

15. Biofísica

La actividad constitutiva del receptor de ghrelina reduce la expresión en superficie de los canales de Ca^{2+} (Ca_v) dependientes de voltaje de manera dependiente de $Ca_v\beta$

Autor: Mustafá, Emilio Román; eromanm90@gmail.com.

Orientador: Raingo, Jesica; jraingo@gmail.com.

Laboratorio de Electrofisiología/ Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) -
CIC-CONICET-UNLP.

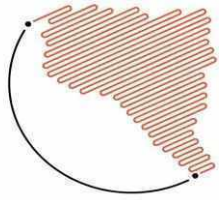
Departamento de Ciencias Biológicas/ Cátedra de Microbiología/ Facultad de Ciencias
Exactas.

Universidad Nacional de La Plata

Resumen

Los canales de calcio (Ca^{+2}) dependientes del voltaje (Ca_v) acoplan la despolarización de la membrana al influjo de Ca^{+2} , lo que desencadena una serie de procesos celulares dependientes de Ca^{+2} . Los Ca_v son, por lo tanto, cruciales en la configuración de la actividad y función neuronal, dependiendo de sus propiedades temporales y espaciales individuales. Además, muchos neurotransmisores y fármacos que actúan a través de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), modulan la actividad neuronal al alterar la expresión, el tráfico o la función de los Ca_v . El objetivo del actual trabajo es entender el mecanismo a través del cual el receptor de la hormona orexigénica ghrelina (GHSR1a, por sus siglas en Inglés *growth hormone secretagogue receptor type 1a*) regula la densidad de Ca_v en la superficie celular. Nuestros resultados indican que GHSR puede inhibir el tráfico hacia la membrana plasmática de varios subtipos de Ca_v , incluso en ausencia de su agonista natural, a través de su actividad constitutiva. Esta forma crónica de inhibición del GPCR sobre los Ca_v depende de la presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$. Esto se demostró tanto en cultivos neuronales primarios hipotalámicos como en sistemas de expresión heterólogos, utilizando electrofisiología de patch clamp y microscopía confocal para examinar las ubicaciones sub-celulares de proteínas marcadas. El efecto de la actividad constitutiva de GHSR en el tráfico de los Ca_v sugiere un papel para esta vía de señalización en áreas del cerebro que controlan la ingesta de alimentos, la recompensa, el aprendizaje y la memoria donde el mismo se expresa.

Palabras claves: canales, calcio, GHSR.

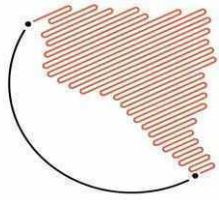


Introducción

Los canales de calcio (Ca^{2+}) operados por voltaje (Ca_V) son proteínas tipo canal iónico selectivas a Ca^{2+} fundamentales en la función neuronal debido a que acoplan la despolarización de la membrana plasmática con aumentos de Ca^{2+} intracelular, traduciendo información eléctrica en una señal química universal. Así, la sublocalización de los distintos subtipos de Ca_V hace que sean capaces de modular procesos neuronales importantes como la transcripción genética (Wheeler, Barrett, Groth, Safa, & Tsien, 2008) (influjo de Ca^{2+} a través de los Ca_V1 en el soma y las dendritas) y liberación de neurotransmisores (Catterall & Few, 2008; Dunlap, Luebke, & Turner, 1995; Pan & Zucker, 2009) (influjo de Ca^{2+} en las terminales axónicas de los Ca_V2). Por otro lado, los Ca_V3 , capaces de abrirse a potenciales más negativos que los Ca_V1 y Ca_V2 contribuyen mediante el influjo de la corriente de calcio positiva entrante y por lo tanto despolarizante, a la forma y a la frecuencia de potenciales de acción en el axón (McKay et al., 2006; Molineux et al., 2006; Perez-Reyes, 2003; Xu & Lipscombe, 2001). Los subtipos de canales Ca_V1 y Ca_V2 son complejos hetero-oligoméricos compuestos por una subunidad principal $\text{Ca}_V\alpha_1$ formadora del poro, y subunidades auxiliares: $\text{Ca}_V\beta$ y $\text{Ca}_V\alpha_2\delta$. Ambas regulan la expresión y el tráfico hacia la membrana plasmática del

complejo canal, y modulan propiedades cinéticas de los Ca_V (Dolphin, 2012; Felix, Calderon-Rivera, & Andrade, 2013). El subtipo de canales Ca_V3 migra hacia a la membrana plasmática sin la necesidad de subunidades auxiliares (Bichet et al., 2000; De Waard, Pragnell, & Campbell, 1994; Fang & Colecraft, 2011), a diferencia de los Ca_V1 y Ca_V2 .

La actividad de los Ca_V es modulada por múltiples proteínas, entre ellas, los receptores acoplados a proteína G (GPCR). En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que la actividad constitutiva (actividad en ausencia de agonista) del receptor de la hormona ghrelina (GHSR1a, por sus siglas en Inglés *Growth hormone secretagogue receptor type 1a*) modula negativamente los Ca_V2 en neuronas hipotalámicas y en un sistema de expresión heterólogo (Lopez Soto et al., 2015). Hallamos que la sola co-expresión en células HEK293T de GHSR con $\text{Ca}_V2.1$ o $\text{Ca}_V2.2$ reduce la amplitud de la corriente a niveles muy bajos. Dicho efecto es causado por la actividad constitutiva del receptor dado que utilizando un agonista inverso de GHSR, un análogo de la sustancia P (SPA, de sus siglas en Inglés *substance-P analog*), o un mutante puntual de GHSR-A204E (carente de actividad constitutiva) (Inoue et al., 2011; Pantel et al., 2006) reestablecimos la amplitud de la corriente de los Ca_V2 a los niveles del control donde



no se expresaba el receptor. Además, GHSR expresado a niveles nativos es suficiente para disminuir la amplitud de las corrientes de calcio endógenas 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).

Objetivos

En el siguiente trabajo tendremos como objetivos contrastar las siguientes hipótesis: 1)- sobre la selectividad de la acción de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v proponemos que: la actividad constitutiva actúa modulando el tráfico de los Ca_v a través de las subunidades auxiliares y por lo tanto este efecto se extendería a todos los Ca_v que formen complejos hetero-oligoméricos con dichas subunidades; 2)- para el mecanismo de acción de la actividad constitutiva de GHSR sobre la densidad de canales Ca_v2 en la membrana plasmática proponemos dos hipótesis: (i) la actividad constitutiva disminuye el tráfico de los Ca_v2 a membrana plasmática desde el retículo endoplásmico, promoviendo su degradación en el interior celular por el proteasoma y/o (ii) la actividad constitutiva promueve la internalización de los Ca_v2

desde la membrana plasmática a hacia el sistema de endosomas, iniciando su degradación por el sistema de lisosomas.

Materiales y métodos

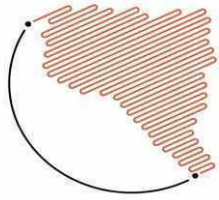
1- Modelos experimentales

1.1- Cultivo celular

La línea celular HEK293t fue utilizada como modelo de estudio en este trabajo. Dicha línea deriva de la línea HEK293 (de las siglas en inglés para *Human Embryo Kidney 293*) y fue generada mediante la transformación con adenovirus de un cultivo de células embrionarias de riñón humano. Esta versión posee el gen sensible a la temperatura para el antígeno T del virus SV40 (de las siglas en Inglés *Simian Virus 40*) y constituye una línea celular altamente transfectable y de uso frecuente 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 y la Dra. Raingo posee documentada experiencia en su uso. 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, EE.UU, e intentando minimizar el sufrimiento animal en cuanto fue posible.

Utilizamos ratones C57BL/6 salvajes y ratones deficientes en el receptor de ghrelina (Zigman et al., 2005) que derivan de cruza entre animales heterocigotas retrocruzados por más de diez generaciones. Ratones de ambos sexos fueron criados 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*. La identificación genotípica de los ratones fue realizada mediante una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa PCR (de las siglas en Inglés para *polimerase chain reaction*) de secuencias específicas utilizando como molde ADN extraído de la cola de los ratones.

1.2.1- Extracción de ADN

Para la extracción de ADN cortamos las colas de los embriones a genotipificar en fragmentos de ~2 mm y las colocamos en tubos eppendorf de 0.1 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*

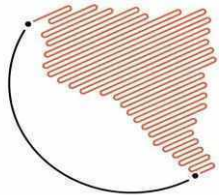
Cycler, TecnoLab, Buenos Aires, Argentina), y sometidos a un ciclo de 1 h (95 °C 45 min, 4°C 15 min). Finalizado este tiempo, a cada tubo añadimos 75 µl de una solución de Tris/HCl 40 mM pH5.5. El contenido de cada tubo fue trasvasado a otro tubo nuevo para eliminar restos de tejido, y los conservamos 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 (de las siglas en Inglés para *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 para cada reacción y el tamaño de banda que se espera en cada una:

-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’

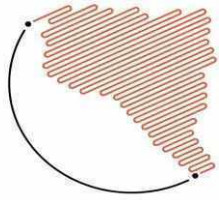
Para cada reacción de PCR utilizamos 12,5 µl finales conteniendo: 1 µl de ADN molde, 1,25 µl de buffer 10X; 0,625 µl de MgCl₂ 50 mM, 2 µl de seroalbumina bovina, 0,25 µl de dNTPs 10 mM, 0,625 µl de cebadores forward y reverse, 0,0625 µl de TaqADN polimerasa (*Promega, Madison, EE.UU.*) y agua milliQ 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 0,2 µl/ml de GelRed™ (*Nucleic Acid Gel Stain, Biotium*).

2- Cultivos celulares

2.1- HEK293T

El mantenimiento de las células fue realizado en botellas T25 (*NEST Biotechnology Co., cat#707003, Jiangsu, China*) utilizando como medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

(*DMEM, Laboratorios Microvet, cat#P3030, Buenos Aires, Argentina*) 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. El repique y los subcultivos fueron realizados al alcanzar las células un 80 % de confluencia retirando el medio de cultivo de las botellas y agregando 3 ml de solución cítrico salina. Luego fueron mantenidas en estufa por 10 min hasta lograr el desprendimiento de la monocapa celular, para luego disgregarlas 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 primario embrionario de hipotálamo.

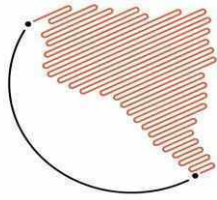
Los cultivos neuronales fueron obtenidos a partir de embriones de ratones salvajes y de ratones deficientes de GHSR de 16-18 días. El protocolo utilizado fue el similar a uno descrito en (Raingo et al., 2012). De manera resumida, las hembras preñadas fueron dislocadas cervicalmente y los embriones fueron removidos rápidamente. 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. El tejido correspondiente al hipotálamo fue disecado y colocado en medio Hank estéril. Posteriormente se realizó 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 con puntas de diámetros sucesivamente más pequeños. En vidrios de 12 mm de diámetro, previamente tratados con poli-L-lisina, sembramos ~ 70.000 células. Las mismas fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera controlada de 95 % aire y 5 %

CO₂ 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 vitamina (*Microvet, Buenos Aires, Argentina*). Al cuarto día de cultivo *in vitro* reemplazamos la mitad del medio de incubación 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- Expression heteróloga

3.1- Transfecciones transientes

La transfección transitoria de los distintos plásmidos (ver tabla) en las condiciones detalladas en la sección de resultados fue realizada utilizando liposomas catiónicos comerciales (*Lipofectamine 2000, Invitrogen® cat#11668-019, Massachusetts, EE.UU.*), el ADN de interés, clonado en un vector de expresión eucariota y células HEK293T crecidas al 80 % de confluencia en placas de cultivo. La mezcla de transfección utilizada siguió las instrucciones del proveedor utilizando una relación

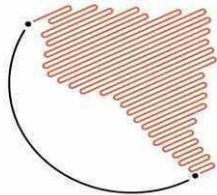


ADN/reactivo de transfección 1:2. Para la correcta expresión de los diferentes clones las células fueron incubadas por 24-48 h según el subtipo de canal de calcio expresado, en los experimentos de patch clamp. Para dichos ensayos,

posteriormente, las células fueron disgregadas con tripsina (0.25 mg/mL), lavadas con DMEM libre de SFB y mantenidas a temperatura ambiente durante el día de experimento de patch.

3.2- Clones utilizados

Nombre completo oficial	Símbolo oficial	Número de acceso GenBank	Mutación	Tag	Nombre en este trabajo
calcium channel, voltage-dependent alpha 1C subunit	Cacna1c	AY728090	-	-	Ca _v 1.2
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D	Cacna1d	AF370009	-	-	Ca _v 1.3
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B	Cacna1b	AF055477	-	-	Ca _v 2.2
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H	Cacna1h	NM_021098	-	-GFP	Ca _v 3.2
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 I	Cacna1i	NM_021096	-	-	Ca _v 3.3
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 3	Cacnb3	M88751	-		Ca _v β ₃
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 3	Cacnb3	M88751	-	eGFP	Ca _v β ₃ -GFP
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2	Cacnb2	M80545			Ca _v β _{2a}
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2	Cacnb2	M80545		eGFP	Ca _v β _{2a} -GFP
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1	Cacna2d1	AF286488			Ca _v α ₂ δ ₁
calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B	Cacna1b	D14157 Addgene 58734	W391A	-	Ca _v 2.2W391A
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2	Cacnb2	M80545	TF8n		Ca _v β _{2a} TF8n
growth hormone secretagogue	GHSR	AY429112			GHSR



receptor					
growth hormone secretagogue receptor	GHSR		A204E		A204E
pPalmitoyl-mTurquoise2		Addgene 36209			Marc. de membrana plasmática (MP)
mCh-Sec61 beta		Addgene 49155			Marc. de retículo endoplásmico (RE)
pmTurquoise2-Golgi		Addgene 36205			Marcador de Golgi (G)
DsRed-rab11WT		Addgene 12679			Marc. de endosoma de reciclaje (ER)
Rab11bS25N (Rab11bGDP)					
pCDNA3-C3-toxin					
pcDNA3.1 (+)					
peGFP					

4- Biología molecular

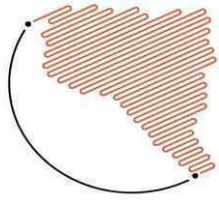
4.1 Obtención de clones para transfección

4.1.1 Cepa bacteriana

La cepa bacteriana DH5 α de la bacteria *Escherichia coli* fue utilizada para la amplificación de plásmidos. Esta cepa se caracteriza por su eficiencia de transformación con ADN no metilado (hsdR), 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 esta cepa es sensible a ampicilina y kanamicina.

4.1.2 Obtención de bacterias competentes

Para obtener nuestras bacterias competentes seguimos los pasos del método Inoue, para lo cual partimos de un stock de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, sembrando una anzada 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 antibiótico (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 A en alguno de los tres cultivos. Este último fue transferido 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) enfriado previamente. La centrifugación y el secado fueron pasos que repetimos 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 µl y las conservamos a -70 °C hasta su uso.

4.1.3 Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

La transformación de las bacterias competentes fue realizada siguiendo el protocolo descrito por (Cohen, 1974). Resumidamente, adicionamos 50 ng de ADN plasmídico a 200 µl de la suspensión de bacterias competentes e incubamos la mezcla en hielo durante 30 min. Posteriormente, la transferimos a un baño de agua a 42 °C para realizar un choque térmico de 45 s de duración. Inmediatamente después colocamos el

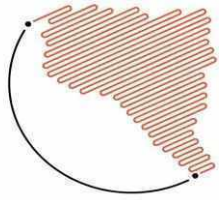
tubo en hielo, al que agregamos 800 µl de medio SOC e incubamos 40 min a 37 °C. Luego, sembramos las bacterias en placas de agar LB con el antibiótico de selección adecuado e incubamos a 37 °C durante una noche para permitir el desarrollo de colonias transformadas.

4.1.4 Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep)

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

4.1.5 Cuantificación de ADN.

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



5- Electrofisiología

Las corrientes iónicas fueron registradas con un amplificador Axopatch 200 (*Molecular Devices*). Los datos fueron recolectados a 20 kHz y filtrados a 10 kHz (-3dB) utilizando el software PCLAMP8.2 (*Molecular Devices*). Las micropipetas utilizadas poseían una resistencia de 2-4 MΩ y fueron llenadas con solución interna. La resistencia en serie admitida fue menor que 6 MΩ y compensada en 80% a un tiempo de 10 μs. La corriente de fuga fue sustraída en tiempo real utilizando un protocolo P/-4. Todos nuestros registros fueron obtenidos a temperatura ambiente (~ 23 °C).

5.1- Corrientes de calcio en HEK293T transfectadas transientemente

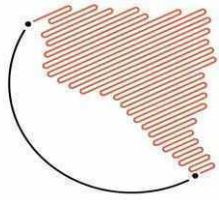
Los registros de patch clamp en configuración célula entera con fijación del voltaje fueron realizados en células identificadas como transfectadas, es decir, aquellas que expresaban la proteína reportera GFP. La solución interna contenía (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES y 4 MgATP (pH 7.2 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 usamos como ion permeante bario (BaCl₂, 10 mM o 20 mM) en lugar de calcio para amplificar la amplitud de las corrientes. El potencial de reposo utilizado en nuestros protocolos

fue de -100 mV para remover los canales de su *closed-state inactivation* (Thaler, Gray, & Lipscombe, 2004).

Los protocolos utilizados para el registro consistieron en pulsos cuadrados desde -100 mV a +10 mV para Ca_v1.2 y Ca_v2.2, y desde -100 mV a -10 mV para Ca_v1.3, por 15 o 25 ms cada 10 s. En experimentos donde utilizamos como ion permeante el Bario (20 mM) el protocolo consistió en pulsos cuadrados desde -100 mV a +20 mV. Para Ca_v3.2 y Ca_v3.3, utilizamos pulsos cuadrados desde -100 mV, a -20 mV o -30 mV por 200 ms cada 10 s.

5.2- Corrientes de calcio o bario en cultivos neuronales primarios

Sobre neuronas cultivadas *in vitro* por 10-16 días fueron realizados registros 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. La solución interna con la que fueron llenadas las micropipetas contenía (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, y 4 MgATP (pH 7.2 con CsOH). Las neuronas inicialmente fueron mantenidas en una solución de alto contenido en sodio conteniendo (en mM): 135 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 HEPES, y 10 glucosa, pH 7.4 con NaOH. Luego de obtenido el sello, las corrientes de calcio fueron registradas en



una solución conteniendo (en mM): 10 BaCl₂, 110 cloruro de colina, 20 cloruro de TEA, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, and 0.001 tetrodotoxina (TTX; *Sigma-Aldrich*), pH 7.4 con CsOH. En algunos experimentos la solución externa utilizada contenía (en mM): 5 CaCl₂, 135 cloruro de colina, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, and 0.001 tetrodotoxina (TTX; *Sigma-Aldrich*), pH 7.4 con CsOH.

6- Microscopía confocal

Las células HEK293T fueron cultivadas en vidrios redondos tratados previamente con poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*) y dispuestos sobre placas de 12-24 pocillos. 24 horas después, las células fueron cotransfectadas con Ca_vβ_{2a}-GFP o Ca_vβ₃-GFP y diferentes combinaciones de otros plásmidos detallados en la sección de resultados con Lipofectamina 2000. Transcurridas 24 h, las células fueron lavadas con PBS 1X. Luego, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % en PBS 1X por 20 min. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces por PBS 1X y montadas sobre vidrios usando el medio de montaje VECTASHIELD®.

Las microfotografías fueron obtenidas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con el software ZEN. La cuantificación de la co-localización de Ca_vβ_{2a}-GFP o Ca_vβ₃-GFP con los diferentes marcadores de compartimentos

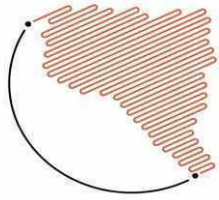
intracelulares fue realizada con la herramienta *Just another Co-localizarían Plugin (JaCoP)* del software de acceso libre FIJI, herramienta que nos permitió calcular los coeficientes de solapamiento de Mander para cada marcador (Ca_vβ-GFP/Marcador *overlap*).

7- Drogas

Para los experimentos de patch clamp y de imágenes en las células HEK293T, fue usado el agonista inverso de GHSR, [*d-Arg1,d-Phe5,d-Trp7,9,Leu11*]-*substance P* (SPA; *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). Para los experimentos de patch clamp en los cultivos neuronales primarios fue utilizado el agonista de Ca_v1 BayK-8644 (*Sigma-Aldrich*).

8- Estadística

Nuestros datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software Inc., California, EE.UU.*). Evaluamos si nuestros datos poseían 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). Los valores de p fueron obtenidos a partir del test t de Student o del test de comparación múltiple de varianzas de una vía ANOVA con el post

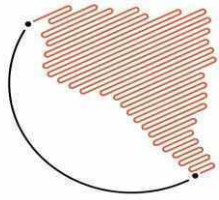


test de Tukey (datos con distribución normal); o a partir del test de Mann-Whitney o el test de comparación múltiple de varianzas no paramétrico Kruskal-Wallis test con el post test de Dunn (datos con distribución no normal). En la leyenda de las figuras señalamos el test específico usado y el tamaño de la muestra para cada conjunto de datos. Consideramos que una diferencia es estadísticamente significativa para valores de $p < 0.05$. Nuestros datos fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media, y los datos individuales como puntos negros.

Resultados y discusión

Inicialmente evaluamos nuestra primera hipótesis, donde proponemos que las subunidades auxiliares probablemente sean el blanco de la actividad constitutiva de GHSR. Estudios previos han demostrado que $Ca_v\beta$ impide la retención de Ca_v2 en el retículo endoplásmico y reduce su entrada en las vías de degradación proteasomal, estabilizando el canal Ca_v2 en la membrana plasmática y consecuentemente aumentando al corriente macroscópica medida (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 expresando heterológamente la subunidad principal

$Ca_v2.2$ junto a $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR en ausencia de $Ca_v\beta_3$ (figura 1A). En dichas condiciones, la corriente macroscópica registrada fue de pequeña amplitud pero medible, y observamos que la co-expresión de GHSR no modificó el nivel de corriente al compararlo con células que no lo expresaban, y en su lugar expresaban un plásmido vacío. En contraposición, al co-expresar GHSR junto a $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$, observamos nuestro ya reportado efecto de disminución dramática de la corriente macroscópica mediada por $Ca_v2.2$ (figura 1B). Dado que la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta_1$ también es capaz de incrementar la expresión en superficie de diferentes isoformas de $Ca_v\alpha_1$ y disminuye la internalización de los mismos, realizamos un experimento similar al anterior pero en este caso en ausencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$. En dicho experimento los niveles de corriente de $Ca_v2.2$ no fueron significativamente diferentes de cero (3.33 ± 1.50 pA/pF, $n=5$, $P= 0.091$), confirmando la importancia de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta_1$ para el correcto transporte del complejo canal hacia la membrana plasmática. No obstante, por experimentos de imágenes utilizando una quimera del canal $Ca_v2.2$ fusionado a GFP, pudimos observar que el canal trafica en menor medida en ausencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$, no obstante la densidad de canal que se encuentra en la membrana plasmática puede ser reducida



por la actividad constitutiva de GHSR (Mustafa et al., 2017). Los resultados hasta aquí presentados sugieren que la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$, pero no la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta$, es requerida para

observar la acción inhibitoria de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v , y esa acción de GHSR involucraría una disminución de la densidad de canal $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática.

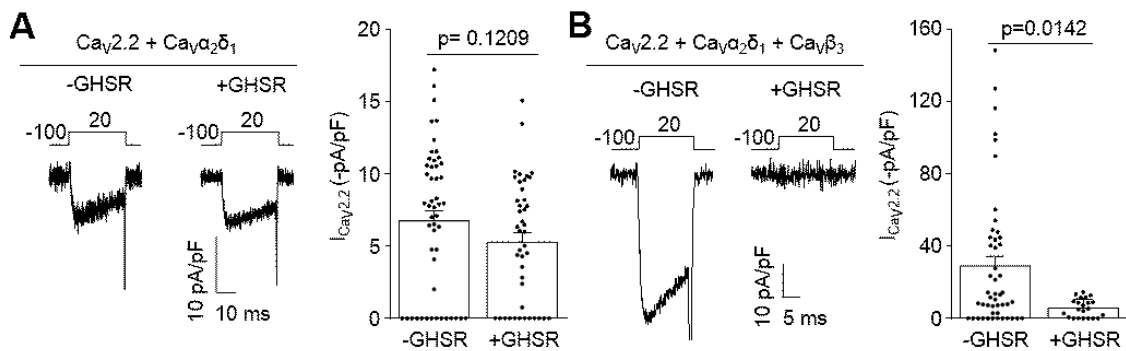
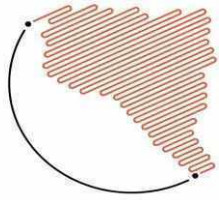


Figura 1. La presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_3$ es necesaria para observar el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes $Ca_v2.2$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). **B.** 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 GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Significancia estadística determinada con test de *Mann-Whitney*.

Teniendo presente los resultados mostrados, 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 . Para ello registramos corrientes de calcio en células HEK293T co-transfectadas con $Ca_v1.2$ o $Ca_v1.3$, junto a sus subunidades auxiliares, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y $Ca_v\beta_3$, en presencia de GHSR o de plásmido vacío. En comparación con el control, encontramos una significativa disminución en los niveles de la corriente macroscópica mediada por $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ en las células que co-expresaban GHSR, y ese efecto era ocluido por la pre-incubación prolongada con el agonista inverso de

GHSR, SPA (figura 2A). Estos resultados indican que la acción inhibitoria de la actividad constitutiva de GHSR se extendería a modular la actividad de otros canales neuronales, como son los Ca_v1 .

Posteriormente, ensayamos si la actividad constitutiva de GHSR podría afectar los canales Ca_v1 endógenos en neuronas hipotalámicas comparando 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). 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, en presencia o no de GHSR, utilizamos la dihidropiridina Bay-K 8644. Este compuesto es una robusta herramienta para aislar las corrientes de Ca_v1 , de las corrientes Ca_v2 , dado que aumenta selectivamente el tiempo del estado

abierto de los canales Ca_v1 (Hess, Lansman, & Tsien, 1984; Thomas, Chung, & Cohen, 1985). Con ello, observamos que Bay-K 8644 incrementó al doble la amplitud de la corriente de bario en neuronas derivadas de animales deficientes para GHSR en comparación con las neuronas derivadas de animales salvajes (figura 2B). Con estos resultados, podemos sugerir que la actividad constitutiva de GHSR disminuye las corrientes macroscópicas Ca_v1 nativas.

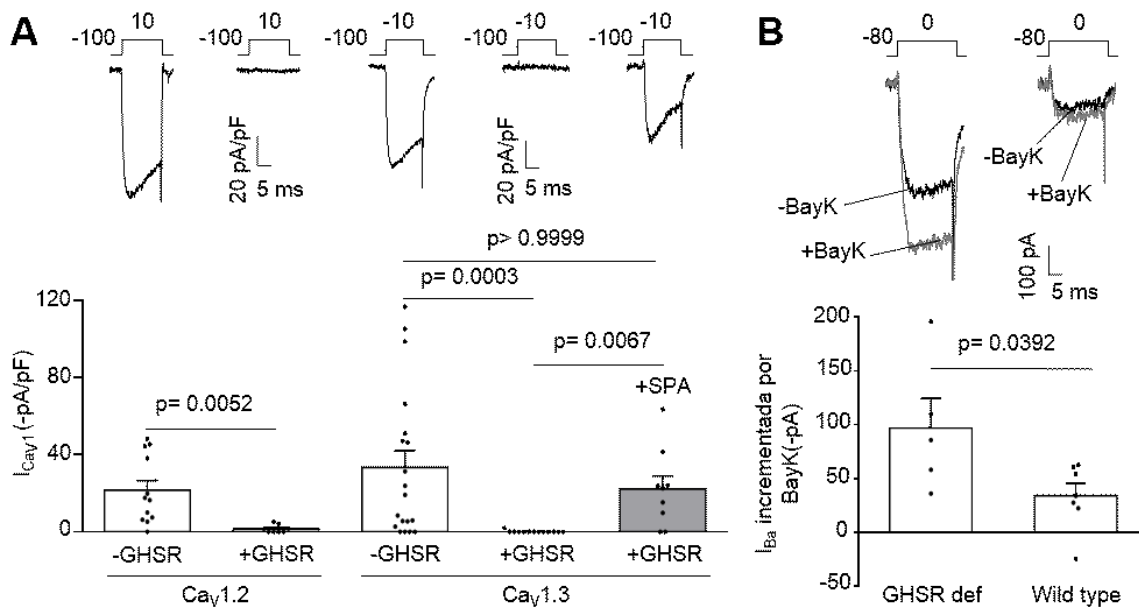
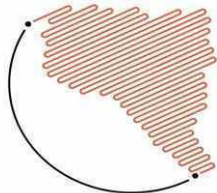


Figura 2. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ en células HEK293T y reduce las corrientes Ca_v1 nativas en neuronas hipotalámicas. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente I_{CaV1} de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v1.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente I_{CaV1} de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v1.3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR (+GHSR) preincubadas o no con SPA (1 μ M, +SPA), o plásmido vacío (-GHSR). **B.** Trazos representativos del efecto de Bay K 8644 (5 μ M) en corrientes de bario registradas en neuronas de ratones deficientes de GHSR (GHSR def) o de ratones salvajes (Wild type), y valores promedio del incremento de I_{Ba} . Significancia estadística determinada con *Kruskal-Wallis* y post-test de *Dunn* (A, $Ca_v1.3$), test de *Mann-Whitney* (A, $Ca_v1.2$) y test *t* de *Student* (B).



Seguidamente evaluamos si la actividad constitutiva de GHSR podía extenderse a modular la actividad de los canales Ca_v3 . Estos canales son funcional y estructuralmente muy diferentes a los ya presentados Ca_v1 y Ca_v2 , y a diferencia de estos últimos, los Ca_v3 trafican hacia la

membrana plasmática en ausencia de subunidades auxiliares. En la figura 3 mostramos que tanto los niveles de corriente macroscópica de $Ca_v3.2$ como los de $Ca_v3.3$ no se ven modificados significativamente por la coexpresión de GHSR en células HEK293T.

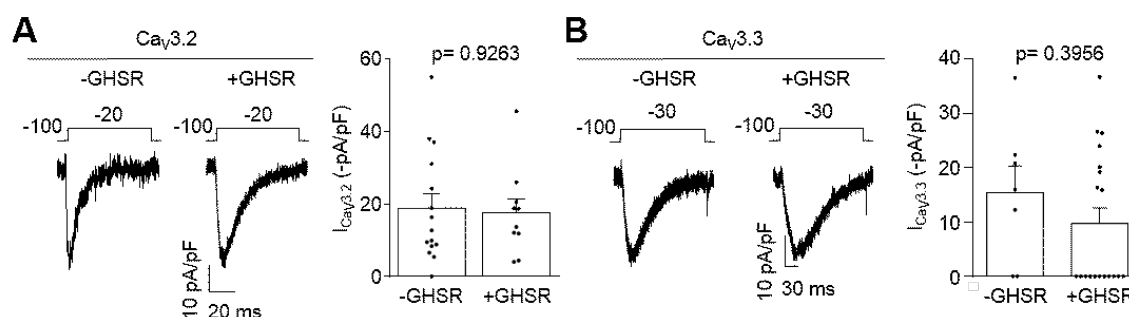


Figura 3. La actividad constitutiva de GHSR no reduce las corrientes $Ca_v3.2$ ni las $Ca_v3.3$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v3.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.2$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). **B.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v3.3}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Significancia estadística determinada con test de *Mann-Whitney*.

No obstante, como varios reportes proponen que el tráfico de dichos Ca_v podría incrementarse por la co-expresión con $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_2\delta$ (Arias, Murbartian, Vitko, Lee, & Perez-Reyes, 2005; Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004; Wyatt, Page, Berrow, Brice, & Dolphin, 1998) ensayamos el efecto de la actividad

constitutiva de GHSR sobre los Ca_v3 en presencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$. Como puede observarse en la figura 4 la co-expresión de $Ca_v3.2$ o de $Ca_v3.3$ junto $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en presencia de GHSR no es suficiente para reducir los niveles de corriente en comparación con células expresando plásmido vacío en reemplazo del receptor.

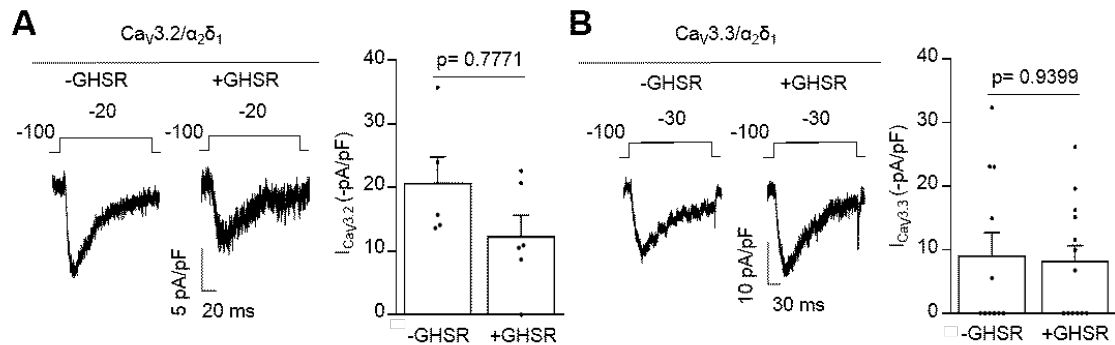
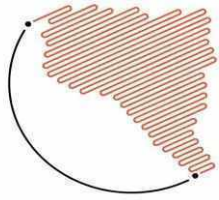


Figure 4. La actividad constitutiva de GHSR no modifica las corrientes $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ en presencia de $Ca_v\alpha_2\delta_1$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v3.2}$ células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR) **B.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v3.3}$ células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v3.3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Significancia estadística determinada con test *t* de Student (A) y test de Mann-Whitney.

Luego ensayamos el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v3 en presencia de $Ca_v\beta_3$. Con ello observamos que la co-expresión de $Ca_v3.2$ o de $Ca_v3.3$ junto con cantidades crecientes de $Ca_v\beta_3$ reducía proporcionalmente las corrientes macroscópicas registradas (figura 5). Coincidente con ello, cabe recordar que la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v2 es dependiente de la concentración de GHSR expresado, por lo que a mayor expresión del receptor se observa una

menor corriente registrada (Lopez Soto et al., 2015). Para corroborar que dicho efecto era debido a la actividad constitutiva de GHSR pre-incubamos con SPA células co-expresando $Ca_v3.2$ o $Ca_v3.3$ junto a $Ca_v\beta_3$ y GHSR, y logramos de esta forma revertir el efecto inhibitorio del receptor. 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 expresada en la célula.

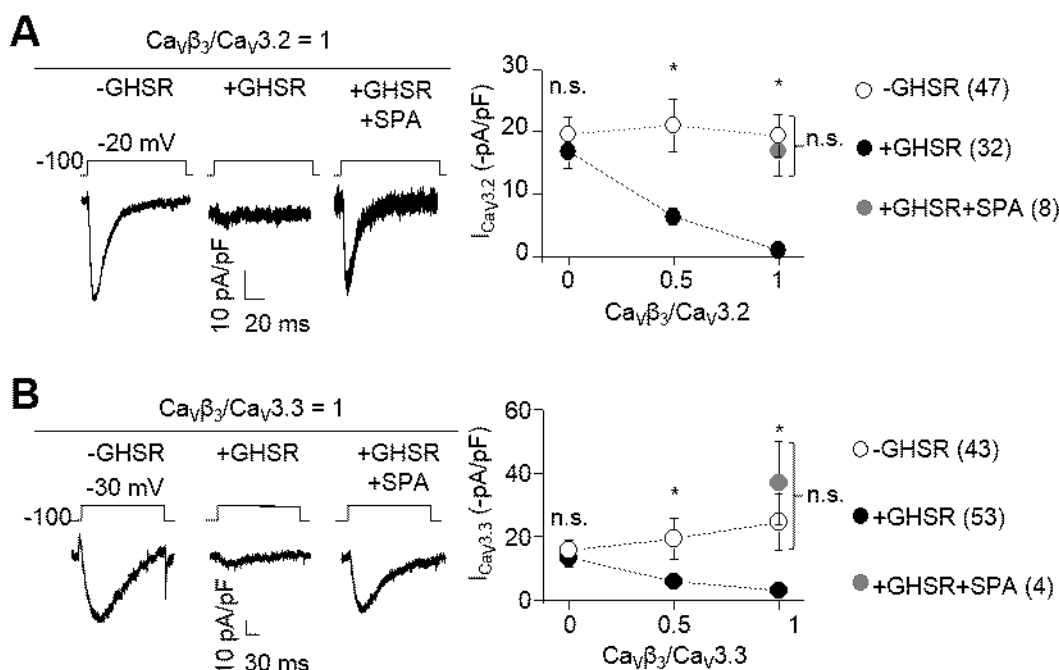
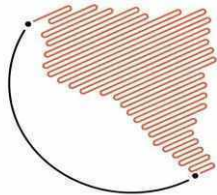
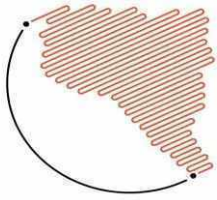


Figure 5. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes $Ca_V3.2$ y $Ca_V3.3$ de manera dependiente de $Ca_V\beta_3$. **A.** Trazos representativos de corriente $I_{CaV3.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_V3.2$, $Ca_V\beta_3$ y GHSR (+GHSR) preincubadas o no con SPA (1 μ M, +GHSR+SPA), o plásmido vacío (-GHSR) y valores promedio de niveles de corriente $I_{CaV3.2}$ en presencia de relaciones molares $Ca_V\beta_3/Ca_V3.2$ crecientes. **B.** Trazos representativos de corriente $I_{CaV3.3}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_V3.3$, $Ca_V\beta_3$ y GHSR (+GHSR) preincubadas o no con SPA (1 μ M, +GHSR+SPA), o plásmido vacío (-GHSR) y valores promedio de niveles de corriente $I_{CaV3.3}$ en presencia de relaciones molares $Ca_V\beta_3/Ca_V3.3$ crecientes. Significancia estadística determinada con test de *Mann Whitney* y *Kruskal-Wallis* con post-test de *Dunn*.

Como se planteó en la hipótesis (2i) 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 (2ii) un incremento en la internalización desde la membrana plasmática hacia los endosomas. Para distinguir 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 (del Inglés *green fluorescent protein*) y marcadores de diferentes compartimentos intracelulares: membrana plasmática, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y endosoma de reciclaje. 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 interaccionar 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, Carr, Shirokov, Rios, & Hosey, 1996; Chien, Gao, Perez-Reyes, & Hosey, 1998; Chien et al., 1995). Al realizar el experimento en un microscopio confocal, observamos que en células HEK293T la co-expresión de

GHSR disminuía la localización de $Ca_v\beta_{2a}$ -GFP en la membrana plasmática incrementándola en el retículo endoplásmico, y débilmente en el aparato de Golgi, sin cambios en endosomas de reciclaje en comparación con células que no expresaban el GHSR. Este efecto patrón de sub-localización de $Ca_v\beta_{2a}$ fue revertido en células pre-incubadas con SPA (figura 6).

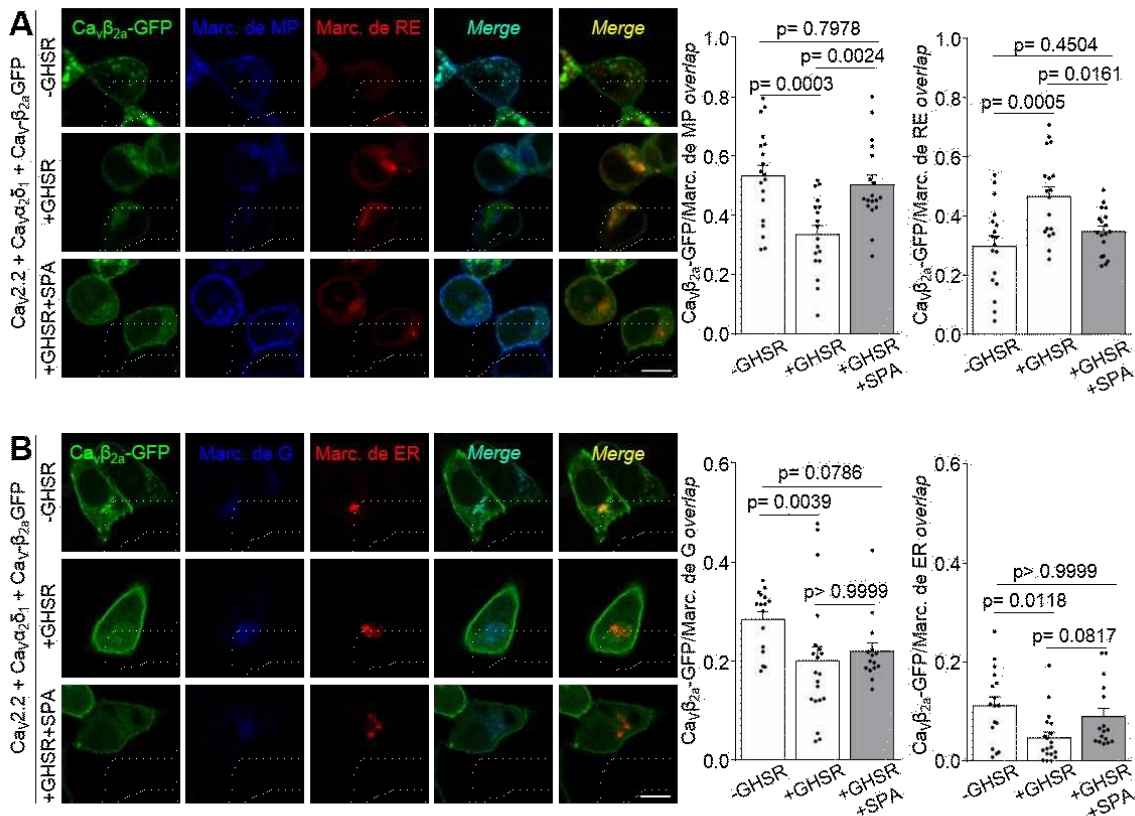


Figura 6. La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad en membrana plasmática de $Ca_v\beta_{2a}$ mientras que la incrementa en el retículo endoplásmico. **A.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_{2a}$ -eGFP, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR pre-incubadas con SPA ($1\mu M$, +GHSR+SPA) o no (+GHSR), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR). **B.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_{2a}$ -eGFP, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de aparato de Golgi (marc. de G), marcador de endosomas de reciclaje (marc. de ER), y GHSR pre-incubadas con SPA ($1\mu M$, +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 $Ca_v\beta_{2a}$ -eGFP con la señal azul proveniente del marcador de MP o de G, o con la señal roja proveniente del marcador de RE o ER. Las barras representan la media \pm error. La barra de escala indica $10\mu m$. Significancia estadística determinada con ANOVA de una vía y post test de Tukey (A) y con Kruskal-Wallis y post test de Dunn (B).

Similares resultados se obtuvieron al utilizar $Ca_v\beta_3$ -GFP (figura 7). En dichas pruebas la subunidad $Ca_v\beta$ fue co-

expresada junto a $Ca_v2.2$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en todos los casos.

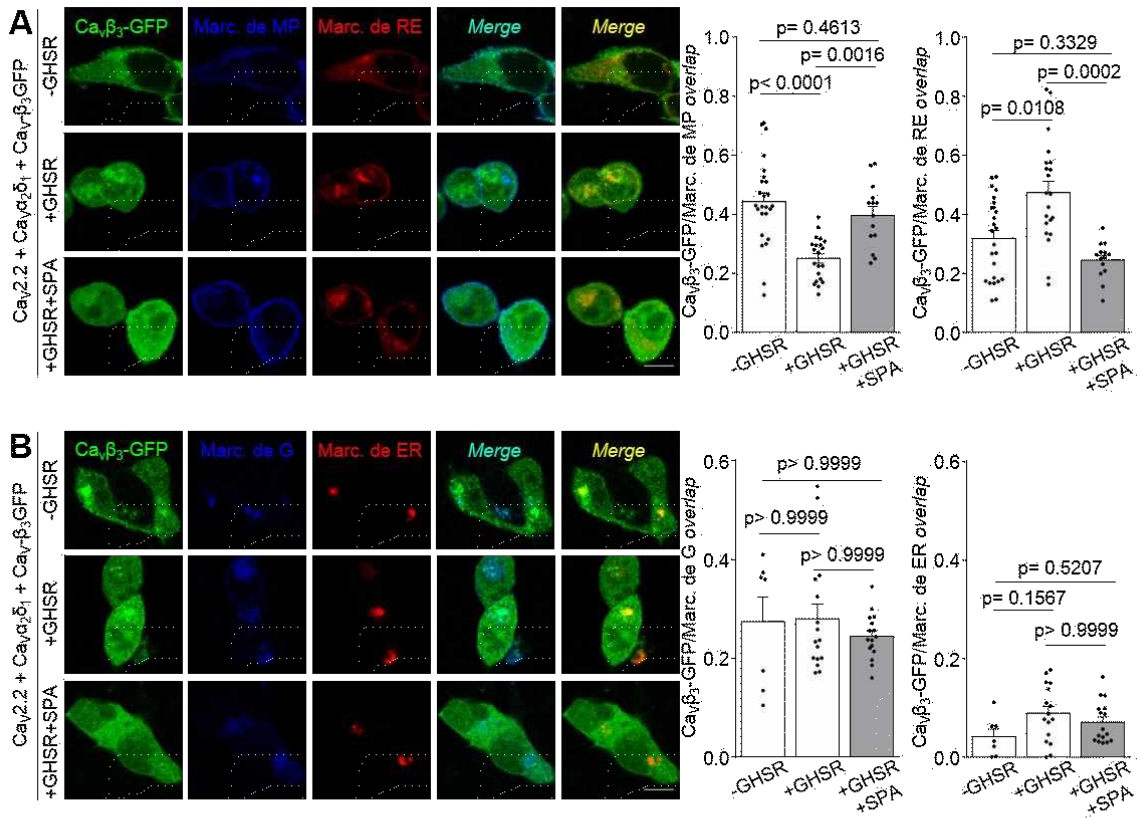
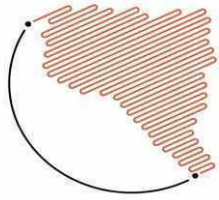


Figura 7. La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad en membrana plasmática de $Ca_v\beta_3$, mientras que la incrementa en el retículo endoplásmico. **A.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ -eGFP, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR preincubadas con SPA (1 μ M, +GHSR+SPA) o no (+GHSR), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR). **B.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\beta_3$ -eGFP, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de aparato de Golgi (marc. de G), marcador de endosomas de reciclaje (marc. de ER), y GHSR preincubadas con SPA (1 μ M, +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 $Ca_v\beta_3$ -eGFP con la señal azul proveniente del marcador de MP o de G, o con la señal roja proveniente del marcador de RE o ER. Las barras representan la media \pm error. La barra de escala indica 10 μ m. Significancia estadística determinada con ANOVA de una vía y post test de Tukey (A) y con *Kruskal-Wallis* y post test de *Dunn* (B).

En concordancia con dichos resultados, observamos que al co-expresar un dominante negativo de Rab11b, una proteína que controla la internalización de $Ca_v1.2$ hacia los endosomas, no alteraba el efecto de la

actividad constitutiva sobre los niveles de corriente de $Ca_v2.2$, que seguían reducidos (figura 8A). Además, hallamos un resultado en la misma dirección cuando ensayamos la participación de una pequeña GTPasa: RhoA. Dicha proteína



está involucrada en modificar la densidad en superficie de los canales $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$ por promoción de un mecanismo dependiente de internalización (Rousset et al., 2015). Al co-exresar un inhibidor de RhoA (C3 toxina) en presencia de $Ca_v2.2$,

junto a sus subunidades auxiliares y GHSR, observamos una significativa reducción de la corriente en comparación con células expresando plásmido vacío (figura 8B).

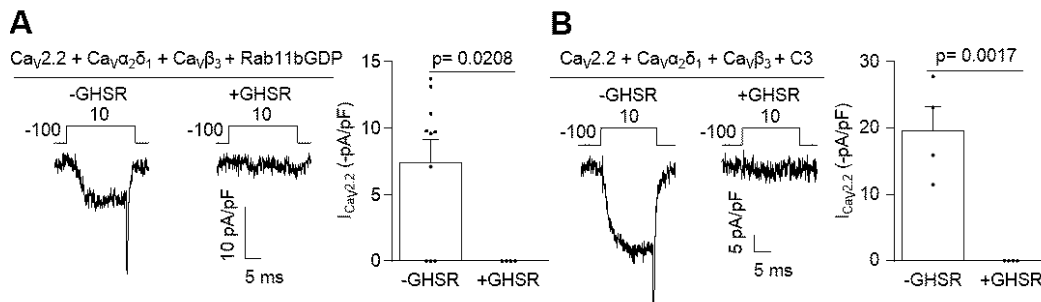


Figura 8. La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes $Ca_v2.2$ de manera independiente de Rab11b y RhoA. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$, Rab11GDP y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). **B.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$, C3 y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Significancia estadística determinada con test *t* de Student.

En base a los resultados anteriores, ¿la actividad constitutiva de GHSR podría modificar la sublocalización celular de $Ca_v\beta$ de manera independiente de la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$? Para responder dicha pregunta, ensayamos la misma serie de experimentos que los presentados en las figuras 6 y 7 pero en ausencia de $Ca_v\alpha_1$. En estas condiciones hallamos que la co-expresión de GHSR no modificaba la distribución de $Ca_v\beta_3$ ni de $Ca_v\beta_{2a}$, como lo hacía al estar presente la

subunidad principal. De acuerdo a lo reportado por otros autores, la subunidad $Ca_v\beta_3$ no se localiza principalmente en la membrana plasmática (Bichet et al., 2000), mientras que la $Ca_v\beta_{2a}$ si lo hace gracias a su modificación post-traduccional. Con ello podemos plantear que el efecto de GHSR actúa modificando la localización sub-celular del complejo canal y no sólo de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$.

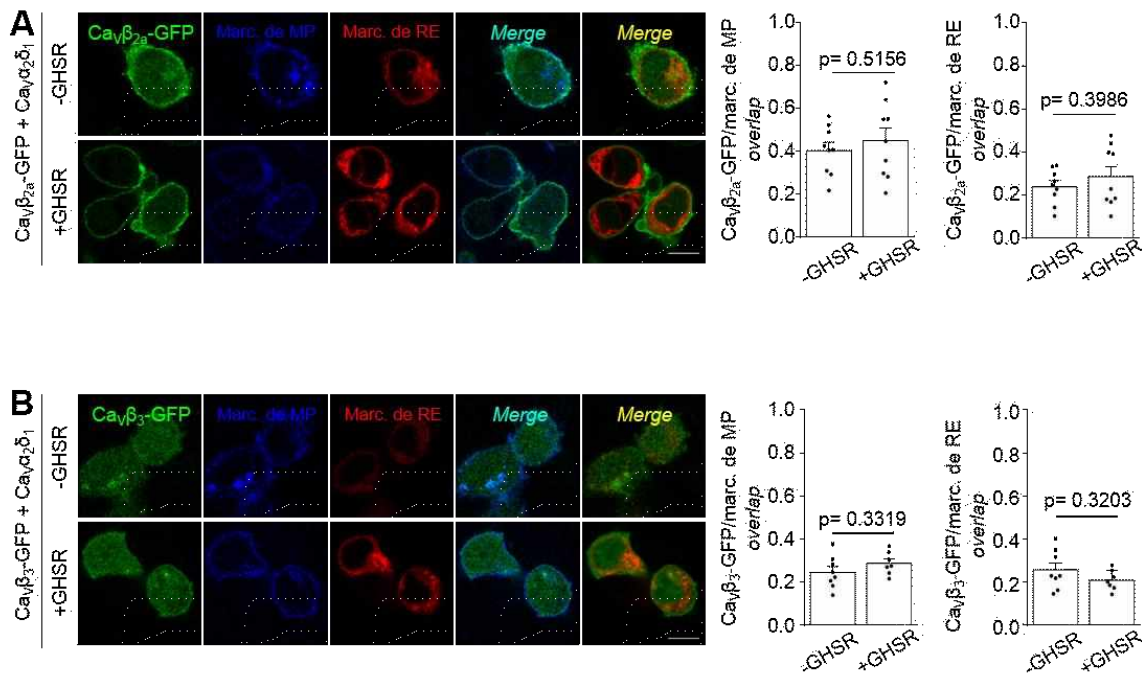
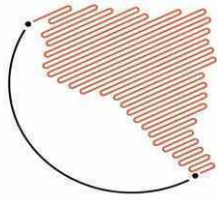
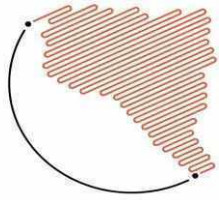


Figura 9. La actividad constitutiva de GHSR no reduce la densidad en membrana plasmática de Ca_vβ en ausencia de Ca_vα₁. **A.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con Ca_vβ_{2a}-eGFP, Ca_vα₂δ₁, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR (+GHSR), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR). **B.** Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con Ca_vβ₃-eGFP, Ca_vα₂δ₁, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y GHSR (+GHSR), y una condición control expresando plásmido vacío (-GHSR). Las barras indican la co-localización entre la señal verde proveniente de Ca_vβ₃/Ca_vβ_{2a}-eGFP con la señal azul proveniente del marc. de MP, o con la señal roja proveniente del marc. de RE. Las barras representan la media ± error. La barra de escala indica 10 μm. Significancia estadística determinada con ANOVA de una vía y post test de Tukey (A) y con Kruskal–Wallis y post test de Dunn (B).

En este contexto, posteriormente analizamos si la interacción entre Ca_vβ y Ca_vα₁ era necesaria para observar el efecto de la actividad constitutiva. Para ello utilizamos una versión mutante de la subunidad principal (Ca_v2.2W391A) previamente descrita con una afinidad reducida a la interacción con Ca_vβ (Leroy et al., 2005; Van Petegem, Duderstadt, Clark, Wang, & Minor, 2008). Como se puede observar en la figura 10A, dicha

mutación no ocluye el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva sobre el complejo canal, tanto al co-expresar la subunidad Ca_vβ₃ como la Ca_vβ_{2a}. En el mismo sentido, realizamos experimentos co-expresando una versión truncada de Ca_vβ_{2a} (Ca_vβ_{2a}TF8n), proteína que no incrementa las corrientes mediadas por Ca_v2.1 ni modifica parámetros de activación (Leyris et al., 2009). En la figura 10B, puede observarse que la actividad



constitutiva de GHSR disminuye la corriente macroscópica mediada por $Ca_v2.2$ aun en presencia de $Ca_v\beta_{2a}$ TF8n. En conjunto, esta serie de experimentos nos permiten proponer que la sustitución en el aminoácido W391 de la subunidad

principal $Ca_v\alpha_1$ así como truncar una porción de la subunidad $Ca_v\beta$ no son estrategias suficientes para impedir el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva sobre el complejo canal.

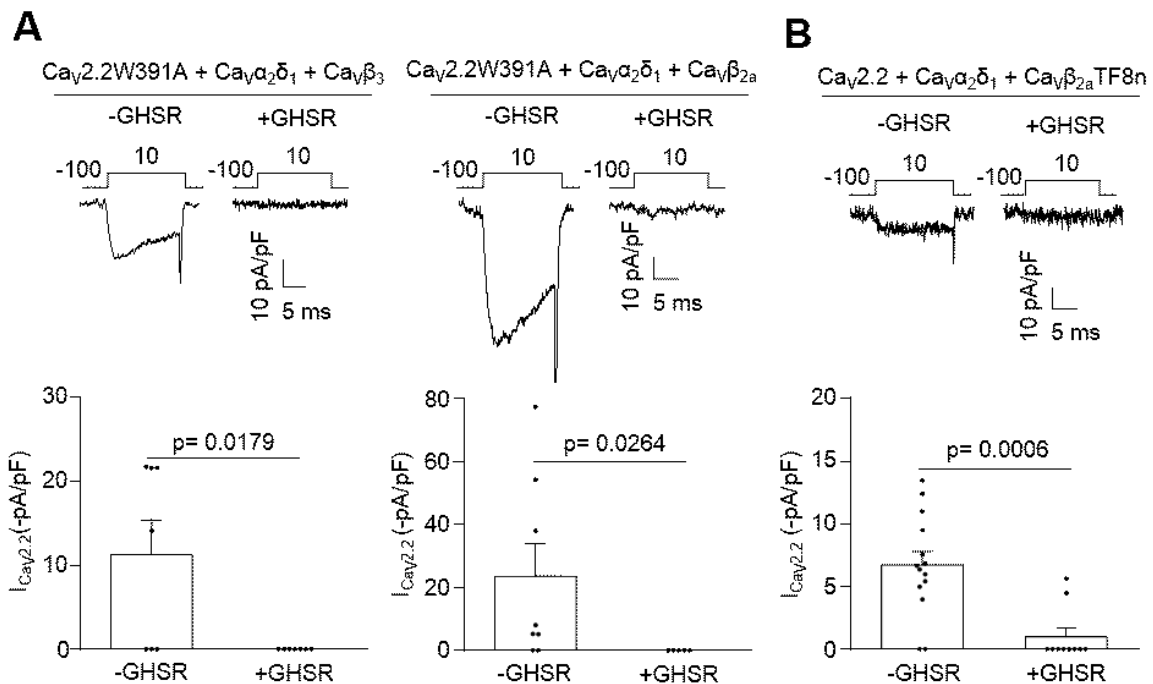
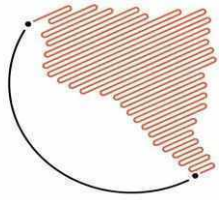


Figura 10. La mutación W391A en $Ca_v\alpha_1$ o el truncamiento en $Ca_v\beta$ no son suficientes para bloquear el efecto inhibitorio de GHSR sobre la actividad de $Ca_v2.2$. **A.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2W391A$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_3$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2W391A$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_{2a}$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). **B.** Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente $I_{Ca_v2.2}$ de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_{2a}TF8n$ y GHSR (+GHSR) o plásmido vacío (-GHSR). Significancia estadística determinada con test de *Mann-Whitney*.

Varios reportes han observado la interacción física entre canales de calcio y GPCRs como mecanismos de modulación de la actividad de los Ca_v . En ese sentido ensayamos esa posibilidad estudiando el tráfico del receptor en este caso para ver

cuál era su patrón en ausencia y presencia de la subunidad principal del canal $Ca_v\alpha_1$ en presencia de $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$. Como puede observarse en la figura 11 se observa que la expresión del receptor (GHSR-YFP), al igual que el



complejo canal, está disminuida en la membrana plasmática, al mismo tiempo que su expresión aumenta en el retículo endoplásmico, solo cuando la subunidad $Ca_v\alpha_1$ esta co-expresada en la célula. Dicho fenómeno no se observa al utilizar una versión mutante del receptor (GHSR-A204E), que carece de actividad constitutiva. En este caso, el receptor se expresa mayoritariamente en la membrana plasmática. Como se planteó previamente estos resultados se podrían explicar si pensamos en que el mecanismo a través del cual ejerce su

efecto la actividad constitutiva de GHSR, implique una 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. No obstante los resultados planteados, experimentos de FRET (Transferencia de energía entre fluorocromos) utilizando versiones fusionadas a fluorocromos de ambas proteínas o co-inmunoprecipitaciones son necesarios para confirmar la hipótesis de la interacción física entre GHSR y Ca_v .

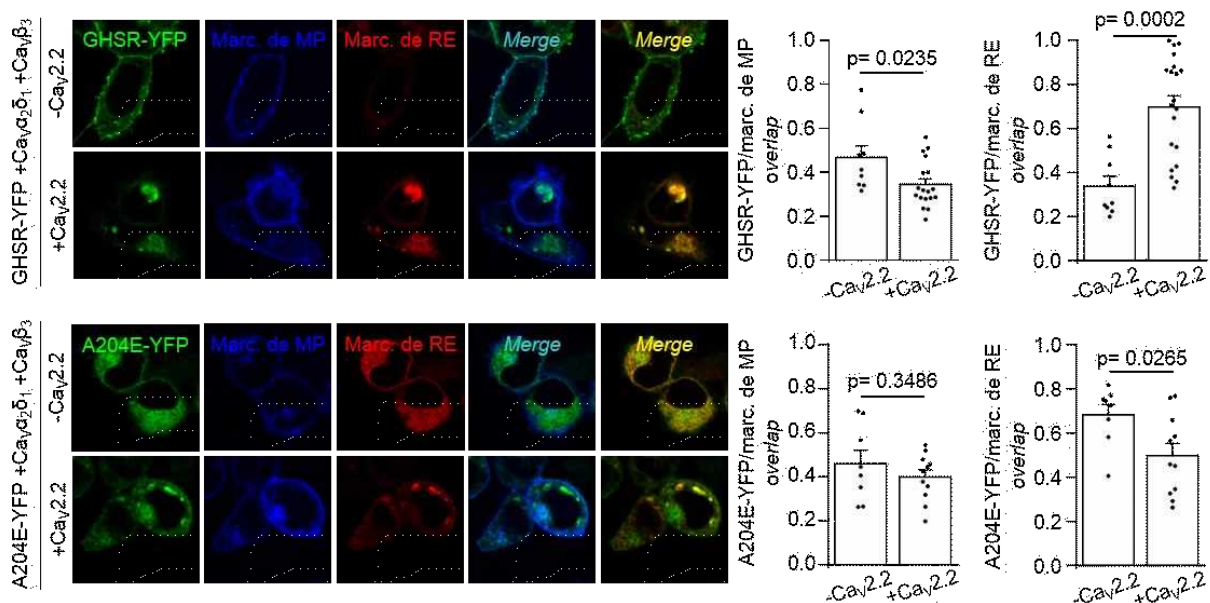
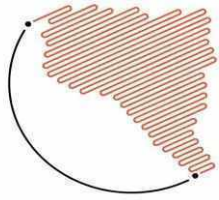


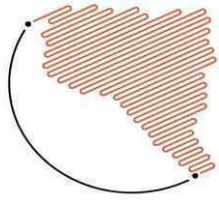
Figura X. A. Microfotografías de células HEK293T cotransfectadas con GHSR-YFP, $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, marcador de membrana plasmática (marc. de MP), marcador de retículo endoplásmico (marc. de RE), y $Ca_v2.2$ (+ $Ca_v2.2$), y una condición control expresando plásmido vacío (- $Ca_v2.2$). **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 $Ca_v2.2$ (+ $Ca_v2.2$), y una condición control expresando plásmido vacío (- $Ca_v2.2$). 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. Las barras representan la media \pm error. La barra de escala indica 10 μ m. Significancia estadística determinada con test *t* de Student.



GHSR es críticamente importante para la regulación del apetito, el peso corporal, el aprendizaje y la memoria (Diano et al., 2006; Jerlhag et al., 2006; Nakazato et al., 2001). En este trabajo extendimos estudios previos de nuestro laboratorio acerca de las acciones 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 exporte 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_BR (GABA_BR, por sus en Inglés *γ-aminobutyric acid B receptor*). Estas formas de modulación son a largo plazo e independientes del nivel de actividad neuronal (Gray, Raingo, & Lipscombe, 2007). Varios de esos receptores reducen la densidad en superficie del 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 endosomas tempranos o hacia 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 en la localización subcelular del complejo canal en los endosomas de reciclaje. 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 a 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 interaccionan 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_v -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 con estos. En el caso de GHSR, el hecho de que la actividad constitutiva dependa de la

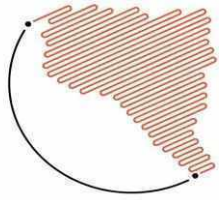


cantidad de receptor expresada (Lopez Soto et al., 2015), y según lo demostrado en este trabajo que dependa de la cantidad de subunidad auxiliar $Ca_v\beta$, abre la posibilidad de que la inhibición crónica en el tráfico de los Ca_v necesite de una interacción directa entre el GPCR y el canal. En ese sentido, nuestro experimento de tráfico de GHSR-YFP, podría demostrarnos indirectamente que este podría ser el mecanismo, dado que su expresión en membrana plasmática en concomitancia con su aumento en el retículo endoplásmico, sólo es observable en presencia de la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$. Fenómeno que no se observa al realizar el ensayo con la versión carente de actividad constitutiva de GHSR (GHSR-A204E).

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 presencia 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 al menos sobre las corrientes macroscópicas mediadas por los Ca_v3 . 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 ello, 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, indagamos acerca de putativas regiones de interacción entre dichas subunidades que podrían estar implicadas en el mecanismo de acción de GHSR. Hallamos que el efecto inhibitorio de GHSR no se modifica al coexpresar una versión mutante de $Ca_v\alpha_1$ ($Ca_v2.2W391A$) o una versión trucada de $Ca_v\beta$ ($Ca_v\beta_{2a}TF8n$). Estos resultados podrían indicarnos que la interacción entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$ mediada por el aminoácido W391 en la región AID (del Inglés *alpha-interaction domain*) y/o el segmento truncado en $Ca_v\beta_{2a}TF8n$ no serían requeridos para observar el efecto inhibitorio de GHSR.

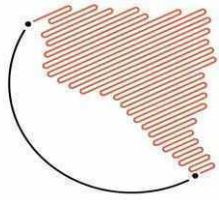
Teniendo en cuenta que encontramos que la inhibición crónica de los canales Ca_v por la actividad constitutiva de GHSR se basa en la retención del complejo canal en el retículo endoplásmico, mientras que observamos una leve disminución en la proporción de canales localizados en el aparato de Golgi (sólo para $Ca_v\beta_{2a}$), nosotros 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 dicha subunidad auxiliar. En esta dirección,



estudios previos han demostrado que $Ca_v\beta$ controla el tráfico hacia la membrana plasmática de los $Ca_v\beta$ (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). No obstante, varios reportes sugieren una putativa función 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, Miranda-Laferte, Neely, & Hidalgo, 2007; Miranda-Laferte et al., 2011). En relación a ello, nosotros encontramos que dos pequeñas GTPasa, Rab11b y RhoA, no estarían involucradas en el mecanismo a través del que actúa la actividad constitutiva de GHSR, soportando la idea que el proceso de internalización no estaría implicado en dicho efecto. Si los canales Ca_v son retenidos en compartimentos intracelulares, una pregunta abierta sería ¿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 en el proteasoma (Altier et al., 2011; Marangoudakis et al., 2012; Waithe, Ferron, Page, Chaggar, & Dolphin, 2011). 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, Albesa, Abriel, & Viard, 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. Nuevos experimentos son necesarios para concluir acerca de los efectores moleculares que ejecutan el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre el tráfico de los Ca_v .

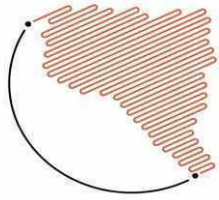
Nuestro grupo de laboratorio previamente demostró que la actividad constitutiva de GHSR reduce la expresión en superficie de Ca_v2 (Lopez Soto et al., 2015). En este nuevo trabajo, extendimos nuestro estudio hacia otros subtipos de Ca_v para mostrar que la inhibición crónica mediada por GHSR se extiende 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, Pajvani, Fife, Spotts, & Greenberg, 2001; West et al., 2001). Uno de los mejores estudios acerca del efecto de la actividad de un GPCR sobre Ca_v1 es el incremento en su actividad 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 y este efecto podría competir con el calcio liberado de compartimentos intracelulares tal como ha sido descrito para la activación de GHSR en neuronas (Andrews et al., 2009; Cabral, Suescun, Zigman, & Perello, 2012; Cowley et al., 2003), indicando que GHSR ejercería un fino control en la dinámica del calcio, y consecuentemente, 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, 2003; Zhang, Jiang, Snutch, & Tao, 2013) y cambios en su actividad debido a variantes de *splicing* (Latour et al., 2004; Murbartian, Arias, & Perez-Reyes, 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 estabilidad en la membrana plasmática de los Ca_v3 no está muy caracterizado (Zhang et al., 2013). Es sabido 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 $Ca_v\beta$ es requisito necesario para observar el efecto inhibitorio de la actividad constitutiva de GHSR. En relación a ello, la interacción entre $Ca_v\beta$ y Ca_v3 no está establecida claramente. Algunos reportes soportan esta interacción mostrando que la corriente Ca_v3 se ve incrementada por la co-expresión de $Ca_v\beta$ (Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004) y proponen la presencia de una conservada secuencia en la región AID en los Ca_v3 y en los Ca_v1 y Ca_v2 (Dolphin, 2003). En oposición, otros estudios fallaron en demostrar el impacto directo de $Ca_v\beta$ en los niveles de corriente de Ca_v3 (Bae, Suh, & Lee, 2010; Leuranguer, Bourinet, Lory, & Nargeot, 1998). Nuestros resultados serían los primeros en indicar que la subunidad $Ca_v\beta$ es requerida para observar la modulación negativa en el tráfico de los Ca_v3 por la actividad constitutiva de un GPCR, revelando un nuevo rol inhibitorio para la subunidad $Ca_v\beta$.



Conclusiones

Nuestros datos actuales y anteriores, nos permiten pensar que la actividad constitutiva de GHSR se extiende a otros canales además de los presinápticos ($Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$), como son los canales de tipo 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 Ca_v estaría disminuida por estar siendo retenidos en el retículo endoplásmico y quizás en menor medida en el aparato de Golgi, y se descartaría que estén siendo internalizados hacia el sistema de endosomas (figura 12). El efecto negativo en el tráfico de Ca_v hacia la membrana

plasmática por GHSR podría superarse mediante la activación de otros GPCR que contrarrestan la cascada de señalización de GHSR constitutivamente activa. Este proceso globalmente llevaría a un control espacio-temporal preciso de la inserción de la membrana de Ca_v . 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 de canales formados con $Ca_v\beta$ en las neuronas que expresan GHSR.

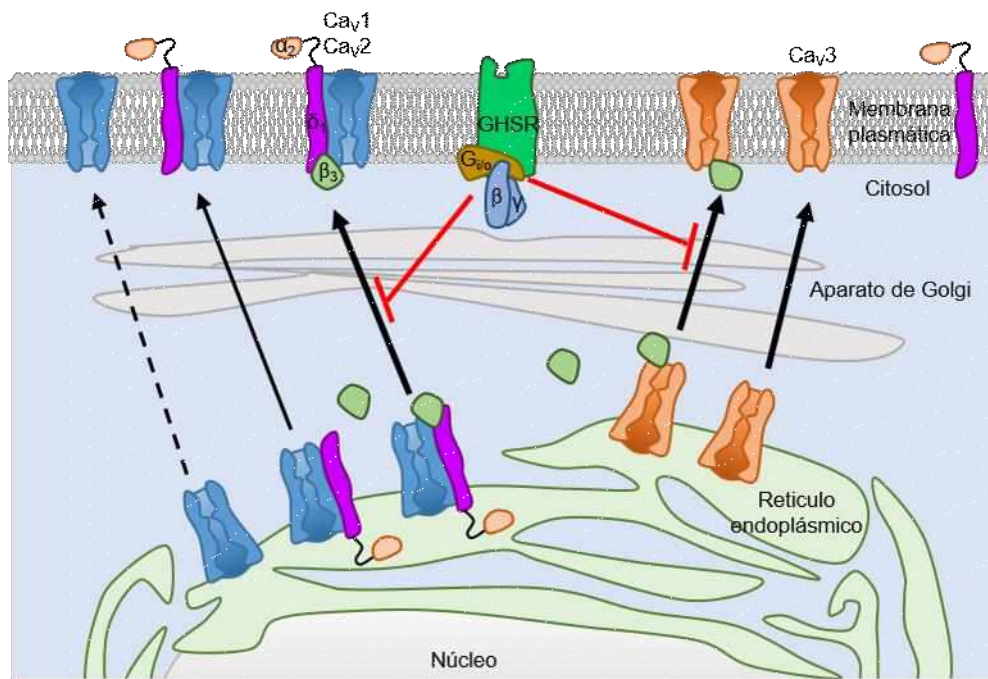
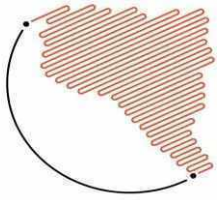
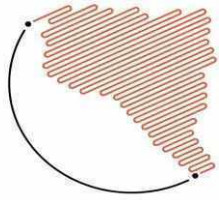


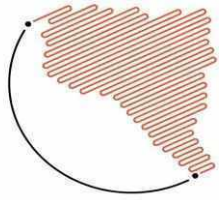
Figura 12. Los canales de calcio Ca_v1 y Ca_v2 trafican débilmente desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática en ausencia de subunidades auxiliares. La coexpresión de las subunidades ($Ca_v\beta$ y/o $Ca_v\alpha_2\delta$) incrementa dicho tráfico estabilizando el complejo canal en la membrana plasmática. De manera diferente, el tráfico de los Ca_v3 hacia la membrana plasmática es independiente de la presencia de las subunidades. Nuestro mecanismo propuesto implica que la actividad constitutiva de GHSR a través de un mecanismo dependiente de la proteína $G_{i/o}$ disminuye la expresión del complejo canal (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3) en la superficie celular por una retención del mismo en el retículo endoplasmático sólo si la subunidad $Ca_v\beta$ está formando parte el complejo canal.

Referencias bibliográficas

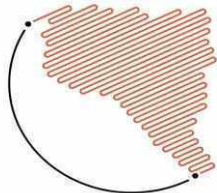
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., . . . Zamponi, G. W. (2011). The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci*, 14(2), 173-180. doi: 10.1038/nn.2712
- Altier, C., Khosravani, H., Evans, R. M., Hameed, S., Peloquin, J. B., Vartian, B. A., . . . Zamponi, G. W. (2006). ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci*, 9(1), 31-40. doi: 10.1038/nn1605
- Andrews, Z. B., Erion, D., Beiler, R., Liu, Z. W., Abizaid, A., Zigman, J., . . . Horvath, T. L. (2009). Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *J Neurosci*, 29(45), 14057-14065. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3890-09.2009
- 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 Ca^{2+} channels. *FEBS Lett*, 579(18), 3907-3912. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.008
- 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(3), 185-191. doi: 10.1007/s10059-010-0106-z



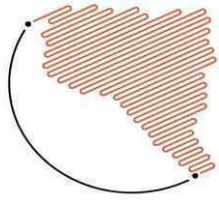
- Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., . . . Zamponi, G. W. (2004). Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci*, 7(2), 118-125. doi: 10.1038/nn1180
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., . . . 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(1), 177-190.
- Cabral, A., Suescun, O., Zigman, J. M., & Perello, M. (2012). Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One*, 7(2), e31462. doi: 10.1371/journal.pone.0031462
- Catterall, W. A., & Few, A. P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59(6), 882-901. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.005
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., . . . 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(4), 649-661.
- 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 beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem*, 271(43), 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 beta2a subunit. *J Biol Chem*, 273(36), 23590-23597.
- Chien, A. J., Zhao, X., Shirokov, R. E., Puri, T. S., Chang, C. F., Sun, D., . . . Hosey, M. M. (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, 270(50), 30036-30044.
- De Waard, M., Pragnell, M., & Campbell, K. P. (1994). Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron*, 13(2), 495-503.
- Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., da Silva, I., Horvath, B., . . . Horvath, T. L. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci*, 9(3), 381-388. doi: 10.1038/nn1656
- 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(5541), 333-339. doi: 10.1126/science.1063395
- Dolphin, A. C. (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, 35(6), 599-620.
- Dolphin, A. C. (2012). Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci*, 13(8), 542-555. doi: 10.1038/nrn3311
- Dolphin, A. C., Wyatt, C. N., Richards, J., Beattie, R. E., Craig, P., Lee, J. H., . . . Perez-Reyes, E. (1999). The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol*, 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. *J Biol Chem*, 279(28), 29263-29269. doi: 10.1074/jbc.M313450200
- Dunlap, K., Luebke, J. I., & Turner, T. J. (1995). Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci*, 18(2), 89-98.



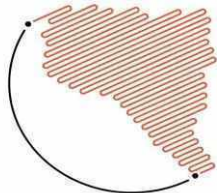
- Fang, K., & Colecraft, H. M. (2011). Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca_v1.2) channels. *J Physiol*, 589(Pt 18), 4437-4455. doi: 10.1113/jphysiol.2011.214247
- Felix, R., Calderon-Rivera, A., & Andrade, A. (2013). Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 2(5), 207-220. doi: 10.1002/wmts.93
- 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. *J Biol Chem*, 282(4), 2156-2162. doi: 10.1074/jbc.M609071200
- Gray, A. C., Raingo, J., & Lipscombe, D. (2007). Neuronal calcium channels: splicing for optimal performance. *Cell Calcium*, 42(4-5), 409-417. doi: 10.1016/j.ceca.2007.04.003
- Hamed, S. A. (2008). Neuroendocrine hormonal conditions in epilepsy: relationship to reproductive and sexual functions. *Neurologist*, 14(3), 157-169. doi: 10.1097/NRL.0b013e3181618ada
- 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(5986), 538-544.
- Inoue, H., Kangawa, N., Kinouchi, A., Sakamoto, Y., Kimura, C., Horikawa, R., . . . 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. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(2), E373-378. doi: 10.1210/jc.2010-1570
- 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. *Addict Biol*, 11(1), 45-54. doi: 10.1111/j.1369-1600.2006.00002.x
- Kisilevsky, A. E., Mulligan, S. J., Altier, C., Iftinca, M. C., Varela, D., Tai, C., . . . Zamponi, G. W. (2008). D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*, 58(4), 557-570. doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.002
- Kisilevsky, A. E., & Zamponi, G. W. (2008). D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels (Austin)*, 2(4), 269-277.
- 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(2), 112-119. doi: 10.1002/glia.20063
- 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 beta1 but not for palmitoylated beta2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *J Neurosci*, 25(30), 6984-6996. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1137-05.2005
- 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(6), 701-708.



- Leyris, J. P., Gondeau, C., Charnet, A., Delattre, C., Rousset, M., Cens, T., & Charnet, P. (2009). RGK GTPase-dependent CaV2.1 Ca²⁺ channel inhibition is independent of CaVbeta-subunit-induced current potentiation. *FASEB J*, 23(8), 2627-2638. doi: 10.1096/fj.08-122135
- Lin, Y. C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., . . . Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5, 4767. doi: 10.1038/ncomms5767
- Lopez Soto, E. J., Agosti, F., Cabral, A., Mustafa, E. R., Damonte, V. M., Gandini, M. A., . . . Raingo, J. (2015). Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *J Gen Physiol*, 146(3), 205-219. doi: 10.1085/jgp.201511383
- Marangoudakis, S., Andrade, A., Helton, T. D., Denome, S., Castiglioni, A. J., & Lipscombe, D. (2012). Differential ubiquitination and proteasome regulation of Ca(V)₂ N-type channel splice isoforms. *J Neurosci*, 32(30), 10365-10369. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0851-11.2012
- McKay, B. E., McRory, J. E., Molineux, M. L., Hamid, J., Snutch, T. P., Zamponi, G. W., & Turner, R. W. (2006). Ca(V)₃ T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci*, 24(9), 2581-2594. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05136.x
- 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. *J Biol Chem*, 286(25), 22203-22210. doi: 10.1074/jbc.M110.201871
- Molineux, M. L., McRory, J. E., McKay, B. E., Hamid, J., Mehaffey, W. H., Rehak, R., . . . Turner, R. W. (2006). Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5555-5560. doi: 10.1073/pnas.0601261103
- Murbartian, J., Arias, J. M., & Perez-Reyes, E. (2004). Functional impact of alternative splicing of human T-type Cav3.3 calcium channels. *J Neurophysiol*, 92(6), 3399-3407. doi: 10.1152/jn.00498.2004
- 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. *J Cell Sci*, 130(22), 3907-3917. doi: 10.1242/jcs.207886
- 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(6817), 194-198. doi: 10.1038/35051587
- Olson, P. A., Tkatch, T., Hernandez-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., . . . Surmeier, D. J. (2005). G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci*, 25(5), 1050-1062. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3327-04.2005
- Pan, B., & Zucker, R. S. (2009). A general model of synaptic transmission and short-term plasticity. *Neuron*, 62(4), 539-554. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.025
- Pantel, J., Legendre, M., Cabrol, S., Hilal, L., Hajaji, Y., Morisset, S., . . .



- Amselem, S. (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest*, 116(3), 760-768. doi: 10.1172/JCI25303
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, 83(1), 117-161. doi: 10.1152/physrev.00018.2002
- Powell, K. L., Cain, S. M., Ng, C., Sirdesai, S., David, L. S., Kyi, M., . . . 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. *J Neurosci*, 29(2), 371-380. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5295-08.2009
- 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. *J Neurosci*, 26(43), 11072-11082. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3229-06.2006
- Raingo, J., Khvotchev, M., Liu, P., Darios, F., Li, Y. C., Ramirez, D. M., . . . Kavalali, E. T. (2012). VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci*, 15(5), 738-745. doi: 10.1038/nn.3067
- 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. *J Biol Chem*, 286(11), 8829-8838. doi: 10.1074/jbc.M110.166520
- Rousset, M., Cens, T., Menard, C., Bowerman, M., Bellis, M., Bruses, J., . . . Charnet, P. (2015). Regulation of neuronal high-voltage activated Ca(V)2 Ca(2+) channels by the small GTPase RhoA. *Neuropharmacology*, 97, 201-209. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.019
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2012). Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci*, 69(6), 843-856. doi: 10.1007/s00018-011-0843-y
- Thaler, C., Gray, A. C., & Lipscombe, D. (2004). Cumulative inactivation of N-type CaV2.2 calcium channels modified by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5675-5679. doi: 10.1073/pnas.0303402101
- 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. *Circ Res*, 56(1), 87-96.
- 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(2), 280-294. doi: 10.1016/j.str.2007.11.010
- 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. *J Biol Chem*, 286(11), 9598-9611. doi: 10.1074/jbc.M110.195909
- West, A. E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., . . . Greenberg, M. E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), 11024-11031. doi: 10.1073/pnas.191352298
- Wheeler, D. G., Barrett, C. F., Groth, R. D., Safa, P., & Tsien, R. W. (2008). CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription



- coupling. *J Cell Biol*, 183(5), 849-863. doi: 10.1083/jcb.200805048
- 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. *J Physiol*, 510 (Pt 2), 347-360.
- Xu, W., & Lipscombe, D. (2001). Neuronal Ca(V)1.3α(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*, 21(16), 5944-5951.
- Zhang, Y., Jiang, X., Snutch, T. P., & Tao, J. (2013). Modulation of low-voltage-activated T-type Ca(2+)(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1550-1559. doi: 10.1016/j.bbame.2012.08.032
- Zigman, J. M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J. N., Lee, C. E., . . . Elmquist, J. K. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115(12), 3564-3572. doi: 10.1172/JCI26002

Agradecimientos

El trabajo presentado también tiene como autores indispensables a Dr. Lopez Soto E. Javier (Departament of Neuroscience, Brown University, Providence, RI); Dra. Martínez Damonte, Valentina (Stanford University); Dra. Lipscombe Diane (Departament of Neuroscience, Brown University, Providence, RI) y Dra. Rodríguez Silvia S (Laboratorio de Electrofisiología-IMBICE). Agradecemos al Dr. Jeffrey Zigman (The

University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX) por proporcionar los ratones deficientes en GHSR y al Dr. Mario Perello y Guadalupe García Romero (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina) por su ayuda y asesoramiento en alojamiento y cuidado de la colonia de ratones. Agradecemos a Sylvia Denome (Departament of Neuroscience, Brown University, Providence, RI) por su excelente asistencia técnica y a Daniel Dubreuil (Departament of Neuroscience, Brown University, Providence, RI) por ayudarnos amablemente con la microscopía confocal.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (PICT2013-1145 y PICT2015-3330 a J.R.). Asimismo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP-X765 y UNLP-X860). Emilio Román Mustafá, Valentina Martínez Damonte, y Jesica Raingo fueron financiados por el CONICET y Silvia S. Rodríguez por la Comisión de Investigaciones de la Provincia de Buenos Aires (CIC). También se agradece por el soporte vital de la Universidad Nacional de La Plata.