR1b, retiene el complejo canal y de ese modo reduce la localización en superficie y en consecuencia la corriente macroscópica.

En este trabajo hemos demostrado que la actividad constitutiva de GHSR reduce el tráfico de Ca_v hacia la superficie celular de manera dependiente de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$. De hecho, la relación molar $Ca_v\beta/Ca_v\alpha_1$ determina el grado de regulación negativa que ejerce la actividad constitutiva de GHSR al menos sobre las corrientes macroscópicas mediadas por los $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. La dependencia del efecto con la estequiometría de las subunidades sugiere que su interacción es necesaria para observar el efecto inhibitorio de GHSR. Consistente con esto, demostramos que la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$ debe estar presente en la célula para que la actividad constitutiva de GHSR modifique la sublocalización celular de $Ca_v\beta$ -GFP. Por otro lado, encontramos que la interacción entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$ mediada por el aminoácido W391 en la región AID de $Ca_v\alpha_1$ no sería requerida para el efecto inhibitorio de GHSR. En relación a esta interacción existen estudios donde se sintetizaron diferentes compuestos con el objetivo de impedir la interacción entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$. El grupo de Minor diseñó un péptido conteniendo un residuo m-xililo que logra incrementar la formación de α hélice del dominio AID de la $Ca_v\alpha_1$, generando estructuralmente una interacción compatible a la nativa AID- $Ca_v\beta$. A través de estudios estructurales y electrofisiológicos estos autores demuestran que ese péptido puede funcionar como antagonista de la interacción nativa entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$ modulando la función del Ca_v . Dicho efecto es selectivo a la isoforma de $Ca_v\beta$ siendo afectada la interacción de $Ca_v\alpha_1$ con la subunidad citosólica $Ca_v\beta_3$ y no siendo afectada la misma interacción pero con la subunidad anclada a la membrana $Ca_v\beta_{2a}$ (Findeisen *et al.*, 2017). Recientemente, Chefdeville y colaboradores demostraron que un análogo sintético de quinazolina se une específicamente a $Ca_v\beta$, inhibiendo selectivamente la interacción proteica entre $Ca_v\beta_2$ y AID del subtipo $Ca_v2.2$ e inhibe su función en neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal. Asimismo esta droga inhibe la localización presináptica de $Ca_v2.2$ *in vivo* e inhibe la neurotransmisión espinal. Finalmente, el compuesto resultó ser anti-nociceptivo en ratas *naive* e invirtió la alodinia mecánica e hiperalgesia térmica en modelos de roedores de dolor

agudo y neuropático (Khanna *et al.*, 2019). Este estudio incrementa la relevancia de la interacción entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$ en diferentes sistemas fisiológicos. En el mismo sentido, Dolphin y colaboradores han demostrado que resulta inadmisibles sobreexpresar en sistemas nativos la subunidad $Ca_v\alpha_1$ en ausencia de $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_2\delta$ bajo el supuesto que dichas subunidades endógenas estarían en exceso y podrían formar un complejo activo con la subunidad principal sobreexpresada. Asimismo, demuestran que existen determinantes aminoácidos en el filtro de selectividad del poro que están implicados en el correcto tráfico hacia la membrana plasmática del complejo canal (Meyer *et al.*, 2019). En este escenario, un ensayo interesante a realizar sería utilizar alguno de estos compuestos que interrumpen la interacción entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$ en células que coexpresan GHSR y evaluar si el efecto de la actividad constitutiva sobre los Ca_v se modifica. En este contexto consideramos que nuestro estudio sobre el mecanismo de acción de la actividad constitutiva de GHSR contribuye a entender la regulación del tráfico de los Ca_v .

En esta tesis, hemos demostrado que, de manera similar a la actividad constitutiva de GHSR, la actividad evocada por ghrelina inhibe la corriente macroscópica mediada por $Ca_v2.2$ en forma dependiente de la presencia de $Ca_v\beta$. En este sentido, y como desarrollamos en la introducción, se ha demostrado que la inhibición del mismo subtipo de canal desencadenada por la activación del receptor de dopamina tipo D2R es menor en aquellas células que no expresan la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ y que dicha inhibición es totalmente independiente del voltaje (Meir *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta que encontramos que la inhibición crónica de los Ca_v por la actividad constitutiva de GHSR se basa en la retención del complejo canal en el retículo endoplásmico, mientras que observamos una leve disminución en la proporción de canales localizados en el aparato de Golgi (sólo para $Ca_v\beta_{2a}$), postulamos que $Ca_v\beta$ actúa como un inhibidor del tráfico hacia la membrana plasmática cuando GHSR se encuentra activo, a pesar del establecido rol como estimulador de dicho tráfico para esta subunidad auxiliar. En esta dirección, estudios previos han demostrado que $Ca_v\beta$ controla el tráfico hacia la membrana plasmática de los Ca_v (Simms & Zamponi, 2012) al prevenir la ubiquitinación del canal y su posterior degradación por el proteasoma al enmascarar un dominio de retención en el retículo endoplásmico presente en la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$ (Altier *et al.*, 2011; Fang & Colecraft, 2011) o quizás exponer un sitio de exportación hacia la membrana plasmática. No obstante, varios reportes sugieren una función putativa dual para $Ca_v\beta$, tanto como estimulante del tráfico hacia la membrana plasmática como mediadora del tráfico hacia endosomas. El grupo de Hidalgo ha postulado un mecanismo donde dímeros de

$Ca_v\beta$ interactúan con dinamina y quizás pequeñas GTPasas estimulando la endocitosis del complejo canal (Gonzalez-Gutierrez *et al.*, 2007; Miranda-Laferte *et al.*, 2011). En relación a ello, nosotros encontramos que dos pequeñas GTPasas, Rab11b y RhoA, no estarían involucradas en el mecanismo a través del cual actúa la actividad constitutiva de GHSR, apoyando la idea de que el proceso de internalización no estaría implicado en dicho efecto. Si los canales Ca_v son retenidos en compartimentos intracelulares, una pregunta abierta es ¿cuál es el destino de estas proteínas? Existen diferentes estudios demostrando que la reducción en el tráfico hacia la membrana plasmática es seguida por un incremento en la degradación por el proteasoma (Altier *et al.*, 2011; Waithe *et al.*, 2011; Marangoudakis *et al.*, 2012). Interesantemente, ha sido mostrado que la subunidad $Ca_v\beta$ es necesaria para incrementar la degradación de los canales por el proteasoma y lisosomas mediada por las proteínas NeDD4-1 (Rougier *et al.*, 2011). Una diferencia clave entre las observaciones de Rougier y nuestros hallazgos es que ellos no observaron una modulación de los canales Ca_v3 , aun en presencia de $Ca_v\beta$, indicando que mecanismos diferentes gobernarían ambos procesos. En relación a NeDD4, recientemente Morgenstern y colaboradores han diseñado un inhibidor recombinante en base a dicha proteína partiendo de la interacción entre $Ca_v\beta$ y NeDD4 reportada previamente. Con dicho inhibidor han logrado impedir la interacción física entre las subunidades $Ca_v\alpha_1$ de los HVA en forma selectiva y consecuentemente la funcionalidad de dichos canales (Morgenstern *et al.*, 2019). Nuevos experimentos son necesarios para concluir acerca de los efectores moleculares que median el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre el tráfico de los Ca_v .

Nuestro grupo de laboratorio previamente demostró que la actividad constitutiva de GHSR reduce la expresión en superficie de Ca_v2 (Lopez Soto *et al.*, 2015). En este nuevo trabajo, extendimos nuestro estudio hacia otros subtipos de Ca_v para demostrar que la inhibición crónica mediada por GHSR se extiende a todos los subtipos, incluyendo los canales neuronales Ca_v1 . Estos canales controlan la transcripción mediada por calcio mediante el acoplamiento de cambios en el voltaje con el influjo de calcio en dendritas y somas neuronales (Dolmetsch *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001). Al menos dos mecanismos relacionan los $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ con la activación de factores de transcripción tales como CREB (del inglés *cAMP response element-binding*): la entrada de calcio a través de los Ca_v difunde al núcleo y activa enzimas nucleares dependientes de calcio, como CaMKIV, que regulan la actividad de factores de transcripción y coreguladores (Hardingham *et al.*, 2001); y el calcio entrante activa proteínas señal dependientes de calcio en las cercanías del canal que propagan la señal al núcleo (Dolmetsch *et al.*, 2001). Asimismo, se ha propuesto, que

la región C-terminal de $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ sería capaz de translocar al núcleo, actuando como un factor de transcripción *per-se* (Gomez-Ospina *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2015). Uno de los estudios más completos acerca del efecto de la actividad de un GPCR sobre Ca_v1 muestra el incremento en la actividad del canal por la activación aguda de GPCRs acoplados a la proteína G_s (Olson *et al.*, 2005). En nuestro caso, los Ca_v1 se encuentran crónicamente inhibidos por GHSR y este efecto podría competir con el calcio liberado de compartimentos intracelulares tal como ha sido descrito para la activación de GHSR en neuronas (Cowley *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2009; Cabral *et al.*, 2012), indicando que GHSR ejercería un control fino de la dinámica del calcio, y consecuentemente, de la activación de genes dependientes de calcio.

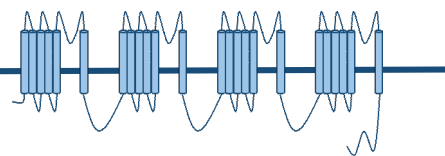
Como demostramos previamente, la actividad constitutiva de GHSR puede disminuir las corrientes macroscópicas mediadas por $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. En neuronas, los Ca_v3 controlan la forma y la frecuencia de los potenciales de acción (Perez-Reyes, 2003b; Zhang *et al.*, 2013) y cambios en su actividad debido a variantes de *splicing* (Latour *et al.*, 2004; Murbartian *et al.*, 2004) o mutaciones sin sentido (Powell *et al.*, 2009) son responsables de estados patológicos tales como epilepsia (Hamed, 2008). Sin embargo, el mecanismo a través del cual se regula el tráfico y la estabilidad en la membrana plasmática de los Ca_v3 no ha sido bien caracterizado (Zhang *et al.*, 2013). Se sabe, por ejemplo, que la regulación por cambios hormonales en la epilepsia puede alterar la expresión de $Ca_v3.1$ (Qiu *et al.*, 2006). Nuestros datos sugieren que neuronas que expresen niveles importantes de GHSR podrían modular negativamente los Ca_v3 . Una observación crucial es el hecho de que la presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$, pero no de $Ca_v\alpha_2\delta$, es necesaria para observar el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR. En este sentido, la interacción de $Ca_v\alpha_2\delta$ con Ca_v3 es discutida, de hecho, recientemente se ha reportado la existencia de una proteína análoga a $Ca_v\alpha_2\delta$ que ejercería una modulación sobre el subtipo de Ca_v3 . Cottrell y colaboradores han informado que la proteína CACHD1 (del inglés *cache (Ca²⁺ channel and chemotaxis receptor) domain containing 1*) se expresa en el sistema nervioso central, en particular en tálamo, hipocampo y cerebelo, con una distribución tisular similar a la de los Ca_v3 . Además, en estudios electrofisiológicos funcionales la coexpresión de CACHD1 con $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ aumentó la densidad de corriente, mientras que en neuronas del hipocampo la sobreexpresión de CACHD1 aumentó la frecuencia de disparo de potenciales de acción mediada por Ca_v3 (Cottrell *et al.*, 2018). Si bien en esta tesis no encontramos un efecto de GHSR dependiente de $Ca_v\alpha_2\delta$, sería interesante ensayar si la coexpresión de CACHD1 es capaz de modular el efecto de la actividad constitutiva de

GHSR sobre las corrientes Ca_v3 . Por otro lado, la interacción entre $Ca_v\beta$ y Ca_v3 tampoco está claramente establecida. Algunos reportes sugieren esta interacción mostrando que la corriente Ca_v3 se ve incrementada por la coexpresión de $Ca_v\beta$ (Dolphin *et al.*, 1999; Dubel *et al.*, 2004) y proponen la presencia de una secuencia conservada en la región AID en los Ca_v3 y en los Ca_v1 y Ca_v2 (Dolphin, 2003a). En oposición, otros estudios fallaron en demostrar el impacto directo de $Ca_v\beta$ en los niveles de corriente de Ca_v3 (Leuranguer *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2010). Nuestros resultados indicarían que la subunidad $Ca_v\beta$ es requerida para la modulación negativa del tráfico de los Ca_v3 por la actividad constitutiva de un GPCR, revelando un nuevo rol funcional para la subunidad $Ca_v\beta$.

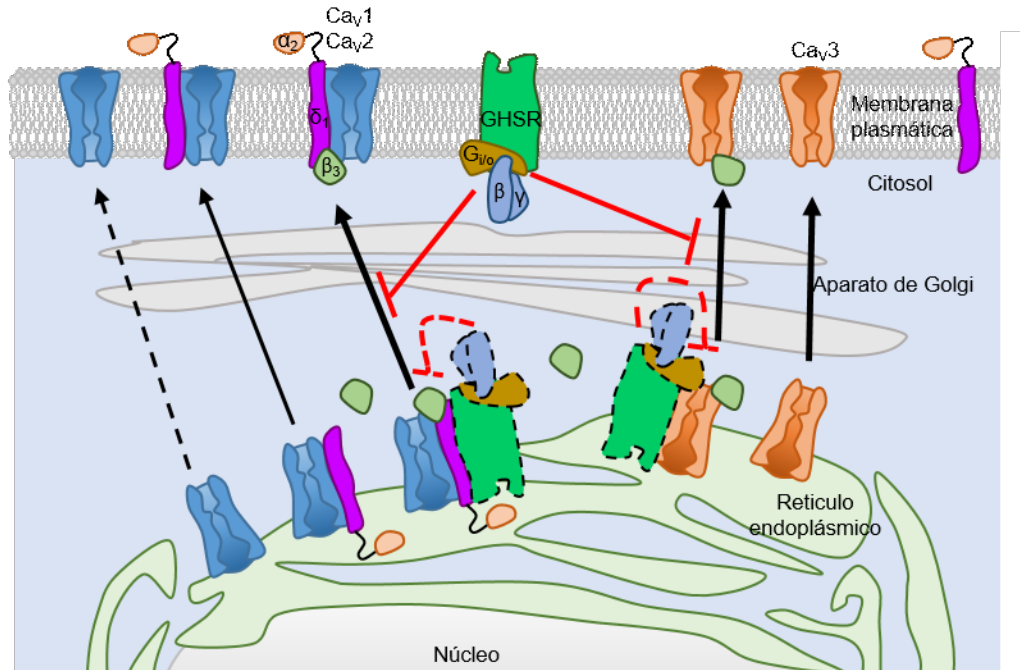
La expresión diferencial y variable de GHSR en diferentes regiones del cerebro podría constituir una forma de regular su actividad constitutiva, y de acuerdo a nuestros datos la expresión diferencial de $Ca_v\beta$ también sería determinante en el impacto de dicha actividad en las neuronas. Además, recientemente se ha propuesto una nueva forma de regular esta actividad con el descubrimiento del agonista inverso endógeno para GHSR: LEAP2 (de sus siglas en inglés *liver expressed antimicrobial peptide 2*) (Schalla & Stengel, 2019). En este sentido, se ha demostrado inicialmente que la secreción de este péptido, sintetizado en el hígado y el intestino delgado, es suprimida en el ayuno. LEAP2 funcionaría como antagonista al inhibir la activación de GHSR por ghrelina y bloquear los principales efectos de la ghrelina *in vivo* como la ingesta de alimentos, la liberación de hormona de crecimiento y el mantenimiento de niveles de glucosa viables durante la restricción calórica crónica (Ge *et al.*, 2018). Posteriormente, M'Kadmi y colaboradores demostraron que la secuencia completa de LEAP2 no es necesaria para sus acciones. De hecho, sólo la porción N-terminal confiere unión y actividad del receptor. Además estos autores observan que tanto LEAP2 como su porción N-terminal se comportan como agonistas inversos y antagonistas competitivos de GHSR al ensayar la producción de fosfato de inositol y la movilización de calcio inducida por ghrelina. Finalmente demostraron que la región N-terminal de LEAP2 puede inhibir la ingesta de alimentos inducida por ghrelina en ratones (M'Kadmi *et al.*, 2019). Nosotros recientemente hemos participado en la caracterización de una versión fluorescente de LEAP2 (F-LEAP2), donde demostramos que la internalización de GHSR reportada por la unión prolongada a ghrelina, no se observa al utilizar F-LEAP2, indicando una modulación diferencial del ligando sobre GHSR (Barrile *et al.*, 2019). Así, varios de nuestros resultados que se basan en el uso de SPA, un agonista inverso de GHSR con acciones inespecíficas *in vivo*, podrían ser ensayados en el futuro con LEAP2 para determinar si este péptido es capaz de funcionar reduciendo el efecto inhibitorio de las corrientes Ca_v por la actividad

constitutiva de GHSR, ampliando la capacidad de ensayos *in vivo* en el marco de este proyecto.

Conclusiones I



Nuestros resultados nos permiten concluir que la actividad constitutiva de GHSR se extiende a otros subtipos de Ca_v además de los presinápticos ($Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$), como son los Ca_v1 y Ca_v3 , con la única condición de que la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ forme parte del complejo canal. La densidad en membrana plasmática de dichos complejos- Ca_v disminuiría al estar retenidos en el retículo endoplásmico y quizás en menor medida en el aparato de Golgi, descartándose en el mecanismo la internalización hacia el sistema de endosomas (esquema 1).



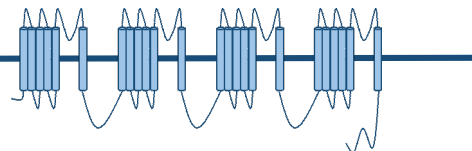
Esquema 1. Los canales de calcio Ca_v1 y Ca_v2 trafican débilmente desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática en ausencia de subunidades auxiliares. La co-expresión de las subunidades ($Ca_v\beta$ y/o $Ca_v\alpha_2\delta$) incrementa dicho tráfico estabilizando el complejo canal en la superficie celular. De manera diferente, el tráfico de los Ca_v3 hacia la membrana plasmática es independiente de la presencia de subunidades auxiliares. Nuestro mecanismo propuesto implica que la actividad constitutiva de GHSR a través de un mecanismo dependiente de la proteína $G_{i/o}$ disminuye la densidad del complejo canal (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3) en la superficie celular por retención del mismo en el retículo endoplásmico sólo si la subunidad $Ca_v\beta$ está formando parte del complejo canal. Ese mecanismo podría implicar la interacción de GHSR con el Ca_v a través de la actividad de la proteína $G_{i/o}$.

El efecto negativo de GHSR sobre el tráfico de Ca_v hacia la membrana plasmática podría involucrar la interacción directa con el propio receptor y esta unión podría a su vez depender de la activación de cascadas de señalización a través de proteína $G_{i/o}$ (esquema 1). Así para superar este efecto inhibitorio se podría pensar en mecanismos que impliquen la activación de otros GPCR que contrarresten la cascada de señalización de GHSR constitutivamente activa, la heteromerización con otro GPCR o la unión del recientemente descubierto agonista inverso endógeno, LEAP2. Este proceso globalmente llevaría a un control espacio-temporal preciso de la inserción de Ca_v en la superficie celular. Asimismo,

dado que cada subtipo de Ca_v neuronal tiene funciones fundamentales, el GHSR constitutivamente activo podría tener un gran impacto en la actividad de las neuronas que expresan GHSR. Esta nueva forma de modulación de la actividad neuronal podría ser relevante para regular la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica y la liberación de neurotransmisores dependiendo de los complejos- Ca_v formados con $Ca_v\beta$ en las neuronas que expresan GHSR.

Capítulo II: “Estudio del efecto de la actividad evocada del receptor de ghrelina (GHSR) sobre las propiedades biofísicas del subtipo Cav3”

Resultados II



De acuerdo a nuestros resultados mostrados en el capítulo I de esta tesis la actividad de GHSR evocada por ghrelina en forma aguda inhibe la corriente $Ca_v3.3$ pero no la $Ca_v3.2$ en un sistema de expresión heterólogo. Siendo que no existen bloqueadores específicos para los subtipos de Ca_v3 y que la información sobre la regulación de los mismos por GPCRs es escasa resulta interesante estudiar si ghrelina es capaz de modificar estas corrientes en neuronas del hipotálamo, un área del cerebro con abundante acceso a la hormona circulante. En este contexto, indagamos si la actividad de GHSR evocada por ghrelina modula las corrientes nativas Ca_v3 . Para ello realizamos registros de corrientes de calcio en cultivos primarios de hipotálamo de embriones de 15-17 días. Para aislar la componente T de la corriente total estimulamos con pulsos cuadrados desde un potencial de -80 mV hasta -20 mV, potencial al que esperamos encontrar los valores máximos de corrientes T en nuestras condiciones experimentales (Muller *et al.*, 1992); además nuestros registros fueron realizados en presencia o no del ion níquel (Ni^{2+} , 50 μM), catión reportado como bloqueante selectivo de las corrientes T y R en estas condiciones (Muller *et al.*, 1992; Mlinar & Enyeart, 1993; Zamponi *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). Para ensayar el efecto de ghrelina utilizamos una dosis saturante de la hormona (500 nM), dosis que además fue ensayada en estudios previos de nuestro grupo para inhibir las corrientes totales Ca_v en neuronas hipotalámicas (Pantel *et al.*, 2006; Lopez Soto *et al.*, 2015). Como se observa en la **figura 19A** encontramos que la aplicación de ghrelina inhibe las corrientes evocadas a -20 mV, y que la aplicación previa de níquel ocluye este efecto inhibitorio. Además observamos que el porcentaje de corriente sensible a níquel se reduce por la pre-aplicación de ghrelina (**figura 19B**). A continuación realizamos curvas de corriente en función de voltaje (I-V) en presencia o no de ghrelina y encontramos que el efecto inhibitorio ocurre en un amplio rango de voltajes (**figura 20**) incluyendo la componente de Ca_v activados a bajos voltajes (~ -20 mV) y la componente de Ca_v de activación a altos voltajes (~ 0 mV). La inhibición a altos voltajes concuerda con nuestros datos anteriores que muestran un efecto inhibitorio de la ghrelina sobre los canales de calcio $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en neuronas hipotalámicas (Lopez Soto *et al.*, 2015). Así, podemos concluir que, además del efecto ya reportado de ghrelina sobre las corrientes de tipo HVA (del inglés *High Voltage-activated*), las corrientes nativas evocadas a -20 mV y sensibles a níquel son susceptibles a la inhibición por la hormona.

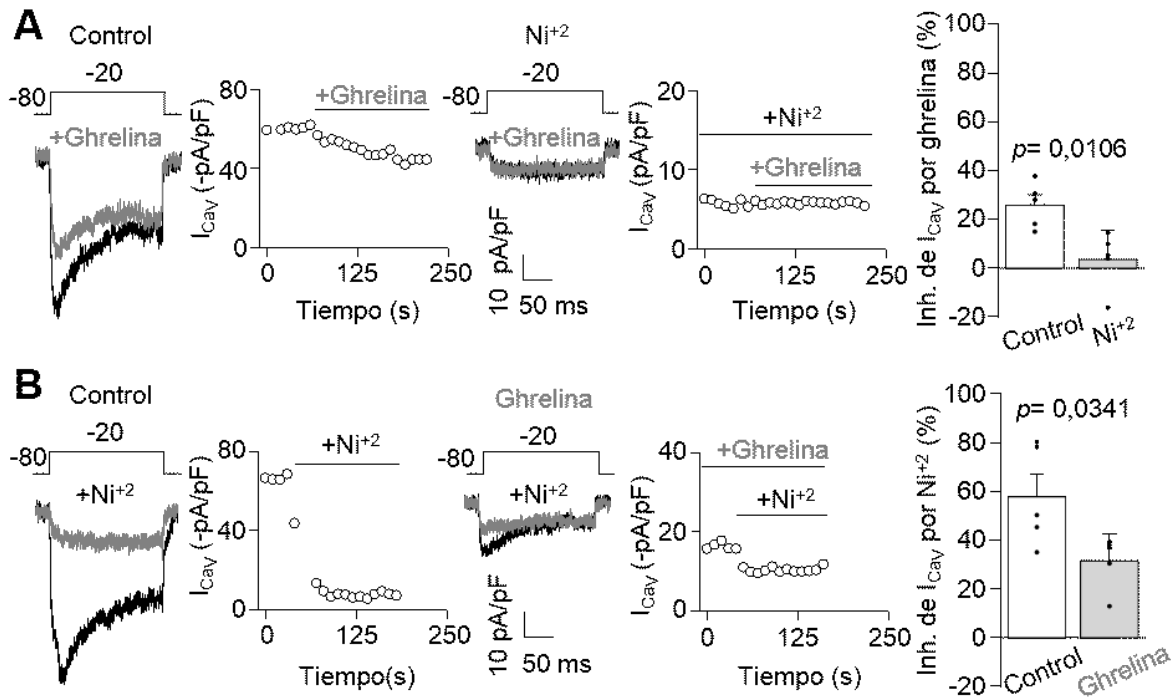


Figura 19. Ghrelina inhibe las corrientes sensibles a níquel en cultivos neuronales hipotalámicos. **A.** Trazos representativos y cursos temporales de corrientes de calcio (I_{Cav}) de neuronas en cultivo evocadas a -20 mV desde un potencial en reposo de -80 mV por 200 ms en condiciones control (Control, $n=5$) y en presencia de $NiCl_2$ (50 μM , Ni^{2+} , $n=5$), antes y después de la aplicación de ghrelina (500 nM) y el porcentaje promedio de inhibición de la I_{Cav} por ghrelina. Los puntos representan la inhibición calculada individualmente para cada neurona. **B.** Trazos representativos y cursos temporales de I_{Cav} de neuronas en cultivo evocadas a -20 mV desde un potencial en reposo de -80 mV por 200 ms en condiciones control (Control, $n=5$) y en presencia de ghrelina (500 nM, Ghrelina, $n=5$), antes y después de la aplicación de $NiCl_2$ (50 μM), y el porcentaje promedio de inhibición de la I_{Cav} por Ni^{2+} . Los puntos representan la inhibición calculada individualmente para cada neurona. Test t de Student.

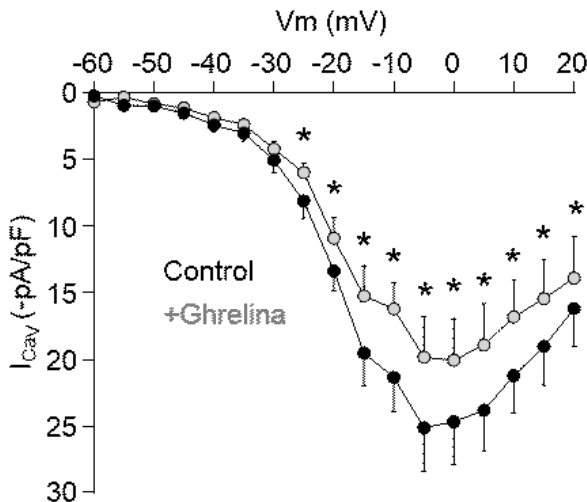


Figura 20. Ghrelina inhibe las corrientes sensibles a níquel en cultivos neuronales hipotalámicos en un amplio rango de potenciales de membrana. Relación entre la corriente promedio de calcio (I_{Cav}) y el voltaje (I-V) en ausencia y presencia de ghrelina (500 nM). El potencial de reposo fue de -80 mV. Los asteriscos representan diferencias estadísticas con $p < 0,05$ ($n = 12$). Test t de Student pareado.

Nuestros experimentos demuestran que las corrientes T nativas son sensibles a ghrelina. Dado que estas corrientes pueden tener contribuciones diferenciales de los tres subtipos ($Ca_v3.1-3$) decidimos investigar la sensibilidad particular de cada uno de manera

aislada en un sistema de expresión heterólogo. Si bien contábamos con datos preliminares presentados en el capítulo I, en este punto quisimos confirmar nuestros resultados y además extender el estudio al subtipo $Ca_v3.1$. Para ello, realizamos coexpresiones de los tres clones que codifican para los subtipos de Ca_v3 junto con el clon de GHSR en células HEK293T. Hallamos que sólo la corriente macroscópica mediada por $Ca_v3.3$ fue sensible a la inhibición por aplicación aguda de 500 nM de ghrelina, sin observar este efecto en las corrientes macroscópicas mediadas por $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$. La **figura 21** muestra trazos representativos de corrientes y los cursos temporales del experimento así como el porcentaje de inhibición al pico de corriente para los tres subtipos de Ca_v3 . En los trazos puede apreciarse que las corrientes con una cinética de activación e inactivación más rápidas (mediadas por $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$) no fueron sensibles a la aplicación de la hormona, mientras que la corriente lenta en su cinética de activación e inactivación ($Ca_v3.3$) si lo fue.

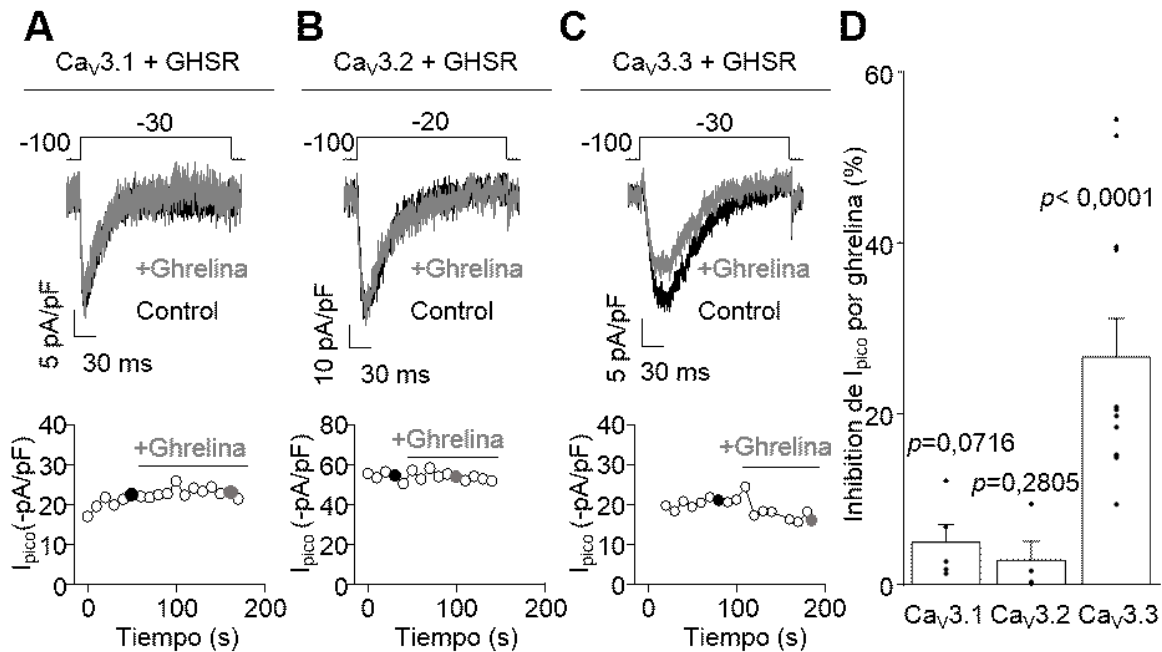


Figure 21. Ghrelina inhibe las corrientes mediadas por $Ca_v3.3$ pero no las mediadas por $Ca_v3.1$ ni $Ca_v3.2$. A-C. Trazos representativos y cursos temporales de niveles de corriente de calcio en células HEK293T cotransfectadas con GHSR y $Ca_v3.1$ (A, $n=5$), $Ca_v3.2$ (B, $n=4$) o $Ca_v3.3$ (C, $n=12$) evocadas a -20 mV o -30 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV por 200 ms en ausencia y presencia de ghrelina (500 nM) y valores promedio del porcentaje de inhibición de la corriente al pico (I_{pico}) por ghrelina. Los puntos individuales representan el porcentaje calculado para cada célula. Test *t* de Student versus cero.

Con el objetivo de descartar un posible efecto directo de ghrelina sobre el canal $Ca_v3.3$, independiente de la activación de GHSR, ensayamos el efecto de ghrelina sobre células HEK293T que sólo expresaban $Ca_v3.3$ y no observamos inhibición de la corriente (inhibición de I_{pico} por ghrelina = $3,3 \pm 2,0$ %, $n=4$, $p=0,1953$, test *t* de Student versus cero).

A continuación realizamos una curva dosis-respuesta para el efecto inhibitorio de la activación de GHSR por ghrelina sobre la corriente $Ca_v3.3$ y estimamos un valor de EC_{50} de $346,1 \pm 1,2$ nM y un máximo de inhibición de $32,5 \pm 3,9$ % (**figura 22**) a través del ajuste de los datos con la ecuación de Hill (ver ecuación 5 en materiales y métodos). Con este conjunto de experimentos demostramos que el efecto de ghrelina es específico para el subtipo $Ca_v3.3$, es mediado por la activación de GHSR y depende de la dosis de ghrelina ensayada.

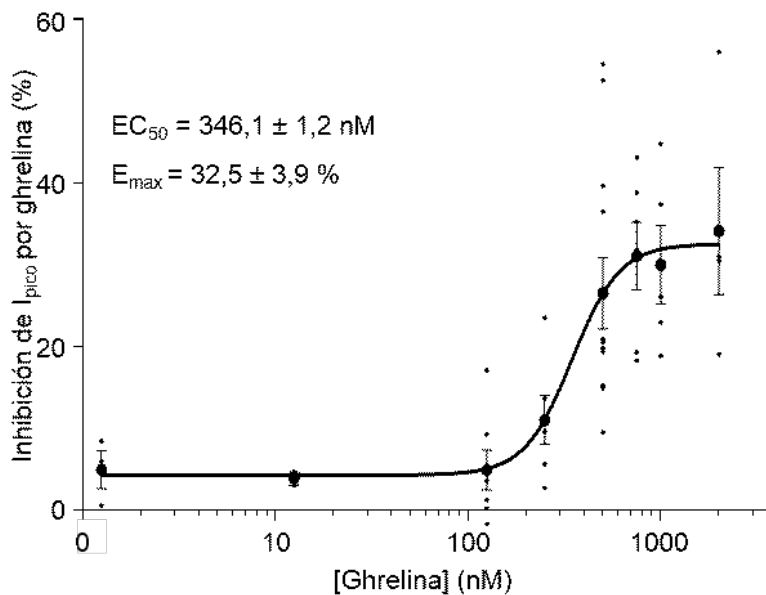


Figure 22. Ghrelina inhibe las corrientes mediadas por $Ca_v3.3$ de manera dependiente de la concentración. Curva concentración de ghrelina – inhibición de la corriente mediada por $Ca_v3.3$ en células HEK293T coexpresando el canal y GHSR. Los círculos negros representan la inhibición promedio \pm SEM, los puntos individuales las inhibiciones de células individuales a cada concentración ensayada y la línea representa el ajuste con la ecuación de Hill ($r^2 = 0,54$), ($n=22$).

Posteriormente investigamos la cascada de señalización intracelular implicada en el efecto inhibitorio de ghrelina sobre $Ca_v3.3$. Teniendo presente que GHSR está principalmente acoplado a la proteína G_q , ensayamos el efecto de ghrelina en dos condiciones donde la actividad G_q se encuentra inhibida: en células HEK293T coexpresando un péptido dominante negativo de G_q (G_q DN) y en células HEK293T coexpresando un péptido antagonista de G_q y G_s (RGS2) (Heximer *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2006). Asimismo, estudiamos la posible participación de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ incorporando un péptido que actúa como *buffer* de $G_{\beta\gamma}$ secuestrando la proteína endógena (Mas-GRK2-ct) (Kammermeier & Ikeda, 1999; Raingo *et al.*, 2007). Como puede verse en la **figura 23** el efecto inhibitorio de ghrelina a través de GHSR sobre la corriente $Ca_v3.3$ fue ocluido en las condiciones en las que la proteína G_q no podía activar la cascada intracelular de señalización, mientras que la subunidad $G_{\beta\gamma}$ no se requiere para este efecto.

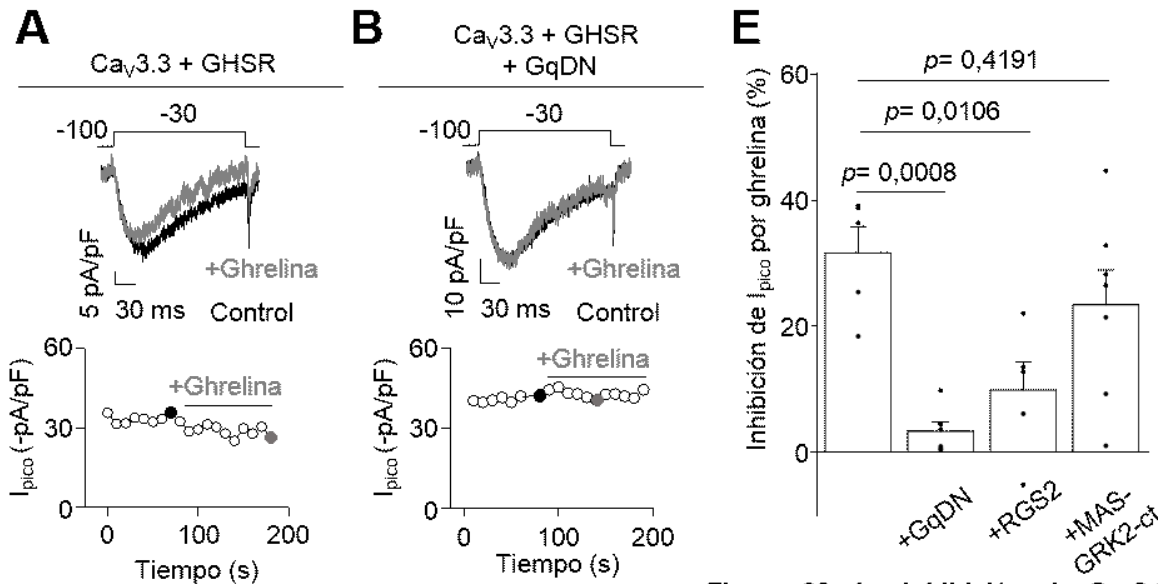


Figure 23. La inhibición de $Ca_v3.3$ por ghrelina está acoplada a la proteína G_q pero no depende de $G_{\beta\gamma}$. A-D. Trazos representativos y cursos temporales de niveles de corriente de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$, GHSR y plásmido vacío (A, $n=5$), o G_q DN (B, $n=6$), o RGS2 (C, $n=5$), o MAS-GRK2-ct (D, $n=7$) evocadas a -30 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV por 200 ms en ausencia y presencia de ghrelina (500 nM) y valores promedio del porcentaje de inhibición de la corriente al pico (I_{pico}) por ghrelina (E). Los puntos individuales representan el porcentaje calculado para cada célula. ANOVA de una vía y post test de Dunnett.

Seguidamente estudiamos que parámetros biofísicos de la corriente $Ca_v3.3$ se modifican por la aplicación de ghrelina. Como primer paso indagamos si variaba la dependencia de la corriente con el voltaje, para esto generamos curvas de corriente-voltaje (I-V) en presencia y en ausencia de ghrelina en células HEK293T coexpresando $Ca_v3.3$ y GHSR, y encontramos que ghrelina inhibe la corriente $Ca_v3.3$ en el rango de voltajes entre -30 y $+20$ mV (**figura 24A**). A continuación ajustamos las curvas I-V con una ecuación Boltzmann-lineal (ver ecuación 6 presentada en la **figura 24A** y en materiales y métodos) y observamos un pequeño pero significativo desplazamiento hacia potenciales hiperpolarizados en la activación. Esto se ve reflejado en las curvas I-V normalizadas al máximo de corriente al pico

(figura 24A panel derecho), y en las diferencias significativas en el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$).

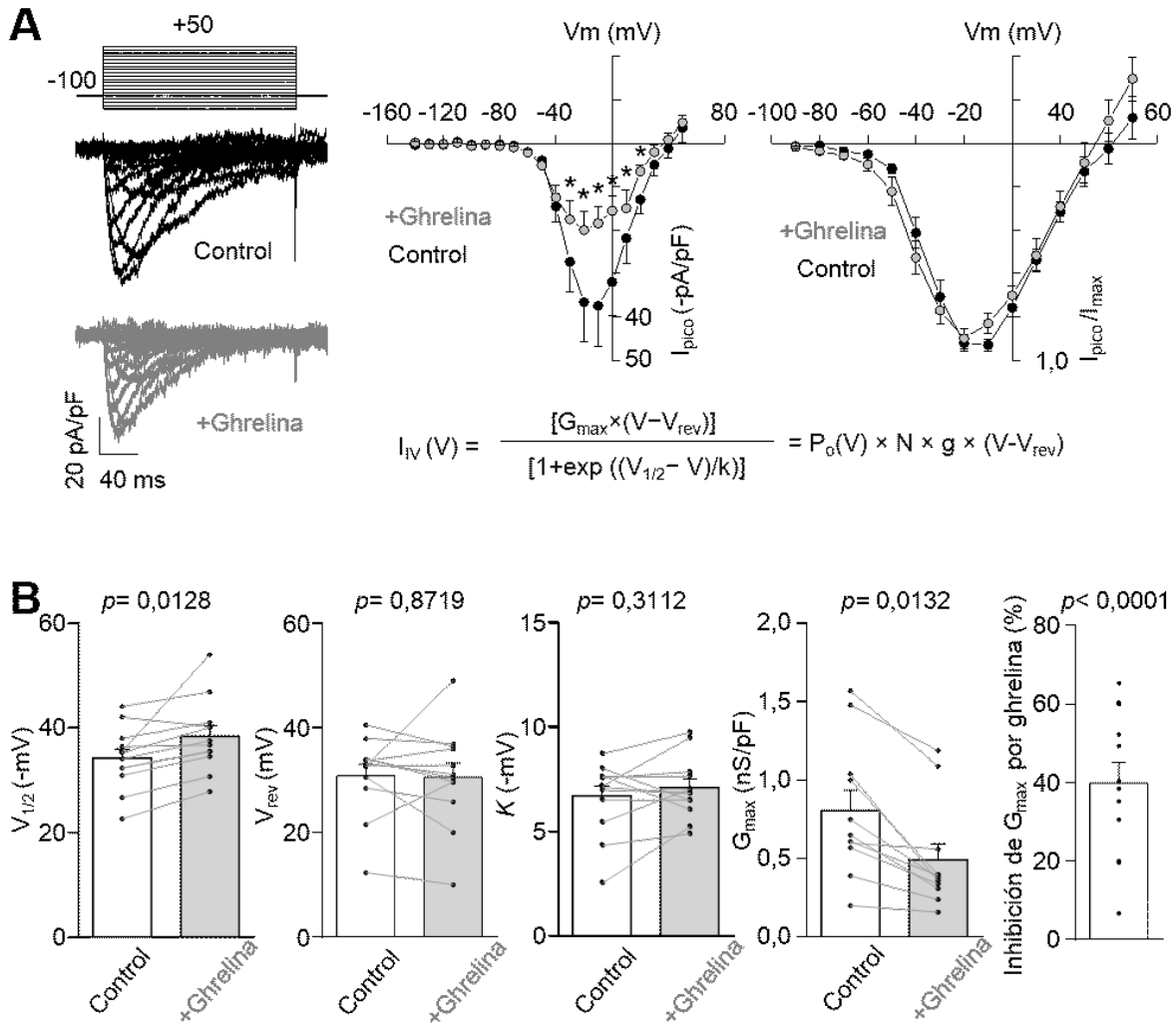


Figura 24. Ghrelin incrementa el $V_{1/2}$ de activación y disminuye la G_{max} de Cav3.3. **A.** Trazos representativos de corriente de células HEK293T cotransfectadas con GHSR y Cav3.3 evocadas a potenciales variables desde -140 mV hasta +50 mV desde un potencial de reposo de -100 mV por 200 ms en ausencia y presencia de ghrelin (500 nM). Relación entre la corriente promedio de Cav3.3 al pico y el voltaje (I-V) (izquierda) y relación I-V de la corriente normalizada al máximo de corriente (derecha). Los asteriscos representan diferencias estadísticas con $p < 0,05$ ($n=12$). Test t de Student pareado. La ecuación describe la función lineal de Boltzmann y la relación teórica I-V. **B.** Valores promedio de voltaje medio de activación ($V_{1/2}$) y de voltaje de reversión (V_{rev}), constante de activación (K) y conductancia máxima (G_{max}) obtenidos en condiciones control y con la aplicación de ghrelin (500 nM). Los puntos y líneas representaron células individuales ($n=12$). Test t de Student pareado. La barra de la derecha representa el porcentaje de inhibición promedio de G_{max} por ghrelin 500 nM, y los puntos representan la inhibición calculada para células individuales. Test t de versus cero.

Por otro lado, no observamos cambios en la constante de activación (K) ni en el potencial de reversión (V_{rev}) (figura 24B). El $V_{1/2}$ representa el potencial al cual se observa la mitad de la máxima amplitud de corriente que puede alcanzar Cav3.3, la constante de activación (K) representa la pendiente de la activación de la curva I-V mientras que V_{rev}

representa el potencial al cual la corriente neta es cero. Sumado a estos resultados, hallamos que ghrelina reduce en un 40 % el valor de la conductancia máxima del canal (G_{max}) que se obtiene de la pendiente de la zona lineal de la curva I-V (**figura 24B**).

La disminución de la corriente macroscópica por ghrelina podría tener su origen en cambios en el número de canales disponibles para abrirse (N), en la conductancia de canal único (g), y/o en la probabilidad de apertura del canal (P_o) (ver ecuación presentada en la **figura 25A**). En este sentido, ensayamos el efecto de ghrelina sobre la probabilidad de apertura de $Ca_v3.3$, realizando curvas de corriente instantánea versus voltaje (I_{inst} -V) utilizando un protocolo similar al empleado para la obtención de la curva I-V con el agregado de un prepulso despolarizante a +60 mV, voltaje al cual estimulamos la apertura de la totalidad de canales disponibles expresados en la membrana celular (**figura 25A**). Luego dividimos la curva I-V obtenida inicialmente por la curva I_{inst} -V, para cada célula en presencia o ausencia de ghrelina, obteniendo de ese modo la relación P_o/P_{omax} versus voltaje mostrada en la **figura 25B** y ajustamos los valores obtenidos con la función de Boltzman (ver ecuación 1 en materiales y métodos).

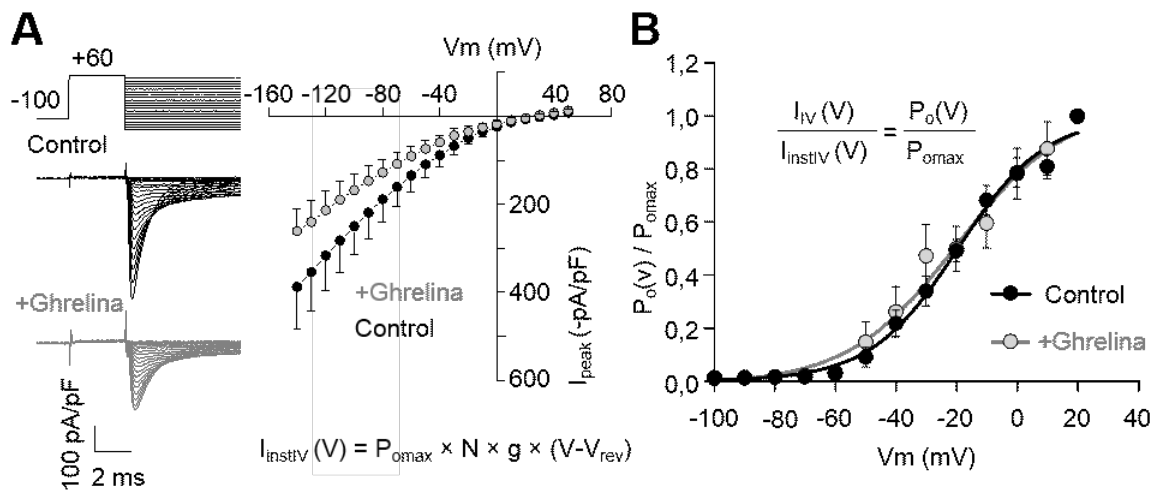


Figura 25. Ghrelina no modifica la probabilidad de apertura dependiente del voltaje. A. Trazos representativos de la corriente de cola de las células HEK293T transfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR evocadas por el prepulso a +60 mV a potenciales de repolarización variables desde un potencial de reposo de -100 mV en condición control y con la aplicación de ghrelina (500 nM) y valores promedio de la corriente al pico (relación I-V instantánea, $n=5$). La ecuación describe la curva I-V instantánea teórica. **B.** Relación promedio de la P_o/P_{omax} en función del voltaje. La línea representa la función Boltzmann ajustada en una condición control y con la aplicación de ghrelina (500 nM). ($n=5$). Extra sum-of-square F test. ($F=0,5859$, ($DFn=4$, $DFd=211$)), $p=0,6717$.

Como puede observarse las curvas fueron iguales en ambas condiciones, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, ghrelina no modificaría la componente P_o/P_{omax} de la corriente, aunque no podemos excluir un efecto putativo de ghrelina sobre la P_{omax} con este abordaje. Los datos presentados hasta aquí nos permiten proponer

que ghrelina disminuye el valor de N y/o de g, cambios que pueden ser interpretados como una corriente de amplitud menor en presencia de ghrelina, sin cambios en la dependencia del voltaje de la probabilidad de apertura del canal.

Siendo que $Ca_v3.3$ se diferencia de los otros dos subtipos de Ca_v3 ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$) por poseer cinéticas de activación e inactivación de la corriente más lentas, consideramos que sería importante examinar el curso temporal del efecto de ghrelina sobre esta corriente T cinéticamente distinta. Como un primer paso monitoreamos la inhibición durante los 200 ms de duración del pulso despolarizante a -30 mV.

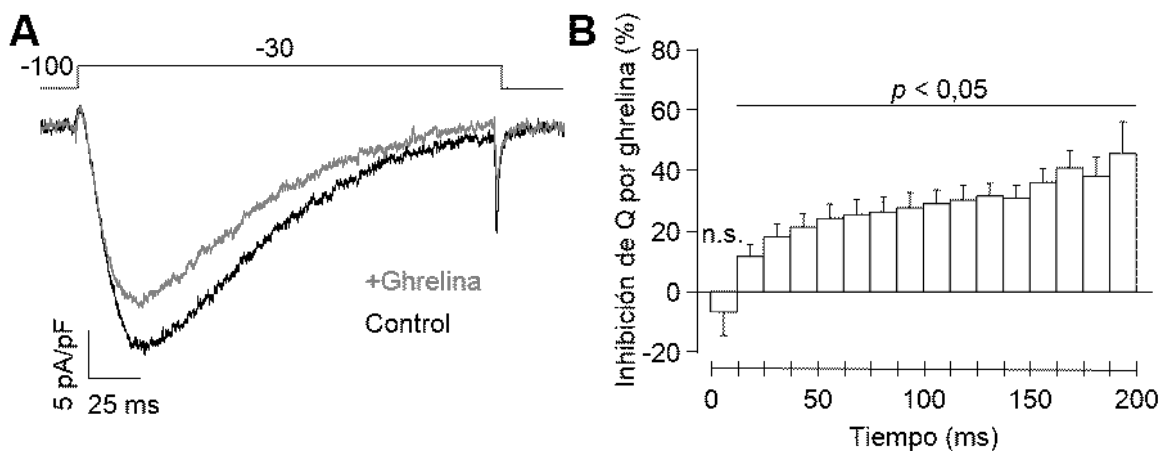


Figure 26. La inhibición de $Ca_v3.3$ por ghrelina persiste durante la fase de inactivación. **A.** Trazos representativos de corriente de células HEK293T cotransfectadas con GHSR y $Ca_v3.3$ evocada a -30 mV desde un potencial de reposo de -100 mV por 200 ms en ausencia y presencia de ghrelina (500 nM). **B.** Las barras representan el porcentaje promedio de inhibición de la carga de calcio desplazada (Q) por ghrelina calculado en 16 intervalos consecutivos de 12,5 ms. (n=9). Test t de Student versus cero. n.s = no significativo.

La **figura 26** muestra un ejemplo representativo de corriente macroscópica $Ca_v3.3$ en presencia o no de ghrelina y el porcentaje promedio de inhibición de la carga desplazada, calculada como el área en 16 intervalos de 12,5 ms para 9 células. Aquí observamos que la inhibición por ghrelina es significativa a partir del segundo intervalo que contiene el pico de corriente, luego aumenta y persiste durante la fase de inactivación, mientras que no se observa inhibición significativa en el primer intervalo, que corresponde principalmente a la fase de activación de la corriente. De esta manera postulamos que ghrelina podría actuar sobre la corriente $Ca_v3.3$ modulando la cinética de activación y/o inactivación. Analizamos entonces las constantes temporales (Tau) de estos dos procesos. Para ello, la fase inicial de los trazos de corriente a cada voltaje en curvas I-V se ajustaron con una ecuación exponencial simple (ver ecuaciones 7 y 8 en materiales y métodos) y las Tau obtenidas se graficaron en función del voltaje en ausencia y presencia de ghrelina (**figura 27**). Así obtuvimos la curva de las Tau de activación en función del voltaje y observamos que las

mismas disminuyen por aplicación de ghrelina en el rango de voltajes entre -40 y -10 mV, fenómeno que puede relacionarse con la falta de inhibición en Q observada para el primer intervalo en la **figura 26**. Un tratamiento similar para la segunda fase de los trazos se realizó a fin de obtener las Tau de inactivación en ausencia y presencia de la hormona ghrelina (**figura 28**). Encontramos que estas Tau son reducidas por la aplicación de ghrelina en el rango de potenciales entre -40 mV y -20 mV. Este dato implica una aceleración de la inactivación de la corriente macroscópica de $Ca_v3.3$ que podría contribuir a la mayor inhibición de la carga desplazada en los intervalos mas tardíos de la figura 26.

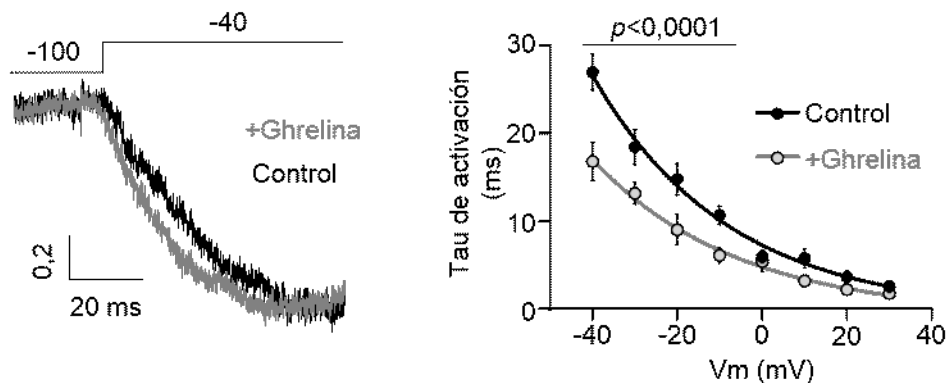


Figura 27. Ghrelina acelera la cinética de activación de la corriente $Ca_v3.3$. **A.** Trazos truncados representativos normalizados de corriente de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR evocadas a -40 mV desde un potencial de reposo de -100 mV a 200 ms en condiciones control y con la aplicación de ghrelina (500 nM). **B.** Constante temporal (tau) media de activación en función del voltaje. ($n = 7$). Extra sum-of-square F test, ($F = 18,44$, ($DFn = 3$, $DFd = 90$)), $p < 0,0001$. Test t de Student pareado en cada potencial. Los puntos son las constantes temporales promedio obtenidas de ajustes exponenciales simples para cada trazo de corriente.

Varios reportes han sugerido que los procesos cinéticos de activación e inactivación de la corriente de los canales tipo T son procesos acoplados (Talavera & Nilius, 2006; Karmazanova *et al.*, 2010). Como consecuencia de ese fenómeno, los cambios macroscópicos en la cinética de inactivación podrían ser consecuencia de modificaciones ocasionadas por ghrelina en el proceso cinético inicial de activación. Para evaluar cambios en la relación entre activación-inactivación realizamos un análisis de correlación de las Tau de ambos procesos. Para ello, graficamos las Tau de activación versus las Tau de inactivación para células individuales obtenidas en el rango de potenciales desde -40 a 0 mV en ausencia y en presencia de ghrelina. Como puede observarse en la **figura 29** la relación entre las Tau de activación y de inactivación para $Ca_v3.3$ presenta una correlación lineal al utilizar el coeficiente de correlación de Spearman (ver en materiales y métodos), lo que sugiere acople entre ambos procesos tanto en la condición control como en presencia de

ghrelina. Este resultado indica que ghrelina afecta el proceso de activación y el de inactivación del canal sin interrumpir el acople natural entre los mismos.

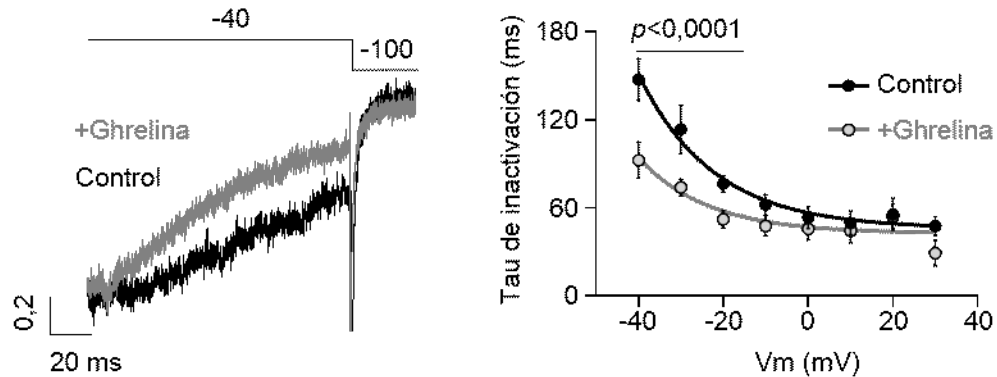


Figura 28. Ghrelina acelera la cinética de inactivación de la corriente $Ca_v3.3$. **A.** Trazos truncados representativos normalizados de corriente de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR evocadas a -40 mV desde un potencial de reposo de -100 mV a 200 ms en condiciones control y con la aplicación de ghrelina (500 nM). **B.** Constante temporal (τ) media de inactivación en función del voltaje. ($n=7$). Extra sum-of-square F test, ($F = 10,42$, ($DFn = 3$, $DFd = 69$)), $p < 0,0001$. Test *t* de Student pareado en cada potencial. Los puntos son las constantes temporales promedio obtenidas de ajustes exponenciales simples para cada trazo de corriente.

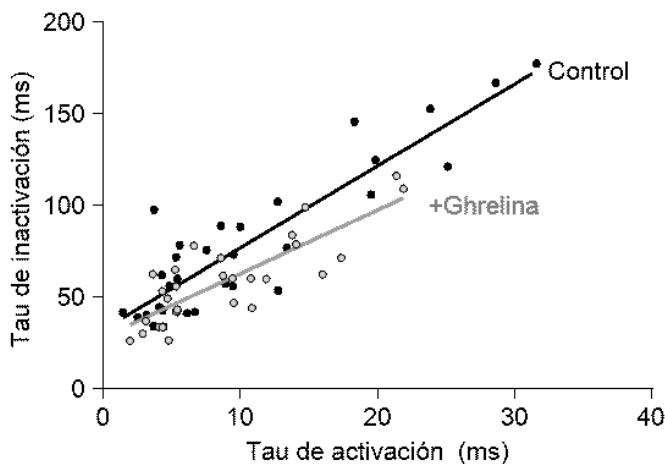


Figura 29. Ghrelina no afecta el acople entre la activación e inactivación de $Ca_v3.3$. Análisis de correlación de Spearman para los procesos activación e inactivación de $Ca_v3.3$ en ausencia (círculos negros) o en presencia de ghrelina (500 nM, círculos grises). Los parámetros de la correlación lineal obtenidos para $Ca_v3.3$ en ausencia de ghrelina son $p < 0,001$ y $r = 0,7855$; y para $Ca_v3.3$ en presencia de ghrelina $p < 0,0001$ y $r = 0,74499$. En todos los casos los símbolos representan la media \pm S.E.M.

Otra característica biofísica que distingue al subtipo $Ca_v3.3$ de los $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ es su rápida deactivación (Chemin *et al.*, 2002), que corresponde al proceso de cierre de los canales. Indagamos entonces si ghrelina a través de la activación de GHSR modula este proceso. Para esto utilizamos un protocolo similar al ensayado previamente para la obtención de la curva I_{inst} -V (figura 25) donde se aplica un pre-pulso inicial a $+60$ mV seguido de una serie de pulsos a potenciales hiperpolarizados desde -140 hasta -60 mV. Posteriormente, los trazos individuales de corriente fueron ajustados con una ecuación exponencial

simple (ver ecuación 9 en materiales y métodos) para obtener los valores de Tau de deactivación. A continuación graficamos las Tau en función del voltaje sin encontrar cambios significativos entre la condición control y con ghrelina (**figura 30**). En conjunto nuestros resultados sobre las propiedades cinéticas del canal $Ca_v3.3$ indican, que además de la reducción en la G_{max} (**figure 24B**) ghrelina también impacta sobre las propiedades cinéticas de la corriente.

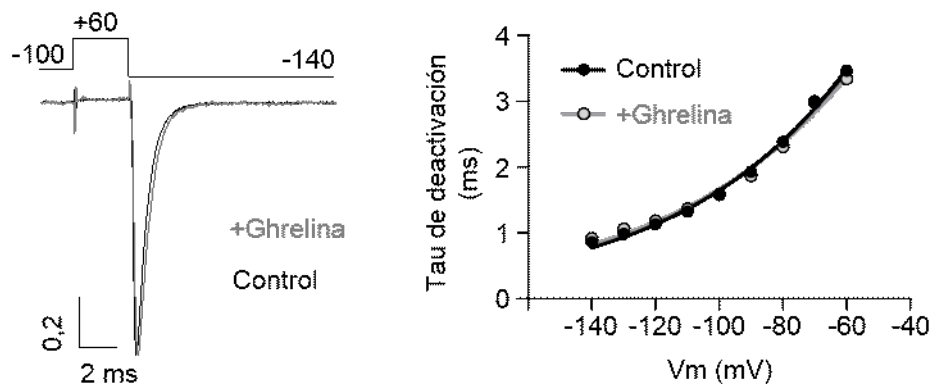


Figura 30. Ghrelina no modifica la cinética de deactivación de la corriente $Ca_v3.3$. Trazos representativos normalizados de corriente de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR evocadas por un pulso previo a +60 mV hasta potenciales de repolarización variables con un potencial de mantenimiento de -100 mV en condición de control y con la aplicación de ghrelina (500 nM). Constante temporal (τ) media de deactivación en función del voltaje. Las líneas representan la función exponencial única ajustada en cada condición. ($n = 5$). Extra sum-of-square F test, ($F = 0,1107$, ($DFn = 2$, $DFd = 86$)), $p = 0,8953$. Los puntos son las constantes temporales promedio obtenidas de ajustes exponenciales simples para cada trazo de corriente.

La contribución de las corrientes T a la generación de patrones de ráfagas de potencial de acción en ciertas neuronas está determinado por cómo estos canales entran o se recuperan del estado inactivado (Aizenman & Linden, 1999; Perez-Reyes, 2003b). Por esta razón, decidimos estudiar si ghrelina impacta en el estado estacionario de inactivación de $Ca_v3.3$. Para esto aplicamos un protocolo con pre-pulsos largos de 1,5 segundos seguidos de un pulso de *test* corto siempre a -30 mV, al cual se abrirán los canales disponibles remanentes que no se encuentran en el estado inactivado. Posteriormente, la corriente obtenida a -30 mV es dividida por la máxima corriente obtenida y graficada en función del voltaje del pre-pulso. Las curvas en ausencia y presencia de ghrelina se ajustaron con la ecuación de Boltzmann (ver ecuación 2 en materiales y métodos). En la **figura 31** se muestra que ghrelina desplaza el potencial medio de inactivación ($V_{1/2}$) hacia potenciales hiperpolarizados, sin modificar la *slope* (Control, $6,02 \pm 0,91$ mV vs +Ghrelin, $5,91 \pm 0,87$ mV ($n=9$), $p = 0,469$, test *t* de Student pareado) indicando que la hormona modifica la entrada al estado estacionario de inactivación de $Ca_v3.3$.

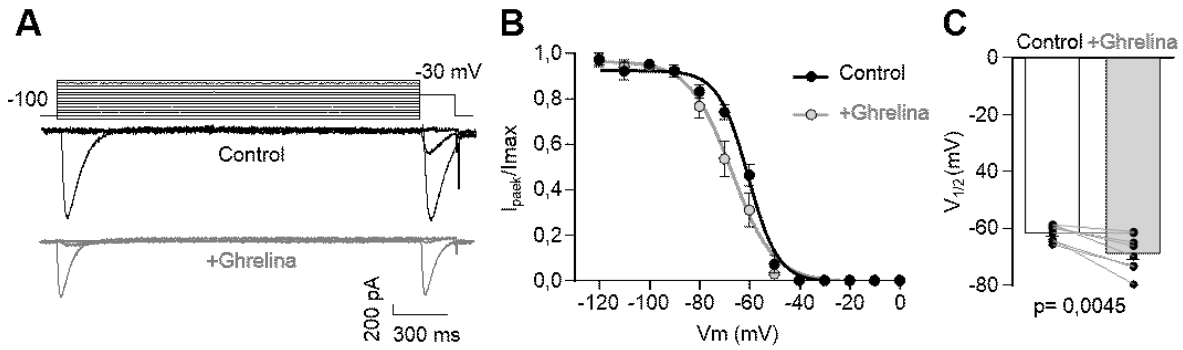


Figura 31. Ghrelin reduce el $V_{1/2}$ de inactivación del estado estacionario de $Ca_v3.3$. **A.** Trazos representativos normalizados de corriente de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR evocadas a -30 mV precedidas por un impulso previo de 1.5 s a un potencial que varía de -120 a $+20$ mV con incrementos de 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV en condición control y con la aplicación de ghrelin (500 nM). Se muestran trazos a -100 , -60 y -30 mV seguidos del pulso a -30 mV. **B.** Curva de inactivación en función del voltaje y ajuste de Boltzmann para cada condición. ($n=9$). Extra sum-of-square F test, ($F = 19,50$ ($DFn = 4$, $DFd = 271$)), $p < 0,0001$. **C.** Potencial de inactivación promedio ($V_{1/2}$) en la condición control y con la aplicación de ghrelin. Test t de Student pareado.

Por otro lado, analizamos la recuperación del canal desde el estado inactivado en función del tiempo. Para ello, evocamos las corrientes $Ca_v3.3$ aplicando un pulso a -30 mV por 500 ms para asegurar la completa inactivación de la corriente desde un potencial de mantenimiento de -100 mV y luego aplicamos sucesivos pulsos cortos de *test* a -30 mV a tiempos crecientes entre pulsos obteniendo de ese modo trazos como los de la **figura 32A**. Dividimos la corriente obtenida a los diferentes tiempos por la corriente del pulso inicial y graficamos la corriente así normalizada en función del tiempo de recuperación. Los valores obtenidos fueron ajustados a una ecuación exponencial (ver ecuación 11 de materiales y

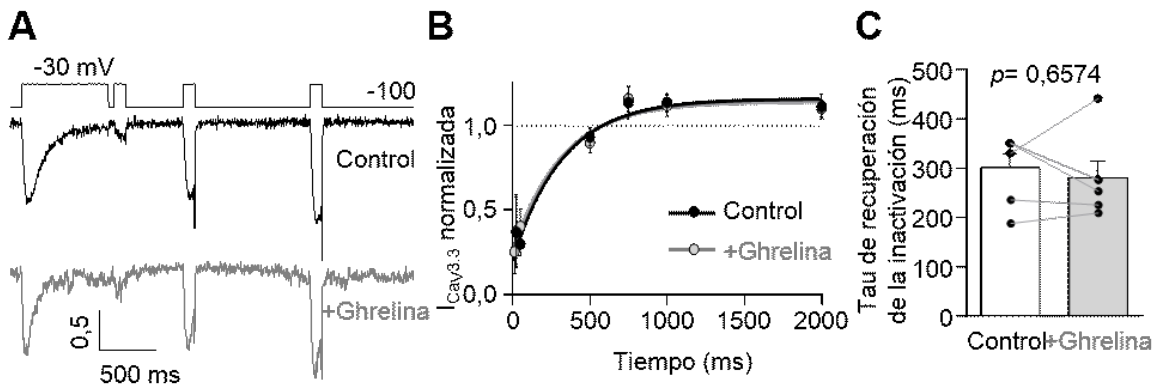


Figura 32. Ghrelin no impacta en la recuperación de la inactivación de $Ca_v3.3$. **A.** Trazos representativos normalizados de corriente de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR que muestran la inactivación de la corriente en un pulso de 500 ms a -30 mV, que luego se recupera a -100 mV durante períodos de tiempo de entre $12,5$ a 2000 ms, para luego registrar nuevamente el máximo de corriente durante 30 ms a -30 mV en condiciones control y con la aplicación de ghrelin (500 nM). **B.** Los puntos representan la corriente de $Ca_v3.3$ promedio recuperada en diferentes períodos de tiempo y las líneas representan la función exponencial ajustada ($n=5$). Extra sum-of-square F test, ($F = 16,75$ ($DFn = 3$, $DFd = 58$)), $p = 0,9179$. **C.** Constante temporal de recuperación promedio (τ) de la inactivación en condiciones de control y con la aplicación de ghrelin (500 nM). Test t de Student pareado.

métodos) que nos permitió calcular la constante temporal de recuperación en ausencia y en presencia de ghrelina. Como se observa en las barras de la **figura 32** no observamos diferencias significativas en la Tau de recuperación de la inactivación a tiempos cortos. Una característica peculiar que distingue al subtipo Cav3.3, es que presenta facilitación en este tipo de protocolos. En nuestros datos puede apreciarse que el máximo alcanzado para la corriente normalizada en la **figura 32B** supera el valor de 1 a tiempos de recuperación mayores a 500 ms. Este fenómeno, que fue previamente observado por otros investigadores, es mediado por un mecanismo aún desconocido (Klockner *et al.*, 1999; Gomora *et al.*, 2002).

Una característica que presentan los canales Cav3 es la denominada corriente *window* o ventana, que permite un ingreso de calcio basal debido al solapamiento de las curvas de activación e inactivación de los canales. Esta corriente basal de calcio ha sido relacionada con funciones fisiológicas (Crunelli *et al.*, 2005) por lo que decidimos indagar si ghrelina modifica esta propiedad. Como se observa en la **figura 33** al solapar las curvas de activación (figura 25B) y de inactivación (figura 31B) en función del voltaje puede obtenerse la corriente *window* para Cav3.3 en ausencia y presencia de ghrelina. Si analizamos el tamaño aproximado del área delimitada por ambas curvas, podemos observar que la presencia de ghrelina provoca un pequeño aumento en esta magnitud. Este dato podría significar que ghrelina estimula la entrada basal de calcio, al mismo tiempo que provoca un desplazamiento hacia la izquierda en el potencial medio de dicha corriente (**figura 33**).

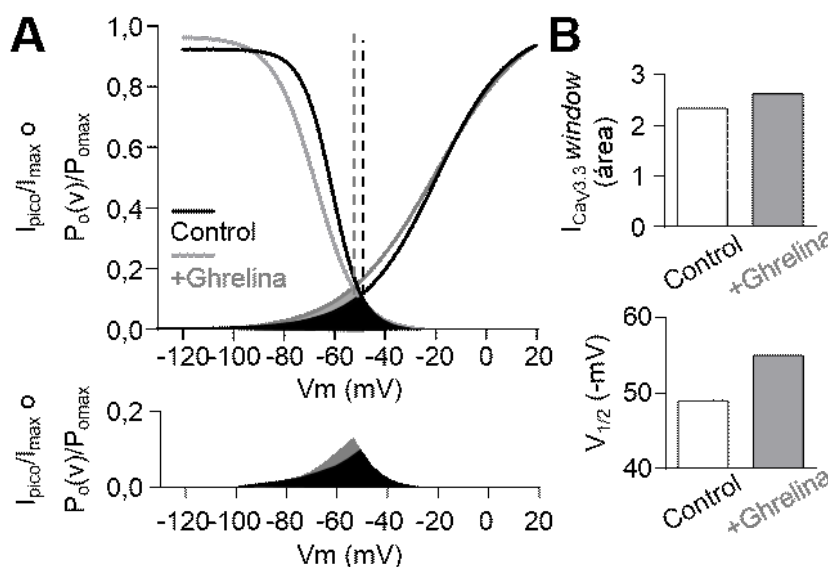


Figura 33. Ghrelina induce un aumento en la corriente de window de Cav3.3 e induce su activación a potenciales más hiperpolarizados. A. Corriente window obtenida del solapamiento de las curvas medias de activación e inactivación de la corriente Cav3.3 en ausencia (Control) o en presencia de ghrelina (+Ghrelina, 500 nM). **B.** Amplitud y voltaje medio de la corriente window de Cav3.3.

Finalmente, intentamos predecir si los cambios biofísicos mediados por ghrelina sobre la corriente Cav3.3 tendrían un impacto sobre el comportamiento eléctrico de una neurona.

Este enfoque nos pareció valioso ya que los tres subtipos de canales T se expresan ampliamente en el cerebro y actualmente no existen inhibidores específicos para bloquear los subtipos selectivamente (Huguenard, 1998; Chemin *et al.*, 2002). Decidimos entonces utilizar el programa de simulación *NEURON* (Hines & Carnevale, 1997) que permite realizar cambios en la contribución de la corriente $Ca_v3.3$ a la corriente T total adaptando un modelo de neuronas talámicas reticulares. La ventaja de este modelo es que ha sido ampliamente utilizado para modelar la contribución de las corrientes T a la actividad neuronal (Chemin *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2016; Cazade *et al.*, 2017). Así, a pesar de que el efecto de ghrelina no se ha descrito en esta zona del cerebro en particular, consideramos que este modelo es adecuado para explorar el impacto de esta hormona en la actividad neuronal. Además de las corrientes T, este modelo considera las conductancias de sodio y de potasio. Para modelar el efecto de ghrelina sobre las corrientes T, dividimos la misma en partes variables entre los 3 subtipos de Ca_v3 . Decidimos conservar los parámetros de la corriente T no $Ca_v3.3$ y los parámetros de la corriente de sodio. Modelamos el efecto de ghrelina sobre la frecuencia de disparo y el tiempo de latencia al primer potencial de acción introduciendo cambios en la contribución de $Ca_v3.3$ a la corriente T total del modelo. Las variaciones realizadas en el modelo se basaron en la información biofísica en $Ca_v3.3$ obtenida en nuestros ensayos en células HEK293T. Además simulamos el efecto inhibitorio de ghrelina sobre las corrientes de potasio previamente descrito (Shi *et al.*, 2013). En otras palabras, corrimos el programa reduciendo el valor de la corriente máxima para $Ca_v3.3$ en un 40% (para simular la reducción que encontramos para G_{max}) y utilizando los valores de los parámetros incluidos en la ecuación de Boltzmann para la inactivación del estado estacionario (h^∞) (ver ecuación 2 en materiales y métodos) y las ecuaciones de decaimiento exponencial para la dependencia de las constantes temporales de la activación (τ_m) (ver ecuación 3 en materiales y métodos) e inactivación (τ_h) (ver ecuación 4 en materiales y métodos) con el voltaje basadas en nuestros datos experimentales en control y en presencia de ghrelina (**tabla 1**). Además, conservamos los valores de los parámetros para la ecuación de Boltzmann para la activación en función del voltaje (m^∞) (ver ecuación 1 en materiales y métodos) porque ghrelina no afecta esta propiedad biofísica de $Ca_v3.3$ como mostramos en la figura 24B. Ensayamos diferentes contribuciones de $Ca_v3.3$ a la corriente T total (nombrada como I_T en el modelo) en un rango de 0 a 100 %. La corriente T restante se completó mediante la adaptación de los datos publicados previamente para los componentes $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ en (Chemin *et al.*, 2002) presentados en la **tabla 1**. Además simulamos el efecto

conocido de ghrelina sobre otra conductancia neuronal: la reducción en un 50 % de la corriente de potasio previamente reportada en diversos tipos neuronales (Shi *et al.*, 2013).

	Parámetros	Ca _v 3.1	Ca _v 3.2	Ca _v 3.3	Ca _v 3.3 +Ghrelina
Activación	V ₅₀ (mV)	-49,25 ± 0,17	-49,01 ± 0,22	-19,54 ± 0,17	-19,54 ± 0,17
	Slope (mV)	5,17 ± 0,15	5,45 ± 0,19	16,43 ± 2,04	16,43 ± 2,04
	I ₀	0,00 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	-0,01 ± 0,02	-0,01 ± 0,02
	I _{max}	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,03 ± 0,07	1,03 ± 0,07
	Tau ₍₀₎ (ms)	2,21 ± 0,09	1,44 ± 0,03	7.28 ± 0.60	4,80 ± 0,55
	Tau _(∞) (ms)	2,08 ± 0,10	1,27 ± 0,03	0.43 ± 2.73	0,77 ± 2,80
	k (mV ⁻¹)	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0.03 ± 0.01	0,03 ± 0,01
Inactivación	V ₅₀ (mV)	-74,18 ± 0,19	-75,24 ± 0,31	-60.97 ± 0.52	-67,51 ± 1,02
	Slope (mV)	5,44 ± 0,17	6,29 ± 0,27	5.95 ± 0.46	8,44 ± 0,89
	I ₀	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01	-0.01 ± 0.01	-0,01 ± 0,01
	I _{max}	0,00 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	0.92 ± 0.01	0,97 ± 0,02
	Tau ₍₀₎ (ms)	12,77 ± 0,34	18,79 ± 0,11	56.69 ± 4.10	46,96 ± 3,26
	Tau _(∞) (ms)	12,34 ± 0,44	18,62 ± 0,13	45.69 ± 8.74	42,42 ± 6,33
	k (mV ⁻¹)	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0.06 ± 0.02	0,06 ± 0,03

La **figura 34A** muestra el tren de potenciales de acción obtenido a partir del modelo y las frecuencias de potenciales de acción obtenidas en las diferentes condiciones ensayadas. La modulación de la corriente Ca_v3.3 por ghrelina reduce la frecuencia de disparo, mientras que, como era de esperarse, la reducción en la conductancia de potasio por ghrelina la incrementa. Al combinar ambos efectos observamos una atenuación en el incremento de la frecuencia de disparo producido por el efecto de ghrelina sobre la conductancia de potasio. También analizamos el tiempo de latencia al primer potencial de acción y hallamos que el efecto de ghrelina solamente sobre Ca_v3.3 incrementa dicho valor en comparación con el control (**figura 34B**). Por otro lado, la inhibición de la corriente de potasio por ghrelina ligeramente reduce el tiempo de latencia, y dicha reducción es ocluida al combinar ambos efectos de ghrelina en la simulación (**figura 34B**). Además encontramos que al disminuir la contribución de Ca_v3.3 a la I_T se reduce el impacto de ghrelina sobre la frecuencia y el tiempo de latencia del primer potencial de acción.

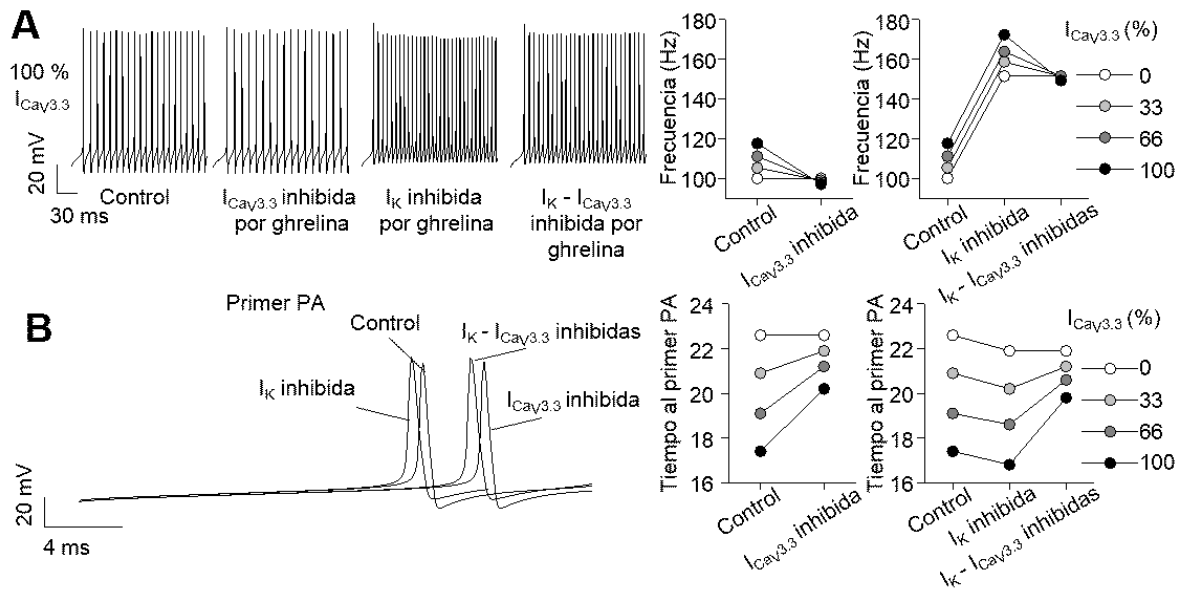
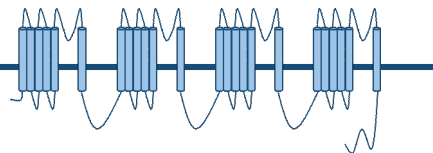


Figura 34. La inhibición de $Ca_v3.3$ por ghrelina modula la frecuencia de disparo neuronas en una simulación del comportamiento neuronal. A. Simulaciones de patrón de disparo en un modelo de neurona reticular talámica bajo cuatro condiciones diferentes: control, corriente de $Ca_v3.3$, corriente de potasio, y corriente de $Ca_v3.3$ y corriente de potasio inhibidas por ghrelina (izquierda). Los gráficos de la derecha representan los valores de frecuencia de disparo obtenidos para cada condición en diferentes contribuciones de $Ca_v3.3$ a la corriente T total. **B.** Primer potencial de acción simulado (izquierda) y gráficos (derecha) que representan el tiempo de latencia al disparo del primer potencial de acción en las mismas condiciones que A.

Esta última serie de resultados nos permite proponer que la expresión de $Ca_v3.3$ puede ser un factor relevante para la acción de ghrelina sobre las propiedades funcionales en neuronas.

Discusión II



Nuestros resultados presentados en este segundo capítulo de tesis muestran que ghrelina, a través de la activación de GHSR, ejerce un efecto selectivo sobre los $Ca_v3.3$ sin alterar los otros subtipos de Ca_v3 : $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$. La activación de GHSR por ghrelina tiene un efecto profundo sobre $Ca_v3.3$, modificando su G_{max} con un leve desplazamiento hacia la izquierda en la dependencia de activación con el voltaje. Además, ghrelina acelera las cinéticas de activación e inactivación de la corriente macroscópica inhibida, y además desplaza el potencial medio de entrada al estado estacionario de inactivación u hacia valores más negativos. Finalmente, utilizando un modelo neuronal logramos simular el impacto de este efecto complejo de ghrelina en la modulación del disparo de potenciales de acción, hallando una atenuación en el incremento en la frecuencia previamente reportado para la aplicación de ghrelina.

Nuestros resultados demuestran que ghrelina modifica específicamente uno de los subtipos de Ca_v3 . Al analizar otros moduladores de $Ca_v3.3$ encontramos una similitud notable con el efecto final de ghrelina sobre la corriente. Por un lado, Chemin y colaboradores (Chemin *et al.*, 2001) estudian el efecto de anandamina, un canabinoide endógeno, que modifica parámetros biofísicos de $Ca_v3.3$ (cinéticas de activación e inactivación, curva del estado estacionario de inactivación, y un pequeño cambio en la curva I-V) de manera similar al efecto de ghrelina aquí descrito. Además ha sido reportada una inhibición selectiva de la corriente macroscópica mediada por $Ca_v3.3$ a través de la activación de receptores muscarínicos para acetilcolina (M1, M3 y M5) (Hildebrand *et al.*, 2007). Esta inhibición disminuye la constante temporal de activación aproximadamente a la mitad, lo que se traduce en una aceleración de dicho proceso; al mismo tiempo que disminuye la constante temporal de inactivación en un tercio de su valor en ausencia de agonista, lo que acelera significativamente la inactivación. Esta modulación negativa de la corriente es dependiente de la dosis de agonista, en este caso carbacol (agonista que mimetiza el efecto de acetilcolina), mediada por GPCRs acoplados a la proteína $G_{q/11}$ e independiente de la cascada intracelular de PI (4,5) P_2 , mientras que anandamina inhibe las corrientes T de manera independiente de proteína G. Más recientemente se reportó que los canales $Ca_v3.3$ son inhibidos por un estímulo eléctrico particular a través de un mecanismo no completamente elucidado pero que comprendería una actividad fosfatasa que se activa con estímulo eléctrico y calcio en neuronas talamocorticales. Esta modulación resulta en una menor corriente macroscópica y en cambios cinéticos similares a los que encontramos en esta tesis con ghrelina (Chemin *et al.*, 2019). En este trabajo y en otro previo de los mismos autores (Cazade *et al.*, 2017), se propone que la menor corriente se debe a una notable aceleración en la cinética de

inactivación de la corriente y a un desplazamiento de la curva de inactivación dependiente de voltaje hacia potenciales hiperpolarizados. Así, es posible proponer que existen algunas características intrínsecas en el $Ca_v3.3$ que son blancos potenciales y conservados para distintos efectores.

Mientras que nosotros estudiamos el efecto de ghrelina sobre las corrientes T neuronales y evaluamos la especificidad de la hormona sobre los 3 subtipos de canales Ca_v3 , otro grupo de investigación ha reportado previamente que ghrelina modula las corrientes tipo T en células espermatozógenas de ratón (Liu *et al.*, 2011). Ellos demuestran que la corriente de calcio sensible a níquel y mibefradil es susceptible a la aplicación aguda de ghrelina. De manera similar a lo observado en nuestros experimentos en cultivos neuronales, la inhibición es independiente del voltaje al ser observada en un rango de voltajes desde -50 a +20 mV. Al analizar la activación en función del voltaje no observan cambios significativos pero si observan un desplazamiento de aproximadamente 10 mV hacia potenciales negativos en la curva del estado estacionario de inactivación similar a nuestro efecto ensayado para el subtipo $Ca_v3.3$. De hecho, proponen que la menor corriente macroscópica observada se debería a que una mayor proporción de canales se estabilizaría en el estado inactivado. Además, demuestran que la inhibición es a través de la proteína $G_{i/o}$ e independiente de $G_{\beta\gamma}$, y que corriente abajo se activarían una nueva PKC y luego PLC. Esta vía es diferente a la que reportamos en esta tesis donde ghrelina inhibe a $Ca_v3.3$ de manera dependiente de G_q e independiente de $G_{\beta\gamma}$. Al tratarse de un estudio sobre corrientes nativas, el reporte citado no explora que subtipo de Ca_v3 sería el sensible a ghrelina, siendo $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.1$ los subtipos que se reportaron como expresados en dicho tejido (Stambouljian *et al.*, 2004). Asimismo realizan un ensayo de dosis respuesta donde obtienen un EC_{50} de 35,7 nM y una inhibición máxima de 38 %, mientras que nuestro ensayo sobre el $Ca_v3.3$ arrojó un EC_{50} de 346,1 nM y una inhibición máxima de 32,5 %. A pesar de que se trata de preparados muy diferentes el reporte de Liu *et al.* y nuestro trabajo presentan similitudes y refuerzan a los canales Ca_v3 como un blanco de acción de la hormona ghrelina.

Los reportes descriptos hasta este punto de la discusión me permiten hipotetizar un mecanismo canónico de inhibición de los canales $Ca_v3.3$ que involucra una aceleración de la cinética de inactivación y un desplazamiento hacia la potenciales más negativos de la curva del estado estacionario de inactivación, generando de ese modo una menor disponibilidad de canales para abrirse frente a un estímulo despolarizante.

¿Cómo contribuye el mecanismo que reportamos aquí en el efecto global de ghrelina sobre la actividad neuronal? Considero que es difícil predecirlo debido a que ghrelina no

modula sólo los canales $Ca_v3.3$. Como previamente hemos reportado GHSR modula basalmente y por aplicación de ghrelina a los canales presinápticos $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ y modula basalmente los canales de expresión somática $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ como hemos demostrado en el capítulo I de esta tesis. Además debemos considerar que ghrelina inhibe corrientes de potasio, responsables de la fase de repolarización del potencial de acción en numerosos tipos neuronales entre ellos neuronas de DRG (Shi *et al.*, 2013). Para intentar responder esta pregunta utilizamos un modelo que nos permitió evaluar el efecto de ghrelina sobre $Ca_v3.3$ y las corrientes de potasio en el disparo de una neurona. Dicho modelo sólo considera como corrientes de calcio a las mediadas por los canales T, sin tener en cuenta a los otros subtipos de Ca_v o canales de potasio modulados por calcio de alta conductancia. Hallamos que el efecto de ghrelina sobre $Ca_v3.3$ moderaría el efecto de la hormona sobre las corrientes de potasio, atenuando el ya reportado incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Es importante destacar que la concentración de ghrelina necesaria para inhibir las corrientes de potasio es un orden de magnitud menor a la necesaria para visualizar el efecto en las corrientes $Ca_v3.3$ (Shi *et al.*, 2013). Esto sugiere que el efecto de ghrelina sobre $Ca_v3.3$ podría actuar como un mecanismo de *feedback* negativo a elevadas concentraciones de ghrelina previniendo un incremento dramático en la frecuencia de disparo. Recientemente se ha demostrado la relevancia de los Ca_v3 en la excitabilidad neuronal vinculada al dolor demostrándose que la activación de TrkB (del inglés *Tropomyosin receptor kinase B*) por BDNF (del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*) provoca un aumento en la amplitud de la corriente de calcio sensible a Níquel 100 μ M en neuronas ganglionares trigeminales (Wang *et al.*, 2019). La aplicación aguda del BDNF genera un desplazamiento hacia la derecha en la inactivación del estado estacionario que podría explicar el aumento de la corriente macroscópica. Por otro lado, ese aumento en la corriente tipo T, que estaría mediada por el subtipo $Ca_v3.2$, incrementa la frecuencia de disparo de potenciales de acción y la hipersensibilidad al dolor. En este escenario, el efecto de inhibición de $Ca_v3.3$ y la consecuente atenuación en el incremento en el *firing* podría funcionar como un moderador del efecto exacerbado del dolor mediado por BDNF al reducir la hiperexcitabilidad. Este efecto se sumaría a los ya reportados efectos para ghrelina como un agente antinociceptivo en neuronas ganglionares trigeminales al atenuar la expresión de TRV1 (del inglés *Transient Receptor potential Vanilloid type 1*) y CGRP (del inglés *Calcitonin Gene Related Peptide*) en un modelo de hiperalgesia (Farajdokht *et al.*, 2018) y en neuronas de DRG al incrementar la expresión de receptores opioides e inhibir la de TRPV1 en un modelo de dolor abdominal recurrente (Mao *et al.*, 2017).

Nuestros resultados proveen nueva información sobre la modulación de los canales Ca_v3 . Los reportes sobre este tema si bien son escasos demuestran una gran heterogeneidad de efectos. De acuerdo a nuestros resultados solo el subtipo $Ca_v3.3$ es blanco de la acción de GHSR evocada por ghrelina, mientras que los subtipos $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ resultan insensibles a la acción de la hormona al menos en nuestras condiciones experimentales. Existen varios reportes describiendo moduladores que actúan específicamente sobre determinados subtipos de Ca_v3 (Zhang *et al.*, 2013). Por ejemplo, la activación del receptor muscarínico M1 desencadena la inhibición de $Ca_v3.3$ acoplándose a la proteína $G_{q/11}$, mientras que los subtipos $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ no se alteran por este mecanismo. Además de involucrar la misma proteína G, el efecto del receptor M1 es muy similar al efecto ejercido por ghrelina en términos biofísicos (Hildebrand *et al.*, 2007). Por otro lado, el subtipo $Ca_v3.3$ es insensible a la acción de otras cascadas dependientes de proteínas G como la que inhibe el $Ca_v3.2$ por activación del receptor del factor liberador de corticotropina (You *et al.*, 2010) e independientes de proteína G (Zhang *et al.*, 2012) que inhiben otros subtipos de Ca_v3 . Esta diversidad en la modulación de los Ca_v3 se suma a los patrones de expresión diferencial de los subtipos de Ca_v3 , no sólo en diferentes áreas del cerebro (Iftinca, 2011), sino también en los diferentes estadios del desarrollo (Yunker *et al.*, 2003). En relación a esto se reportó que $Ca_v3.3$ se expresa a niveles altos en el cerebro durante las etapas embrionarias (Yunker *et al.*, 2003) lo que nos permite proponer un vínculo entre el efecto modulador de la ghrelina en cultivos embrionarios y su efecto específico sobre las corrientes de $Ca_v3.3$ observadas *in vitro*. Por lo tanto, nuestros datos y otros sugieren que modificar la contribución de subtipos específicos de Ca_v3 a la corriente T podría ser un mecanismo común para sintonizar la actividad eléctrica en las neuronas. Sería atractivo realizar experimentos electrofisiológicos de medidas de voltaje en rebanadas cerebrales de ratones deficientes en $Ca_v3.3$ para acompañar nuestros estudios sobre el impacto de la ghrelina en la funcionalidad de las neuronas hipotalámicas.

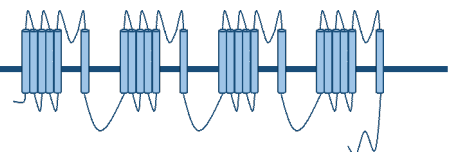
Los canales Ca_v3 presentan corriente ventana o *window current* (Perez-Reyes, 2003b), es decir, que sus curvas de activación e inactivación del estado estacionario en función del voltaje presentan un rango de potenciales al cual una fracción de canales están activados y no inactivan completamente. En el caso de los canales Ca_v3 este fenómeno genera una pequeña corriente tónica entrante a la cual se estima que contribuyen entre el 0,05 y 0,8 % del número total de canales en diferentes subtipos neuronales, y gracias al clonado de los 3 subtipos de Ca_v3 , se ha comprobado que la mayor corriente ventana sería

generada por el subtipo $Ca_v3.3$ en comparación con $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ debido a sus propiedades biofísicas diferenciales (Klockner *et al.*, 1999). De acuerdo a nuestros resultados, la corriente ventana en presencia de ghrelina tendría una magnitud levemente mayor. Por lo tanto, se podría pensar que frente a un estímulo sináptico sub-umbral se generaría un mayor aumento de calcio intracelular en las dendritas en presencia de ghrelina. Ese incremento del calcio local podría tener varios efectos en la integración sináptica: el influjo de calcio afectaría de manera directa la duración y amplitud de las corrientes post-sinápticas excitatorias, al prolongar la duración de la despolarización (Magee & Johnston, 1995); la entrada de calcio activaría indirectamente canales de potasio modulados por calcio, y de ese modo se promovería una hiperpolarización de la membrana (Spruston *et al.*, 1995); y ese aumento post-sináptico en la concentración de calcio podría impactar en procesos dependientes de calcio, tales como la plasticidad a corto y largo plazo (Aizenman *et al.*, 1998).

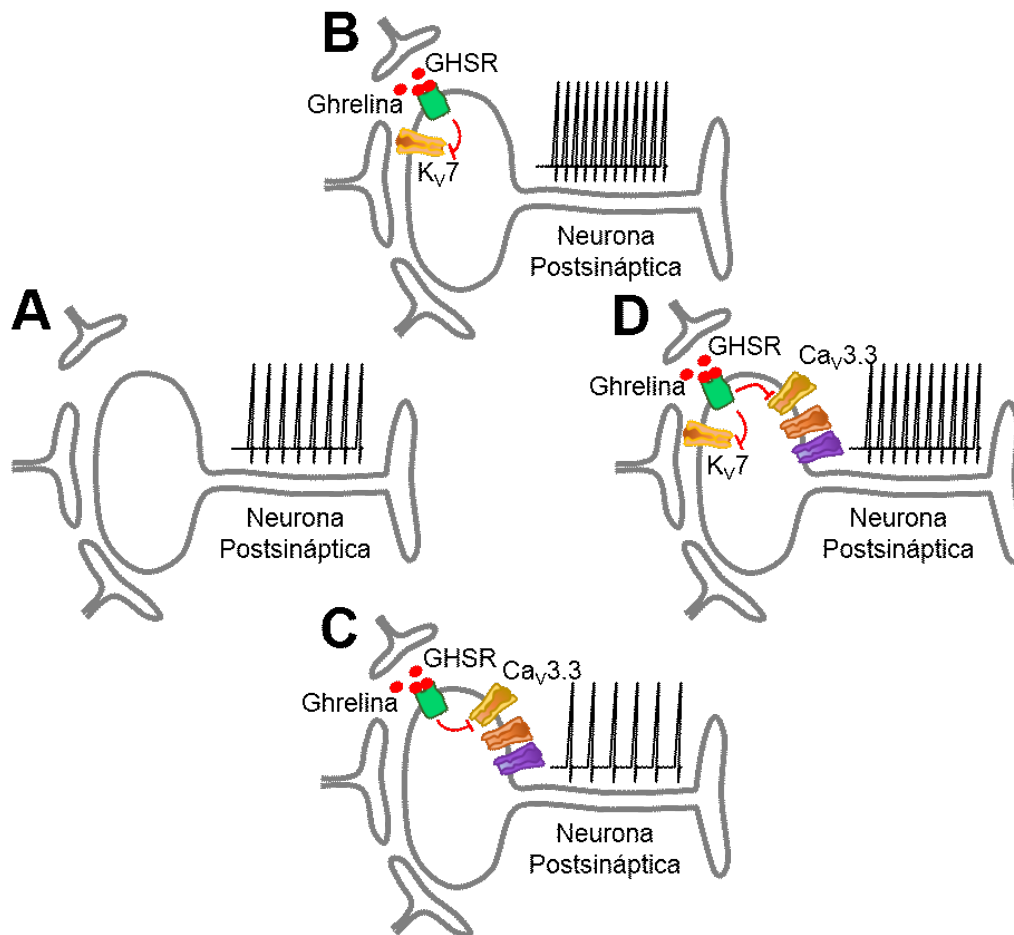
Algunas formas de enfermedades severas, como epilepsia y dolor crónico, involucran anomalías en las corrientes T y pueden ser consideradas *channelopathies* (Nelson *et al.*, 2006). Esas enfermedades están bajo intenso estudio para poder desarrollar nuevas drogas. En este sentido, diversos mutantes de Ca_v3 poseen fenotipos epilépticos, y pequeñas moléculas orgánicas que bloquean los canales T son efectivas en el control de estados epilépticos (Heron *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2014; Proft *et al.*, 2017). Asimismo, está bien establecido un rol para las corrientes T en el dolor neuropático y bloqueantes de dichas corrientes han sido propuestos como parte de nuevas estrategias para el dolor agudo, inflamatorio y crónico (Snutch & Zamponi, 2018). Por otro lado, desde su descubrimiento, ghrelina ha sido estudiada como blanco terapéutico de varios desórdenes tales como obesidad y adicción (Seim *et al.*, 2012). En particular, muchos esfuerzos fueron enfocados en análogos de ghrelina que pudieran interactuar con su receptor, GHSR. Adicionalmente a conseguir compuestos más estables que ghrelina, esas drogas pueden activar o inhibir cascadas de señalización específicas, o bloquear la actividad constitutiva del receptor, con diferentes eficacias (Asakawa *et al.*, 2003; M'Kadmi *et al.*, 2015). Muchos de esos compuestos sintéticos están disponibles y podrían ser ensayados como inhibidores de las corrientes T, y de ese modo podrían considerarse para el tratamiento de patologías que involucren anomalías excitatorias del sistema nervioso central. Por otro lado, nuevas estrategias enfocadas en el secuestro de ghrelina o en la reducción de su síntesis (Nakazato *et al.*, 2001; Helmling *et al.*, 2004) podrían afectar la actividad de todos los blancos de ghrelina,

incluidos los canales $Ca_v3.3$. En resumen, nuestros resultados no solo contribuyen a entender el mecanismo que modula los $Ca_v3.3$ sino que también identifica un nuevo blanco de ghrelina, un modulador neuronal con gran interés farmacológico.

Conclusiones II



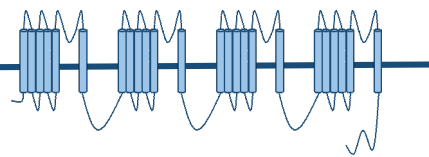
En este capítulo de tesis demostramos que ghrelina, a través de la activación de GHSR, ejerce un efecto inhibitorio sobre las corrientes Ca_v3 . Ghrelina inhibe las corrientes de calcio nativas sensibles a $NiCl_2$ y evocadas a voltajes bajos en cultivos de neuronas hipotalámicas. Encontramos que este efecto de ghrelina es selectivo sobre los $Ca_v3.3$, sin alterar la actividad de $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, en un sistema de expresión heteróloga. Dicho efecto comprende una reducción en G_{max} con un leve desplazamiento hacia potenciales más negativos en la dependencia de activación con el voltaje. Además, ghrelina acelera la cinética de activación e inactivación de la corriente macroscópica inhibida, así como un desplazamiento hacia potenciales hiperpolarizados en el potencial medio del estado estacionario de inactivación. Nuestra predicción basada en los ensayos *in silico* indica que la inhibición de



Esquema 2. La actividad eléctrica de una neurona postsináptica es modulada por la actividad de las neuronas presinápticas cercanas (A). La activación de GHSR por ghrelina inhibe los canales de potasio operados por voltaje (K_v7) generando un aumento en la frecuencia de disparos de potenciales de acción (B). Además ghrelina inhibe selectivamente la corriente de calcio mediada por $Ca_v3.3$ de modo que reduce la actividad eléctrica neuronal (C). En conjunto, la inhibición del $Ca_v3.3$ por la hormona genera una atenuación al incremento del disparo originado por la inhibición de K_v7 (D).

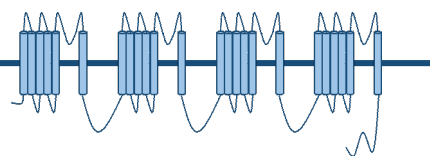
$Ca_v3.3$ atenuaría la estimulación de la frecuencia de disparo de potenciales de acción originada por la inhibición de las corrientes de potasio por ghrelina (**esquema 2**). En resumen, descubrimos un nuevo blanco de ghrelina en las neuronas: el $Ca_v3.3$.

Conclusiones Generales



GHSR posee dos modos de actividad, una evocada por ghrelina y otra constitutiva. La actividad evocada por ghrelina, a nivel molecular, libera calcio desde compartimentos intracelulares (Howard *et al.*, 1996) y activa la transcripción (Holst *et al.*, 2003; Holst *et al.*, 2005) en forma dependiente de proteína G_q . A nivel sináptico, ghrelina incrementa la respuesta postsináptica a glutamato a través de la estimulación de receptores AMPA en la membrana postsináptica (Ribeiro *et al.*, 2014). Tanto la actividad evocada como la actividad constitutiva actúan a nivel presináptico inhibiendo la liberación de GABA. Nuestro laboratorio ha contribuido a la comprensión del efecto producido por la actividad constitutiva de GHSR, mostrando que este receptor modula los Ca_v a través de mecanismos diferentes dependiendo de su modo de activación. La actividad constitutiva de GHSR reduce el tráfico de Ca_v2 , resultando en una menor densidad de canales en la membrana plasmática y, en consecuencia, disminuye la liberación de GABA (Lopez Soto *et al.*, 2015; Martinez Damonte *et al.*, 2018). Como demostramos en el primer capítulo, el efecto de la actividad constitutiva requiere la presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ y este efecto es común para todos los subtipos de canales de calcio que poseen la subunidad $Ca_v\beta$ como parte de su complejo, incluyendo los canales de expresión postsináptica ($Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$). De este modo, inicialmente hemos postulado que la actividad constitutiva de GHSR modifica la cantidad de canales pre y postsinápticos, mientras que la aplicación aguda de ghrelina reduce las corrientes presinápticas mediadas por Ca_v2 afectando la liberación de GABA. En el segundo capítulo, presentamos un nuevo blanco de la actividad de GHSR evocada de ghrelina: los $Ca_v3.3$, canales que contribuyen a la corriente T y participan en el patrón de disparo de potenciales de acción en neuronas. En resumen, los Ca_v son efectores centrales del sistema ghrelina/GHSR.

Bibliografía



- Aizenman, C.D. & Linden, D.J. (1999) Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *Journal of neurophysiology*, **82**, 1697-1709.
- Aizenman, C.D., Manis, P.B. & Linden, D.J. (1998) Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron*, **21**, 827-835.
- Altier, C. (2012) GPCR and voltage-gated calcium channels (VGCC) signaling complexes. *Sub-cellular biochemistry*, **63**, 241-262.
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H.W., Hermosilla, T. & Zamponi, G.W. (2011) The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature neuroscience*, **14**, 173-180.
- Altier, C., Khosravani, H., Evans, R.M., Hameed, S., Peloquin, J.B., Vartian, B.A., Chen, L., Beedle, A.M., Ferguson, S.S., Mezghrani, A., Dubel, S.J., Bourinet, E., McRory, J.E. & Zamponi, G.W. (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nature neuroscience*, **9**, 31-40.
- Andrade, A., Hope, J., Allen, A., Yorgan, V., Lipscombe, D. & Pan, J.Q. (2016) A rare schizophrenia risk variant of CACNA1I disrupts CaV3.3 channel activity. *Scientific reports*, **6**, 34233.
- Andrews, Z.B., Erion, D., Beiler, R., Liu, Z.W., Abizaid, A., Zigman, J., Elsworth, J.D., Savitt, J.M., DiMarchi, R., Tschoep, M., Roth, R.H., Gao, X.B. & Horvath, T.L. (2009) Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 14057-14065.
- Arias, J.M., Murbartian, J., Vitko, I., Lee, J.H. & Perez-Reyes, E. (2005) Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS letters*, **579**, 3907-3912.
- Arnot, M.I., Stotz, S.C., Jarvis, S.E. & Zamponi, G.W. (2000) Differential modulation of N-type 1B and P/Q-type 1A calcium channels by different G protein subunit isoforms. *The Journal of physiology*, **527 Pt 2**, 203-212.
- Arshavsky, V.Y., Lamb, T.D. & Pugh, E.N., Jr. (2002) G proteins and phototransduction. *Annual review of physiology*, **64**, 153-187.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Katsra, G., Fujimiya, M., Fujino, M.A. & Kasuga, M. (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut*, **52**, 947-952.

- Bae, J., Suh, E.J. & Lee, C. (2010) Interaction of T-type calcium channel Ca(V)3.3 with the beta-subunit. *Mol Cells*, **30**, 185-191.
- Barrile, F., M'Kadmi, C., De Francesco, P.N., Cabral, A., Garcia Romero, G., Mustafa, E.R., Cantel, S., Damian, M., Mary, S., Denoyelle, S., Baneres, J.L., Marie, J., Raingo, J., Fehrentz, J.A. & Perello, M. (2019) Development of a novel fluorescent ligand of growth hormone secretagogue receptor based on the N-Terminal Leap2 region. *Molecular and cellular endocrinology*, **498**, 110573.
- Beedle, A.M., McRory, J.E., Poirot, O., Doering, C.J., Altier, C., Barrere, C., Hamid, J., Nargeot, J., Bourinet, E. & Zamponi, G.W. (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nature neuroscience*, **7**, 118-125.
- Benleulmi-Chaachoua, A., Chen, L., Sokolina, K., Wong, V., Jurisica, I., Emerit, M.B., Darmon, M., Espin, A., Stajlar, I., Tafelmeyer, P., Zamponi, G.W., Delagrangé, P., Maurice, P. & Jockers, R. (2016) Protein interactome mining defines melatonin MT1 receptors as integral component of presynaptic protein complexes of neurons. *Journal of pineal research*, **60**, 95-108.
- Berecki, G., Motin, L. & Adams, D.J. (2016) Voltage-Gated R-Type Calcium Channel Inhibition via Human mu-, delta-, and kappa-opioid Receptors Is Voltage-Independently Mediated by Gbetagamma Protein Subunits. *Molecular pharmacology*, **89**, 187-196.
- Bernstein, G.M. & Jones, O.T. (2007) Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: role of the alpha2/delta subunit. *Cell calcium*, **41**, 27-40.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. & De Waard, M. (2000) The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, **25**, 177-190.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J. & Snutch, T.P. (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nature neuroscience*, **2**, 407-415.
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G.A., Chang, D., Hong, A. & Chang, K. (1980) Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, **106**, 663-667.
- Bowers, C.Y., Momany, F.A., Reynolds, G.A. & Hong, A. (1984) On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, **114**, 1537-1545.

- Brice, N.L., Berrow, N.S., Campbell, V., Page, K.M., Brickley, K., Tedder, I. & Dolphin, A.C. (1997) Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody. *The European journal of neuroscience*, **9**, 749-759.
- Cabral, A., Suescun, O., Zigman, J.M. & Perello, M. (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS one*, **7**, e31462.
- Cain, S.M. & Snutch, T.P. (2010) Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels*, **4**, 475-482.
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Hebllich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A. & Dolphin, A.C. (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 11230-11235.
- Carbone, E. & Lux, H.D. (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*, **310**, 501-502.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology*, **16**, 521-555.
- Cazade, M., Bidaud, I., Lory, P. & Chemin, J. (2017) Activity-dependent regulation of T-type calcium channels by submembrane calcium ions. *eLife*, **6**.
- Clapham, D.E. & Neer, E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **37**, 167-203.
- Cohen, S.N. (1974) Transformation of Escherichia coli by recombinant plasmid replicons constructed in vitro *Mechanisms in Recombination*. Springer, pp. 155-165.
- Cornet, V., Bichet, D., Sandoz, G., Marty, I., Brocard, J., Bourinet, E., Mori, Y., Villaz, M. & De Waard, M. (2002) Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *The European journal of neuroscience*, **16**, 883-895.
- Cottrell, G.S., Soubrane, C.H., Hounshell, J.A., Lin, H., Owenson, V., Rigby, M., Cox, P.J., Barker, B.S., Ottolini, M., Ince, S., Bauer, C.C., Perez-Reyes, E., Patel, M.K., Stevens, E.B. & Stephens, G.J. (2018) CACHD1 is an alpha2delta-Like Protein That Modulates CaV3 Voltage-Gated Calcium Channel Activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **38**, 9186-9201.

- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D. & Horvath, T.L. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, **37**, 649-661.
- Crunelli, V., Toth, T.I., Cope, D.W., Blethyn, K. & Hughes, S.W. (2005) The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. *The Journal of physiology*, **562**, 121-129.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J. & Lory, P. (2002) Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ($\alpha(1G)$, $\alpha(1H)$ and $\alpha(1I)$) to neuronal excitability. *The Journal of physiology*, **540**, 3-14.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Nargeot, J. & Lory, P. (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *The EMBO journal*, **20**, 7033-7040.
- Chemin, J., Stamenic, T.T., Cazade, M., Llinares, J., Blesneac, I., Todorovic, S.M. & Lory, P. (2019) A novel phospho-modulatory mechanism contributes to the calcium-dependent regulation of T-type $Ca(2+)$ channels. *Scientific reports*, **9**, 15642.
- Chien, A.J., Carr, K.M., Shirokov, R.E., Rios, E. & Hosey, M.M. (1996) Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel $\beta 2a$ subunit and effects on channel function. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 26465-26468.
- Chien, A.J., Gao, T., Perez-Reyes, E. & Hosey, M.M. (1998) Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the $\beta 2a$ subunit. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 23590-23597.
- Chien, A.J., Zhao, X., Shirokov, R.E., Puri, T.S., Chang, C.F., Sun, D., Rios, E. & Hosey, M.M. (1995) Roles of a membrane-localized β subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca^{2+} channels. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 30036-30044.
- Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D.K., Narita, K., Wheatley, C.L., Marks, D.L. & Pagano, R.E. (2002) Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *The Journal of clinical investigation*, **109**, 1541-1550.
- Chow, K.B., Sun, J., Chu, K.M., Tai Cheung, W., Cheng, C.H. & Wise, H. (2012) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Molecular and cellular endocrinology*, **348**, 247-254.

- Damian, M., Mary, S., Maingot, M., M'Kadmi, C., Gagne, D., Leyris, J.P., Denoyelle, S., Gaibelet, G., Gavara, L., Garcia de Souza Costa, M., Perahia, D., Trinquet, E., Mouillac, B., Galandrin, S., Gales, C., Fehrentz, J.A., Floquet, N., Martinez, J., Marie, J. & Baneres, J.L. (2015) Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 1601-1606.
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C.S., Pratt, W.S. & Dolphin, A.C. (2010) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 1654-1659.
- De Jongh, K.S., Warner, C. & Catterall, W.A. (1990) Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 14738-14741.
- De Waard, M., Pragnell, M. & Campbell, K.P. (1994) Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron*, **13**, 495-503.
- DePuy, S.D., Yao, J., Hu, C., McIntire, W., Bidaud, I., Lory, P., Rastinejad, F., Gonzalez, C., Garrison, J.C. & Barrett, P.Q. (2006) The molecular basis for T-type Ca²⁺ channel inhibition by G protein beta2gamma2 subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14590-14595.
- Destexhe, A., Contreras, D., Steriade, M., Sejnowski, T.J. & Huguenard, J.R. (1996) In vivo, in vitro, and computational analysis of dendritic calcium currents in thalamic reticular neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 169-185.
- Diano, S., Farr, S.A., Benoit, S.C., McNay, E.C., da Silva, I., Horvath, B., Gaskin, F.S., Nonaka, N., Jaeger, L.B., Banks, W.A., Morley, J.E., Pinto, S., Sherwin, R.S., Xu, L., Yamada, K.A., Sleeman, M.W., Tschop, M.H. & Horvath, T.L. (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience*, **9**, 381-388.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M. & Greenberg, M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, **294**, 333-339.
- Dolphin, A.C. (2003a) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **35**, 599-620.

- Dolphin, A.C. (2003b) G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, **55**, 607-627.
- Dolphin, A.C. (2012) Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nature reviews. Neuroscience*, **13**, 542-555.
- Dolphin, A.C. (2016) Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of physiology*, **594**, 5369-5390.
- Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G. & Perez-Reyes, E. (1999) The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *The Journal of physiology*, **519 Pt 1**, 35-45.
- Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. & Nargeot, J. (2004) Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 29263-29269.
- Dunlap, K. & Fischbach, G.D. (1978) Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature*, **276**, 837-839.
- Dunlap, K. & Fischbach, G.D. (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *The Journal of physiology*, **317**, 519-535.
- Eason, M.G., Kurose, H., Holt, B.D., Raymond, J.R. & Liggett, S.B. (1992) Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 15795-15801.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. & Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25**, 533-535.
- Evans, R.M., You, H., Hameed, S., Altier, C., Mezghrani, A., Bourinet, E. & Zamponi, G.W. (2010) Heterodimerization of ORL1 and opioid receptors and its consequences for N-type calcium channel regulation. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 1032-1040.
- Fang, K. & Colecraft, H.M. (2011) Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca(V)1.2) channels. *The Journal of physiology*, **589**, 4437-4455.

- Farajdokht, F., Mohaddes, G., Shanehbandi, D., Karimi, P. & Babri, S. (2018) Ghrelin attenuated hyperalgesia induced by chronic nitroglycerin: CGRP and TRPV1 as targets for migraine management. *Cephalalgia : an international journal of headache*, **38**, 1716-1730.
- Findeisen, F., Campiglio, M., Jo, H., Abderemane-Ali, F., Rumpf, C.H., Pope, L., Rossen, N.D., Flucher, B.E., DeGrado, W.F. & Minor, D.L., Jr. (2017) Stapled Voltage-Gated Calcium Channel (CaV) alpha-Interaction Domain (AID) Peptides Act As Selective Protein-Protein Interaction Inhibitors of CaV Function. *ACS chemical neuroscience*, **8**, 1313-1326.
- Fletcher, J.E., Lindorfer, M.A., DeFilippo, J.M., Yasuda, H., Guilford, M. & Garrison, J.C. (1998) The G protein beta5 subunit interacts selectively with the Gq alpha subunit. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 636-644.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J. & Caron, M.G. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual review of neuroscience*, **27**, 107-144.
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M.L., Sako, H., Green, S.A., Dascal, N., Scott, J.D. & Hosey, M.M. (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron*, **19**, 185-196.
- Ge, X., Yang, H., Bednarek, M.A., Galon-Tilleman, H., Chen, P., Chen, M., Lichtman, J.S., Wang, Y., Dalmas, O., Yin, Y., Tian, H., Jermutus, L., Grimsby, J., Rondinone, C.M., Konkar, A. & Kaplan, D.D. (2018) LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell metabolism*, **27**, 461-469 e466.
- Gether, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews*, **21**, 90-113.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimousin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Gadella, T.W., Jr. & Royant, A. (2012) Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature communications*, **3**, 751.
- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L. & Dolmetsch, R. (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)_{1.2} encodes a transcription factor. *Cell*, **127**, 591-606.
- Gomora, J.C., Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.H. & Perez-Reyes, E. (2002) Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)_{3.3}: insights into prepulse facilitation. *Biophysical journal*, **83**, 229-241.

- Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Neely, A. & Hidalgo, P. (2007) The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 2156-2162.
- Gray, A.C., Raingo, J. & Lipscombe, D. (2007) Neuronal calcium channels: splicing for optimal performance. *Cell calcium*, **42**, 409-417.
- Hamed, S.A. (2008) Neuroendocrine hormonal conditions in epilepsy: relationship to reproductive and sexual functions. *The neurologist*, **14**, 157-169.
- Hanlon, M.R., Berrow, N.S., Dolphin, A.C. & Wallace, B.A. (1999) Modelling of a voltage-dependent Ca²⁺ channel beta subunit as a basis for understanding its functional properties. *FEBS letters*, **445**, 366-370.
- Hardingham, G.E., Arnold, F.J. & Bading, H. (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature neuroscience*, **4**, 261-267.
- Helmling, S., Maasch, C., Eulberg, D., Buchner, K., Schroder, W., Lange, C., Vonhoff, S., Wlotzka, B., Tschop, M.H., Rosewicz, S. & Klussmann, S. (2004) Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 13174-13179.
- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **380**, 258-262.
- Hermans, E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics*, **99**, 25-44.
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H. & Surmeier, D.J. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 8987-8995.
- Heron, S.E., Khosravani, H., Varela, D., Bladen, C., Williams, T.C., Newman, M.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Mulley, J.C. & Zamponi, G.W. (2007) Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Annals of neurology*, **62**, 560-568.
- Hess, P., Lansman, J.B. & Tsien, R.W. (1984) Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature*, **311**, 538-544.

- Heximer, S.P., Watson, N., Linder, M.E., Blumer, K.J. & Hepler, J.R. (1997) RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 14389-14393.
- Hildebrand, M.E., David, L.S., Hamid, J., Mulatz, K., Garcia, E., Zamponi, G.W. & Snutch, T.P. (2007) Selective inhibition of Cav3.3 T-type calcium channels by Galphaq/11-coupled muscarinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 21043-21055.
- Hille, B. (2001) Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates. *Sunderland, MA*, **1375**.
- Hines, M.L. & Carnevale, N.T. (1997) The NEURON simulation environment. *Neural computation*, **9**, 1179-1209.
- Hofmann, F., Biel, M. & Flockerzi, V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annual review of neuroscience*, **17**, 399-418.
- Holst, B., Brandt, E., Bach, A., Heding, A. & Schwartz, T.W. (2005) Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Molecular endocrinology*, **19**, 2400-2411.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T.H., Ankersen, M. & Schwartz, T.W. (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Molecular endocrinology*, **17**, 2201-2210.
- Holst, B., Holliday, N.D., Bach, A., Elling, C.E., Cox, H.M. & Schwartz, T.W. (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 53806-53817.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.S., Chaung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., DeMartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G. & Van der Ploeg, L.H. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, **273**, 974-977.
- Howe, A.R. & Surmeier, D.J. (1995) Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **15**, 458-469.

- Huang, L., Shanker, Y.G., Dubauskaite, J., Zheng, J.Z., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A.I., Max, M. & Margolskee, R.F. (1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nature neuroscience*, **2**, 1055-1062.
- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V.N., Renger, J.J., Dolphin, A.C. & Shah, M.M. (2011) Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nature neuroscience*, **14**, 478-486.
- Huguenard, J.R. (1998) Low-voltage-activated (T-type) calcium-channel genes identified. *Trends in neurosciences*, **21**, 451-452.
- Iftinca, M.C. (2011) Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation. *Journal of medicine and life*, **4**, 126-138.
- Ikeda, S.R. (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. & Japan Growth Genome, C. (2011) Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **96**, E373-378.
- Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S.D., Vedvick, T.S., Harpold, M.M. & Campbell, K.P. (1991) Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 3287-3293.
- Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S.L., Andersson, M., Svensson, L. & Engel, J.A. (2006) Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addiction biology*, **11**, 45-54.
- Josephson, I.R. & Varadi, G. (1996) The beta subunit increases Ca²⁺ currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Biophysical journal*, **70**, 1285-1293.
- Kammermeier, P.J. & Ikeda, S.R. (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.
- Karmazinova, M., Beyl, S., Stary-Weinzinger, A., Suwattanasophon, C., Klugbauer, N., Hering, S. & Lacinova, L. (2010) Cysteines in the loop between IS5 and the pore helix of Ca(V)₃.1 are essential for channel gating. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **460**, 1015-1028.

- Kenakin, T.P. (2012) Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *British journal of pharmacology*, **165**, 1659-1669.
- Khanna, R., Yu, J., Yang, X., Moutal, A., Chefdeville, A., Gokhale, V., Shuja, Z., Chew, L.A., Bellampalli, S.S., Luo, S., Francois-Moutal, L., Serafini, M.J., Ha, T., Perez-Miller, S., Park, K.D., Patwardhan, A.M., Streicher, J.M., Colecraft, H.M. & Khanna, M. (2019) Targeting the CaV α -CaV β interaction yields an antagonist of the N-type CaV2.2 channel with broad antinociceptive efficacy. *Pain*, **160**, 1644-1661.
- Kisilevsky, A.E., Mulligan, S.J., Altier, C., Iftinca, M.C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B.A. & Zamponi, G.W. (2008) D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*, **58**, 557-570.
- Kisilevsky, A.E. & Zamponi, G.W. (2008) D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels*, **2**, 269-277.
- Klockner, U., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Daud, A., Hescheler, J., Pereverzev, A., Perez-Reyes, E. & Schneider, T. (1999) Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned α 1 subunits, α 1G, α 1H and α 1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *The European journal of neuroscience*, **11**, 4171-4178.
- 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.
- Korbonits, M., Goldstone, A.P., Gueorguiev, M. & Grossman, A.B. (2004) Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, **25**, 27-68.
- Latour, I., Louw, D.F., Beedle, A.M., Hamid, J., Sutherland, G.R. & Zamponi, G.W. (2004) Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. *Glia*, **48**, 112-119.
- Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. & Perez-Reyes, E. (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α 1H. *Biophysical journal*, **77**, 3034-3042.
- Leroy, J., Richards, M.W., Butcher, A.J., Nieto-Rostro, M., Pratt, W.S., Davies, A. & Dolphin, A.C. (2005) Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for β 1 but not for palmitoylated β 2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 6984-6996.

- Leuranguer, V., Bourinet, E., Lory, P. & Nargeot, J. (1998) Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology*, **37**, 701-708.
- Lin, Y.C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. & Callewaert, N. (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature communications*, **5**, 4767.
- Liu, K., Jiang, D., Zhang, T., Tao, J., Shen, L. & Sun, X. (2011) Activation of growth hormone secretagogue type 1a receptor inhibits T-type Ca²⁺ channel currents through pertussis toxin-sensitive novel protein kinase C pathway in mouse spermatogenic cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, **27**, 613-624.
- Lopez Soto, E.J., Agosti, F., Cabral, A., Mustafa, E.R., Damonte, V.M., Gandini, M.A., Rodriguez, S., Castrogiovanni, D., Felix, R., Perello, M. & Raingo, J. (2015) Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *The Journal of general physiology*, **146**, 205-219.
- Lu, L., Sirish, P., Zhang, Z., Woltz, R.L., Li, N., Timofeyev, V., Knowlton, A.A., Zhang, X.D., Yamoah, E.N. & Chiamvimonvat, N. (2015) Regulation of gene transcription by voltage-gated L-type calcium channel, Cav1.3. *The Journal of biological chemistry*, **290**, 4663-4676.
- Llinas, R.R., Sugimori, M. & Cherksey, B. (1989) Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **560**, 103-111.
- M'Kadmi, C., Cabral, A., Barrile, F., Giribaldi, J., Cantel, S., Damian, M., Mary, S., Denoyelle, S., Dutertre, S., Peraldi-Roux, S., Neasta, J., Oiry, C., Baneres, J.L., Marie, J., Perello, M. & Fehrentz, J.A. (2019) N-Terminal Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2 (LEAP2) Region Exhibits Inverse Agonist Activity toward the Ghrelin Receptor. *Journal of medicinal chemistry*, **62**, 965-973.
- M'Kadmi, C., Leyris, J.P., Onfroy, L., Gales, C., Sauliere, A., Gagne, D., Damian, M., Mary, S., Maingot, M., Denoyelle, S., Verdie, P., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Baneres, J.L. & Marie, J. (2015) Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *The Journal of biological chemistry*, **290**, 27021-27039.
- Magee, J.C. & Johnston, D. (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science*, **268**, 301-304.

- Makita, N. & Iiri, T. (2014) Biased agonism: a novel paradigm in G protein-coupled receptor signaling observed in acquired hypocalciuric hypercalcemia. *Endocrine journal*, **61**, 303-309.
- Mao, Y., Li, Z., Chen, K., Yu, H., Zhang, S., Jiang, M., Ma, Y., Liang, C., Liu, H., Li, H., Hua, Q., Zhou, H., Sun, Y. & Fan, X. (2017) Antinociceptive Effect of Ghrelin in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome Involves TRPV1/Opioid Systems. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, **43**, 518-530.
- Marangoudakis, S., Andrade, A., Helton, T.D., Denome, S., Castiglioni, A.J. & Lipscombe, D. (2012) Differential ubiquitination and proteasome regulation of Ca(V)2.2 N-type channel splice isoforms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 10365-10369.
- Martinez Damonte, V., Rodriguez, S.S. & Raingo, J. (2018) Growth hormone secretagogue receptor constitutive activity impairs voltage-gated calcium channel-dependent inhibitory neurotransmission in hippocampal neurons. *The Journal of physiology*, **596**, 5415-5428.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P. & Willard, F.S. (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **62**, 551-577.
- McKee, K.K., Palyha, O.C., Feighner, S.D., Hreniuk, D.L., Tan, C.P., Phillips, M.S., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H. & Howard, A.D. (1997) Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Molecular endocrinology*, **11**, 415-423.
- Meir, A., Bell, D.C., Stephens, G.J., Page, K.M. & Dolphin, A.C. (2000) Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. *Biophysical journal*, **79**, 731-746.
- Meyer, J.O., Dahimene, S., Page, K.M., Ferron, L., Kadurin, I., Ellaway, J.I.J., Zhao, P., Patel, T., Rothwell, S.W., Lin, P., Pratt, W.S. & Dolphin, A.C. (2019) Disruption of the Key Ca(2+) Binding Site in the Selectivity Filter of Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels Inhibits Channel Trafficking. *Cell reports*, **29**, 22-33 e25.
- Mintz, I.M., Adams, M.E. & Bean, B.P. (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*, **9**, 85-95.
- Miranda-Laferte, E., Ewers, D., Guzman, R.E., Jordan, N., Schmidt, S. & Hidalgo, P. (2014) The N-terminal domain tethers the voltage-gated calcium channel beta2e-subunit to the plasma membrane via electrostatic and hydrophobic interactions. *The Journal of biological chemistry*, **289**, 10387-10398.

- Miranda-Laferte, E., Gonzalez-Gutierrez, G., Schmidt, S., Zeug, A., Ponimaskin, E.G., Neely, A. & Hidalgo, P. (2011) Homodimerization of the Src homology 3 domain of the calcium channel beta-subunit drives dynamin-dependent endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 22203-22210.
- Mlinar, B. & Enyeart, J.J. (1993) Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *The Journal of physiology*, **469**, 639-652.
- Morgenstern, T.J., Park, J., Fan, Q.R. & Colecraft, H.M. (2019) A potent voltage-gated calcium channel inhibitor engineered from a nanobody targeted to auxiliary CaVbeta subunits. *eLife*, **8**.
- Muller, T.H., Misgeld, U. & Swandulla, D. (1992) Ionic currents in cultured rat hypothalamic neurones. *The Journal of physiology*, **450**, 341-362.
- Murbartian, J., Arias, J.M. & Perez-Reyes, E. (2004) Functional impact of alternative splicing of human T-type Cav3.3 calcium channels. *Journal of neurophysiology*, **92**, 3399-3407.
- Mustafa, E.R., Lopez Soto, E.J., Martinez Damonte, V., Rodriguez, S.S., Lipscombe, D. & Raingo, J. (2017) Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca(2+) channels in a CaVbeta-dependent manner. *Journal of cell science*, **130**, 3907-3917.
- 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.
- Nelson, M.T., Todorovic, S.M. & Perez-Reyes, E. (2006) The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Current pharmaceutical design*, **12**, 2189-2197.
- Neve, K. (2009) *Functional selectivity of G protein-coupled receptor ligands: new opportunities for drug discovery*. Springer Science & Business Media.
- Notcovich, C., Diez, F., Tubio, M.R., Baldi, A., Kazanietz, M.G., Davio, C. & Shayo, C. (2010) Histamine acting on H1 receptor promotes inhibition of proliferation via PLC, RAC, and JNK-dependent pathways. *Experimental cell research*, **316**, 401-411.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P. & Tsien, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, **316**, 440-443.
- Olcese, R., Qin, N., Schneider, T., Neely, A., Wei, X., Stefani, E. & Birnbaumer, L. (1994) The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron*, **13**, 1433-1438.

- Oldham, W.M. & Hamm, H.E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 60-71.
- Olson, P.A., Tkatch, T., Hernandez-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., Zhang, H., Bezprozvanny, I. & Surmeier, D.J. (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels is dependent on a Shank-binding domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 1050-1062.
- Pantel, J., Legendre, M., Cabrol, S., Hilal, L., Hajaji, Y., Morisset, S., Nivot, S., Vie-Luton, M.P., 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. *The Journal of clinical investigation*, **116**, 760-768.
- Pazos, Y., Casanueva, F.F. & Camina, J.P. (2007) Basic aspects of ghrelin action. *Vitamins & Hormones*, **77**, 89-119.
- Perez-Reyes, E. (2003a) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews*, **83**, 117-161.
- Perez-Reyes, E. (2003b) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews*, **83**, 117-161.
- Petersenn, S., Rasch, A.C., Penschorn, M., Beil, F.U. & Schulte, H.M. (2001) Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, **142**, 2649-2659.
- Powell, K.L., Cain, S.M., Ng, C., Sirdesai, S., David, L.S., Kyi, M., Garcia, E., Tyson, J.R., Reid, C.A., Bahlo, M., Foote, S.J., Snutch, T.P. & O'Brien, T.J. (2009) A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 371-380.
- Powell, K.L., Cain, S.M., Snutch, T.P. & O'Brien, T.J. (2014) Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. *British journal of clinical pharmacology*, **77**, 729-739.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P. & Campbell, K.P. (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature*, **368**, 67-70.

- Proft, J., Rzhetsky, Y., Lazniewska, J., Zhang, F.X., Cain, S.M., Snutch, T.P., Zamponi, G.W. & Weiss, N. (2017) The Cacna1h mutation in the GAERS model of absence epilepsy enhances T-type Ca²⁺ currents by altering calnexin-dependent trafficking of Cav3.2 channels. *Scientific reports*, **7**, 11513.
- Qiu, J., Bosch, M.A., Jamali, K., Xue, C., Kelly, M.J. & Ronnekleiv, O.K. (2006) Estrogen upregulates T-type calcium channels in the hypothalamus and pituitary. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 11072-11082.
- Raino, J., Castiglioni, A.J. & 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, Y.C., Ramirez, D.M., Adachi, M., Lemieux, P., Toth, K., Davletov, B. & Kavalali, E.T. (2012) VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nature neuroscience*, **15**, 738-745.
- Rajagopal, S., Rajagopal, K. & Lefkowitz, R.J. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Drug discovery*, **9**, 373-386.
- Randall, A. & Tsien, R.W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **15**, 2995-3012.
- Rangel, A., Sanchez-Armass, S. & Meza, U. (2010) Protein kinase C-mediated inhibition of recombinant T-type Cav3.2 channels by neurokinin 1 receptors. *Molecular pharmacology*, **77**, 202-210.
- Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L.M. & Robishaw, J.D. (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 21765-21771.
- Reuter, H. (1983) Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature*, **301**, 569-574.
- Rhee, S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual review of biochemistry*, **70**, 281-312.
- Ribeiro, L.F., Catarino, T., Santos, S.D., Benoist, M., van Leeuwen, J.F., Esteban, J.A. & Carvalho, A.L. (2014) Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, E149-158.

- Richards, M.W., Leroy, J., Pratt, W.S. & Dolphin, A.C. (2007) The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of Cavbeta subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation. *Channels*, **1**, 92-101.
- Rougier, J.S., Albesa, M., Abriel, H. & Viard, P. (2011) Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1 (NEDD4-1) controls the sorting of newly synthesized Ca(V)1.2 calcium channels. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 8829-8838.
- Rousset, M., Cens, T., Menard, C., Bowerman, M., Bellis, M., Bruses, J., Raoul, C., Scamps, F. & Charnet, P. (2015) Regulation of neuronal high-voltage activated Ca(V)₂ Ca(2+) channels by the small GTPase RhoA. *Neuropharmacology*, **97**, 201-209.
- Roy, A.A., Baragli, A., Bernstein, L.S., Hepler, J.R., Hebert, T.E. & Chidiac, P. (2006) RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. *Cellular signalling*, **18**, 336-348.
- Roy, A.A., Lemberg, K.E. & Chidiac, P. (2003) Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions. *Molecular pharmacology*, **64**, 587-593.
- Sato, J., Makita, N. & Iiri, T. (2016) Inverse agonism: the classic concept of GPCRs revisited [Review]. *Endocrine journal*, **63**, 507-514.
- Schalla, M.A. & Stengel, A. (2019) LEAP2: A novel regulator of food intake and body weight? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1-2.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, **9**, 676-682.
- Seim, I., El-Salhy, M., Hausken, T., Gundersen, D. & Chopin, L. (2012) Ghrelin and the brain-gut axis as a pharmacological target for appetite control. *Current pharmaceutical design*, **18**, 768-775.
- 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. *Nature communications*, **4**, 1435.
- Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S. & Wakabayashi, I. (2002) Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *The Journal of clinical investigation*, **109**, 1429-1436.

- Siehl, S. (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British journal of pharmacology*, **158**, 41-49.
- Simms, B.A. & Zamponi, G.W. (2012) Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **69**, 843-856.
- Smrcka, A.V. (2008) G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **65**, 2191-2214.
- Snutch, T.P. & Zamponi, G.W. (2018) Recent advances in the development of T-type calcium channel blockers for pain intervention. *British journal of pharmacology*, **175**, 2375-2383.
- Spruston, N., Schiller, Y., Stuart, G. & Sakmann, B. (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science*, **268**, 297-300.
- Stamboulian, S., Kim, D., Shin, H.S., Ronjat, M., De Waard, M. & Arnoult, C. (2004) Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3. 1 (α 1G) calcium channel: CaV3. 2 (α 1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *Journal of cellular physiology*, **200**, 116-124.
- Stea, A., Tomlinson, W.J., Soong, T.W., Bourinet, E., Dubel, S.J., Vincent, S.R. & Snutch, T.P. (1994) Localization and functional properties of a rat brain alpha 1A calcium channel reflect similarities to neuronal Q- and P-type channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10576-10580.
- Strange, P.G. (2002) Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, **23**, 89-95.
- Surmeier, D.J.,argas, J., Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C. & Greengard, P. (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, **14**, 385-397.
- Talavera, K. & Nilius, B. (2006) Evidence for common structural determinants of activation and inactivation in T-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **453**, 189-201.
- Tao, J., Hildebrand, M.E., Liao, P., Liang, M.C., Tan, G., Li, S., Snutch, T.P. & Soong, T.W. (2008) Activation of corticotropin-releasing factor receptor 1 selectively inhibits CaV3.2 T-type calcium channels. *Molecular pharmacology*, **73**, 1596-1609.

- Tedford, H.W. & Zamponi, G.W. (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacological reviews*, **58**, 837-862.
- Thaler, C., Gray, A.C. & Lipscombe, D. (2004) Cumulative inactivation of N-type CaV2.2 calcium channels modified by alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 5675-5679.
- Thomas, G., Chung, M. & Cohen, C.J. (1985) A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circulation research*, **56**, 87-96.
- Tschop, M., Smiley, D.L. & Heiman, M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**, 908-913.
- Tsien, R. (1983) Calcium channels in excitable cell membranes. *Annual review of physiology*, **45**, 341-358.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. & Fox, A.P. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in neurosciences*, **11**, 431-438.
- Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. & Minor, D.L., Jr. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*, **429**, 671-675.
- Van Petegem, F., Duderstadt, K.E., Clark, K.A., Wang, M. & Minor, D.L., Jr. (2008) Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaValpha1 AID-CaVbeta interaction site that is critical for channel modulation. *Structure*, **16**, 280-294.
- Vassart, G. & Costagliola, S. (2011) G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nature reviews. Endocrinology*, **7**, 362-372.
- Waithe, D., Ferron, L., Page, K.M., Chaggar, K. & Dolphin, A.C. (2011) Beta-subunits promote the expression of Ca(V)2.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 9598-9611.
- Wang, H., Wei, Y., Pu, Y., Jiang, D., Jiang, X., Zhang, Y. & Tao, J. (2019) Brain-derived neurotrophic factor stimulation of T-type Ca(2+) channels in sensory neurons contributes to increased peripheral pain sensitivity. *Science signaling*, **12**.
- West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X. & Greenberg, M.E. (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 11024-11031.

- Wolfe, J.T., Wang, H., Howard, J., Garrison, J.C. & Barrett, P.Q. (2003) T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature*, **424**, 209-213.
- Wyatt, C.N., Page, K.M., Berrow, N.S., Brice, N.L. & Dolphin, A.C. (1998) The effect of overexpression of auxiliary Ca²⁺ channel subunits on native Ca²⁺ channel currents in undifferentiated mammalian NG108-15 cells. *The Journal of physiology*, **510 (Pt 2)**, 347-360.
- Yeon, J.H., Park, C.G., Hille, B. & Suh, B.C. (2018) Translocatable voltage-gated Ca(2+) channel beta subunits in alpha1-beta complexes reveal competitive replacement yet no spontaneous dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, E9934-E9943.
- You, H., Altier, C. & Zamponi, G.W. (2010) CCR2 receptor ligands inhibit Cav3.2 T-type calcium channels. *Molecular pharmacology*, **77**, 211-217.
- Yunker, A.M., Sharp, A.H., Sundarraj, S., Ranganathan, V., Copeland, T.D. & McEnery, M.W. (2003) Immunological characterization of T-type voltage-dependent calcium channel CaV3.1 (alpha 1G) and CaV3.3 (alpha 1I) isoforms reveal differences in their localization, expression, and neural development. *Neuroscience*, **117**, 321-335.
- Zamponi, G.W., Bourinet, E. & Snutch, T.P. (1996) Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *The Journal of membrane biology*, **151**, 77-90.
- Zamponi, G.W. & Currie, K.P. (2013) Regulation of Ca(V)₂ calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta*, **1828**, 1629-1643.
- Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L. & Tsien, R.W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*, **32**, 1075-1088.
- Zhang, Y., Jiang, X., Snutch, T.P. & Tao, J. (2013) Modulation of low-voltage-activated T-type Ca(2+)(+) channels. *Biochimica et biophysica acta*, **1828**, 1550-1559.
- Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, D., Zhang, D., Qian, Z., Liu, C. & Tao, J. (2012) Inhibition of T-type Ca(2+)(+) channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *British journal of pharmacology*, **166**, 1247-1260.

Zigman, J.M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J.N., Lee, C.E., Jones, J.E., Deysher, A.E., Waxman, A.R., White, R.D., Williams, T.D., Lachey, J.L., Seeley, R.J., Lowell, B.B. & Elmquist, J.K. (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation*, **115**, 3564-3572.

Zurek, N., Sparks, L. & Voeltz, G. (2011) Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules. *Traffic*, **12**, 28-41.