



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral: “Evaluación del impacto de la coexpresión del receptor de ghrelina (GHSR) y los receptores de dopamina tipo 1 y 2 (D1R y D2R) sobre la modulación de los canales de calcio operados por voltaje presinápticos (Ca_v2)”

Tesista: Lic. Santiago Cordisco Gonzalez

Director/a: Dra. Jesica Raingo

Año: 2020

Agradecimientos

A la educación pública, las universidades públicas y los gobiernos que apoyan la inclusión educativa.

A Jesica por hacerme parte de su laboratorio y guiarme durante estos años. A Román por sus consejos, críticas constructivas y compañía durante todo el doctorado. A Sil por el eterno aguante. A Valen por incluirme y compartir conmigo desde el principio. A Cambria, Clara, Ema, Javi y Fran.

A la oficina de becarios 1, sin ellos no habría ciencia ni becario que aguante.

Al IMBICE y su gente.

A la familia y amigos.

ÍNDICE

Índice

RESUMEN.....	5
RESUMEN EN INGLÉS.....	7
PUBLICACIONES.....	9
Publicaciones directamente asociadas a este trabajo de tesis.....	9
Publicaciones no asociadas directamente con este trabajo de tesis.....	9
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	15
Canales de calcio activados por voltaje (Ca _v).....	15
Receptores acoplados a proteína G (GPCR).....	17
Regulación de Ca _v 2.1-2 por GPCRs.....	19
Receptores de dopamina.....	21
Receptor de dopamina tipo 1 (D1R).....	21
Receptor de dopamina tipo 2 (D2R).....	23
Receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR) o receptor de ghrelina.....	24
Oligomerización de GPCRs y su impacto en la fisiología neuronal.....	26
Heterodímeros D1R-GHSR.....	29
Heterodímeros D2R-GHSR.....	29
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Modelos experimentales.....	33
1.1. Línea celular.....	33
1.2. Animales.....	33
2. Cultivos celulares.....	33
2.1. Cultivos de células HEK293T.....	33
2.2. Cultivo primario de neuronas embrionarias hipotalámicas.....	34

3. Expresión heteróloga	35
3.1. Transfecciones transitorias de células HEK293T	35
3.2. Transfecciones transitorias de células HEK293T para la producción de lentivirus ..35	
3.2.1. Producción y cosecha de partículas lentivirales	35
3.2.2. Transducción de cultivos primarios neuronales	35
3.2.3. Plásmidos utilizados	36
4. Preparación y obtención de plásmidos.....	37
4.1. Transformación de bacterias competentes	37
4.2. Extracción de ADN plasmídico a mediana escala.....	37
4.3. Determinación de la concentración de ADN	37
5. Drogas	38
6. Microscopia y obtención de imágenes	38
6.1. Experimentos de colocalización.....	38
6.2. Experimentos de cantidad de fluoróforo en la membrana plasmática	38
6.3. Experimentos de relación de fluorescencia en citoplasma sobre fluorescencia en la membrana plasmática.....	39
7. Citometría de flujo.....	39
8. Electrofisiología	40
9. Análisis de datos y estadísticas	42
RESULTADOS.....	44
1. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre la modulación de los canales $Ca_v2.2$	44
1.1. Confirmación de la colocalización de D1R y GHSR expresados en forma heteróloga en células HEK293T	44
1.2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre la modulación de los canales $Ca_v2.2$ producida por la actividad dependiente de agonista de cada uno de los receptores (Objetivo 1).....	45

1.3. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre las corrientes basales de los canales $Ca_v2.2$ (Objetivo 2).....	48
2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre la modulación de los canales $Ca_v2.2$	52
2.1. Confirmación de la interacción de D2R y GHSR expresados en forma heteróloga en células HEK293T	52
2.2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre la modulación de los canales $Ca_v2.2$ por la actividad dependiente de agonista de cada uno de los receptores (Objetivo 3)	55
2.3. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre las corrientes basales de los canales $Ca_v2.2$ (Objetivo 4).....	62
2.4. Estudiar el impacto de la coexpresión del D2R y el GHSR sobre las corrientes de calcio nativas de neuronas embrionarias hipotalámicas.....	71
DISCUSIÓN.....	78
Interacción entre D1R y GHSR	78
Interacción entre D2R y GHSR	83
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFÍA.....	94

RESUMEN

RESUMEN

Los canales de calcio operados por voltaje tipo $Ca_v2.2$ son activados por potenciales de acción que llegan a la terminal presináptica y las corrientes de calcio a través de su poro inducen la liberación de neurotransmisores. En este contexto, la regulación de $Ca_v2.2$ es crítica para la comunicación neuronal. Uno de los mecanismos más importantes para esta regulación es la actividad de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptor*). Entre los GPCRs capaces de modular la actividad de $Ca_v2.2$ están el receptor de ghrelina (GHSR) y los receptores de dopamina tipo 1 y 2 (D1R y D2R). En estudios previos de nuestro laboratorio demostramos que la actividad constitutiva de GHSR reduce el tráfico de $Ca_v2.2$ hacia la membrana plasmática, mientras que su actividad dependiente de ghrelina inhibe las corrientes $Ca_v2.2$ en forma aguda. Para el caso de los receptores de dopamina, la actividad dependiente de dopamina de ambos receptores produce la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$. Estudios recientes han demostrado que el receptor GHSR es capaz de heterodimerizar con los receptores de dopamina en distintas áreas del cerebro, siendo las más importantes el hipocampo (para D1R-GHSR) y el hipotálamo (para D2R-GHSR). La formación de estos heterodímeros altera profundamente las vías de señalización involucradas con consecuencias fisiológicas importantes. Nosotros aquí exploramos como la coexpresión de GHSR y de los receptores de dopamina en células HEK293T modula el efecto de la actividad de cada GPCR sobre los canales $Ca_v2.2$. En el estudio sobre la coexpresión de D1R y GHSR observamos que el efecto de la actividad dependiente de agonista de ambos GPCRs sobre las corrientes $Ca_v2.2$ no se modifica. Por otro lado las corrientes basales $Ca_v2.2$ disminuyen dramáticamente por la coexpresión de D1R y GHSR. Con respecto a la coexpresión de D2R y GHSR encontramos que el efecto de la actividad dependiente de ghrelina de GHSR sobre los $Ca_v2.2$ no se modifica mientras que el efecto de la actividad dependiente de dopamina de D2R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ se reduce. Al estudiar las corrientes basales en presencia solo de D2R encontramos una inhibición tónica de las corrientes removible por voltaje. La coexpresión de GHSR reduce las corrientes basales de $Ca_v2.2$ y además ocluye la inhibición tónica observada para D2R. En esta tesis investigamos las vías de señalización implicadas en los efectos de D1R-GHSR y D2R-GHSR sobre los canales $Ca_v2.2$. Además, exploramos cómo la sobreexpresión de D2R y GHSR en cultivos de neuronas hipotalámicas afecta la modulación de las corrientes de calcio nativas por estos GPCRs. En resumen, nuestros resultados nos permiten proponer que la heterodimerización de GHSR con dos subtipos de receptores para dopamina tiene un impacto profundo en la modulación que cada GPCR ejerce sobre los $Ca_v2.2$.

RESUMEN EN INGLÉS

RESUMEN EN INGLÉS

$Ca_v2.2$ voltage-gated calcium channels are activated by action potentials in neuronal presynaptic terminals, where the calcium currents through the channel pore induce the release of neurotransmitters. In this context, $Ca_v2.2$ regulation is critical for neuronal communication. One of the most important mechanisms for this regulation is the activity of G protein-coupled receptors (GPCRs). The ghrelin receptor (GHSR) and the dopamine receptors type 1 and 2 (D1R and D2R) are among the GPCRs capable of modulating the activity of $Ca_v2.2$. In previous studies of our laboratory, we demonstrated that the constitutive activity of GHSR chronically reduces the traffic of $Ca_v2.2$ towards the plasma membrane, while its ghrelin-dependent activity inhibits $Ca_v2.2$ currents in an acute manner. In the case of dopamine receptors, the dopamine-dependent activity of D1R and D2R receptors causes the inhibition of $Ca_v2.2$ currents. Recent studies have shown that GHSR is capable of heterodimerizing with dopamine receptors in different areas of the brain, the most important being the hippocampus (for D1R-GHSR) and the hypothalamus (for D2R-GHSR). The formation of these heterodimers profoundly alters the signaling pathways involved, with important physiological consequences. Here, we explore how the co-expression of GHSR and dopamine receptors in HEK293T cells modulates the effect of each GPCR activity on the $Ca_v2.2$ channels. In the study of the co-expression of D1R and GHSR, we observed that the effect of the agonist-dependent activity of both GPCRs on $Ca_v2.2$ currents is not modified. On the other hand, basal $Ca_v2.2$ currents are dramatically decreased due to the co-expression of D1R and GHSR. Regarding the co-expression of D2R and GHSR, we found that the effect of ghrelin-dependent activity of GHSR on $Ca_v2.2$ currents is not modified while the effect of dopamine-dependent activity of D2R on $Ca_v2.2$ currents is reduced. When studying the basal $Ca_v2.2$ currents in the presence of D2R alone we found a tonic inhibition of currents removable by voltage. Co-expression of GHSR reduces the basal $Ca_v2.2$ currents and also occludes the tonic inhibition observed for D2R alone. In this thesis we investigated the signaling pathways involved in the effects of D1R-GHSR and D2R-GHSR on $Ca_v2.2$ channels. In addition, we explored how over-expression of D2R and GHSR in hypothalamic neuron cultures affects the modulation of native calcium currents by these GPCRs. In summary, our results allow us to propose that the heterodimerization of GHSR with two subtypes of dopamine receptors has a profound impact on the modulation that each GPCR exerts on $Ca_v2.2$.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Publicaciones directamente asociadas a este trabajo de tesis

Cordisco Gonzalez S., Mustafá E.R., Rodriguez S.S., Perello M., Raingo J. "Dopamine receptor type 2 (D2R) and ghrelin receptor (GHSR) co-expression alters Ca_v2.2 modulation by G protein signaling cascades".

ACS CHEMICAL NEUROSCIENCE; doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00426; Año 2019.

Publicaciones no asociadas directamente con este trabajo de tesis

Mustafá E.R., **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.

Agosti F., **Cordisco Gonzalez S.**, Martinez Damonte V., Tolosa M.J., Di Siervi N., Schioth H.B., Davio C., Perello M., Raingo J. "Melanocortin 4 receptor constitutive activity inhibits L-type voltage-gated calcium channels in neurons".

NEUROSCIENCE, doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.007; Año 2017.

LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

A204E	mutante puntual del GHSR
5-HT _{2A}	receptor de serotonina 5-HT _{2A}
5-HT _{2C}	receptor de serotonina 5-HT _{2C}
AA 2A	receptor de adenosina A 2A
AC	adenilato ciclasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AT II	angiotensina II
AT1R	receptor de angiotensina II tipo 1
ATP	adenosín trifostato
Cav	canales de calcio operados por voltaje
CCP	coeficiente de correlación de Pearson
ChTx	toxina del cholera
CREB	proteína de unión a elementos reguladores de AMPc
D1R	receptor de dopamina tipo 1
D2R	receptor de dopamina tipo 2
D3R	receptor de dopamina tipo 3
D4R	receptor de dopamina tipo 4
D5R	receptor de dopamina tipo 5
DAG	diacil glicerol
DARPP-32	fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa
dB	decibeles
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
Dopa	dopamina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEM	error estándar de la media
EGTA	etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) -N, N, N', N'-ácido tetraacético
FIJI	<i>Fiji Is Just ImageJ</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GABA	ácido γ -aminobutírico

GDP	guanosina-5'-difosfato
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
Ghre	ghrelina
GHRP-6	<i>growth-hormone-releasing peptides 6</i>
GHSR	receptor de ghrelina
GIRK	canales de potasio rectificadores entrante regulados por proteínas G
GPCR	receptor acoplado a proteína G
Gq DN	Gq-Q209L/D277N
GRK	quinasas asociadas a GPCRs
GTP	guanosina-5'-trifosfato
GTPasa	guanosina trifosfatasa
H ₃	receptor de histamina H ₃
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico
HVA	<i>high voltage-activated</i>
I _{Ba}	corrientes de bario
I _{CaV2.2}	corrientes de calcio Ca _v 2.2
IP ₃	inositol 1,4,5-tris-fosfato
JACoP	<i>Just another colocatizacion plugin</i>
kg	kilogramo
kHz	kiloHertz
LB	Luria Bertani
LVA	<i>low voltage-activated</i>
M	molar
M1	coeficiente de Manders 1
M2	coeficiente de Manders 2
MC3R	receptor de melanocortina 3
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MP	membrana plasmática
ms	milisegundo

mV	milivolt
MΩ	megaohm
nm	nanómetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
ORL1	<i>opioid receptor like-1</i>
pA	picoamperes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pF	picofaradio
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PTx	toxina pertussis
Quin	quinpirole
r.p.m.	revoluciones por minuto
RGB	rojo, verde, azul
RGS	<i>regulators of G-protein signaling</i>
RhoGEFs	<i>RhoGTPase nucleotide exchange factors</i>
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
s	segundo
SNARE	receptores de proteínas de fijación soluble de NSF
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SPA	[D-Arg ¹ ,D-Phe ⁵ ,D-Trp ^{7,9} ,Leu ¹¹]-substance P analog
SV40	antígeno T derivado del virus SV40
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TM6	hélice transmembrana 6
TTx	tetrodotoxina
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Canales de calcio activados por voltaje (Ca_v)

Los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v) son estructuras fundamentales de las células excitables ya que acoplan la despolarización de la membrana plasmática a la entrada del ion calcio, el cual puede a su vez modificar el potencial de membrana y es además un segundo mensajero universal. Estos canales censan el voltaje de la membrana lo que provoca la apertura de su poro selectivo para calcio permitiendo el ingreso de este ion desde el medio extracelular. En el sistema nervioso central estos canales participan de procesos fisiológicos importantes como disparo de potenciales de acción, liberación de neurotransmisores, activación de cascadas de señalización y expresión génica (Simms & Zamponi, 2014). La clasificación de los subtipos de Ca_v se fue modificando en el tiempo a medida que nuevas corrientes de calcio se aislaron y nuevos genes se identificaron (Catterall, 2000). La división más sencilla que existe de los Ca_v es clasificarlos por los voltajes a los que se activan: Ca_v que se activan a altos voltajes o HVA (del inglés, *high voltage-activated*) y Ca_v que se activan a bajos voltajes o LVA (del inglés, *low voltage-activated*) (Neely & Hidalgo, 2014). Otra clasificación se basa en la cinética de la corriente macroscópica, el tipo celular donde se expresan y los inhibidores específicos. Así, durante mucho tiempo se clasificó a los Ca_v en canales tipo L (del inglés *Long lasting*), N (del inglés *Non long lasting and Neuronal*), P/Q (del inglés *Purkinje* para las corrientes tipo P y Q para las corrientes aisladas en neuronas granulares de cerebelo), R (del inglés *Resistant*) y T (del inglés *Transient*). Por último la clasificación moderna actual proviene de la identidad genética de los canales. Existen diez genes conocidos que codifican para los canales $Ca_v1.1-4$, $Ca_v2.1-3$, $Ca_v3.1-3$ (Ertel *et al.*, 2000). En el grupo de los HVA se encuentran los canales $Ca_v1.1-4$, que median las corrientes tipo L y los canales $Ca_v2.1-3$, que median las corrientes tipo P/Q, N y R, respectivamente (Catterall, 2000). Las corrientes tipo T mediadas por los canales $Ca_v3.1-3$ pertenecen al grupo de canales LVA. En neuronas, la distribución de los distintos Ca_v no es homogénea y está relacionada con el rol fisiológico que cumple cada subtipo. Los Ca_v1 se localizan predominantemente en somas y dendritas donde contribuyen a la integración de las señales eléctricas que llegan a una neurona y además participan de la regulación de la expresión génica (Bean, 1989a). Los Ca_v2 controlan la liberación de neurotransmisores en las terminales presinápticas (Takahashi & Momiyama, 1993; Cao & Tsien, 2010). Los Ca_v3 se encuentran presentes en dendritas donde regulan el patrón de disparo de potenciales de acción (Perez-

Reyes, 2003). Sin embargo, las funciones y la distribución de los Ca_v son variables y no están completamente comprendidas.

A nivel estructural los Ca_v son complejos heteroméricos de cuatro o cinco subunidades codificadas por genes independientes. La subunidad $Ca_v\alpha_1$ forma el poro iónico y otorga las características principales al canal como su sensibilidad a fármacos específicos y las propiedades biofísicas ya que posee el sensor de voltaje y la compuerta de activación. Estructuralmente posee ~2000 aminoácidos agrupados en cuatro dominios repetidos, cada uno con seis segmentos transmembrana (S1-S6). Los segmentos S4 constituyen el sensor de voltaje del canal y los segmentos S5 y S6 forman el poro (Catterall, 2000). La subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ es citoplasmática y se asocia a la subunidad $Ca_v\alpha_1$ promoviendo la expresión en la superficie celular de la subunidad principal y el normal funcionamiento de la compuerta del canal (Lacerda *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1991). Diferentes subtipos de $Ca_v\beta$ otorgan propiedades de activación e inactivación diferentes a los Ca_v (Hofmann *et al.*, 1994; Hosey *et al.*, 1996). Los subtipos de $Ca_v\beta$ modifican además la sensibilidad de los Ca_v a algunas vías de modulación (Proft & Weiss, 2015). La subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2$ es extracelular y se ancla a la membrana a través un puente disulfuro con la subunidad $Ca_v\delta_1$, que es una proteína transmembrana (Gurnett *et al.*, 1996), por procesamiento post traduccional (De Jongh *et al.*, 1990; Jay *et al.*, 1991). Por último, la subunidad auxiliar $Ca_v\gamma$ está compuesta de cuatro segmentos transmembrana, se encuentra principalmente en músculo esquelético (Jay *et al.*, 1990) y su función en el sistema nervioso no se conoce aún.

Dada la importancia funcional de los Ca_v en neuronas existen múltiples mecanismos que regulan finamente su nivel de expresión como así también de las propiedades cinéticas y de sensibilidad al voltaje. Por otro lado, varias canalopatías tienen su base en desarreglos funcionales de estos canales (Cain & Snutch, 2011). Sumado a la inhibición clásica de los canales tipo L en corazón y tejido vascular por las dihidropiridinas recientemente varios moduladores de subtipos de Ca_v neuronales se han comenzado a utilizar en clínica para tratar el dolor crónico (Moore *et al.*, 2009; De Logu & Geppetti, 2019). Los mecanismos de regulación de los Ca_v incluyen numerosas vías de señalización que actúan sobre las subunidades del canal. En el caso de los Ca_v1 son regulados positiva o negativamente a través de fosforilaciones de su subunidad principal por diferentes quinasas (Striessnig *et al.*, 2006; Calin-Jageman & Lee, 2008). Los Ca_v2 son modulados además por la unión directa de las proteínas SNARE (receptores de proteínas de fijación soluble de NSF) y la subunidad $G\beta\gamma$ de proteínas G (Dolphin, 2009; Mochida, 2018). La regulación de los Ca_v3 se encuentra mucho menos estudiada (Perez-Reyes, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Muchas de las vías implicadas en estas regulaciones se desencadenan a partir de la actividad de receptores acoplados a proteína G.

Receptores acoplados a proteína G (GPCR)

Los GPCRs son proteínas integrales de la membrana plasmática con siete dominios transmembrana que son fundamentales para la comunicación celular. Los GPCRs funcionan como sensores de ligandos extracelulares y mediante su acople a proteínas G transmiten esta información al medio intracelular. Son la familia más diversa y amplia de receptores transmembrana conocidos y si bien anteriormente se clasificaron en clases de A-F, los de mamíferos actualmente se dividen en cinco familias (clasificación GRAFS): glutamato (clase C), rhodopsina (clase A), adhesina (parte de la clase B), *frizzled/taste2* (clase F) y secretina (parte de la clase B) (Joost & Methner, 2002; Schiöth & Fredriksson, 2005). La primera estructura de un GPCR fue obtenida para el receptor de rhodopsina (clase A) mediante cristalización en el año 2000 (Palczewski *et al.*, 2000). Otro avance importante en el entendimiento de estos receptores fue logrado por Kobilka y Stevens, los cuales lograron cristalizar el receptor β_2 -adrenergico humano unido a un ligando desentrañando los distintos estados conformacionales del GPCR (Cherezov *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007). Dada la importancia de estas investigaciones en el año 2012, Palczewski y Kobilka recibieron el premio Nobel de química por sus estudios sobre los receptores acoplados a proteínas G.

Los mecanismos de señalización de los GPCRs se dan principalmente a través de la regulación de las proteínas G unidas y también por mecanismos independientes de estas últimas, como son la fosforilación mediada por quinasas asociadas a GPCRs (GRK, del inglés *G protein-coupled receptor kinase*) o por el acoplamiento a arrestina (Hilger *et al.*, 2018). Mediante estudios de cristalización de proteínas, se observó que la activación de los GPCRs produce una reorganización conformacional de la parte citoplasmática de la proteína que expone un bolsillo al cual se unen las proteínas G, las GRKs o arrestina (Hilger *et al.*, 2018). Una propiedad importante de los GPCRs es su desensibilización que se produce por la internalización del GPCR ante la presencia prolongada del agonista. Este efecto es muy importante porque termina la señalización a través del receptor y evita que pueda volver a ser activado en una ventana de tiempo limitado. El mecanismo de internalización es complejo y depende de PKA, proteína quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*) o las GRKs reclutadas por G $\beta\gamma$ que fosforilan la región C-terminal de los GPCRs activados promoviendo la unión de arrestinas (Ferguson, 2001; Gainetdinov *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los GPCRs pueden cointernalizar con proteínas de membrana blancas aumentando la diversidad de mecanismos regulatorios de los GPCRs (Altier *et al.*, 2006; Kisilevsky & Zamponi, 2008).

Las proteínas G son complejos heterotriméricos, compuestos por la proteína $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ une GTP al activarse y lo hidroliza a GDP al volver al estado inactivado (Wettschureck & Offermanns, 2005). En el estado inactivado, la proteína $G\alpha$ unida a GDP se asocia físicamente con el GPCR y el dímero $G\beta\gamma$. La llegada de un agonista extracelular específico cambia la conformación del receptor lo que promueve el intercambio del GDP por GTP en $G\alpha$, separándola de $G\beta\gamma$ y permitiendo que ambas subunidades lleven a cabo sus funciones fisiológicas. La terminación de la activación de las proteínas G se da por la hidrólisis del GTP a GDP producidas de manera intrínseca por la actividad GTPasa de $G\alpha$ o mediante la cooperación de proteínas regulatorias de las proteínas G, entre estas, las RGS (del inglés *regulators of G-protein signaling*), lo que produce la reasociación entre $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ (Proft & Weiss, 2015).

Las proteínas $G\alpha$ pueden ser de cuatro tipos: G_i/o , G_s , $G_q/11$ y $G_{12/13}$, mientras que hay cinco isoformas para $G\beta$ y doce para $G\gamma$ (Wettschureck & Offermanns, 2005). Las proteínas G_i/o inhiben a varios subtipos de adenilato ciclasas (AC) (Sadana & Dessauer, 2009). Sus niveles de expresión son relativamente altos y al ser activadas liberan una gran cantidad de proteínas $G\beta\gamma$ por lo que se cree que es la principal isoforma en activar las vías de señalización dependientes de $G\beta\gamma$ (Clapham & Neer, 1997; Robishaw & Berlot, 2004). Las proteínas G_s acoplan la activación de GPCRs al aumento de AMPc, mediante su interacción con distintas AC (Beavo & Brunton, 2002; Chin *et al.*, 2002). La activación de proteína quinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*) es un blanco clásico del AMPc (Bers, 2002). Por otro lado las proteínas $G_q/11$ activas se asocian a la isoforma β de la fosfolipasa C activándola ($PLC\beta$) (Exton, 1996; Rhee, 2001). $G_{12/13}$ activa RhoGEFs (del inglés *RhoGTPase nucleotide exchange factors*), la cual se transloca a la membrana plasmática y activa la GTPasa RhoA (Siehler, 2009). El acople entre cada GPCR y las proteínas G es variable en cuanto a la especificidad del subtipo de proteína $G\alpha$, pudiendo ser muy selectivo como es el caso del receptor de dopamina tipo 2 (D2R) estudiado en esta tesis, que se acopla exclusivamente a G_i/o ; mientras que el receptor de ghrelina, también estudiado aquí, es muy promiscuo en su acople, pudiendo unirse a varios subtipos de proteína $G\alpha$ (Neve, 2010; M'Kadmi *et al.*, 2015).

Además de la activación canónica de los GPCRs por la unión de sus ligandos agonistas, estos receptores pueden encontrarse en estados activos y señalizar a través de proteína G en ausencia de agonistas. Esta propiedad se conoce como actividad constitutiva. La existencia de la actividad constitutiva de los GPCRs se describió hace más de 30 años. En los '90 Costa y Herz realizaron experimentos con el receptor β_2 -adrenergico y el δ -opioide, y observaron que ambos adoptaban un estado activado en ausencia de ligando (Costa & Herz, 1989). Más tarde el descubrimiento de ligandos capaces de ocluir esta actividad, hoy conocidos como agonistas inversos, amplió las

posibilidades de estudiar la actividad basal de los GPCRs. Otros avances sobre esta propiedad de los GPCRS se logró a través de la mutagénesis, generalmente en la región TM6, para lograr GPCRs activados constitutivamente (Costa & Cotecchia, 2005). La relevancia fisiológica de la actividad constitutiva de los GPCRs ha ganado importancia en parte porque se encontraron mutaciones asociadas con varios fenotipos que aumentan la actividad constitutiva de GPCRs (Tao, 2008) como así también ligandos endógenos que funcionan como agonistas inversos (Tao *et al.*, 2010; M'Kadmi *et al.*, 2019). Un modelo molecular simple que explica los estados conformacionales de los GPCRs propone que estos pueden existir en un estado inactivo (R) con la capacidad de unir agonistas y pasar de este modo a otro estado (AR) y que, a su vez, estos dos estados pueden ser activados ya sea constitutivamente (R*) o en presencia del agonista (AR*). Así los agonistas inversos estabilizarían el estado R. En este modelo los antagonistas no modifican el equilibrio entre los estados del GPCRs dado que poseen igual afinidad de unión por R y R* (Bennett *et al.*, 2013).

Regulación de Cav2.1-2 por GPCRs

Los canales Cav2.1 y Cav2.2 se encuentran preferentemente en la presinapsis y acoplan la llegada de potenciales de acción al ingreso de calcio a la terminal sináptica. Los iones calcio catalizan la fusión de las vesículas que contienen neurotransmisores a la membrana plasmática, liberando así su contenido al espacio intersináptico donde interaccionan con sus receptores específicos permitiendo el flujo de información en el cerebro. Por lo tanto, los Cav2.1-2 constituyen un cuello de botella en el proceso de transmisión sináptica y su regulación es sumamente importante. Una de las formas de regulación más común y mejor estudiada es la producida por la actividad de los GPCR (Hille, 1994; Jones & Elmslie, 1997; Ikeda & Dunlap, 1999). Esta regulación no solo es importante a nivel fisiológico, sino que es sumamente utilizada de forma terapéutica, como por ejemplo el uso de agonistas específicos de los receptores opioides para el manejo de síntomas del dolor (Pergolizzi & Raffa, 2019). Hace más de 30 años que la inhibición de los Cav por un agonista de un GPCR se relacionó con la inhibición de la liberación de neurotransmisores. Dunlap y Fischbach mostraron que la norepinefrina reducía la componente dependiente de calcio de los potenciales de acción (Dunlap & Fischbach, 1978) y la amplitud de las corrientes de calcio (Dunlap & Fischbach, 1981) en neuronas de ganglio de la raíz dorsal. Hoy en día sabemos que los mecanismos involucrados en la modulación de los Cav2.1-2 por los GPCRs son diversos.

Uno de los mecanismos más estudiados es la inhibición producida por la unión directa del dímero G $\beta\gamma$ entre el dominio I y II de los Cav2.1-2 (De Waard *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997) sin involucrar segundos mensajeros solubles (Hille, 1994; Dolphin, 1995; Wickman & Clapham, 1995). Esta inhibición se denomina dependiente de voltaje debido a que la unión de G $\beta\gamma$ al canal se debilita a voltajes altos. Esto le da características particulares a la inhibición: por un lado las corrientes macroscópicas activadas por pulsos largos despolarizantes se activan más lentamente debido a que la inhibición se remueve progresivamente al mantener la célula a un voltaje despolarizado, por otro lado es posible remover transitoriamente la inhibición con la aplicación de un prepulso a muy altos voltajes antes del pulso de ensayo (Marchetti *et al.*, 1986; Bean, 1989b). En cuanto al mecanismo de inhibición se postula que la unión de G $\beta\gamma$ enlentece las corrientes de *gating*, originadas por el movimiento del sensor de voltaje, y que además estas se desacoplan de la corriente iónica (Jones *et al.*, 1997). Además de la inhibición dependiente de voltaje, los GPCRs pueden inhibir las corrientes Cav2.1-2 de manera independiente de voltaje a través de modulación de la actividad del canal por segundos mensajeros y/o modulando su tráfico. La inhibición independiente del voltaje mejor comprendida es a través de Gq la cual es más lenta que la inhibición por unión de G $\beta\gamma$ ya que depende de segundos mensajeros (Zamponi & Currie, 2013). La vía clásica activada por proteína Gq involucra a la enzima PLC que depleciona el PIP₂ de la membrana, el cual es necesario para el correcto funcionamiento de los Cav2.1-2 (Suh & Hille, 2008). Por otro lado, ejemplos de GPCRs que modulan el tráfico de Cav son los receptores de dopamina y nociceptina, los cuales fomentan el tráfico del Cav2.2 hacia la membrana plasmática y además, al ser activados por sus agonistas, cointernalizan con los Cav (Zamponi & Currie, 2013).

Hoy sabemos que la actividad constitutiva de algunos GPCRs, como el receptor de ghrelina, el receptor de melacortina 4, el receptor de nociceptina (ORL1) y receptores de opioides (MOR1), modifican la actividad de los Cav2.1-2 (Beedle *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2010; Agosti *et al.*, 2014; Lopez Soto *et al.*, 2015; Gandini *et al.*, 2019). La forma que se produce esta modulación difiere entre los GPCRs incluyendo modulación del tráfico del canal, fosforilaciones y la participación del dímero G $\beta\gamma$.

Receptores de dopamina

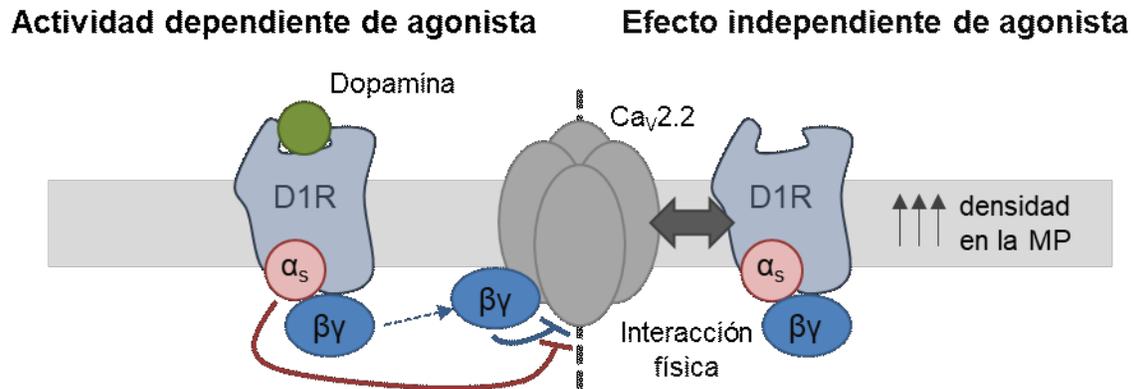
La historia de los receptores de dopamina está íntimamente asociada con el uso de antipsicóticos en la segunda guerra mundial, en donde se los usaba para aumentar el efecto de los analgésicos (Lacomme *et al.*, 1952). Luego se observó que además estas drogas tenían efectos sobre otros síntomas como las alucinaciones en pacientes psicóticos (Delay *et al.*, 1952). Este efecto fue tan sorprendente que obtuvo la atención de toda la comunidad psiquiátrica y comenzó la investigación de los mecanismos de acción de estas drogas, en búsqueda de comprender la psicosis y la esquizofrenia. En las décadas del 50 y 60, el uso de clopromazina en los Estados Unidos redujo drásticamente las internaciones debidas a esquizofrenia. El descubrimiento de que los antipsicóticos se unían al receptor de dopamina se produjo gracias a experimentos de competencia entre haloperidol y dopamina (Seeman *et al.*, 1976), y ese mismo año se postuló la existencia de dos receptores de dopamina, uno excitatorio y otro inhibitorio (Cools & Van Rossum, 1976). En el año 1979 se comienza a nombrar a estos receptores como receptores de dopamina tipo 1 (D1R) y receptores de dopamina tipo 2 (D2R) (Kebabian & Calne, 1979). Esta simple nomenclatura permaneció hasta los años 90 cuando se clonaron los distintos receptores de dopamina; D1R y D5R que pertenecen a los *D1R-like receptors*, los cuales son capaces de estimular AC, y D2R, D3R y D4R que pertenecen a los *D2R-like receptors* e inhiben a la AC (Neve, 2010). Todos los receptores de dopamina son GPCRs, que integran una subfamilia de la clase A que se caracterizan por unir catecolaminas, al igual que los adrenoreceptores. Las estructuras de los *D2R-like receptors* han sido obtenidas por cristalización, mientras que las estructuras de los receptores tipo 1 todavía son desconocidas (códigos del banco de datos de proteínas, PDB, del inglés *Protein Data Bank*, 6CM4 para D2R, 3PBL para D3R y 5WIU y 5WIV para D4R). Actualmente los receptores de dopamina se asocian al control de la locomoción, regulaciones de los efectos producidos por drogas de abuso, memoria y al crecimiento y comportamiento alimentario (Di Chiara & Bassareo, 2007; Surmeier *et al.*, 2007; Skibicka *et al.*, 2013). En esta tesis estudiamos específicamente a los receptores D1R y D2R de los cuales presentamos información relevante a continuación.

Receptor de dopamina tipo 1 (D1R)

El D1R es una proteína de 446 aminoácidos y su gen se compone de un exón no codificante y un exón codificante separados por un intrón pequeño (Zhou *et al.*, 1990). El gen de D1R se encuentra localizado en el cromosoma 5q35.1 (Grandy *et al.*, 1990). D1R se expresa en el

sistema nervioso central, mayoritariamente en el estriado, estriado dorsal, núcleo accumbens, *substantia nigra*, bulbo olfatorio, corteza prefrontal e hipocampo (Rangel-Barajas *et al.*, 2015). D1R participa en el control del movimiento (Deval *et al.*, 2006; Kravitz *et al.*, 2010; Gerfen & Surmeier, 2011), la plasticidad neuronal (Hamilton *et al.*, 2010; Kim & Kita, 2013; Aira *et al.*, 2016), la memoria, el aprendizaje asociativo (Puig *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015; Freund *et al.*, 2016) y los comportamientos alimentarios (Skibicka *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2014). A nivel molecular la actividad de D1R está asociada, principalmente, a la proteína Gs, siendo la estimulación de la AC su acción más frecuente (Brown & Makman, 1972; Keibian *et al.*, 1972), sin embargo en células del neostriado donde la proteína Gs se expresa en baja cantidad y la Golf es más frecuente, la estimulación de la AC por D1R se produce a través de esta última (Drinnan *et al.*, 1991; Zhuang *et al.*, 2000; Corvol *et al.*, 2001). Además D1R presenta actividad constitutiva mediada por la proteína Gs que se evidencia como un nivel basal de AMPc alto que depende de la cantidad de D1R expresado (Tiberi & Caron, 1994).

La estimulación de la AC por la activación por agonista de D1R produce la desinhibición de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual fosforila diferentes proteínas blanco, entre ellas la proteína de unión a elementos reguladores de AMPc (CREB, del inglés *cyclic AMP regulatory element-binding protein*), la fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa (DARPP-32, del inglés *dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein*) y varios canales iónicos. La activación de CREB produce su translocación al núcleo donde funciona como activador transcripcional de genes asociados con la plasticidad sináptica, la formación de memoria y en los cambios a largo plazo producidos por el desarrollo de adicción a drogas (Berke & Hyman, 2000; Josselyn & Nguyen, 2005). La enzima PKA fosforila canales de sodio operados por voltaje, los canales de calcio tipo N y P/Q y canales de K⁺ rectificadores anómalos produciendo su inhibición, mientras que la fosforilación de los canales de calcio tipo L los activa (Li *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1993; Cantrell *et al.*, 1997; Smith & Goldin, 1997; Arias-Montano *et al.*, 2007). Mientras que la activación de D1R por dopamina produce la disminución de las corrientes Ca_v2.2, la sola expresión del receptor aumenta la densidad en membrana de este canal por un mecanismo que involucra la interacción física entre D1R y Ca_v2.2 (Kisilevsky *et al.*, 2008) (Ver **esquema 1**).



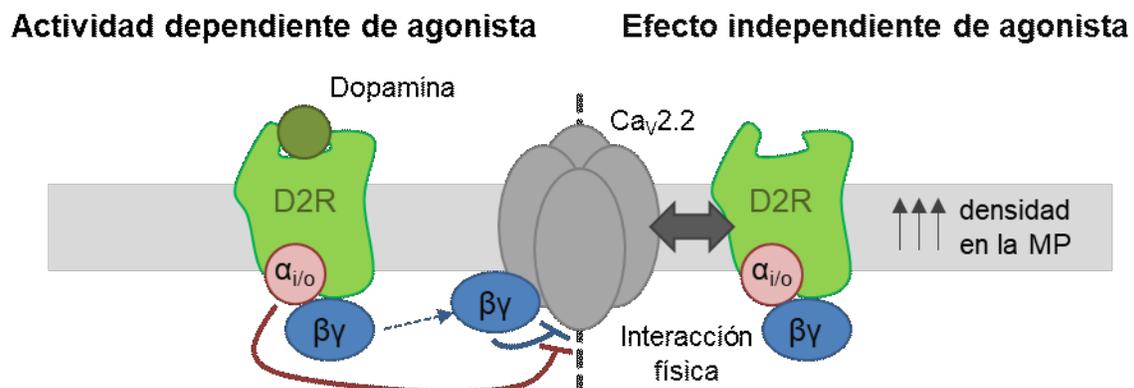
Esquema 1. Esquema de las vías de señalización para D1R que actúan sobre $Ca_v2.2$ propuestas en (Kisilevsky et al., 2008). Representación de la inhibición de los canales $Ca_v2.2$ por la actividad dependiente de agonista de D1R, en forma dependiente (azul) e independiente de (rojo) del voltaje (izquierda) y efecto de la interacción física entre $Ca_v2.2$ y D1R sobre la densidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática (MP) (derecha).

Receptor de dopamina tipo 2 (D2R)

El gen que codifica para D2R se compone de un exón no codificante separado de siete exones codificante por un gran intrón, a su vez los exones están separados por seis intrones y en humanos se encuentra en el cromosoma 11q23-24 (Grandy et al., 1989a). El D2R posee dos isoformas que se producirían por *splicing* alternativo del ARNm denominadas D2_LR (del inglés *long*) que codifica para una proteína de 444 aminoácidos y D2_SR (del inglés *short*) que codifica para una proteína de 415 aminoácidos (Grandy et al., 1989b). El D2R es el D2R-like receptor que se expresa en mayor cantidad en el cerebro. Sus principales áreas de expresión son el núcleo accumbens, estriado, tubérculo olfatorio, sustancia nigra y el área central tegmental (Chronwall et al., 1994). En el sistema nervioso central D2R participa de procesos relevantes como locomoción, circuito de abuso de drogas, control del apetito y es además blanco de sustancias antipsicóticas (Skibicka et al., 2013).

Las isoformas de *splicing* del D2R poseen una distribución diferencial en neuronas, el D2_SR se encuentra principalmente en cuerpos celulares y axones de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, siendo preferentemente presináptico, y el D2_LR está muy expresado en la postsinápsis de neuronas de estriado y núcleo accumbens (Khan et al., 1998). Nosotros denominaremos simplícidamente D2R al D2_LR utilizado en esta tesis. La actividad de D2R está asociada principalmente a proteínas Gi/o sensibles a la toxina pertussis (PTx) que inhiben la

actividad de la AC (Ohara *et al.*, 1988) y se cree que la Go es su vía más importante (Lledo *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994; Painson *et al.*, 1994; Watts *et al.*, 1998; Leaney & Tinker, 2000; Cordeaux *et al.*, 2001; Nickolls & Strange, 2003). La inhibición de la AC produce efectos opuestos al D1R sobre PKA, y por ende, sobre CREB y DARPP-32 (Nishi *et al.*, 1997; Nishi *et al.*, 2000). La existencia de actividad constitutiva para D2R no está aún bien establecida. Existen estudios reportando menores niveles de AMPc basal por la expresión de D2R, sin embargo Zhang y colaboradores presentan un trabajo de revisión poniendo en duda estos trabajos en base a problemas experimentales (Zhang *et al.*, 2014). La actividad evocada por agonistas de D2R inhibe las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ a través de la proteína Gi/o. Esta inhibición esta mediada por dos vías una a través de $G\beta\gamma$ que es dependiente voltaje y otra mediada por $G\alpha$ que es independiente de voltaje y además de esta modulación, la interacción física con $Ca_v2.2$ aumenta la densidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática (Lledo *et al.*, 1992; Canti & Dolphin, 2003; Kisilevsky & Zamponi, 2008) (Ver **esquema 2**).



Esquema 2. Esquema de las vías de señalización para D2R que actúan sobre $Ca_v2.2$ propuestas en (Kisilevsky & Zamponi, 2008). Representación de la inhibición de los canales $Ca_v2.2$ por la actividad dependiente de agonista de D2R, en forma dependiente (azul) e independiente (rojo) del voltaje (izquierda) y efecto de la interacción física entre $Ca_v2.2$ y D2R sobre la densidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática (MP) (derecha).

Receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR) o receptor de ghrelina

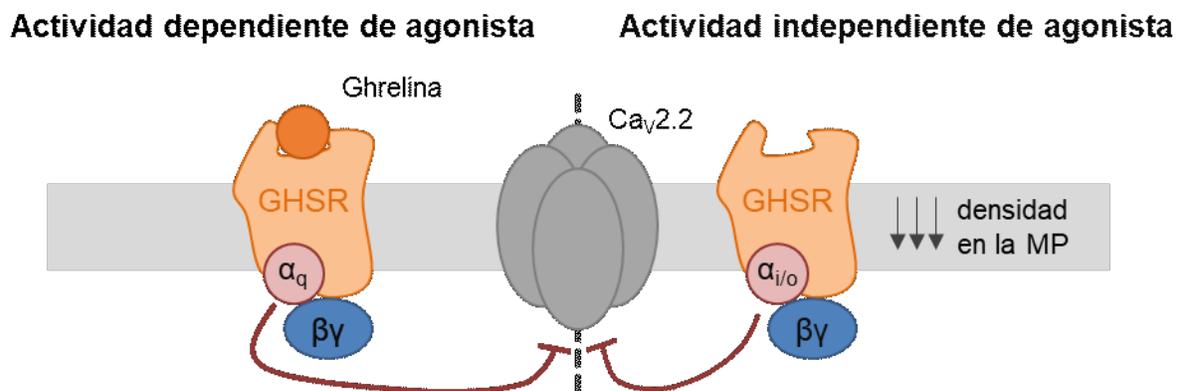
La historia de ghrelina y su receptor comienza en los años 60 con los primeros experimentos en busca de moléculas capaces de producir la secreción de hormonas hipotalámicas hipofisiotrópicas. El descubrimiento de la hormona liberadora de tirotrófina en 1966 y la

resolución de su estructura llevaron a los investigadores a producir péptidos sintéticos con funciones similares, entre los cuales se encontraron compuestos capaces de producir liberación de la hormona de crecimiento (Bowers, 1977). Uno de ellos fue el GHRP-6 (del inglés *growth-hormone-releasing peptides*) reportado como el primer agonista activo en la glándula pituitaria en experimentos *in vitro* e *in vivo* que luego fue utilizado en humanos (Bowers *et al.*, 1990). Una vez demostrada la unión de GHRP-6 al hipotálamo y a la glándula pituitaria se diseñaron antagonistas específicos del receptor, uno de los cuales fue el análogo de la sustancia P ([DArg¹DPhe⁵DTrp^{7,9}Leu¹¹]-Substance-P) que inhibió la unión del GHRP-6 a su receptor aún desconocido (Bitar *et al.*, 1991). A mediados de los 90 finalmente se aisló y clonó este receptor, denominándose receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR, del inglés *growth hormone secretagogue receptor*) (Howard *et al.*, 1996; McKee *et al.*, 1997), el cual resultó ser un GPCR clase A. La búsqueda del ligando endógeno de este receptor finalizó en 1999 cuando se identificó a la ghrelina (Kojima *et al.*, 1999), un péptido de 28 aminoácidos sintetizado por células endócrinas de la pared del estómago y liberado a la circulación sanguínea.

El receptor de ghrelina se expresa en muchos tejidos, siendo muy importante en la glándula pituitaria e hipotálamo (Guan *et al.*, 1997). Entre las funciones que se le asocian están el control del gasto energético y del apetito (Howick *et al.*, 2017), la respuesta al estrés (Cabral *et al.*, 2012), procesos de aprendizaje y memoria (Diano *et al.*, 2006; McNay, 2007). El gen que codifica para GHSR tiene 2 exones y se localiza en el cromosoma 3q26.31 (McKee *et al.*, 1997). El gen codifica para dos isoformas del receptor, el GHSR1a y GHSR1b, que se forman por *splicing* alternativo. El 1a es la isoforma entera del receptor, posee 366 aminoácidos, y pertenece a la familia de GPCRs clase A, mientras que el 1b es una versión acortada en la región 3' que genera un receptor de 5 dominios transmembrana y cuenta con 289 aminoácidos. La isoforma 1a es la única funcional (Howard *et al.*, 1996) y la 1b funciona como dominante negativo de la isoforma 1a reduciendo la expresión de membrana del receptor (Leung *et al.*, 2007). En esta tesis denominaremos simplifícadamente GHSR al GHSR1a.

El GHSR se acopla principalmente a la proteína Gq/11, activando PLC y produciendo diacil glicerol (DAG) y inositol 1,4,5-tris-fosfato (IP₃) (Holst *et al.*, 2003; M'Kadmi *et al.*, 2015). Este receptor tiene la particularidad de poseer una alta actividad constitutiva que alcanza el 50 % del máximo de actividad dependiente de agonista (Holst *et al.*, 2003). Estudios de nuestro laboratorio y de otros demuestran que en las neuronas los blancos moleculares de GHSR son muy variados, incluyendo canales de potasio que controlan el potencial de membrana y el disparo de potenciales de acción (Shi *et al.*, 2013), Ca_v pre y postsinápticos (Lopez Soto *et al.*, 2015; Mustafa *et al.*, 2017; Martinez Damonte *et al.*, 2018; Mustafa *et al.*, 2019), factores de transcripción

(Nakazato *et al.*, 2001; Chung & Park, 2016) y estructuras que liberan calcio de reservorios intracelulares (Yamazaki *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2014). En varios trabajos publicados de nuestro laboratorio presentamos detalles de cómo las actividades de GHSR dependiente e independiente de ghrelina impactan sobre el $Ca_v2.1-2$. La actividad evocada por ghrelina de GHSR mediada por la proteína Gq produce la inhibición de las corrientes $Ca_v2.1-2$ mediante un mecanismo independiente del voltaje, mientras que la actividad constitutiva de GHSR reduce el tráfico de $Ca_v2.1-2$ a la membrana plasmática en forma dependiente de la proteína G_i/o a través de un mecanismo que involucra a la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ (Lopez Soto *et al.*, 2015; Mustafa *et al.*, 2017) (Ver **esquema 3** para el efecto de GHSR sobre el canal utilizado en esta tesis: $Ca_v2.2$).



Esquema 3. Esquema de las vías de señalización para GHSR que actúan sobre $Ca_v2.2$ propuestas en (Lopez Soto *et al.*, 2015). Representación de la inhibición de los canales $Ca_v2.2$ por la actividad dependiente de agonista de GHSR (izquierda) y efecto de la actividad independiente de agonista sobre la densidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática (MP) (derecha).

Oligomerización de GPCRs y su impacto en la fisiología neuronal

La oligomerización de GPCRs fue observada a mediados de los años 70 de manera indirecta mediante experimentos farmacológicos que estudiaban la unión de agonistas y antagonistas a GPCRs. En estos experimentos se observó efectos de cooperatividad positiva y negativa que fueron explicados por la interacción de los sitios de unión entre los receptores en complejos dimericos u oligomericos (Bouvier, 2001). A pesar del creciente interés por los oligomeros de GPCRs en los siguientes años, recién en la década del 90 con experimentos de transcomplementación (construcción de quimeras entre GPCRs) la comunidad científica

comienza a considerar seriamente esta propiedad de los GPCRs. Se utilizaron quimeras de los receptores α_2 -adrenergic y muscarinico M_3 que contenían los primeros cinco dominios transmembrana de un receptor y los últimos dos del otro. Cuando se expresó una sola de las quimeras no se observó unión de agonistas ni activación de los GPCRs, mientras que la coexpresión de ambas quimeras restauró la actividad de ambos GPCRs por los ligandos específicos (Maggio *et al.*, 1993). Este resultado se interpretó como la complementación entre los dominios de las quimeras por la interacción proteína-proteína entre las mismas (Bouvier, 2001). En el año 2000, varios laboratorios de manera independiente, utilizaron experimentos de bioluminiscencia y transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, del inglés *Förster resonance energy transfer*) para demostrar de forma inequívoca la formación de dímeros de GPCRs unidos a diferentes fluoróforos en células vivas (Angers *et al.*, 2000; Overton & Blumer, 2000; Rocheville *et al.*, 2000). Actualmente, la mayoría de la literatura apunta a que los GPCRs existen como dímeros o oligómeros funcionales (Van Craenenbroeck, 2012). Sin embargo el rol fisiológico de la dimerización todavía hoy es objeto de debate. Se ha reportado que ciertos GPCRs necesitan de la dimerización para poder traficar a la membrana. En este sentido se postula que la dimerización comenzaría en las etapas tempranas de la biosíntesis y que la dimerización en el retículo plasmático sería un requerimiento para que los GPCRs pasen los controles de calidad durante la biosíntesis (Van Craenenbroeck, 2012). Por otro lado la dimerización de los GPCRs modularía su activación constitutiva o por ciertos agonistas mientras que también se propone que modifica los mecanismos de transducción de señales implicados (Bouvier, 2001; Szidonya *et al.*, 2008).

Un ejemplo muy explorado es la heterodimerización de D1R y D2R, dos receptores que se coexpresan ampliamente en el cerebro (Lee *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2010). La interacción física entre estos GPCRs se estudió mediante FRET y cointernalización en un sistema heterólogo de expresión (O'Dowd *et al.*, 2005; So *et al.*, 2005; Dziedzicka-Wasylewska *et al.*, 2006; So *et al.*, 2007). La activación en simultaneo de ambos receptores por dopamina activa a la proteína Gq (Lee *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2007), en contraste con la actividad de cada GPCR aislado, donde D1R se acopla a Gs y D2R a Gi/o, preferencialmente. La activación de la proteína Gq, por los heterómeros D1R-D2R estimula a PLC y produce un aumento de calcio intracelular desde compartimentos intracelulares (Friedman *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004). Además la interacción D1R-D2R modifica el efecto de los agonistas específicos de D1R, SKF81297, SKF83822 y SKF83959 (Rashid *et al.*, 2007). Estos agonistas activan D1R en el heterómero D1R-D2R con diferente efecto sobre la movilización de calcio intracelular a través de Gq. SKF81297 activa la vía solo cuando D2R en el heterómero es simultáneamente activado.

SKF83822 no activa esta vía en el heterómero y SKF83959 logra activarla aun en ausencia de un agonista D2R. Las implicancias fisiológicas de la formación de estos heterómeros están aún en estudio. La formación de heterómeros de D1R y D2R podría explicar por qué en una célula se expresaría ambos receptores para dopamina siendo que actúan de manera contrapuesta, uno activando y el otro inhibiendo las AC (Hopf *et al.*, 2003; Wu & Hablitz, 2005).

D1R puede heterodimerizar con otros GPCRs clase A. Por ejemplo en estriado puede heterodimerizar con D3R, el receptor de histamina H₃ y el receptor opioide MOR (Fiorentini *et al.*, 2008; Juhasz *et al.*, 2008; Marcellino *et al.*, 2008; Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011). La activación de D3R potencia la actividad de D1R en la estimulación de la actividad locomotora y alteraciones de D1R o sobreexpresión de D3R producirían disfunciones motoras. En células que coexpresan D1R y H₃, la activación de H₃ inhibe el aumento de AMPc por la activación de D1R y este efecto es independiente de Gs (vía clásica de activación de H₃).

En el caso de D2R, este puede también heterodimerizar con D3R (Scarselli *et al.*, 2001), D4R (Borroto-Escuela *et al.*, 2011) y D5R (So *et al.*, 2009) con diferente impacto en las vías de señalización. Otros dos GPCRs que forman heterómeros con D2R son farmacológicamente relevantes: el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos para la esquizofrenia (Borroto-Escuela *et al.*, 2010), y el receptor de adenosina A (2A) en el estriado, relevante para el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia (Hillion *et al.*, 2002).

El GHSR también puede heterodimerizar con otros GPCRs clase A. En neuronas del hipotálamo, GHSR heterodimeriza con el receptor de melanocortina 3 (MC3R), exacerbando la actividad agonista dependiente de MC3R para lo cual se requiere que GHSR esté activado constitutivamente (Rediger *et al.*, 2011). La heterodimerización de GHSR con el receptor de serotonina 2C (5-HT_{2C}) reduce el efecto de ghrelina sobre el calcio intracelular (Schellekens *et al.*, 2013).

Si bien la modulación de los Ca_v por oligómeros de GPCRs no está muy estudiada un trabajo de Evans y colaboradores muestra claramente que la heterodimerización del receptor de nociceptina (*opioid receptor-like 1*, ORL1) y los receptores opioides impacta sobre las vías que modulan los Ca_v2. (Evans *et al.*, 2010). Estos autores observaron que la formación de heterómeros ORL1-receptores opioides disminuye la inhibición de Ca_v2.2 por agonistas del ORL1 y que este efecto es mediado por el incremento de una inhibición tónica de los Ca_v2.2 por Gβγ a través de una activación basal de ORL1. En esta tesis nosotros estudiamos el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR y de D2R y GHSR sobre las corrientes Ca_v2.2. Nos basamos para este estudio en los datos que presentamos a continuación.

Heterodímeros D1R-GHSR

La interacción de D1R y GHSR tiene varios efectos reportados. En el hipocampo la activación de D1R por dopamina en presencia de ghrelina aumenta el AMPc cuatro veces más que en ausencia de ghrelina (Jiang *et al.*, 2006). Además dopamina aumenta el calcio intracelular desde compartimentos internos mediante la proteína Gq (Kern *et al.*, 2015). Se postula que los cambios producidos por la interacción D1R-GHSR impacta en la regulación de la plasticidad sináptica hipocampal, impactando sobre comportamientos asociados a la consolidación de la memoria y el aprendizaje (Kern *et al.*, 2015).

Heterodímeros D2R-GHSR

La formación de dímeros entre D2R y GHSR en el hipotálamo modifica dramáticamente las vías activadas por agonistas de D2R que en presencia de GHSR aumentan el calcio intracelular en forma dependiente de proteína Gi/o (Kern *et al.*, 2012). A nivel comportamental, la activación de estas neuronas hipotalámicas por dopamina produce un efecto anorexigénico en ratones salvajes que no se observa en ratones deficientes para GHSR (Kern *et al.*, 2012).

En esta tesis estudiamos a $Ca_v2.2$ como blanco de las vías de señalización modificadas por la interacción D1R-GHSR y D2R-GHSR. Estos canales son actores claves de las funciones neuronales y estructuras muy sensibles a cambios en la actividad de los GPCRs, ya sea por agonistas o por la actividad constitutiva de los receptores. En el desarrollo de este trabajo nos enfocamos especialmente en el rol de la actividad constitutiva ya que es un aspecto poco estudiado y que creemos, es fundamental para entender globalmente la funcionalidad de los GPCRs en las células.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Hipótesis: la coexpresión del receptor de ghrelina (GHSR) y los receptores de dopamina tipo 1 y 2 (D1R y D2R) modifica la modulación de los canales de calcio Cav2.2 por estos GPCRs.

Para contrastar esta hipótesis proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre la modulación de los canales Cav2.2 producida por la actividad dependiente de agonista de cada uno de los receptores.
2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre las corrientes basales de los canales Cav2.2.
3. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre la modulación de los canales Cav2.2 producida por la actividad dependiente de agonista de cada uno de los receptores.
4. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre las corrientes basales de los canales Cav2.2.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales

1.1. Línea celular

Como modelo experimental principal utilizamos una línea celular que deriva de la línea HEK293 proveniente de riñón embrionario humano (del inglés *Human Embryo Kidney 293*), y además contienen el antígeno T derivado del virus SV40 (del inglés *Simian Virus 40*), denominadas HEK293T. La presencia del antígeno T permite la replicación de vectores que contengan el origen de replicación del SV40. Las HEK293T son células altamente transfectables y de muy fácil manipulación. Se usan frecuentemente en experimentos de *patch clamp* ya que no presentan gran variedad de corrientes iónicas en su membrana.

1.2. Animales

Utilizamos ratones salvajes C57BL/6 que fueron criados en el sector de bioterio del IMBICE en presencia de ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y manteniendo la temperatura del recinto constante en 22 °C. Los animales tuvieron acceso a agua y alimento de manera *ad libitum*. Utilizamos los embriones de estos ratones para realizar los experimentos en neuronas hipotalámicas. Estos experimentos fueron aprobados por el comité de ética del IMBICE y fueron diseñados basándose en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health*, de Estados Unidos.

2. Cultivos celulares

2.1. Cultivos de células HEK293T

Mantuvimos las células HEK293T en frascos de plástico T25 dentro de estufas con temperatura y atmósfera controlada (37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % aire). Usamos medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco, New York, Estados Unidos) con el agregado de 10 % de suero fetal bovino (FBS; Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina). Cosechamos las células, cada vez que los cultivos crecieron hasta alcanzar el 80 % de confluencia, para ello retiramos el medio de cultivo y agregamos 3 ml de solución de cítrico salina (0.135 M KCl, 0.015 M citrato de sodio) e incubamos en la estufa durante 10 minutos para luego disgregarlas mecánicamente mediante pipeteo. De esta suspensión celular en cítrico salina partimos para sembrar células para los distintos experimentos o para el reinicio del ciclo de crecimiento en los frascos T25. Para los experimentos de electrofisiología y de citometría de flujo

usamos placas de cultivo plásticas de 12 pocillos en las cuales sembramos ~0,1 ml de la suspensión celular anterior. Para la producción de lentivirus crecimos las células en placas de plástico de 100 mm y utilizamos toda la suspensión celular obtenidas del repique de un frasco T25. En los experimentos de imágenes en el microscopio marca Zeiss, utilizamos placas de 24 pocillos a los que previamente le agregamos vidrios de cubreobjetos redondos de 12 mm pretratados con poli-L-Lisina (Sigma Aldrich, # P7280, Buenos Aires, Argentina) y les sembramos ~0,1 ml de la suspensión de células. Para el reinicio del ciclo de crecimiento sembramos 0,5 ml de la suspensión celular en 5 ml del medio de cultivo.

2.2. Cultivo primario de neuronas embrionarias hipotalámicas

Obtuvimos los cultivos primarios de neuronas de embriones P15-P17 de ratones salvajes como describimos en (Martinez Damonte *et al.*, 2018). Anestesiarnos las ratonas preñadas con hidrato de cloral (500 mg/kg), extrajimos los embriones y los colocamos en una solución de Hank estéril. Trabajando en esterilidad removimos los cerebros de los embriones, los orientamos sobre la cara dorsal y les removimos el hipotálamo con fórceps. Preservamos el tejido en Hank estéril frío hasta terminada la extracción de los hipotálamos de todos los embriones. Luego lavamos dos veces con Hank nuevo y agregamos una solución de Hank con tripsina 0,25 mg/ml (Microvet #L2700-100, Buenos Aires, Argentina) e incubamos la mezcla a 37 °C por 20 min. Pasados los 20 min, agregamos 300 µl de suero fetal bovino y 50 µl de desoxirribonucleasa I de páncreas bovino 0,28 mg/ml (Sigma Aldrich #D5025). Centrifugamos las células a 1000 r.p.m. durante 5 min y descartamos el sobrenadante. Agregamos 1 ml de Hank estéril y disgregamos mecánicamente con agujas estériles de tamaños cada vez menores. Sembramos 70000 células en vidrios estériles de 12 mm pretratados con poli-L-lisina en placas plásticas de 24 pocillos. Dejamos las células 30 min en la estufa a 37 °C y después le agregamos DMEM / F12 1:1 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 0,25 % de glucosa, 2 mM de glutamina (Gibco #21051-016), 3,3 µg/ml de insulina (Novo Nordisk Pharmaceutical Industries, Inc, Buenos Aires, Argentina), 40 µg/ml sulfato de gentamicina (Richet, Buenos Aires, Argentina), 1 % de solución de vitaminas (Microvet) y 1:50 de suplemento B27 (Gibco). Mantuvimos los cultivos a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % aire y al cuarto día reemplazamos la mitad del medio de crecimiento con medio suplementado con citosina-β-D-arabinofuranosida (Sigma Aldrich, #C1768) para lograr una concentración final de 5 µM.

3. Expresión heteróloga

3.1. Transfecciones transitorias de células HEK293T

Transfectamos las células que utilizamos en los experimentos de *patch clamp*, imágenes o citometría de flujo con Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen #11668019) y Opti-MEM (Invitrogen #31985062) respetando el protocolo propuesto por los fabricantes. Usamos 2,5 µg finales de ADNc. Para los experimentos de *patch clamp* agregamos 0,2 µg de un plásmido que codifica para la proteína GFP soluble para identificar aquellas células que están transfectadas. Plaqueamos las células como explicamos previamente, 24 horas después de esto las transfectamos y luego de otras 24 horas las utilizamos para los distintos experimentos.

3.2. Transfecciones transitorias de células HEK293T para la producción de lentivirus

Para la producción de lentivirus transfectamos las células con Polyethylenimine (PEI, Polysciences, Inc #23966, Pennsylvania, Estados Unidos) y Opti-MEM usando 20 µg de ADNc finales y 40 µl de PEI. Plaqueamos las células como explicamos anteriormente y 24 horas después las transfectamos. Para la producción de lentivirus de tercera generación, utilizamos 20 µg de ADNc total por placa (3,5 µg del plásmido de envoltura pCMV-VSV-G, 4 µg de plásmido de empaquetamiento pMDLg/pRRE, 2,5 µg del plásmido de empaquetamiento pRSV-Rev y 10 µg del plásmido con el vector de transferencia). En nuestro caso utilizamos dos plásmidos de transferencia el FU-GHSR-mOrange (Martinez Damonte *et al.*, 2018) o FU-D2R-GFP-W.

3.2.1. Producción y cosecha de partículas lentivirales

Como las partículas lentivirales se generan por brotación, las cosechamos del sobrenadante de las células HEK293T transfectadas en las placas de 100 mm. A las 48 horas de la transfección, recolectamos el medio de cultivo de estas placas, lo centrifugamos a 1000 r.p.m. durante 10 minutos y lo filtramos con filtros de 0,22 µm de tamaño de poro.

3.2.2. Transducción de cultivos primarios neuronales

Una vez que cosechamos las partículas virales de D2R o GHSR, retiramos el medio de los cultivos neuronales, lo reservamos en esterilidad y lo reemplazamos por el medio conteniendo las partículas virales de GHSR-mOrange o D2R-GFP o por la mezcla de ambos e incubamos durante 4 horas a 37 °C en la estufa con atmosfera controlada (5 % CO₂ y 95 % aire). Luego de las 4 horas retiramos el medio que contenía las partículas virales y lo reemplazamos por el que

tenía anteriormente y habíamos conservado. Realizamos la infección de los cultivos neuronales el quinto día de cultivo, y recién utilizamos las neuronas transducidas 9 días después.

3.2.3. Plásmidos utilizados

Para los experimentos de esta tesis utilizamos los siguientes plásmidos:

- . $Ca_v2.2e37b$ (#AF055477), $Ca_v\beta_3$ (#M88751) y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ (#AF286488), cedidos por la Dra. Diane Lipscombe, Department of Neurosciences, Brown University, Providence, Estados Unidos.

- . receptor de dopamina tipo 1 fusionado a la proteína amarillo fluorescente, D1R-YFP, cedido por el Dr. G Zamponi, Calgary, Canadá.

- . receptor de dopamina tipo 2 fusionado a la proteína verde fluorescente, D2R-GFP (#MG226860) donado por el Dr. Marcelo Rubinstein, INGEBI, Buenos Aires, Argentina.

- . receptor secretagogo de la hormona del crecimiento o receptor de Ghrelina, GHSR (#AY429112) cedido por el Dr. J. Marie, Université de Montpellier, Montpellier, Francia.

- . receptor mutante de GHSR con mutación puntual A204E, GHSR.A204E (#AY429112), cedido por el Dr. J. Marie.

- . receptor de angiotensina II tipo 1, AT1R, donado por el Dr. Mark Shapiro, University of Texas Health, San Antonio, Texas, Estados Unidos.

- . dominante negativo de la proteína Gq, G_q DN, (G_q-Q209L/D277N), Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, Missouri, Estados Unidos (Yu & Simon, 1998; Lauckner *et al.*, 2005).

- . inhibidor de G $\beta\gamma$, dominio C-terminal asociado a la membrana de la quinasa 2 acoplada a GPCR, *Myristoylated C-terminal G $\beta\gamma$ -binding domain of the G protein-coupled receptor kinase 2*, MAS-GRK2-ct, cedido por el Dr. S. R. Ikeda, US National Institutes of Health, Estados Unidos. (Kammermeier & Ikeda, 1999; Raingo *et al.*, 2007)

- . plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente soluble, GFP.

- . plásmido pcDNA3.1+ (Invitrogen, #V790-20).

- . receptores producidos mediante biología molecular en el laboratorio: GHSR-GFP, GHSR-mCherry, GHSR-mOrange.

En los experimentos que llevan transfectado el $Ca_v2.2$, siempre llevan además las subunidades auxiliares $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ en igual proporción molar. Cuando cambiamos la relación entre GPCR y $Ca_v2.2$ siempre mantenemos constante la cantidad de $Ca_v2.2$ y compensamos la cantidad de ADNc con el pcDNA3.1+. En cada experimento se informa la relación GPCR: $Ca_v2.2$ usada.

4. Preparación y obtención de plásmidos

4.1. Transformación de bacterias competentes

Para la amplificación de los plásmidos necesarios durante los experimentos de este trabajo de tesis, utilizamos bacterias competentes de la cepa bacteriana *Escherichia Coli* DH5 α competidas mediante el método descrito por Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Usamos esta cepa bacteriana debido a que: son eficientes para la transformación con ADN no metilado (hsdR), ausencia de actividad endonucleasa inespecífica I (endA1-) y actividad de recombinación disminuida (recA1-). Además, son sensibles a ampicilina y kanamicina. Almacenamos las bacterias competentes a -70 °C. Para la transformación utilizamos el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook & Russell, 2006), usamos 100 ng de ADN plasmídico en 200 μ l de suspensión de bacterias competentes. Realizamos un choque térmico incubando primero la mezcla en hielo por 30 min y después pasando la mezcla a 42 °C por 45 s. Pasado ese tiempo transferimos el tubo a hielo nuevamente por 1 a 2 minutos y le adicionamos 0,8 ml de medio SOC, incubamos luego por 1 hora a 37 °C. Una vez que las bacterias se recuperaron y expresaron los marcadores de resistencia, tomamos 200 μ l de esta suspensión de células y las sembramos en placas de 90 mm con medio agar-SOB complementado con 20 mM de MgSO $_4$ y el antibiótico específico para el plásmido que deseamos amplificar. Estas placas las incubamos por 12 a 16 horas a 37 °C.

4.2. Extracción de ADN plasmídico a mediana escala

Para la extracción del ADN plasmídico de las bacterias crecidas en el punto 4.1., transferimos una colonia proveniente de las placas a 5 ml de medio LB con el antibiótico de selección del plásmido. Después de crecerlas de 12 a 16 horas a 37 °C con agitación enérgica, centrifugamos el cultivo por 30 min a 4000 r.p.m. a 4 °C. Usamos el kit comercial para midi-prep, *QIAfilter® Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, #12145, Massachusetts, Estados Unidos) para aislar el ADN plasmídico amplificado siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.3. Determinación de la concentración de ADN

Usamos un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc, Delaware, Estados Unidos), para medir la absorbancia a 260 nm y cuantificar el ADN plasmídico. Usamos las relaciones entre las absorbancias a 260/280 nm y 260/230 nm como parámetros de calidad, siendo ~1,8 y entre 2,0 y 2,5 rangos aceptables para las respectivas relaciones.

5. Drogas

Utilizamos los siguientes agonistas de GPCR: para GHSR, ghrelina (Global Peptide, # PI-G-03, Colorado, Estados Unidos), para D1R y D2R, dopamina hidroclicorada (Sigma Aldrich #H8502), para D2R, (-) quinpirole hidroclicorado (Sigma Aldrich #Q102) y para AT1R, angiotensina II (Sigma Aldrich #A9525). Usamos el agonista inverso del GHSR, [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9},Leu¹¹]-substance P analog o SPA(Santa Cruz Biotechnology, Inc, #sc-361166, Texas, Estados Unidos). Para inhibir la proteína Gi/o usamos toxina Pertussis o PTx (Sigma Aldrich # P7208) y para inhibir la proteína Gs, la toxina del cholera o ChTx (Sigma Aldrich #C8052).

6. Microscopia y obtención de imágenes

6.1. Experimentos de colocalización

Para los experimentos de colocalización transfectamos células HEK293T como describimos anteriormente pero en vidrios de 12 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina. En la mezcla de transfección agregamos los plásmidos que codifican para los receptores D1R-YFP y GHSR-mOrange en relación molar GPCR:Ca_v2.2 = 0,1. Lavamos las células con PBS y las fijamos con paraformaldehido 4 % (en PBS) por 30 min. Finalizado el tiempo de incubación hicimos 3 lavados con PBS y montamos los vidrios redondos en portaobjetos. Utilizamos un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 con objetivos de 63X/1,4, un módulo de iluminación Apotome.2 y una cámara AxioCam 506. Usamos los filtros 38 HE (excitación 470/40 nm y emisión 525/50 nm para detectar YPF) y 43 HE (excitación 550/25 nm y emisión 605/70 nm para detectar mOrange). Mediante el programa FIJI (ImageJ) delimitamos el límite de las células de manera manual y utilizamos esa área para el análisis de colocalización mediante el complemento de FIJI específico, JACoP (del inglés, *Just another colocalization plugin*). De esta manera analizamos la colocalización de los dos receptores como se describe en (Bolte & Cordelieres, 2006) y obtuvimos los coeficientes de Pearson y Manders.

6.2. Experimentos de cantidad de fluoróforo en la membrana plasmática

Para estos experimentos transfectamos células HEK293T en vidrios de 12 mm pretratados con poli-L-lisina como describimos previamente. En la mezcla de transfección agregamos el Ca_v2.2 con las subunidades auxiliares, Ca_vβ₃ y Ca_vα₂δ₁, y D2R-GFP, GHSR-mOrange o ambos en relaciones molares GPCR:Ca_v2.2 = 0,5 y 0,1. Para fijar las células, primero lavamos con PBS y luego, incubamos con paraformaldehido 4 % (en PBS) por 30 min. Finalizado el tiempo de

incubación hicimos 3 lavados con PBS y montamos los vidrios redondos con las células en portaobjetos usando un medio de montaje que contenía Hoechst. Adquirimos las imágenes de manera idéntica a las descritas en el punto 6.1. en el microscopio Zeiss AxioObserver Z1.

Delimitamos el límite exterior de la membrana plasmática manualmente en cada célula (área A_{ext} , fluorescencia F_{ext}). Para delimitar el límite interno de la membrana plasmática, redujimos en $0,5 \mu\text{m}$ el A_{ext} (área A_{int} , fluorescencia F_{int}). Para los experimentos en donde cuantificamos la cantidad de señal fluorescente en la membrana plasmática (MP), la misma se calculó con la ecuación (1).

$$\text{Fluorescencia en MP} = F_{ext} - F_{int}$$

6.3. Experimentos de relación de fluorescencia en citoplasma sobre fluorescencia en la membrana plasmática

Utilizamos las células anteriores que expresaban los receptores en la relación molar GPCR:Ca_v2.2 = 0,1 y además, hicimos condiciones para estudiar la internalización de los GPCRs, en las cuales aplicamos $0,5 \mu\text{M}$ de ghrelina por 20 min antes del protocolo de fijación. Analizamos las imágenes de la misma manera que en el punto 6.2, calculando A_{ext} , F_{ext} , A_{int} y F_{int} . Con esta información calculamos la relación de fluorescencia citoplasmática / fluorescencia en la MP (F_{cit} / F_{memb}) mediante la siguiente ecuación (2):

$$F_{cit} / F_{memb} = (F_{int} / A_{int}) / ((F_{ext} - F_{int}) / (A_{ext} - A_{int}))$$

7. Citometría de flujo

Para los experimentos de citometría de flujo, sembramos las células HEK293T en placas de 12 pocillos y las transfectamos como describimos previamente usando la relación molar GPCR:Ca_v2.2 = 0,5. Despegamos las células transfectadas 24 horas después usando tripsina $0,25 \text{ mg/ml}$ durante 1 min y luego inhibimos la actividad enzimática con el agregado de DMEM complementado con 10 % suero fetal bovino. Una vez que las células estaban en solución, hicimos 2 ciclos de centrifugación a 1000 r.p.m. durante 5 min y lavados con 1 ml de PBS. Utilizamos estas células en un citómetro FACSaria Fusion (BD Bioscience, Estados Unidos) para estudiar la presencia de FRET en nuestro sistema de estudio. Excitamos el donador (GFP) con un láser de 488 nm. Detectamos las señales de emisión del donador y del aceptor (mCherry) de manera específica usando filtros de 530/23 nm y 616/30 nm, respectivamente. El máximo de absorción para la excitación del GFP se encuentra en 475 nm, por lo que el uso del láser de 488 nm fue óptimo. Por su lado, el mCherry posee el máximo de absorción se encuentra en 587, por lo que teóricamente el láser de 488 nm no debería excitar al mCherry, pero éste si debería ser

excitado por la emisión del GFP. Registramos ~20000 eventos en cada condición. A pesar de que el mCherry no debería excitarse con el láser de 488 nm, en nuestro sistema observamos fluorescencia mCherry basal. Dado a la imposibilidad de utilizar el láser de 561 nm que se utiliza para excitar este fluoróforo, nos fue imposible cuantificar el FRET mediante los programas específicos.

Analizamos los histogramas obtenidos para la señal de fluorescencia mCherry y observamos la presencia de distintas poblaciones con diferentes señales de fluorescencia. Para cuantificar el FRET usamos la relación entre el área de la población de alta señal mCherry y el área de bajo la curva de todo el histograma.

8. Electrofisiología

Despegamos las células HEK293T transfectadas en placas de 12 pocillos usando tripsina 0,25 mg/ml durante 1 min y una vez terminado ese tiempo utilizamos DMEM complementado con 10 % suero fetal bovino para terminar la reacción enzimática. Hicimos 2 ciclos de centrifugado a 1000 r.p.m. durante 5 min y lavados con DMEM para limpiar el medio de restos de suero fetal bovino que dificulta los experimentos de *patch clamp*. Realizamos los experimentos de electrofisiología a temperatura ambiente (23 °C) y mantuvimos las células a esa temperatura.

En todos los experimentos utilizamos la configuración de célula entera con fijación de voltaje. En los experimentos realizados en células HEK293T, fijamos los potenciales de mantenimiento a -100 mV y fijamos a 10 mV los pulsos para registrar las corrientes de calcio durante 30 ms cada 10 s. Para neuronas estos valores fueron: mantenimiento a -80 mV y pulsos de registro a 0 mV durante 30 ms cada 10 s. Realizamos los protocolos para estudiar la inhibición tónica por Gβγ de los canales de calcio haciendo dos pulsos a 10 mV consecutivos (I_1 e I_2) y previo al segundo, un prepulso muy despolarizante a 150 mV para remover la inhibición dependiente de voltaje (Evans *et al.*, 2010).

Registramos las corrientes usando los amplificadores Axopatch 200 (Molecular Devices, California, Estados Unidos) o EPC7 (HEKA, Massachusetts, Estados Unidos) con sus respectivos programas de registro y control de los amplificadores (pClamp y PatchMaster, respectivamente). Utilizamos una frecuencia de muestreo de 20 kHz y filtramos la señal a 10 kHz (-3dB). Fabricamos las pipetas de vidrio (King Precision Glass, Inc, California, Estados Unidos) usando un estirador de pipetas Sutter P97 (Sutter Instruments, California, Estados Unidos) con resistencias entre 2 y 5 MΩ, y las resistencias en serie permitidas no excedieron el valor de tres veces la resistencia de las pipetas. Descartamos las células que tuvieron corrientes de fuga

mayores a 200 pA a un potencial de -100 mV y, además, eliminamos las corrientes de fuga en tiempo real usando el protocolo P/-4.

Utilizamos perfusiones hechas con jeringas de 10 ml montadas 30 cm sobre el nivel de las células para el agregado de las distintas soluciones externas a las cámaras de *patch clamp*. El flujo de perfusión fue ~1 ml/min. Utilizamos adaptadores multivías realizados en el laboratorio de manera casera y jeringas independientes para cada solución. El potencial de junta líquida para la solución externa de calcio 2 mM usada en células HEK293T (ver composición más adelante) fue de ~7.4 y para la solución externa de bario 10 mM usada en neuronas (ver composición más adelante) fue de ~6.5 mV. Medimos estos valores antes de cada experimento y no fueron corregidos, por lo que los voltajes mostrados fueron ligeramente más negativos.

Cultivamos las neuronas en los vidrios de 12 mm pretratadas con poli-L-lisina como describimos anteriormente. Removimos los vidrios de las placas de cultivo para los experimentos de *patch clamp* mediante pinzas de cirugía y los conservamos en una solución de mantenimiento alta en sodio (ver composición más adelante). Una vez elegida la neurona a estudiar, realizamos el giga sello, rompimos la membrana mediante succión y registramos las corrientes de sodio. Cuando se llegó a un nivel estable de estas corrientes cambiamos la solución de mantenimiento por una solución de bario 10 mM, que contiene tetrodotoxina (TTx, Sigma-Aldrich) para inhibir las corrientes de sodio, y registramos las corrientes Ca_v nativas. Cuando los niveles de corrientes Ca_v se estabilizaron, cambiamos la solución externa de bario por otra solución externa igual, conteniendo quinpirole o ghrelina en concentraciones específicas. Realizamos este agregado de manera alternada. En los registros de corrientes neuronales ubicamos el electrodo de referencia en un compartimiento anexo a la cámara de registro con una solución 2 M de KCl conectado con la cámara de registro a través de un puente salino de agar 2 M KCl para evitar cambios del potencial de junta debido a los cambios de las soluciones extracelulares.

Utilizamos las siguientes soluciones:

- Solución interna de las pipetas (mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES y 4 MgATP (pH 7.2 regulado con CsOH).
- Solución externa de calcio (2 mM) para células HEK293T (mM): 140 cloruro de colina, 10 HEPES, 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.3-7.4 regulado con CsOH).
- Solución externa de bario (10 mM) para neuronas (mM): 110 cloruro de colina, 10 HEPES, 10 glucosa, 20 cloruro de tetraetilamonio, 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.001 TTx (pH 7.3-7.4 regulado con CsOH).
- Solución de mantenimiento alta en sodio (135 mM) para neuronas (mM): 10 HEPES, 1.2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.7 KCl, 10 glucosa y 135 NaCl (pH 7.3-7.4 regulado con NaOH).

9. Análisis de datos y estadísticas

En los gráficos de barras, los puntos representan los valores individuales y las barras representan la media y el error estándar de la media (EEM).

Analizamos los datos obtenidos en los experimentos de *patch clamp* con el pClamFit 10 (Molecular Devices) y medimos las corrientes al pico mínimo de corriente durante los pulsos de prueba. Normalizamos las corrientes mostradas en los experimentos para estudiar la actividad agonista de los receptores al valor máximo de corriente en cada condición. Cuando estudiamos las corrientes basales, normalizamos las mismas usando el valor de la capacitancia de la membrana celular como referencia del tamaño celular de cada célula. Graficamos los trazos representativos de las corrientes de calcio usando el programa OriginPro 9 (OriginLab, Massachusetts, Estados Unidos).

Analizamos la información obtenida en los experimentos de citometría de flujo con el programa FlowJo (Becton, Dickinson & Company, BD Biosciences). Realizamos los histogramas, el ajuste de las distintas poblaciones y el cálculo de las áreas bajo las curvas con OriginPro 9.

Analizamos todas las imágenes obtenidas con el programa FIJI (ImageJ).

Para los análisis estadísticos usamos el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, California, Estados Unidos). Analizamos la normalidad de las poblaciones mediante el test de *Kolmogorov–Smirnov* y la homogeneidad de varianzas con las pruebas de *Bartlett* o *Brown-Forsythe*. En cada figura detallamos el test estadístico utilizado en cada experimento y consideramos diferencia significativa a valores de $P < 0,05$. Las curvas de dosis respuesta fueron ajustadas con la ecuación de Hill.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre la modulación de los canales Cav2.2

1.1. Confirmación de la colocalización de D1R y GHSR expresados en forma heteróloga en células HEK293T

El estudio de la colocalización de los receptores D1R y GHSR se realizó utilizando versiones fusionadas de los receptores a las proteínas fluorescentes YFP (del inglés *Yellow Fluorescent Protein*) con D1R (D1R-YFP) y mOrange con GHSR (GHSR-mOrange) para obtener microfotografías y evaluar la colocalización de ambos receptores descrita previamente (Jiang *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2015). Para esto transfectamos células HEK293T con plásmidos que contienen los ADNc de D1R-YFP y GHSR-mOrange y, luego de 24 horas, utilizando un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 con iluminación UV y un adaptador Apotome.2 obtuvimos microfotografías de las células con los filtros correspondientes a cada fluoróforo. Para comprobar la colocalización de los receptores obtuvimos los coeficientes de correlación de Pearson y de colocalización de Mander mediante el programa FIJI (**figura 1**). En el panel 1A se observan microfotografías representativas de una célula para cada uno de los fluoróforos analizados y una tercera microfotografía donde se muestra el solapamiento (*merge*). Los valores del coeficiente de correlación de Pearson calculados para cada célula coexpresando los receptores y su valor promedio se presentan en el panel 1B, mientras que los paneles 1C y 1D muestran los coeficientes de colocalización de Mander (M1, fracción de D1R-YFP que se solapa con GHSR-mOrange, y M2, fracción de GHSR-mOrange que se solapa con D1R-YFP) calculados para el mismo conjunto de células. En estos tres paneles se muestran los valores de los mismos coeficientes calculados al rotar 90 grados la imagen de una de las señales fluorescente. Al analizar y comparar el conjunto de datos de cada coeficiente con su respectivo control (rotación de una de las imágenes 90 grados) se observa una diferencia significativa, lo que nos indica que las proteínas fluorescentes colocalizan en estas células (Dunn *et al.*, 2011; McDonald & Dunn, 2013).

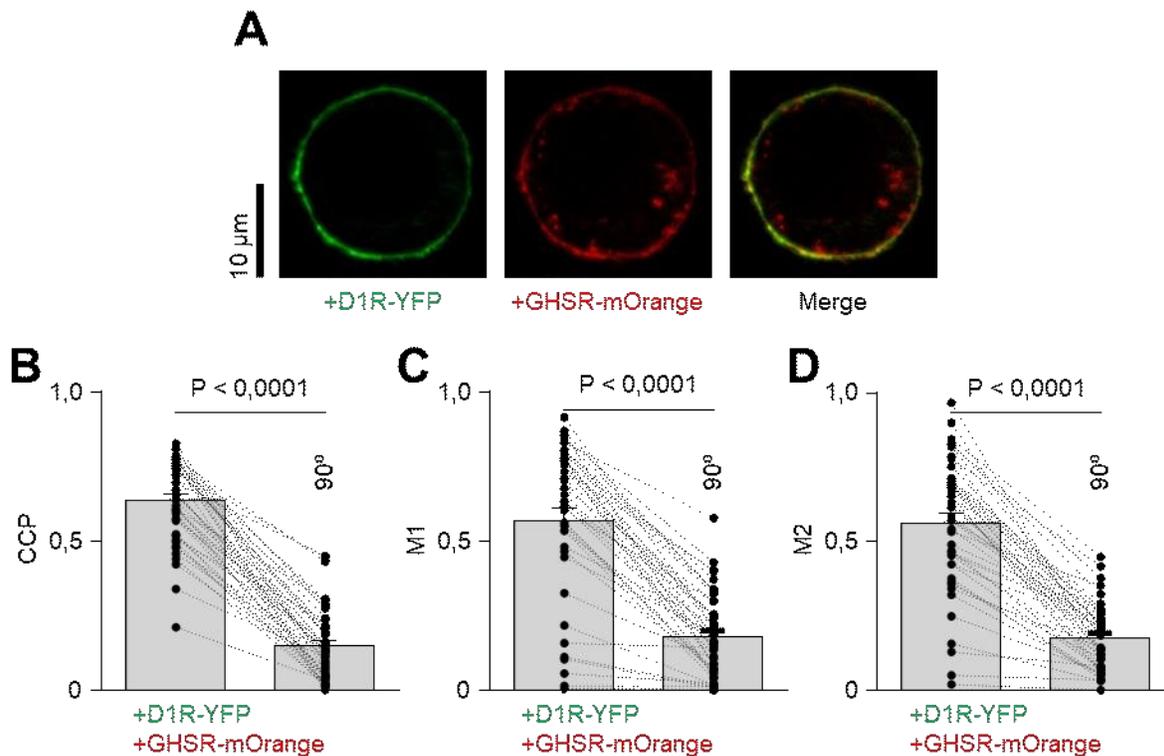


Figura 1. D1R-YFP y GHSR-mOrange colocalizan en células HEK293T. **A.** Microfotografías de células HEK293T transfectadas con D1R-YFP y GHSR-mOrange. Las barras representan la media y el EEM del coeficiente de correlación de Pearson (**B**, CCP) y de colocalización de Mander (**C** y **D**, M1 y M2) calculados en células HEK293T transfectadas con D1R-YFP y GHSR-mOrange (+D1R-YFP +GHSR-mOrange, $n = 45$) y los calculados luego de la rotación de una de las imágenes 90° . La significancia estadística fue evaluada por test t de Student.

1.2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre la modulación de los canales Cav2.2 producida por la actividad dependiente de agonista de cada uno de los receptores (Objetivo 1).

Para completar el Objetivo 1 de esta tesis primero evaluamos si el efecto de ghrelina sobre las corrientes Cav2.2 se modifica al coexpresar D1R y GHSR. Para esto transfectamos células HEK293T con el canal Cav2.2, sus subunidades auxiliares Cav β_3 y Cav $\alpha_2\delta_1$, GHSR o GHSR y D1R. Utilizamos la relación molar GPCR:Cav2.2 = 0,1 debido a que a esa relación molar la actividad constitutiva de GHSR no es suficiente para modificar las corrientes de calcio Cav2.2 basales cuando se expresa solo con Cav2.2 como demostramos previamente (Lopez Soto *et al.*,

2015). En estas condiciones realizamos experimentos de *patch clamp* en configuración de célula entera y con fijación de voltaje para medir las corrientes de calcio de $Ca_v2.2$. Al evocar estas corrientes con un pulso cuadrado de voltaje desde -100 mV hasta +10 mV cada 10 segundos encontramos que la aplicación de 0,5 μ M de ghrelina inhibe la corriente de calcio y que el porcentaje de inhibición no difiere entre la condición con GHSR solo o la condición donde se coexpresa con D1R (**figura 2**). En estos experimentos observamos que los niveles de corrientes de calcio basales disminuyeron notablemente cuando se coexpresaban ambos receptores. En el objetivo 2 indagamos sobre la participación de la actividad constitutiva de GHSR en este efecto. Aquí, debido a esta observación del cambio de amplitud de las corrientes decidimos evaluar la actividad dependiente de agonista de GHSR sobre el canal $Ca_v2.2$ reemplazando GHSR salvaje por una versión mutada que carece de actividad constitutiva pero responde a ghrelina (GHSRA204E) (Pantel *et al.*, 2006; Lopez Soto *et al.*, 2015), al que en adelante lo denominaré A204E. En la **figura 2** se observa que la inhibición de las corrientes de calcio por la actividad evocada por ghrelina cuando expresamos GHSR salvaje o A204E no se modifica significativamente en presencia de D1R. En resumen, la inhibición del $Ca_v2.2$ producida por la unión de ghrelina a GHSR o a A204E no se modifica por la coexpresión de D1R.

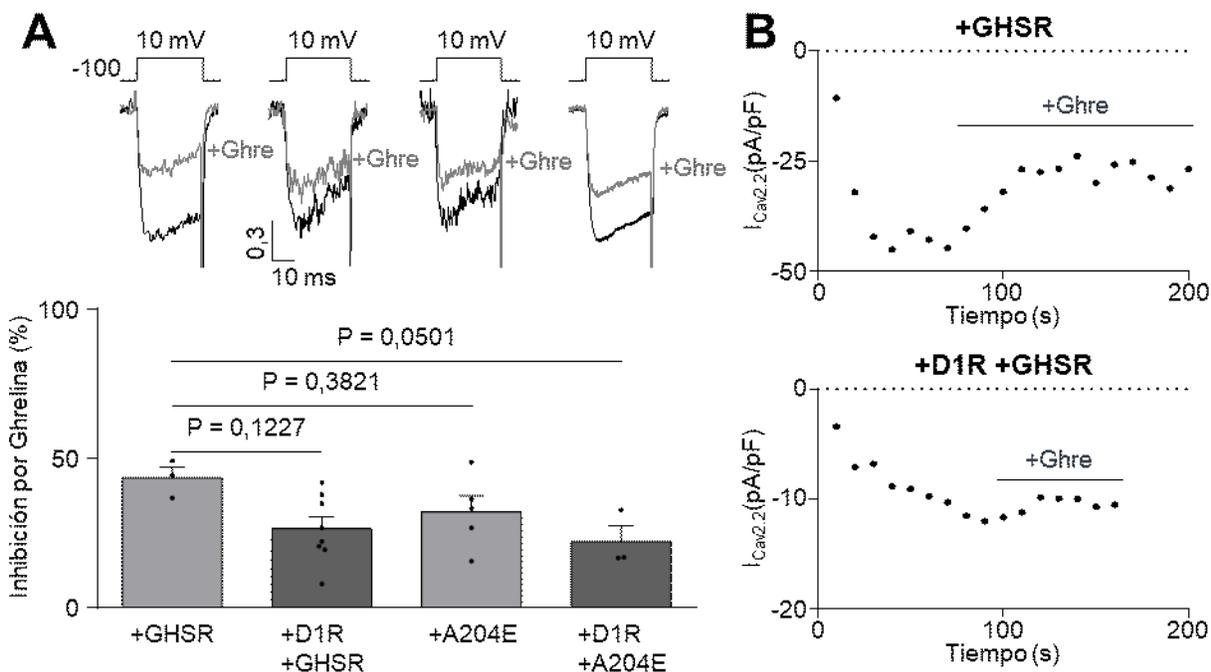


Figura 2. La coexpresión de D1R no modifica el efecto de la actividad dependiente de ghrelina de GHSR salvaje o su versión mutada A204E sobre los $Ca_v2.2$. A. Trazos

representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y GHSR (+GHSR, $n = 3$), $Ca_v2.2$, GHSR y D1R (+D1R +GHSR, $n = 8$), $Ca_v2.2$ y A204E (+A204E, $n = 5$) o $Ca_v2.2$, A204E y D1R (+D1R +A204E, $n = 3$) antes y después de la aplicación de ghrelina ($0,5 \mu M$, +Ghre). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +GHSR). **B.** Cursos temporales representativos de la corriente $Ca_v2.2$ durante la aplicación de ghrelina en las condiciones experimentales +GHSR (arriba) y +D1R +GHSR (abajo).

A continuación, estudiamos si la coexpresión de D1R y GHSR modifica la acción de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$. Como mencionamos antes, dopamina inhibe las corrientes $Ca_v2.2$ por una vía de señalización que involucra a Gs (Kisilevsky *et al.*, 2008). Para esto transfectamos células HEK293T con el canal $Ca_v2.2$, sus subunidades auxiliares $Ca_v\beta_3$ y $Ca_v\alpha_2\delta_1$ y D1R o D1R y GHSR o D1R y A204E, utilizando relaciones molares GPCR: $Ca_v2.2 = 0,1$ al igual que en el experimento anterior. Al evaluar el efecto de $10 \mu M$ de dopamina sobre las corrientes de calcio evocadas por el pulso cuadrado de -100 mV a $+10$ mV encontramos que el porcentaje de inhibición de las corrientes no difiere por la coexpresión de GHSR o A204E (**figura 3**). Así encontramos que la coexpresión de D1R y GHSR no afecta la acción de dopamina ni la de ghrelina sobre las corrientes $Ca_v2.2$.

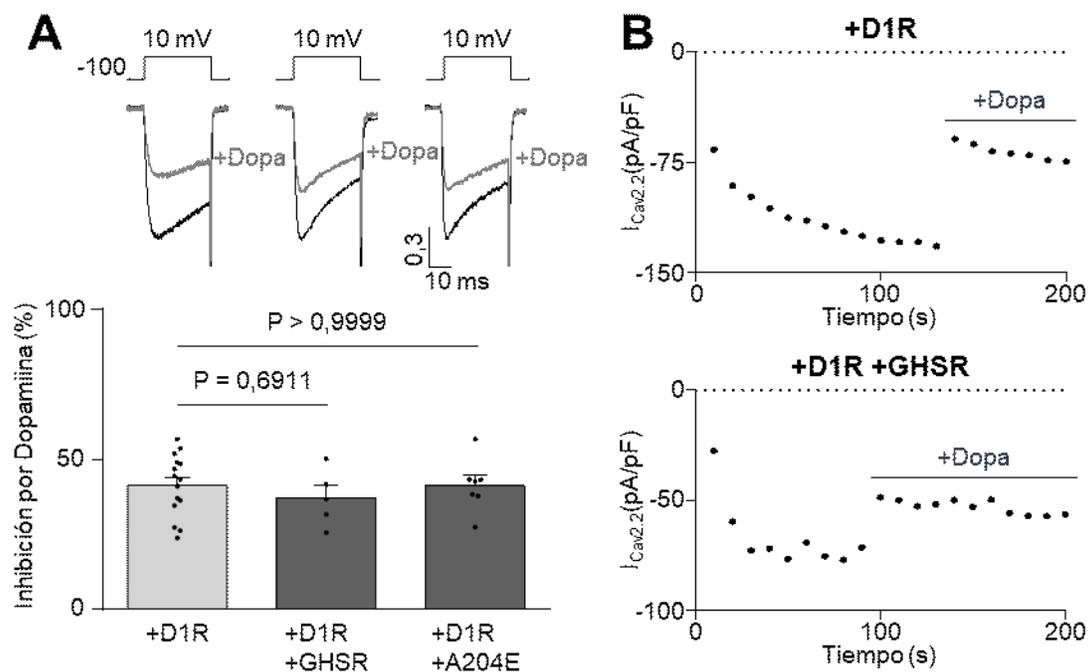


Figura 3. La coexpresión de GHSR no modifica el efecto de la actividad dependiente de dopamina de D1R sobre los Cav2.2. **A.** Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio Cav2.2 ($I_{\text{Cav2.2}}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y D1R (+D1R, $n = 15$), Cav2.2, D1R y GHSR (+D1R +GHSR, $n = 5$) o Cav2.2, D1R y el mutante puntual de GHSR, A204E (+D1R +A204E, $n = 7$) antes y después de la aplicación de dopamina ($10 \mu\text{M}$, +Dopa). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +D1R). **B.** Cursos temporales representativos de las corrientes Cav2.2 durante la aplicación de dopamina en las condiciones experimentales +D1R (arriba) y +D1R +GHSR (abajo).

1.3. Estudiar el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre las corrientes basales de los canales Cav2.2 (Objetivo 2)

Para estudiar el efecto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre los niveles basales de corriente Cav2.2 transfectamos células HEK293T con el canal Cav2.2, sus subunidades auxiliares, (Control) solo o junto a GHSR (+GHSR), D1R (+D1R) o D1R y GHSR (+D1R +GHSR) en relación molar GPCR:Cav2.2 = 0,1. En la **figura 4** se observa que la coexpresión de D1R y GHSR reduce significativamente las corrientes Cav2.2. Ni la sola expresión de GHSR ni la de D1R son suficientes para modificar significativamente las corrientes en este experimento (si bien la estadística no confirma diferencias, la coexpresión de D1R tendría una tendencia a aumentarlas y GHSR a reducirlas). En este experimento incluimos además una herramienta farmacológica para disminuir la actividad constitutiva de GHSR: el agonista inverso de GHSR, SPA. La preincubación con SPA de células expresando el canal y los dos receptores evitó parcialmente la disminución de la corriente provocada por la coexpresión de D1R y GHSR. De esta manera podemos concluir que la coexpresión de D1R y GHSR modula negativamente las corrientes de calcio Cav2.2 y que cuando se inhibe la actividad constitutiva del GHSR se revierte esta disminución de corriente.

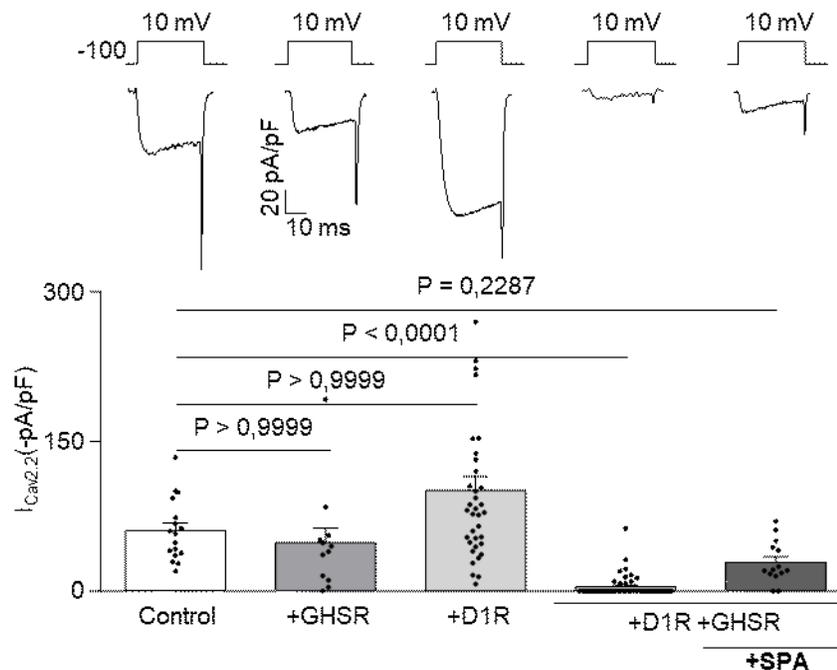


Figura 4. La coexpresión de D1R y GHSR reduce las corrientes basales de calcio $Ca_v2.2$. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 17$), $Ca_v2.2$ y GHSR (+GHSR, $n = 12$), $Ca_v2.2$ y D1R (+D1R, $n = 35$), $Ca_v2.2$, D1R y GHSR (+D1R +GHSR, $n = 48$) o $Ca_v2.2$, D1R y GHSR con preincubación con el agonista inverso de GHSR, SPA (+D1R +GHSR +SPA, $n = 14$) y barras que representan la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus Control).

En base a los resultados de la **figura 4**, decidimos confirmar que el efecto de la coexpresión de D1R y GHSR sobre las corrientes basales se debe a una exacerbación del efecto de la actividad constitutiva de GHSR en esta condición. Esta hipótesis se basa en que la actividad constitutiva de GHSR produce un efecto basal inhibitorio sobre las corrientes $Ca_v2.2$ que es significativo a concentraciones molares de GHSR más altas que las utilizadas en este experimento (Lopez Soto *et al.*, 2015). Para corroborar la participación de la actividad constitutiva de GHSR utilizamos como herramienta el reemplazo de GHSR salvaje por A204E. Para esto cotransfectamos células HEK293T con el $Ca_v2.2$, sus subunidades auxiliares, y D1R, A204E o D1R y A204E. En la **figura 5** se muestra que las corrientes $Ca_v2.2$ basales no se modifican cuando se encuentran coexpresados D1R y A204E al comparar los valores con el control o la

condición expresando solo A204E. En este experimento observamos nuevamente que la sola expresión de D1R tiende a aumentar la corriente basal. Este aumento de la corriente $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D1R ha sido corroborado aumentando el tamaño muestral (n) y es el tema de otra tesis que se desarrolla en el Laboratorio de Electrofisiología en la cual se confirmó que se debe a la actividad constitutiva de D1R (McCarthy *et al.* manuscrito en revisión).

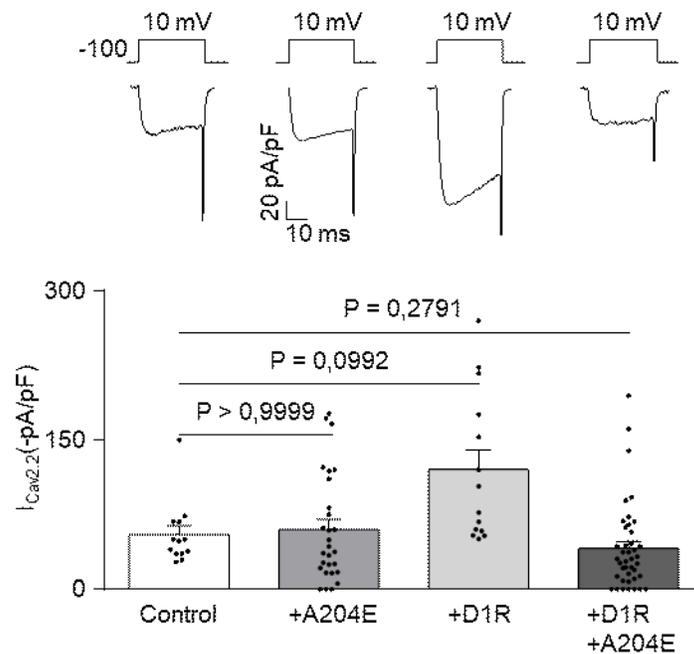


Figura 5. La coexpresión de D1R y A204E no modifica las corrientes $Ca_v2.2$. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 13$), $Ca_v2.2$ y el mutante de GHSR, A204E (+A204E, $n = 28$), $Ca_v2.2$ y D1R (+D1R, $n = 14$) o $Ca_v2.2$, D1R y A204E (+D1R +A204E, $n = 41$) y barras representando la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus Control).

El efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los canales de calcio está mediado por la proteína Gi/o (Lopez Soto *et al.*, 2015). Para estudiar si esta misma proteína G está involucrada en la disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ basales al coexpresar D1R y GHSR, utilizamos tres herramientas: la preincubación con la toxina pertussis (PTx), inhibidor de Gi/o; la preincubación con la toxina colérica (ChTx), inhibidor de Gs; y la cotransfección con el plásmido que contiene el ADNc para Q209L/D277N (Gq DN), un dominante negativo de la proteína Gq. En la **figura 6**

se muestra que sólo la inhibición de la proteína Gi/o restaura las corrientes basales a niveles control. Este resultado nos permite proponer que el efecto de la coexpresión de D1R provoca una exacerbación de la activación de la proteína Gi/o por la actividad constitutiva de GHSR.

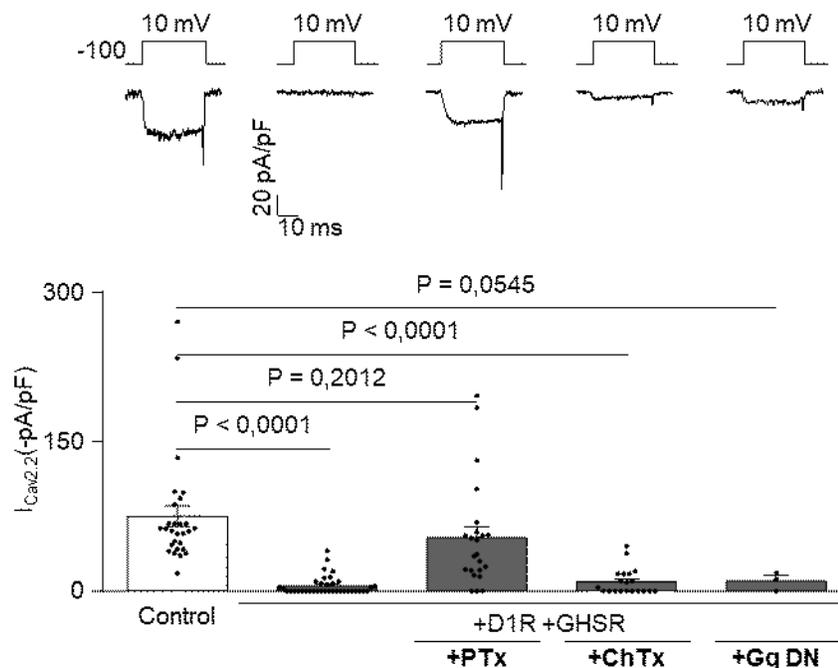


Figura 6. La disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D1R y GHSR depende de la proteína Gi/o. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células transfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 28$), $Ca_v2.2$, D1R y GHSR (+D1R +GHSR, $n = 37$), $Ca_v2.2$, D1R y GHSR preincubadas con un inhibidor de la proteína Gi/o, PTx (+D1R +GHSR +PTx, $n = 23$), $Ca_v2.2$, D1R y GHSR preincubadas con un inhibidor de la proteína Gs, ChTx (+D1R +GHSR +ChTx, $n = 20$) o $Ca_v2.2$, D1R, GHSR y un dominante negativo de la proteína Gq, Gq DN (+D1R +GHSR +Gq DN, $n = 3$) y barras representando la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus Control).

En resumen, los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2 son: D1R y GHSR se encuentran colocalizados en células HEK293T transfectadas con los plásmidos D1R-YFP y GHSR-mOrange, la coexpresión de D1R y GHSR genera una disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ basales que depende de la actividad constitutiva de GHSR y de la proteína Gi/o mientras que las actividades

dependientes de agonistas para cada receptor se mantienen inalteradas en presencia del otro receptor.

2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre la modulación de los canales Cav2.2

2.1. Confirmación de la interacción de D2R y GHSR expresados en forma heteróloga en células HEK293T

Para estudiar la interacción de D2R y GHSR realizamos experimentos de FRET en células HEK293T utilizando un citómetro de flujo. Para esto ensayamos la presencia de FRET en células transfectadas con una versión de D2R fusionada a GFP (*Green fluorescent protein*) (D2R-GFP) que funcionó como dador y GHSR fusionado a mCherry (GHSR-mCherry) que cumplió la función de aceptor. Como controles negativos transfectamos GHSR-mCherry solo o con GFP soluble y como control positivo utilizamos GHSR-mCherry y GHSR-GFP, debido a que está probado que GHSR forma homodímeros (Kern *et al.*, 2012; Damian *et al.*, 2018). El citómetro de flujo utilizado fue FACSaria Fusion (BD Biosciences) que solo contaba con el láser de 488 nm para excitar a GFP. En estas condiciones nosotros esperábamos que el mCherry no fuese excitado por este laser. Sin embargo, detectamos señal mCherry excitando con el láser de 488 nm a células que solo expresaban GHSR-mCherry (**figura 7**, Control Negativo I), esto es coherente con las simulaciones de los espectros de absorción de los fluoróforo que utilizamos donde calculamos que la excitación del mCherry con un láser de 488 nm sería de ~7 % (sección spectrum-viewer de la página de internet www.bdbiosciences.com). Esta señal basal de fluorescencia sumada al inconveniente de no poder excitar las proteínas mCherry con un láser específico de 561 nm nos impidió la detección de FRET en nuestro sistema mediante los procedimientos documentados para evaluar la heterodimerización de GPCRs (Horvath *et al.*, 2016). Como mecanismo alternativo utilizamos histogramas de frecuencia para la intensidad de la señal mCherry en los que logramos discriminar distintas poblaciones de células mediante ajustes estadísticos. La **figura 7** muestra histogramas representativos obtenidos en las distintas condiciones. En cada uno la línea punteada representa la señal adquirida cuando se excitan células HEK293T sin transfectar la cual se superpone con el primer pico de todos los histogramas mostrados. En gris oscuro se señala la población de células con niveles altos de intensidad para mCherry. Nosotros postulamos que en caso de existir FRET esta población aumentaría con respecto al control. Para evaluar cambios en el tamaño de esta población calculamos la relación entre el área de esta

población y el área total del histograma en cada condición experimental. Como esperábamos, no encontramos diferencia entre la condición con GHSR-mCherry solo y con GFP soluble (Control Negativo II), mientras que en la condición coexpresando GHSR-mCherry y GHSR-GFP observamos un aumento del tamaño de esta población consistente con la formación de homodímeros de GHSR capaces de producir señal FRET (Kern *et al.*, 2012; Damian *et al.*, 2018). En la condición experimental coexpresando GHSR-mCherry y D2R-GFP también observamos el aumento de la población de alta señal mCherry. Este resultado nos permitió confirmar la interacción entre D2R y GHSR en nuestro sistema experimental.

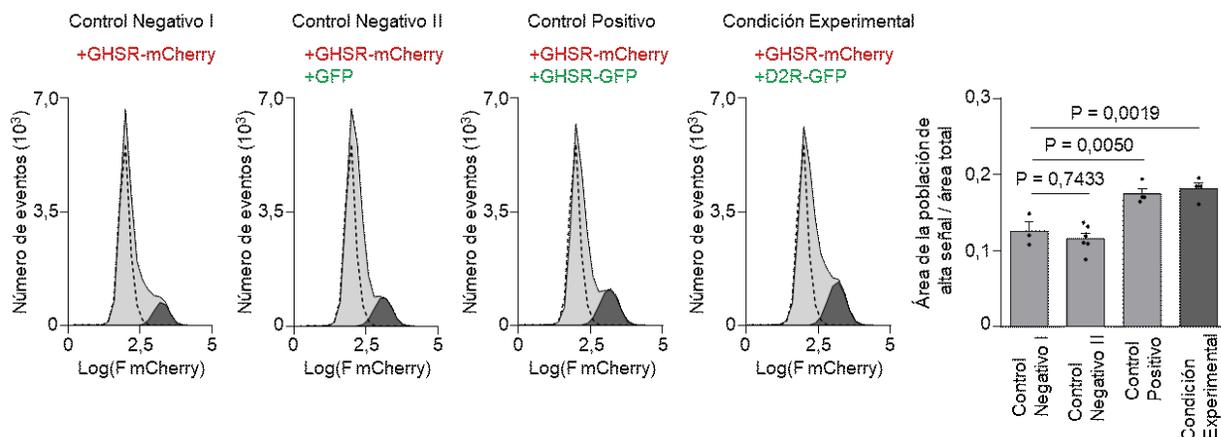


Figura 7. La coexpresión de D2R-GFP aumenta la población de células de alta fluorescencia GHSR-mCherry por FRET. Ajuste de histogramas de frecuencia de la señal de fluorescencia del mCherry de experimentos de FRET por citometría de flujo en células HEK293T transfectadas con GHSR-mCherry (Control Negativo I, $n = 3$ experimentos independientes), GHSR-mCherry y GFP soluble (Control Negativo II, $n = 6$ experimentos independientes), GHSR-mCherry y GHSR-GFP (Control Positivo, $n = 4$ experimentos independientes) o GHSR-mCherry y D2R-GFP (Condición Experimental, $n = 4$ experimentos independientes) (izquierda). La línea punteada en los histogramas representa la señal adquirida en células HEK293T sin transfectar. El área total de la señal adquirida se muestra coloreada en gris claro mientras que el área de alta señal mCherry se muestra coloreada de gris oscuro. Las barras representan la media y el EEM de la proporción del área de la población de alta señal mCherry respecto del área total del histograma para las cuatro condiciones experimentales (derecha). La significancia estadística fue evaluada por test de ANOVA y post test de Dunnett (versus Control Negativo I).

Otra forma de estudiar la interacción entre GPCRs, es evaluar la cointernalización de los dos receptores estimulando la internalización de uno de ellos por algún procedimiento bien establecido, generalmente exponiéndolo a su agonista a altas concentraciones o por tiempos prolongados (Hillion *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2010; Schellekens *et al.*, 2013). Para GHSR sabemos que la unión de ghrelina estimula su internalización, así que aquí usamos este agonista para ensayar la cointernalización de D2R y GHSR. Para esto, transfectamos células HEK293T con los plásmidos que codifican para D2R-GFP, GHSR-mOrange o ambos receptores (igual cantidad de ADNc que usamos en los experimentos de *patch clamp*) preincubando con 0,5 μ M de ghrelina durante 15 minutos. En estas condiciones determinamos la relación entre la señal de fluorescencia citoplasmática y la fluorescencia en la membrana plasmática de D2R-GFP y GHSR-mOrange. Como control negativo primero determinamos que la preincubación con ghrelina no modifique la cantidad de D2R en la membrana plasmática en la condición que expresa solo el D2R-GFP (**figura 8**, Condición a). Como control positivo confirmamos que en células que solo expresan GHSR-mOrange la aplicación de ghrelina produce un aumento de la señal de GHSR-mOrange en el interior celular (**figura 8**, Condición b). En la condición en la que se coexpresan D2R-GFP y GHSR-mOrange observamos que la preincubación con ghrelina produce un aumento significativo de GHSR-mOrange en el interior celular mientras que el aumento de la señal de D2R-GFP en el interior celular no llega a ser significativo, aunque el valor de p apenas mayor que 0,05 ($P = 0,0518$) (**figura 8**, Condición c). Además, sin hacer una comparación estadística detallada podemos observar que los valores de la fluorescencia interna de D2R-GFP en ausencia de ghrelina para la condición que solo expresa D2R-GFP y la que expresa ambos receptores observamos que es mayor cuando se coexpresa GHSR-mOrange y lo mismo ocurre para GHSR-mOrange. Esta observación está de acuerdo con un reporte previo (Schellekens *et al.*, 2013) que muestra que la heterodimerización de GPCRs es suficiente para modificar el patrón de expresión de los GPCRs, aumentando la proporción de los mismos en el interior celular. En cuanto a la cointernalización, si bien el resultado estadístico no nos permite aseverarlo, podemos decir que existe una tendencia a que D2R cointernalice con GHSR.

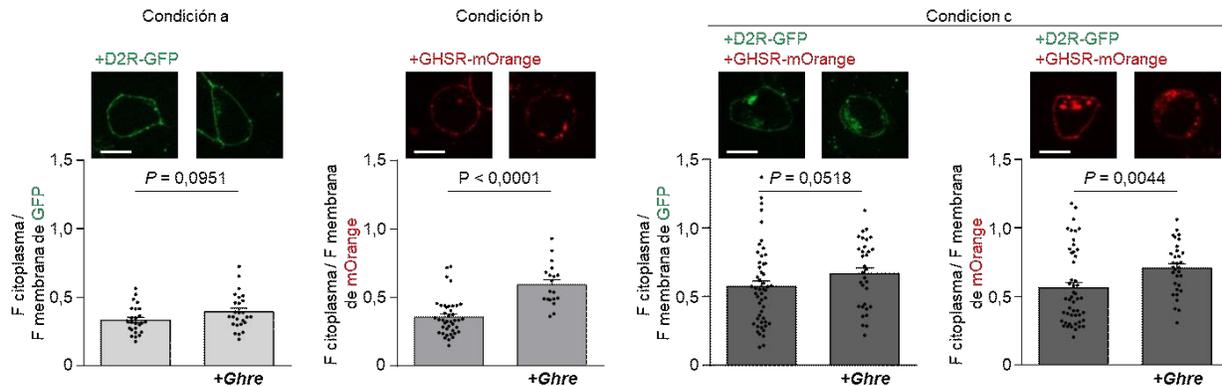


Figura 8. La coexpresión de D2R-GFP y de GHSR-mOrange cambia la distribución de ambos receptores en presencia de ghrelina. Microfotografías representativas (arriba) y barras (abajo) que representan la media y el EEM de la relación de fluorescencia en el citoplasma y la fluorescencia del D2R-GFP y GHSR-mOrange en la membrana plasmática en presencia o ausencia de $0,5 \mu\text{M}$ de ghrelina en células HEK293T transfectadas con $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v\beta_3$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ y D2R-GFP (sin ghrelina $n = 25$ y con ghrelina, +Ghre, $n = 26$), o GHSR-mOrange (sin ghrelina $n = 43$ y con ghrelina, +Ghre, $n = 19$) o D2R-GFP y GHSR-mOrange (sin ghrelina $n = 51$ y con ghrelina, +Ghre, $n = 32$). Las escalas representan $10 \mu\text{m}$. Las significancias estadísticas se evaluaron por test *t* de Student.

2.2. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre la modulación de los canales $\text{Ca}_v2.2$ por la actividad dependiente de agonista de cada uno de los receptores (Objetivo 3)

Una vez confirmada la interacción entre D2R y GHSR en nuestro sistema procedimos a estudiar la actividad evocada por agonistas de D2R y de GHSR sobre las corrientes de calcio $\text{Ca}_v2.2$. Comenzamos estudiando el efecto de la actividad evocada por ghrelina sobre las corrientes $\text{Ca}_v2.2$ mediante experimentos de *patch clamp* en células HEK293T transfectadas con el $\text{Ca}_v2.2$ y GHSR o $\text{Ca}_v2.2$, GHSR y D2R, utilizando relaciones molares $\text{GPCR}:\text{Ca}_v2.2 = 0,1$ que, como mencionamos previamente, no modifican las corrientes basales por la actividad constitutiva de GHSR (Lopez Soto *et al.*, 2015). Evaluamos el efecto de $0,5 \mu\text{M}$ de ghrelina (Lopez Soto *et al.*, 2015) y calculamos el porcentaje de inhibición producido por la aplicación aguda de ghrelina en las distintas condiciones experimentales. Como se observa en la **figura 9** la coexpresión de D2R no modifica el porcentaje de inhibición de la corriente $\text{Ca}_v2.2$ por ghrelina.

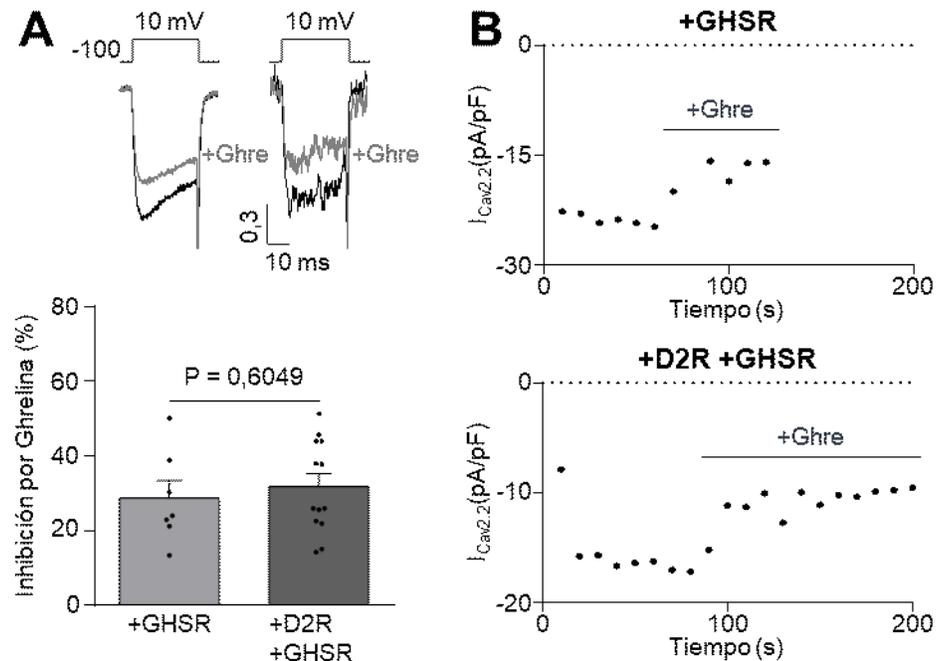


Figura 9. La coexpresión de D2R no modifica la inhibición de la corriente $Ca_v2.2$ por la actividad de GHSR dependiente de ghrelina. A. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y GHSR (+GHSR, $n = 7$) o $Ca_v2.2$, GHSR y D2R (+D2R +GHSR, $n = 13$) antes y después de la aplicación de ghrelina ($0,5 \mu M$, +Ghre). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición de la $I_{Ca_v2.2}$ (abajo). La significancia estadística fue evaluada por test t de Student. **B.** Cursos temporales representativos de las corrientes $Ca_v2.2$ durante la aplicación de ghrelina en las condiciones experimentales +GHSR (arriba) y +D2R +GHSR (abajo)

Luego ensayamos el efecto de $10 \mu M$ de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en células expresando D2R o coexpresando D2R y GHSR en las mismas condiciones utilizadas para el ensayo con ghrelina. En este experimento encontramos que en células coexpresando GHSR la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la aplicación aguda de dopamina es menor (**figura 10**). A continuación, comenzamos a indagar en las propiedades de GHSR que interfieren con el efecto de dopamina/D2R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ y evaluamos el requerimiento de la actividad constitutiva de GHSR. Para esto usamos dos maniobras: preincubamos las células con el agonista inverso de GHSR, SPA, y reemplazamos a GHSR por el mutante A204E (Lopez Soto *et al.*, 2015). La preincubación de las células que coexpresan D2R y GHSR con el agonista

inverso por 20 horas y la coexpresión de A204E reestablecieron los niveles de inhibición de la corriente a los valores control (condición +D2R). Estos resultados sugieren que la actividad constitutiva de GHSR es necesaria para que la coexpresión de este receptor con D2R logre reducir la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina.

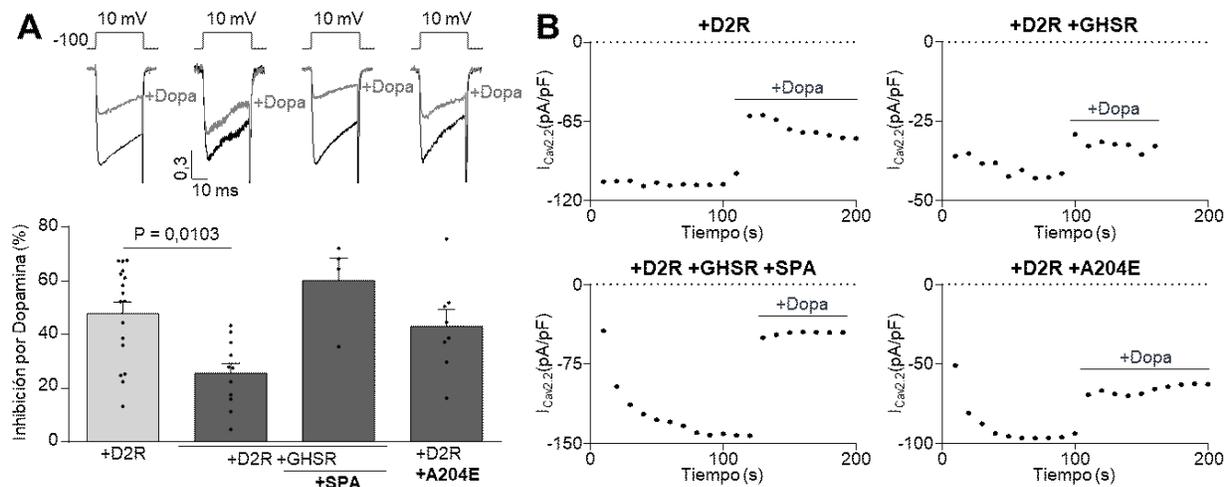


Figura 10. La coexpresión de GHSR reduce la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la activación de D2R mediada por dopamina en forma dependiente de su actividad constitutiva. **A.** Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, n = 17), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR preincubadas (+D2R +GHSR +SPA, n = 4) o no (+D2R +GHSR, n= 11) con SPA (1 μ M) o $Ca_v2.2$, D2R y A204E (+D2R +A204E, n =8) antes y después de la aplicación de dopamina (10 μ M, +Dopa). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición de $I_{Ca_v2.2}$ (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +D2R, P = 0,7231 para +D2R +GHSR +SPA y P > 0,9999 para +D2R +A204E). **B.** Cursos temporales representativos de las corrientes $Ca_v2.2$ durante la aplicación de dopamina en todas las condiciones experimentales.

A continuación, exploramos si el efecto de GHSR sobre la inhibición de las corrientes por dopamina/D2R se debe a una reducción en la afinidad de dopamina por D2R o a una menor eficacia de dopamina para inhibir las corrientes. Para esto realizamos curvas dosis-respuesta a dopamina en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR. Encontramos que la coexpresión de GHSR reduce significativamente el porcentaje máximo de inhibición de las corrientes de calcio (**figura 11**) mientras que los valores de EC_{50} obtenidos

fueron similares a los valores de K_D reportados para la unión de la dopamina al D2R (Gingrich & Caron, 1993). Este resultado nos indica que la coexpresión de GHSR reduce la eficacia de dopamina para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ cuando se une a D2R. En este experimento también estudiamos la condición expresando los dos receptores preincubada 20 horas con SPA y encontramos que en estas células la eficacia de dopamina para inhibir las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ se recupera a valores control (+D2R).

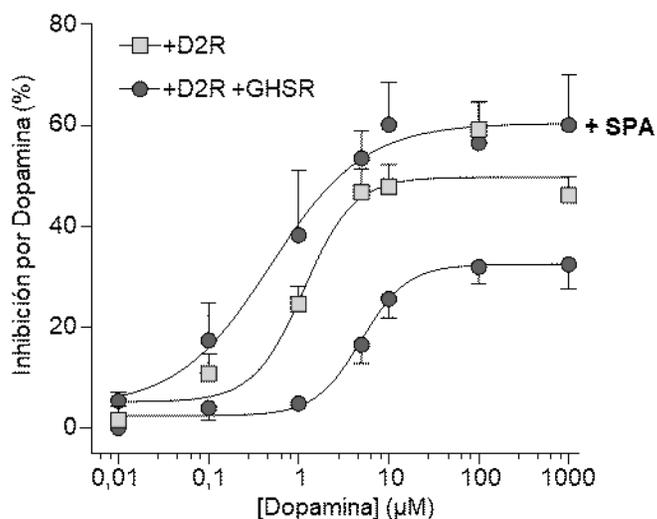


Figura 11. La coexpresión de GHSR con D2R reduce la eficacia de dopamina para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$. Curvas dosis-respuesta para el porcentaje de inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina (concentraciones de 0,01 a 1000 μM) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (cuadrados) o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (círculos) preincubadas o no con SPA (1 μM , +SPA). Los símbolos representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición de las corrientes de calcio y las líneas, el ajuste con la ecuación de Hill. Los n de cada condición son: 89 para +D2R, 48 para +D2R +GHSR y 28 para +D2R +GHSR +SPA (con un rango de 3 a 25 para cada concentración). El máximo de inhibición por dopamina en la condición +D2R +GHSR (intervalo de confianza de 99% = 24,65 a 41,22) es significativamente diferente de la condición +D2R (intervalo de confianza de 99% = 44,30 a 53,16) y de la condición +D2R +GHSR +SPA (intervalo de confianza de 99% = 42,26 a 72,88).

Previamente se estableció que la coexpresión de GHSR cambia la vía de señalización de D2R activada por dopamina de Gi/o a una vía acoplada a Gq que provoca la activación de PLC y el consecuente aumento de calcio citoplasmático desde reservas intracelulares (Kern *et al.*, 2012).

En base a esto decidimos investigar la participación de la proteína Gq en el efecto de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$. Para esto, cotransfectamos células HEK293T con $Ca_v2.2$ y D2R como control y con $Ca_v2.2$, D2R y GHSR agregando o no el plásmido que codifica para el dominante negativo de la proteína Gq (Gq DN) que evita la activación de esta proteína G sin modificar el estado conformacional de los GPCRs (Lauckner *et al.*, 2005). Observamos que la expresión de Gq DN no modificó el porcentaje de inhibición de las corrientes por dopamina en células que expresan D2R (**figura 12**). Por otro lado, cuando la actividad de la proteína Gq fue ocluida en presencia de ambos receptores la inhibición de las corrientes de calcio se recuperó a valores similares al control (+D2R). Por lo tanto, podemos concluir que la disminución del efecto de dopamina sobre las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ en células coexpresando D2R y GHSR involucra un mecanismo que requiere de la activación de la proteína Gq.

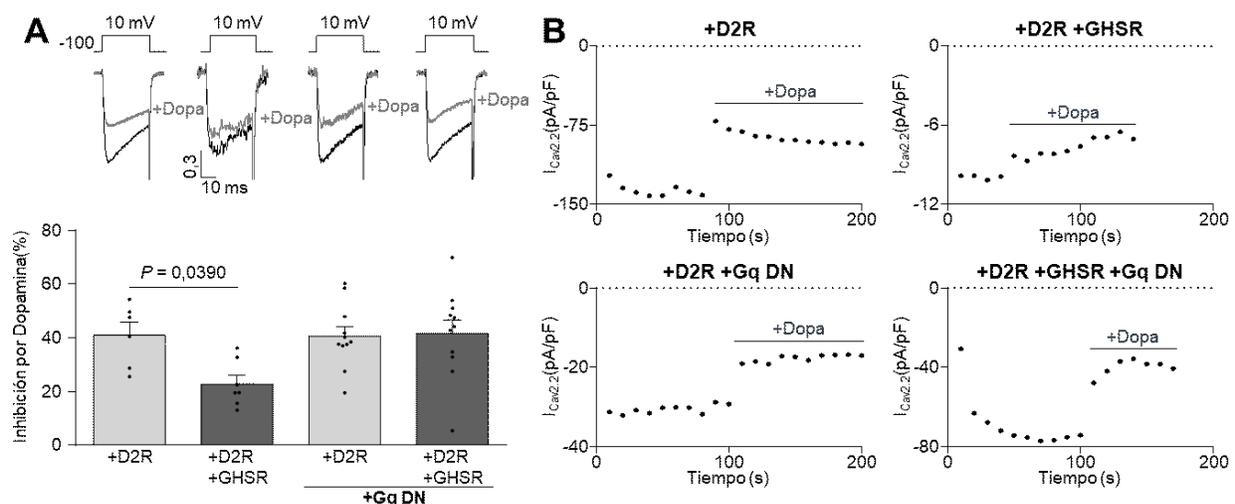


Figura 12. La coexpresión de GHSR reduce la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la activación de D2R mediada por dopamina en forma dependiente de la proteína Gq. **A.** Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 6$), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n = 7$), $Ca_v2.2$, D2R y el dominante negativo de la proteína Gq (Gq DN) (+D2R +Gq DN, $n = 11$) o $Ca_v2.2$, D2R, GHSR y Gq DN (+D2R +GHSR +Gq DN, $n = 11$) antes y después de la aplicación de dopamina (10 μ M, +Dopa). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición de $I_{Ca_v2.2}$ (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +D2R, $P > 0,9999$ para +D2R +Gq DN y para +D2R +GHSR +Gq DN). **B.** Cursos temporales representativos de las corrientes $Ca_v2.2$ durante la aplicación de dopamina en todas las condiciones experimentales.

Luego indagamos respecto de la especificidad de GHSR en el efecto de dopamina para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$. En particular ensayamos si la coexpresión de otro GPCR acoplado a Gq es suficiente para modificar la actividad evocada por dopamina de D2R sobre las corrientes de calcio. Para esto utilizamos el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) que al ser activado por su agonista angiotensina II inhibe de forma aguda las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ (Yamada *et al.*, 2002). Cotransfectamos células HEK293T con $Ca_v2.2$ y D2R o $Ca_v2.2$, D2R y AT1R, registramos las corrientes $Ca_v2.2$ aplicando 10 μ M de dopamina. Antes ensayamos la funcionalidad de AT1R en nuestro sistema experimental ya que se ha informado que $Ca_v2.2$ es sensible a la activación de AT1R por angiotensina II. Cotransfectamos células con $Ca_v2.2$ y AT1R y aplicamos 1 μ M de angiotensina II sobre las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ observando una disminución de $\sim 30\%$ (**figura 13A**). Luego de demostrar que AT1R era funcional en nuestro sistema experimental reemplazamos GHSR por AT1R en células expresando D2R y $Ca_v2.2$ y no observamos cambios en la inhibición de la corriente $Ca_v2.2$ por dopamina (**figura 13B**) Nuestros resultados indican entonces que el efecto reducido de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ provocado por la coexpresión de GHSR es específico para este receptor.

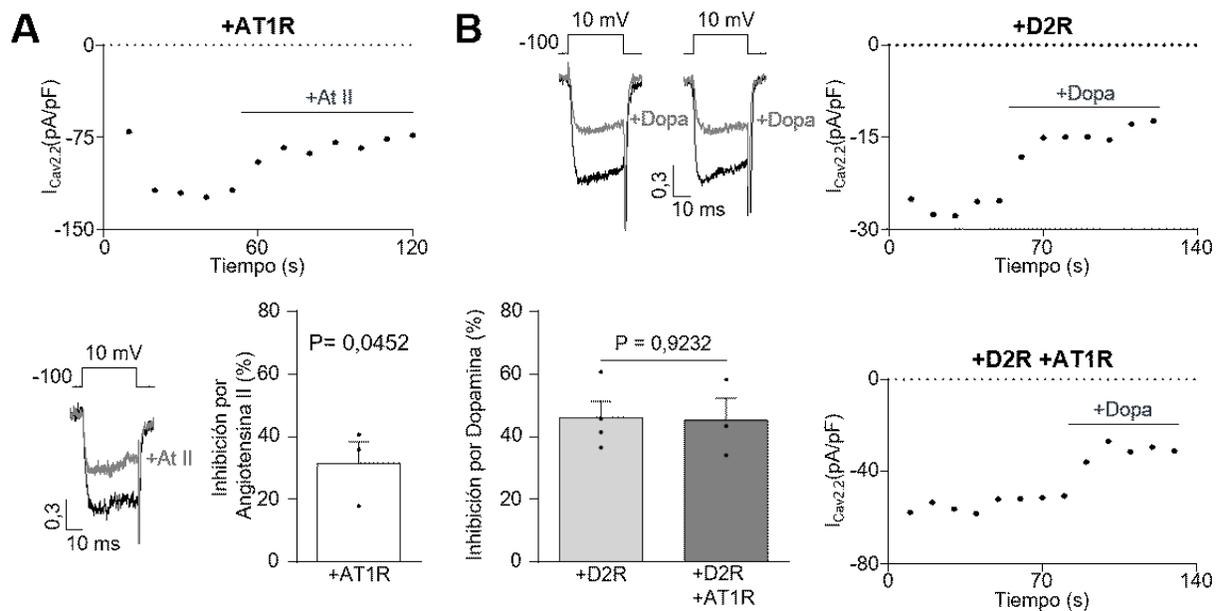


Figura 13. La coexpresión de AT1R y D2R no modifica la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina. **A.** Curso temporal y trazos representativos de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y AT1R (+AT1R, $n = 3$) antes y después de la aplicación de Angiotensina II (1 μ M, +At II). La barra representa la media y el EEM del porcentaje de inhibición de $I_{Ca_v2.2}$. La significancia

estadística fue evaluada por el test *t* de Student (versus cero). **B.** Trazos representativos (izquierda arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) normalizadas por el máximo de corriente en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 4$) o $Ca_v2.2$, D2R y AT1R (+D2R +AT1R, $n = 3$) antes y después de la aplicación de dopamina ($10 \mu M$, +Dopa). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición de $I_{Ca_v2.2}$ (izquierda abajo). La significancia estadística fue evaluada por el test *t* de Student. Cursos temporales representativos de las corrientes $Ca_v2.2$ durante la aplicación de dopamina en las dos condiciones experimentales (derecha).

Kern *et al.* demostraron que el dímero $G\beta\gamma$ participa de la cascada de señalización que produce la liberación de calcio de retículo por dopamina cuando D2R se coexpresa con GHSR (Kern *et al.*, 2012). En base a este antecedente nosotros estudiamos si se requiere $G\beta\gamma$ para observar la reducción del efecto de dopamina sobre $Ca_v2.2$ cuando coexpresamos D2R y GHSR. Para esto utilizamos un plásmido que codifica para MAS-GRK2-ct, un péptido *buffer* de $G\beta\gamma$ que lo secuestra y evita que cumpla su función al liberarse de la proteína $G\alpha$ (Kammermeier & Ikeda, 1999; Raingo *et al.*, 2007). Así, comparamos el efecto de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR agregando o no el plásmido que codifica para MAS-GRK2-ct. Nuestros resultados de la **figura 14** indican que la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina disminuyó significativamente en presencia de MAS-GRK2-ct en células que solo expresan el canal y D2R, similar a lo reportado previamente (Kisilevsky & Zamponi, 2008). Por otro lado en la condición coexpresando D2R y GHSR la inhibición fue menor que en la condición expresando solo canal y D2R. Sorprendentemente MAS-GRK2-ct no modifica la inhibición por dopamina cuando ambos receptores están coexpresados, lo que nos permite concluir que en presencia de GHSR la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina es independiente de $G\beta\gamma$.

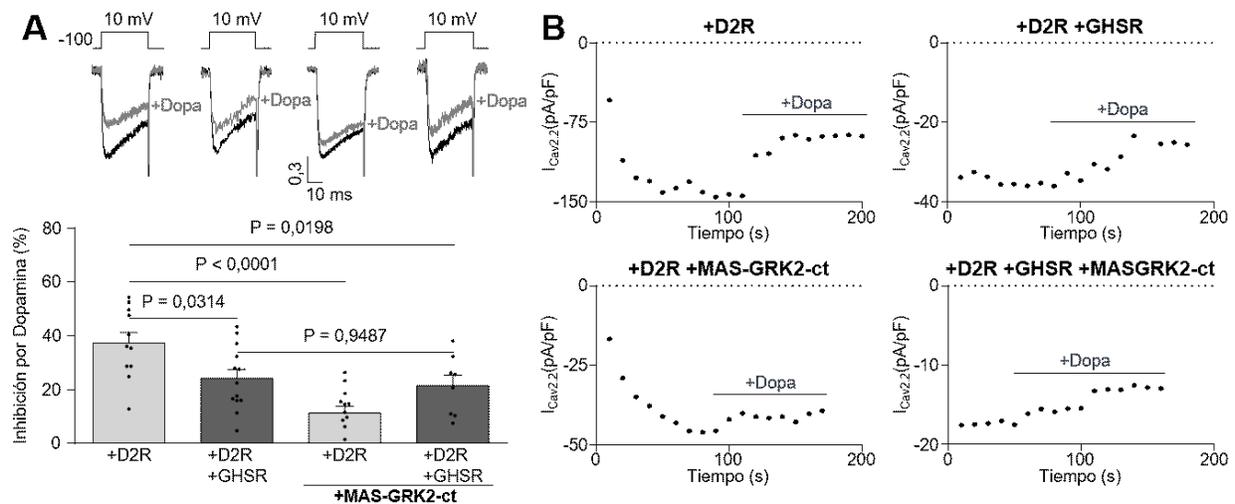


Figura 14. La inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina en células coexpresando D2R y GHSR es independiente de $G\beta\gamma$. **A.** Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ normalizadas por el máximo de corriente ($I_{CaV2.2}$) en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 11$), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n= 13$), $Ca_v2.2$, D2R y MAS-GRK2-ct, un inhibidor de $G\beta\gamma$ (+D2R +MAS-GRK2-ct, $n = 13$) o $Ca_v2.2$, D2R, GHSR y MAS-GRK2-ct (+D2R +GHSR +MAS-GRK2-ct, $n = 8$) antes y después de la aplicación de dopamina (10 μM , +Dopa). Las barras representan la media y el EEM del porcentaje de inhibición de $I_{CaV2.2}$ (abajo). La significancia estadística fue evaluada por ANOVA de una vía y post test de Turkey (otros valores de P que no se muestran en la figura son: para +D2R +GHSR vs +D2R +MAS-GRK2-ct $P = 0,0290$ y para +D2R +MAS-GRK2-ct versus +D2R +GHSR +MAS-GRK2-ct $P = 0,2066$). **B.** Cursos temporales representativos de las corrientes $Ca_v2.2$ durante la aplicación de dopamina en todas las condiciones.

2.3. Estudiar el impacto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre las corrientes basales de los canales $Ca_v2.2$ (Objetivo 4)

Para estudiar cómo se afectan las corrientes basales de $Ca_v2.2$ en presencia de D2R y GHSR decidimos evaluar dos relaciones molares de GPCR: $Ca_v2.2 = 0,1$ y $0,5$. Tomamos esta decisión ya que los efectos basales podrían depender de la actividad constitutiva de los receptores y al cambiar el nivel de expresión modificaríamos el efecto de las vías implicadas. El primer paso para realizar estos experimentos fue evaluar la expresión de los receptores unidos a proteínas fluorescentes mediante microscopia y corroborar que un aumento de la cantidad de plásmido

utilizado en las mezclas de transfección se reflejara en un aumento de la señal de fluorescencia en la membrana plasmática de las células HEK293T. Utilizando un sistema experimental similar al de la **figura 8** estudiamos primero como se modifica la cantidad de fluorescencia D2R-GFP en la membrana plasmática de células cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R-GFP en las relaciones molares GPCR: $Ca_v2.2$ = 0,1 y 0,5 (**figura 15**) y observamos que, como era de esperarse, al aumentar la cantidad de D2R-GFP aumentó la fluorescencia. Repetimos este ensayo para $Ca_v2.2$ y GHSR-mOrange, y observamos nuevamente que al incrementar la cantidad de ADNc de GHSR-mOrange aumenta la señal fluorescente en la superficie celular. Luego cotransfectamos células con $Ca_v2.2$, D2R-GFP y GHSR-mOrange en las relaciones molares GPCR: $Ca_v2.2$ = 0,5 y 0,1. Como se puede observar en la **figura 15** el aumento de la fluorescencia para cada receptor en la membrana plasmática no se afecta por la coexpresión del otro GPCR.

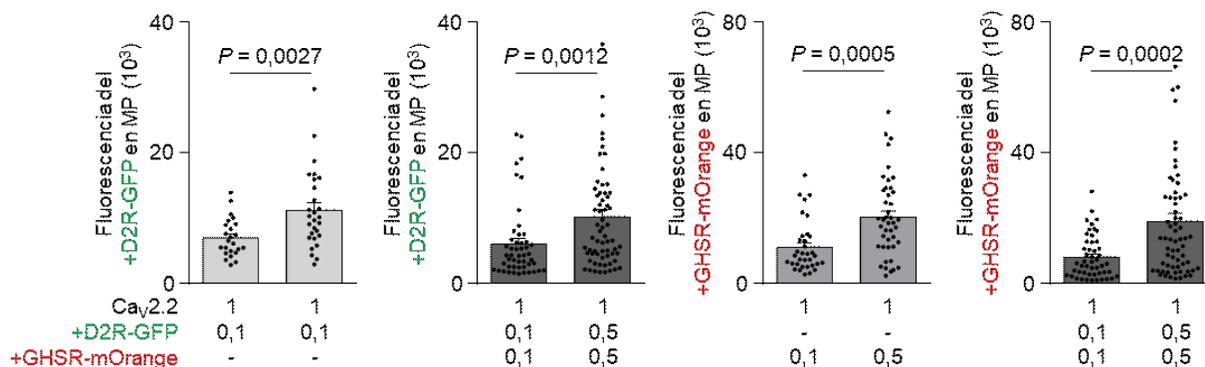


Figura 15. La señal de fluorescencia de D2R-GFP y GHSR-mOrange en la membrana plasmática aumenta con la cantidad de ADNc transfectado. Las barras representan la media y el EEM de la señal fluorescente de D2R-GFP y de GHSR-mOrange en la membrana plasmática (MP) de células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R-GFP y/o GHSR-mOrange en las relaciones molares GPCR: $Ca_v2.2$ = 0,1 o 0,5. (D2R-GFP 0,1 n = 24 y 0,5 n = 28, GHSR-mOrange 0,1 n = 34 y 0,5 n = 43 o D2R-GFP y GHSR-mOrange 0,1 n = 49 y 0,5 n = 65). Las significancias estadísticas fueron evaluadas por test t de Student.

Una vez establecidos estos controles procedimos a estudiar el efecto de la coexpresión de D2R y GHSR sobre las corrientes de calcio basales. Para esto transfectamos células HEK293T con $Ca_v2.2$, $Ca_v2.2$ y D2R, $Ca_v2.2$ y GHSR o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR. Los receptores se transfectaron en las relaciones molares GPCR: $Ca_v2.2$ = 0,1 y 0,5. Comparamos los niveles de corrientes $Ca_v2.2$ basales y observamos que las condiciones coexpresando D2R y GHSR

sufrieron una disminución significativa de las corrientes basales $Ca_v2.2$ (**figura 16**), siendo el efecto más pronunciado en las células que expresaban los receptores en la relación molar GPCR: $Ca_v2.2 = 0,5$. En las células que expresaban solo el D2R o el GHSR, no observamos cambios significativos en los niveles de corrientes $Ca_v2.2$ respecto de la condición expresando solo $Ca_v2.2$. Sin embargo, la condición expresando solo GHSR, muestra una tendencia de las corrientes de calcio a disminuir, en concordancia con el efecto esperado para la actividad constitutiva de GHSR sobre este canal (Lopez Soto *et al.*, 2015). Por otro lado, en la condición expresando solo D2R con el $Ca_v2.2$, observamos que a niveles bajos de expresión la corriente basal tiende a ser mayor que en control (en forma similar a lo mencionado para D1R, **figura 4**), mientras que a niveles altos de expresión la tendencia se revierte. Este efecto dual no significativo de la expresión de D2R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ está en concordancia con datos previos que reportan que la expresión del D2R aumenta la cantidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática (Kisilevsky & Zamponi, 2008). En conclusión, este experimento indica que la coexpresión de D2R y GHSR modula negativamente la corriente basal de $Ca_v2.2$ en forma dependiente del nivel de expresión de los GPCRs.

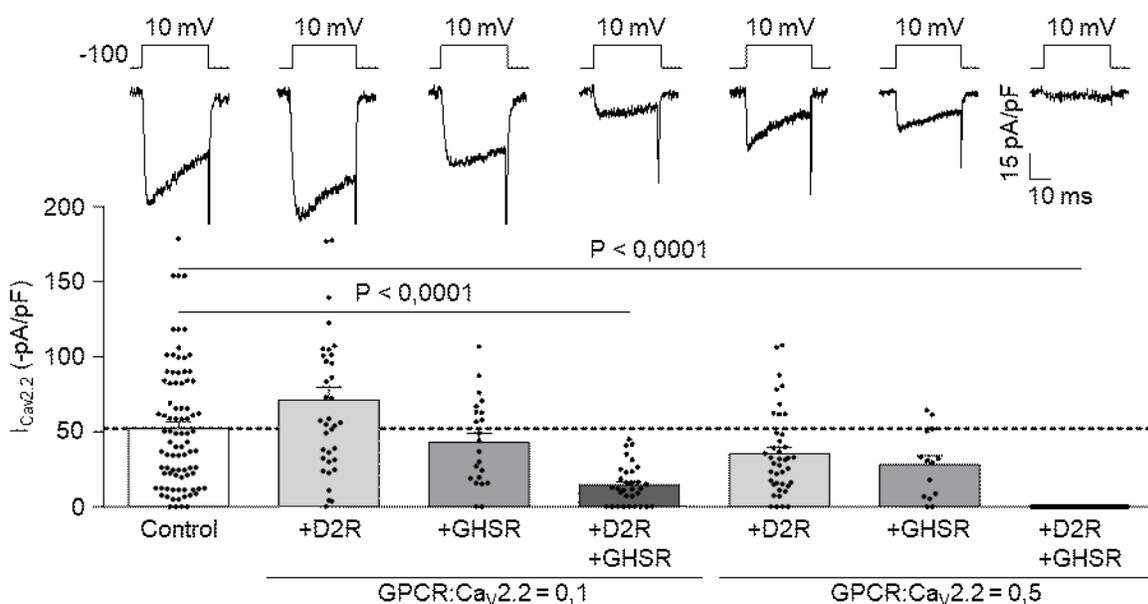


Figura 16. La coexpresión de D2R y GHSR reduce las corrientes basales $Ca_v2.2$. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 86$), $Ca_v2.2$ y D2R, $Ca_v2.2$ y GHSR o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR en las relaciones molares GPCR: $Ca_v2.2 = 0,1$ (+D2R, $n = 36$; +GHSR, $n = 22$; +D2R

+GHSR, $n = 32$) y 0,5 (+D2R, $n = 41$; +GHSR, $n = 14$; +D2R +GHSR, $n = 53$). Las barras representan la media y el EEM de las corrientes de calcio $I_{CaV2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus Control) (otros valores de P no mostrados en la figura son: $P = 0,7926$ para +D2R 0,1, $P > 0,9999$ para +GHSR 0,1, $P = 0,5911$ para +D2R 0,5 y $P = 0,4655$ para +GHSR 0,5).

De manera similar a lo encontrado para la coexpresión de D1R y GHSR decidimos aquí evaluar si la disminución de las corrientes basales de $Ca_v2.2$ en presencia de D2R y GHSR depende de la actividad constitutiva de GHSR. Para esto, ensayamos el efecto de la preincubación con SPA y del reemplazo de GHSR por A204E (Pantel *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2011; Lopez Soto *et al.*, 2015; Martinez Damonte *et al.*, 2018). En la **figura 17** se observa que en las condiciones coexpresando D2R y GHSR preincubada con SPA o D2R y A204E las corrientes $Ca_v2.2$ no son diferentes de la condición que solo expresa D2R. Estos resultados sugieren que la actividad constitutiva de GHSR es necesaria para la reducción de las corrientes basales por la coexpresión de D2R y GHSR.

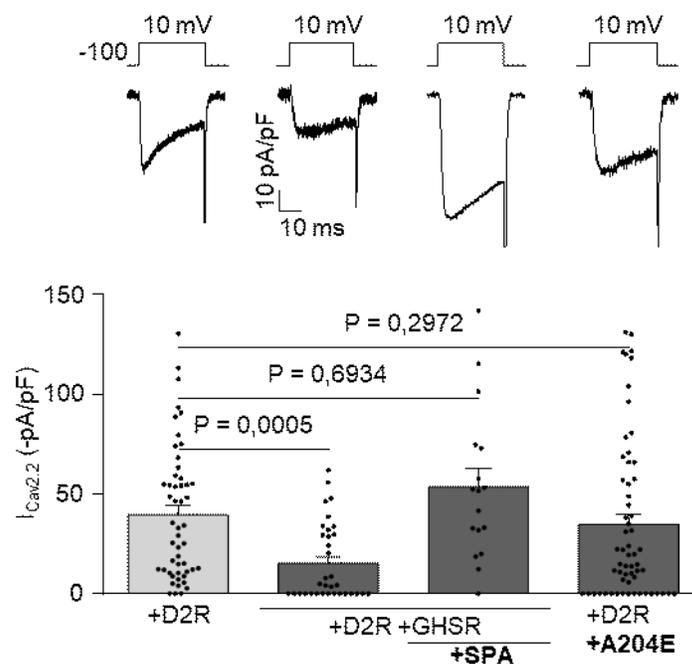


Figura 17. La disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D2R y GHSR depende de la actividad constitutiva de GHSR. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{CaV2.2}$) en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R

(+D2R, $n = 51$), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n = 34$), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR preincubadas con $1 \mu\text{M}$ de SPA (+D2R +GHSR +SPA, $n = 17$) o $Ca_v2.2$, D2R y A204E (+D2R +A204E, $n = 60$). Las barras representan la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +D2R).

A continuación, indagamos sobre la participación de Gq en la disminución de la corriente basal por la coexpresión de D2R y GHSR. En forma análoga a los experimentos de la sección anterior (**figura 12**) utilizamos el plásmido de expresión que contiene el ADNc del dominante negativo de la proteína Gq (Gq DN). Cotransfectamos células HEK293T con $Ca_v2.2$ y D2R o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR con y sin Gq DN y registramos las corrientes de calcio tipo $Ca_v2.2$. Encontramos que en presencia de D2R, GHSR y Gq DN la corriente basal recupera los valores de la condición control indicando que la proteína Gq se encuentra involucrada en la disminución de las corrientes basales $Ca_v2.2$ (**figura 18**).

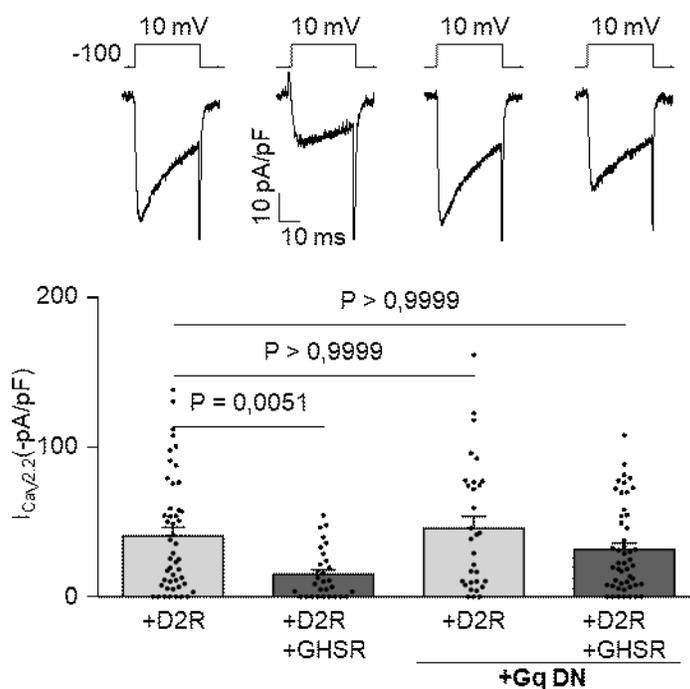


Figura 18. La disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D2R y GHSR depende de la proteína Gq. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 48$), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n = 30$), $Ca_v2.2$, D2R y un dominante negativo de la proteína Gq (Gq DN)

(+D2R +Gq DN, $n = 31$) o $Ca_v2.2$, D2R, GHSR y Gq DN (+D2R +GHSR +Gq DN, $n = 49$). Las barras representan la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +D2R).

Por otro lado, también indagamos en la especificidad de GHSR para reducir la corriente basal de $Ca_v2.2$ al coexpresarse con D2R utilizando, al igual que en la **figura 13**, AT1R. Medimos las corrientes basales $Ca_v2.2$ en células HEK293T expresando $Ca_v2.2$ (Control), $Ca_v2.2$ y D2R, $Ca_v2.2$ y AT1R o $Ca_v2.2$, D2R y AT1R. Encontramos que la coexpresión de AT1R no modifica las corrientes basales de calcio $Ca_v2.2$ en presencia o ausencia de D2R (**figura 19**) indicando que el efecto basal observado para GHSR es específico.

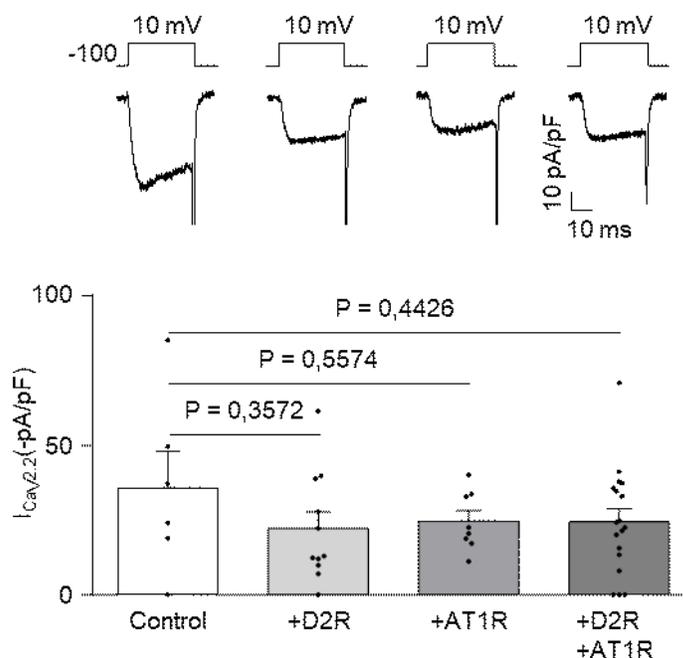


Figura 19. La coexpresión de D2R y AT1R no modifica las corrientes basales de calcio $Ca_v2.2$. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 6$), $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 11$), $Ca_v2.2$ y AT1R (+AT1R, $n = 8$) o $Ca_v2.2$, D2R y AT1R (+D2R +AT1R, $n = 18$). Las barras representan la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus Control).

Posteriormente evaluamos la participación de $G\beta\gamma$ en la reducción de las corrientes basales de calcio usando el *buffer* del péptido $G\beta\gamma$, MAS-GRK2-ct. Cotransfectamos células HEK293T

con $Ca_v2.2$ y D2R, $Ca_v2.2$, D2R y GHSR, $Ca_v2.2$, D2R y MAS-GRK2-ct o $Ca_v2.2$, D2R, GHSR y MAS-GRK2-ct. Los resultados mostrados en la **figura 20** indican que logramos reproducir la reducción de la corriente basal $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D2R y GHSR y que el bloqueo de la actividad del dímero $G\beta\gamma$ evita esta reducción, ya que los niveles de corriente son iguales a los de la condición expresando solo D2R.

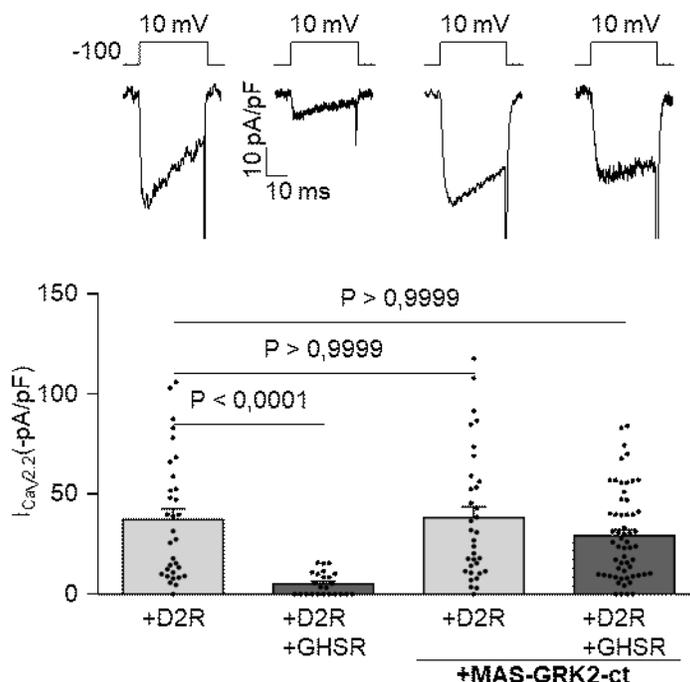


Figura 20. La disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D2R y GHSR depende de la proteína $G\beta\gamma$. Trazos representativos (arriba) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 32$), $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n = 24$), $Ca_v2.2$, D2R y un péptido buffer de $G\beta\gamma$, MAS-GRK2-ct (+D2R, $n = 32$) o $Ca_v2.2$, D2R, GHSR y MAS-GRK2-ct (+D2R +GHSR +MAS-GRK2-ct, $n = 58$). Las barras representan la media y el EEM de las $I_{Ca_v2.2}$ para cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus +D2R).

Un trabajo previo de Evans *et al.* (Evans *et al.*, 2010) demuestra que la heterodimerización del receptor de nociceptina (*opioid receptor-like 1*, ORL1) con receptores opioides clásicos reduce la inhibición aguda del agonista de ORL1, nociceptina, sobre las corrientes $Ca_v2.2$ debido a la presencia de una inhibición tónica dependiente de $G\beta\gamma$ y del voltaje. Aquí nos propusimos estudiar si la coexpresión de D2R y GHSR produce también una inhibición tónica dependiente

de $G\beta\gamma$ y el voltaje. Para esto utilizamos el mismo protocolo detallado en Evans *et al.* (Evans *et al.*, 2010) que consiste en dos pulsos despolarizantes a +10 mV (I_1 e I_2) separados por 200 ms y un prepulso despolarizante a 150 mV antes del segundo pulso a +10 mV (I_2). El prepulso se aplica para liberar la unión de $G\beta\gamma$ a $Ca_v2.2$. De este modo es esperable un aumento de la corriente de calcio en el segundo pulso a +10 mV en caso de que exista una inhibición tónica dependiente de $G\beta\gamma$. Al aplicar este protocolo en condición control (solo $Ca_v2.2$) observamos que las corrientes de calcio en el segundo pulso (I_2) eran menores que en el primer pulso (I_1) (**figura 21**). Exploramos si esta reducción inesperada para el control en I_2 se debía a la aplicación del prepulso despolarizante eliminándolo del protocolo. A pesar de la eliminación del prepulso, las corrientes I_2 no recuperaron los niveles de I_1 , lo que nos indicó que los 200 ms entre I_1 e I_2 son insuficientes para la recuperación de los canales desde el estado inactivado (Thaler *et al.*, 2004). Cuantificamos estos cambios de la corriente control entre ambos pulsos calculando la relación I_2/I_1 .

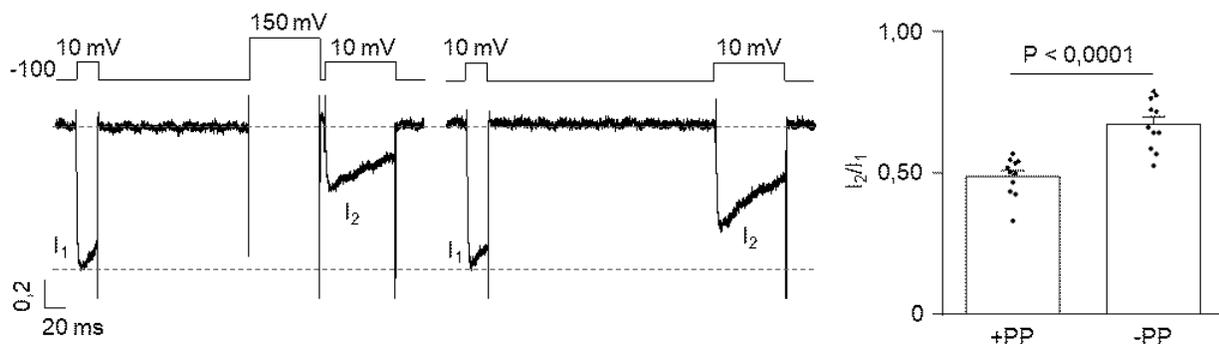


Figura 21. Pulsos despolarizantes de 150 mV producen la disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ basales en condiciones control. Trazos representativos (izquierda) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) evocadas por dos pulsos a +10 mV (I_1 e I_2) con y sin un prepulso despolarizante de +150 mV en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ ($n = 11$) normalizadas por el máximo de corriente I_1 . Las barras representan la media y el EEM de la relación I_2/I_1 en presencia (+PP) o ausencia (-PP) del prepulso despolarizante de +150 mV (derecha). La significancia estadística fue evaluada por test t de Student.

Una vez establecido el cambio de la disminución de las corrientes $Ca_v2.2$ por la aplicación del protocolo propuesto por (Evans *et al.*, 2010), realizamos el experimento en las condiciones experimentales de interés y calculamos la relación I_2/I_1 para las corrientes de células expresando $Ca_v2.2$ solo, D2R, GHSR o D2R y GHSR. En células coexpresando $Ca_v2.2$ y GHSR no

observamos diferencia en la relación I_2/I_1 respecto de la condición control. En contraste en células coexpresando $Ca_v2.2$ y D2R observamos que la diferencia entre las corrientes en I_2 e I_1 que describimos para la condición control desaparece, e inclusive existe una clara facilitación en algunas células, siendo el valor medio de la relación I_2/I_1 cercano a 1 (**figura 22A**) mientras que este valor vuelve a ser menor a 1 en células coexpresando los dos GPCRs. Este resultado es contrario a lo observado en el trabajo de Evans, ya que la coexpresión de D2R y GHSR estaría ocluyendo la inhibición tónica de las corrientes por D2R. Para confirmar que esta inhibición tónica producida por D2R se debe a $G\beta\gamma$, repetimos el experimento de la **figura 22A** en presencia de MAS-GRK2-ct y encontramos que esta maniobra elimina la inhibición tónica de las corrientes $Ca_v2.2$ por D2R (**figura 22B**). Una posible explicación de estos resultados es que el D2R posea actividad independiente de dopamina y que señalice basalmente vía $G\beta\gamma$ provocando la inhibición tónica dependiente de voltaje de las corrientes de calcio. Podemos decir también que al estar presente GHSR, esta inhibición basal se perdería, en concordancia con los otros efectos encontrados aquí mostrando que cuando ambos GPCRs están presentes $G\beta\gamma$ pierde la capacidad de funcionar en las vías activadas por D2R.

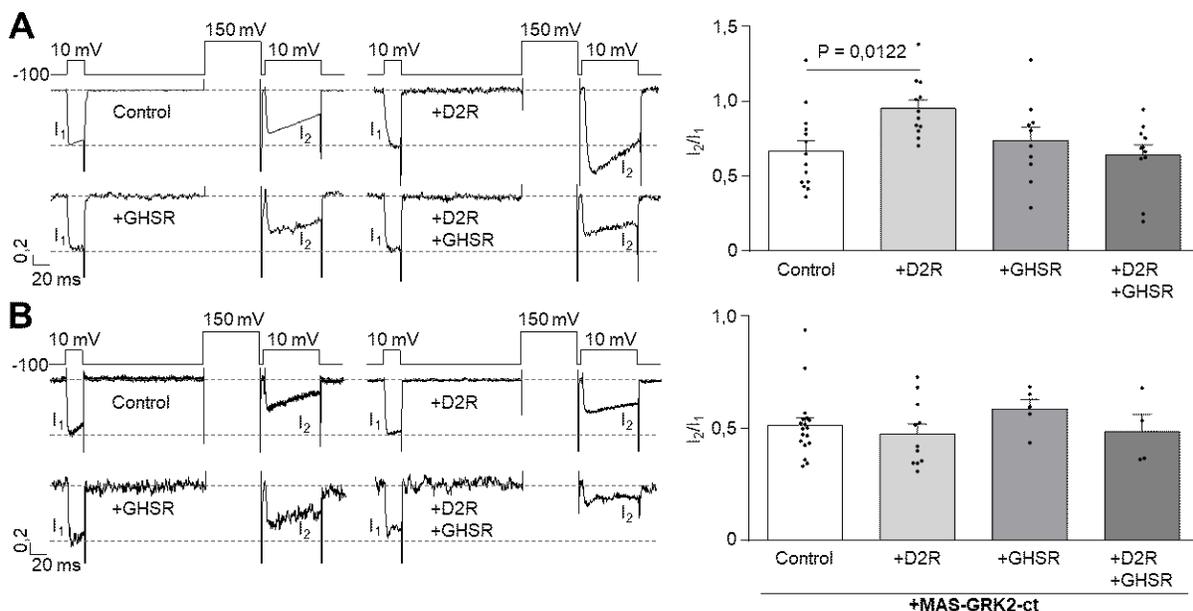


Figura 22. La coexpresión de D2R inhibe tónicamente vía $G\beta\gamma$ a los canales $Ca_v2.2$ y está inhibición se pierde en presencia de GHSR. A. Trazos representativos (izquierda) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) evocadas por dos pulsos a +10 mV (I_1 e I_2) con un prepulso despolarizante a +150 mV normalizadas por el máximo de corriente I_1 en células HEK293T

cotransfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 14$), $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 12$), $Ca_v2.2$ y GHSR (+GHSR, $n = 10$) o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n = 11$). Las barras representan la media y el EEM de la relación I_2/I_1 para cada condición (derecha). La significancia estadística fue evaluada por test de ANOVA de una vía y post test de Dunnett (versus Control, otros valores de P no incluidos en la figura son $P = 0,8096$ para +GHSR y $P = 0,9865$ para +D2R +GHSR). **B.** Trazos representativos (izquierda) de las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) evocadas por el mismo protocolo que en A en células HEK293T cotransfectadas con $Ca_v2.2$ (Control, $n = 18$), $Ca_v2.2$ y D2R (+D2R, $n = 11$), $Ca_v2.2$ y GHSR (+GHSR, $n = 5$) o $Ca_v2.2$, D2R y GHSR (+D2R +GHSR, $n = 4$), todas con el agregado del inhibidor de $G\beta\gamma$ MAS-GRK2-ct. Las barras representan la media y el EEM de la relación I_2/I_1 para cada condición (derecha). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn (versus Control, otros valores de P no incluidos en la figura son $P > 0,9999$ para +D2R, $P = 0,3880$ para +GHSR y $P > 0,9999$ para +D2R +GHSR).

2.4. Estudiar el impacto de la coexpresión del D2R y el GHSR sobre las corrientes de calcio nativas de neuronas embrionarias hipotalámicas

Los experimentos mostrados hasta aquí sugieren que la interacción de D2R y GHSR podría ejercer efectos importantes en las neuronas que coexpresen estos GPCRs. Para explorar esta posibilidad en un contexto más fisiológico decidimos utilizar como modelo experimental cultivos neuronales de embriones de ratones salvajes (E15-E17). Utilizamos como tejido el hipotálamo donde Kern *et al.* demostraron que existen neuronas que coexpresan D2R y GHSR (Kern *et al.*, 2012). Estudiamos el efecto de agonistas específicos de D2R (quinpirole 10 μ M) y de GHSR (ghrelina 0,5 μ M) sobre las corrientes de calcio nativas activadas por voltaje. Para esto utilizamos bario como ion permeante para amplificar el tamaño de las corrientes nativas. En nuestros experimentos encontramos que los porcentajes de inhibición de las Ca_v abarcaban un rango de valores amplio (**figura 23**). Al analizar si existía una correlación entre los valores de inhibición por ambos agonistas observamos que las corrientes Ca_v que presentaron alta inhibición por quinpirole mostraron una baja inhibición por ghrelina (ejemplo a, **figura 23**) e inversamente, las corrientes Ca_v muy inhibidas por ghrelina, mostraron menor respuesta a quinpirole (ejemplo b, **figura 23**). Para cuantificar esta observación calculamos el coeficiente de correlación de Spearman entre el porcentaje de inhibición de las corrientes Ca_v por quinpirole y por ghrelina y encontramos una correlación inversa entre los mismos. Este resultado nos indica que en

neuronas del hipotálamo el efecto sobre las corrientes de calcio de cada receptor estaría influenciado por la presencia del otro.

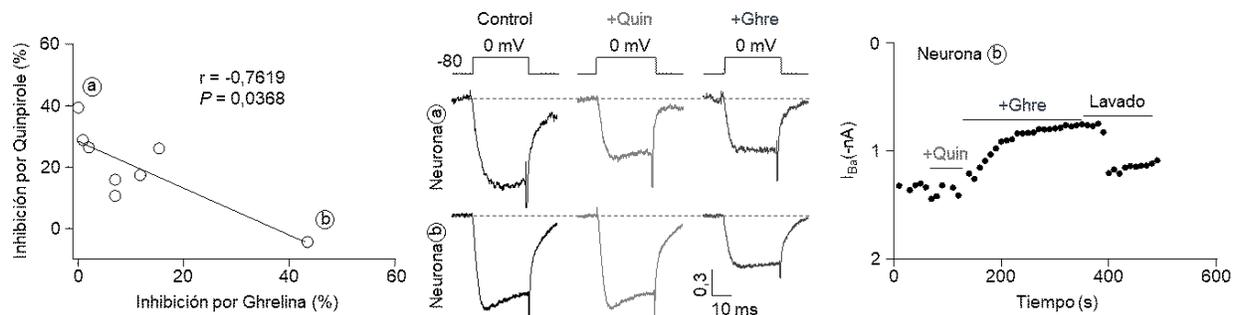


Figura 23. Los porcentajes de inhibición por quinpirole y ghrelina de las corrientes Ca_v nativas de neuronas hipotalámicas correlacionan inversamente. Correlación entre los porcentajes de inhibición de las corrientes Ca_v de bario (I_{Ba}) por quinpirole y ghrelina (izquierda). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r) y el valor P de la misma. La línea representa el mejor ajuste lineal de los datos experimentales ($r^2 = 0,6615$, pendiente = $-0,7633$, $P = 0,0141$ versus cero). Trazos representativos (centro) de las corrientes I_{Ba} antes y después de la aplicación de quinpirole ($10 \mu\text{M}$, +Quin) y ghrelina ($0,5 \mu\text{M}$, +Ghre) de las neuronas presentadas como a y b en el gráfico de correlación entre los porcentajes de inhibición. Curso temporal de las corrientes de bario (derecha) obtenidas luego de la aplicación de quinpirole (+Quin), ghrelina (+Ghre) y el posterior lavado de los agonistas para la neurona b.

Luego estudiamos este efecto de manera más controlada sobreexpresando D2R y GHSR en cultivos de neuronas hipotalámicas para obtener una población más homogénea de neuronas expresando un GPCR específico o ambos. Para esto utilizamos un sistema de transducción lentiviral de alta eficiencia. Registramos las corrientes de calcio neuronales y evaluamos el efecto de quinpirole y ghrelina en los cultivos sobreexpresando D2R, GHSR o ambos GPCRs. El efecto inhibitorio de ghrelina fue mayor en neuronas que sobreexpresan GHSR que en las que sobreexpresan D2R (**figura 24A**). En neuronas sobreexpresando ambos receptores la inhibición por ghrelina no fue significativamente diferente a la de la condición sólo sobreexpresando GHSR. En forma análoga el efecto de quinpirole fue mayor en neuronas que solo expresaban D2R que en neuronas que solo expresaban GHSR (**figura 24B**) y en neuronas que sobreexpresaban ambos GPCRs. Este resultado concuerda con los mostrados previamente en que el efecto de la activación de D2R sobre las corrientes Ca_v es modulado por la presencia de GHSR y también

que la activación de GHSR por ghrelina no se modifica significativamente por la presencia de D2R.

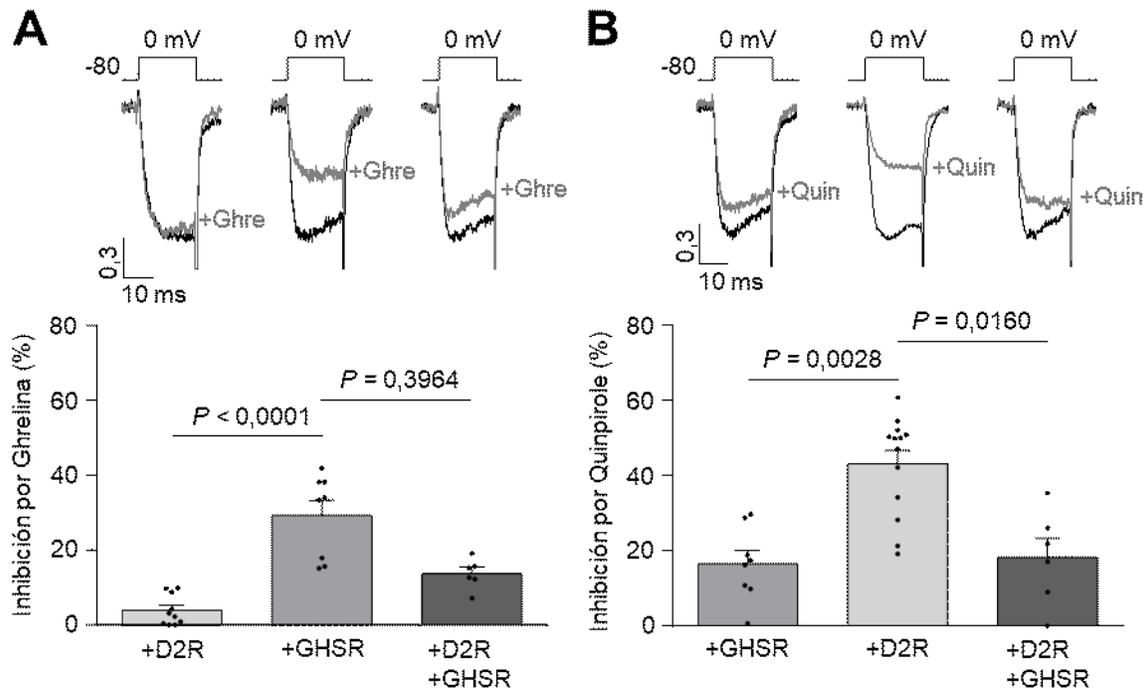


Figura 24. La sobreexpresión de D2R y GHSR reduce la inhibición de las corrientes Ca_V nativas por quinpirole en neuronas hipotálamicas. A. Trazos representativos (arriba) de corrientes de bario (I_{Ba}) normalizadas por el máximo de corriente en neuronas hipotálamicas transducidas con lentivirus para D2R (+D2R, $n = 10$), GHSR (+GHSR, $n = 8$), o ambos receptores (+D2R +GHSR, $n = 6$), antes y después de la aplicación de ghrelina (0,5 μ M, +Ghre). Las barras representan la media y el EEM de los porcentajes de inhibición de las I_{Ba} por ghrelina en cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn ($P = 0,0742$ para +D2R versus +D2R +GHSR). **B.** Trazos representativos (arriba) de corrientes de bario (I_{Ba}) normalizadas por el máximo de corriente en neuronas hipotálamicas transducidas con lentivirus para GHSR (+GHSR, $n = 8$), D2R (+D2R, $n = 13$), o ambos receptores (+D2R +GHSR, $n = 6$), antes y después de la aplicación de quinpirole (10 μ M, +Quin). Las barras representan la media y el EEM de los porcentajes de inhibición de las I_{Ba} por quinpirole en cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por Kruskal-Wallis y post test de Dunn ($P > 0,9999$ para +GHSR versus +D2R +GHSR).

Para este experimento volvimos a graficar los porcentajes de inhibición por ghrelina versus los porcentajes de inhibición por quinpirole (**figura 25**) y no obtuvimos una correlación entre los % de inhibición por los agonistas en ninguna condición. Un análisis descriptivo nos permite observar que las neuronas que sobreexpresan D2R se ubican en un sector del gráfico con alta sensibilidad a quinpirole y baja sensibilidad a ghrelina (cuadrados), mientras que las neuronas que sobreexpresan GHSR (triángulos) o ambos receptores (cuadrados) se ubican en un sector del gráfico con sensibilidad similar a quinpirole.

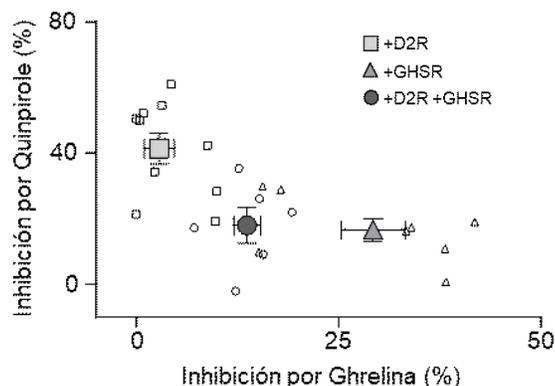


Figura 25. La sobreexpresión de D2R y GHSR produce la pérdida de la correlación inversa entre la inhibición de las corrientes Ca_v nativas por quinpirole y ghrelina en neuronas hipotalámicas. Gráfico de los porcentajes de inhibición de I_{Ba} por quinpirole versus ghrelina de neuronas hipotalámicas transducidas con lentivirus para D2R (cuadrados, $n = 10$), GHSR (triángulos, $n = 8$) o ambos receptores (círculos, $n = 6$). Los símbolos pequeños y vacíos representan valores individuales. Los coeficientes de correlación de Spearman y los valores P fueron calculados para los tres grupos: $r = -0,1945$ y $P = 0,5755$ para +D2R, $r = -0,2143$ y $P = 0,6191$ para +GHSR, y $r = 0,2000$ y $P = 0,7139$ para +D2R +GHSR, en ningún caso se alcanzó la significancia estadística. Los símbolos grandes y coloreados representan la media y el EEM de los porcentajes de inhibición de I_{Ba} por quinpirole y ghrelina para cada grupo.

Al diagramar estos experimentos tuvimos en cuenta la posibilidad de que la aplicación de uno de los agonistas pueda influenciar negativamente el efecto del segundo agonista en la misma célula y así reducir el efecto observado. Para evitar esto agregamos los agonistas de manera alternada entre los registros. Por otro lado, verificamos que las inhibiciones de las corrientes Ca_v por los agonistas sean lavables. En la **figura 26** se muestran los cursos temporales para la inhibición por quinpirole y ghrelina, y el lavado de estos efectos en neuronas en las tres condiciones evaluadas.

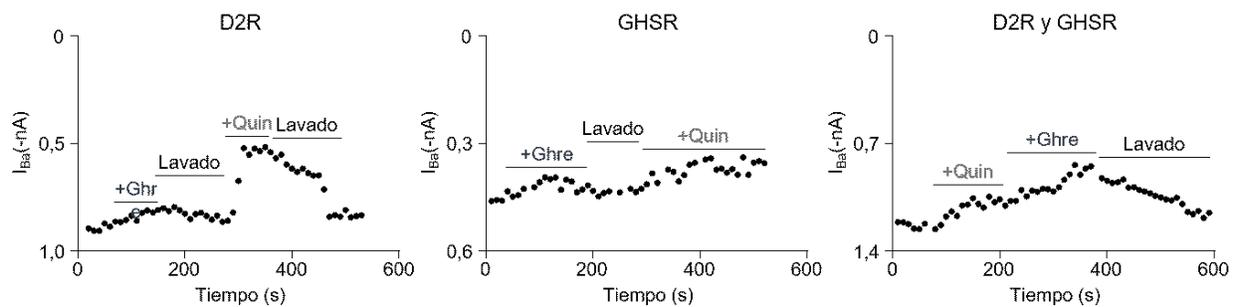


Figura 26. El efecto inhibitorio de ghrelina y quinpirole sobre las corrientes nativas Ca_V es reversible. Cursos temporales de las corrientes de bario (I_{Ba}) de neuronas hipotalámicas transducidas con D2R (izquierda), GHSR (centro) y ambos receptores (derecha) durante el agregado de ghrelina (+Ghre) y quinpirole (+Quin) y el lavado de estos efectos.

Además de evaluar los efectos inhibitorios sobre las corrientes Ca_V nativas de neuronas hipotalámicas por la activación de ambos receptores, exploramos si la sobreexpresión de los GPCRs modifica las corrientes basales Ca_V . Para esto medimos estas corrientes en neuronas sin transducir (Control), transducidas con D2R (+D2R), con GHSR (+GHSR) y con ambos receptores (+D2R +GHSR) (**figura 27**). Aquí esperábamos que la sobreexpresión de GHSR redujera las corrientes Ca_V respecto de las corrientes Control, como fue observado en (Lopez Soto *et al.*, 2015), y que la coexpresión de ambos receptores disminuyera aún más la corriente como correlato de nuestros experimentos en células HEK293T. Sin embargo en este experimento no encontramos diferencias significativas entre los grupos.

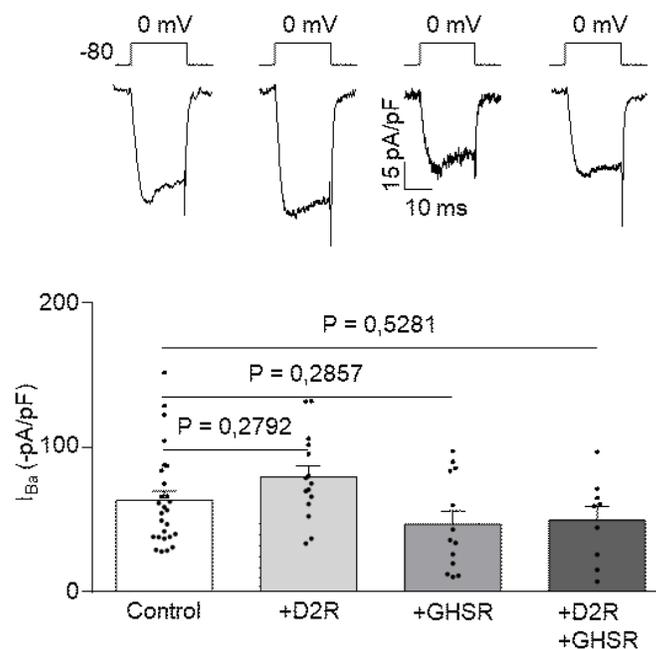


Figura 27. Las corrientes basales Ca_V no se modifican por la sobreexpresión de D2R y GHSR. Trazos representativos (arriba) de las corrientes Ca_V (I_{Ba}) de neuronas hipotalámicas sin transducir (Control), transducidas con D2R (+D2R), con GHSR (+GHSR) o con ambos receptores (+D2R +GHSR). Las barras representan la media y el EEM de las I_{Ba} en cada condición (abajo). La significancia estadística fue evaluada por ANOVA de una vía y post test de Dunnett (versus Control).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Interacción entre D1R y GHSR

En la primera parte de mi trabajo de tesis estudiamos el impacto de la coexpresión de D1R y GHSR en el efecto de ambos GPCRs sobre los $Ca_v2.2$. Usando microscopia de fluorescencia en células HEK293T cotransfectadas con ambos receptores fusionados a proteínas fluorescentes determinamos la colocalización de estos receptores mediante el cálculo del coeficiente de Pearson y de Mander para las células que coexpresaban ambos receptores (**figura 1**). Esta técnica no es suficiente para determinar la interacción física entre ambos receptores, pero nos informa que ambos receptores se encuentran en las mismas estructuras intracelulares o se ubican en los mismos dominios de la membrana plasmática (Dunn *et al.*, 2011). Por lo tanto esta técnica no confirma que ambos receptores se encuentren heterodimerizando pero sugiere la asociación entre ambos GPCRs en la membrana plasmática de nuestro sistema experimental. Técnicas de FRET serían más apropiadas para ensayar la formación de heterómeros, para lo cual deberíamos reemplazar la proteína fluorescente de fusión de GHSR por mCherry que es un fluoróforo más apropiado que mOrange para la transferencia de energía desde el donador YFP. La asociación entre ambos receptores en células HEK293 fue demostrada en varios trabajos previos mediante otras técnicas como cointernalización (Schellekens *et al.*, 2013) y coimmunoprecipitación (Jiang *et al.*, 2006). Estas técnicas poseen desventajas que podrían producir lecturas erróneas de los resultados cuando se las compara con técnicas de FRET o BRET en las cuales la transferencia de energía entre dos moléculas solo se produce por la interacción a nivel molecular. La interacción de ambos receptores fue observada por BRET en células HEK293 en (Jiang *et al.*, 2006) y luego en el año 2015 se observó la heterodimerización en rebanadas de hipocampo mediante la detección de FRET entre ghrelina biotilnada y un agonista de D1R fusionado a una proteína roja fluorescente (Kern *et al.*, 2015). Dados estos antecedentes y nuestro resultado positivo para parámetros que cuantifican la colocalización de proteínas podemos asumir que en nuestro sistema experimental D1R y GHSR están interaccionando.

Al ensayar los efectos de la coexpresión de D1R y GHSR observamos que la actividad evocada por agonista de ambos receptores sobre las corrientes $Ca_v2.2$ no se afectó por la coexpresión del otro GPCR (**figuras 2 y 3**). En contraste las corrientes basales $Ca_v2.2$ se vieron fuertemente afectadas por la coexpresión de ambos receptores observándose una disminución significativa de los niveles de corriente cuando las comparamos con células que solo expresaban

Ca_v2.2 (**figura 4**). Los niveles de corriente basal para Ca_v2.2 en células que solo expresaban GHSR o D1R en una relación molar GPCR:Ca_v2.2 = 0,1 no sufrieron cambios significativos respecto de la condición que solo expresaba Ca_v2.2 (aunque en el caso de D1R hay una tendencia a corrientes mayores como mencionamos antes). Nuestros estudios previos demostraron que la actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes Ca_v2.2 en forma crónica y dependiente de la cantidad de receptor expresado, siendo efectiva a partir de una relación molar GHSR:Ca_v2.2 = 0,5 (Lopez Soto *et al.*, 2015). Aquí quisimos indagar si la actividad constitutiva de GHSR participa del mecanismo que reduce la corriente Ca_v2.2 basal por la coexpresión de bajos niveles de D1R y GHSR. Para esto utilizamos el agonista inverso de GHSR, SPA, y observamos que se recupera la corriente Ca_v2.2 a niveles control. Además reemplazamos GHSR por una versión mutante puntual que carece de actividad constitutiva (A204E) y observamos que la corriente basal tampoco se afecta por la coexpresión de D1R (**figura 5**). Al indagar que proteínas G intervenían en el efecto basal de la coexpresión de D2R y GHSR encontramos que solo Gi/o participa del efecto.

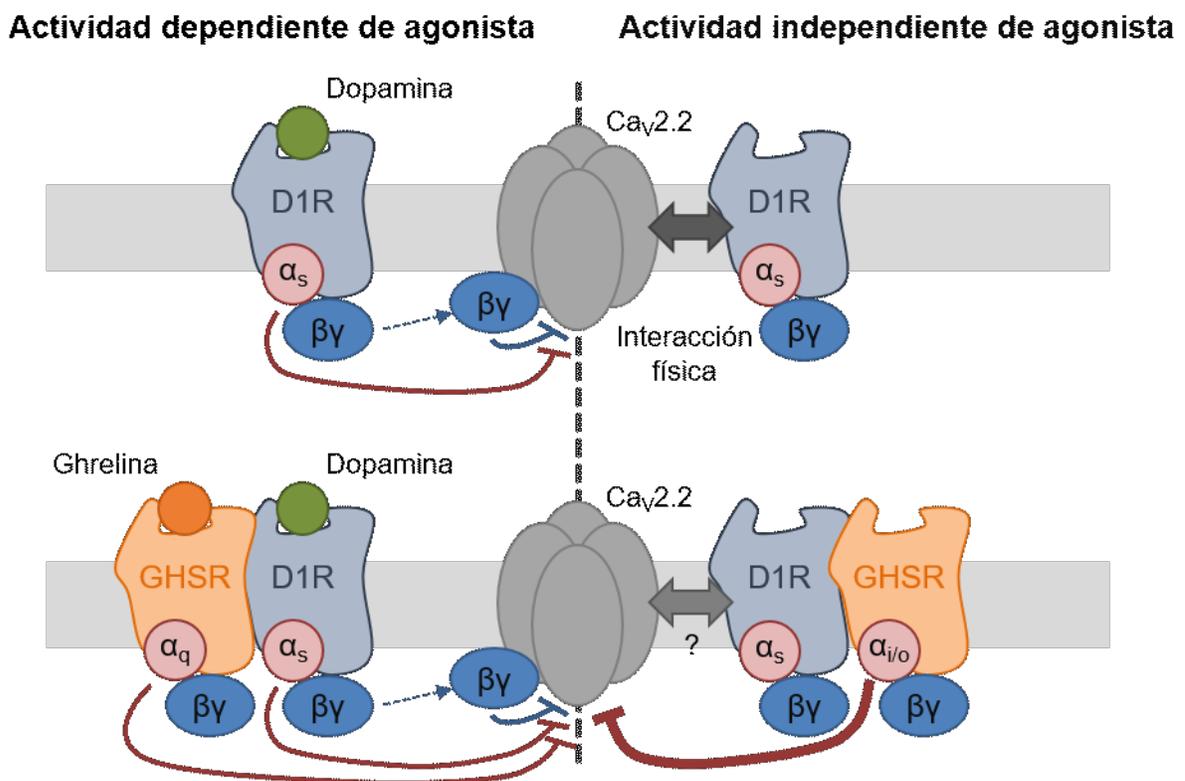
Un posible modelo para explicar estos resultados es plantear que la coexpresión de D1R y GHSR exagera la actividad constitutiva de GHSR a través de Gi/o que, como mencionamos antes, reduce crónicamente las corrientes Ca_v2.2 (Lopez Soto *et al.*, 2015). En el **esquema 4** presentamos un gráfico resumiendo este modelo. Entre los posibles mecanismos que vincularían la interacción entre D1R y GHSR con una mayor actividad constitutiva de este último podemos pensar que la heterodimerización de D1R con GHSR aumente la expresión de GHSR en la membrana. Este mecanismo sería válido si consideramos que GHSR necesita estar en la membrana plasmática para poder señalizar a través de proteínas G, algo que aún no se ha establecido para los GPCRs constitutivamente activos. En este sentido Kisilevsky *et al.* demostraron que la interacción física de D1R y el Ca_v2.2 produce un aumento de la expresión en membrana del canal (Kisilevsky *et al.*, 2008) aunque los niveles de D1R en la membrana plasmática no son evaluados en este trabajo. Una posibilidad es que el GHSR desplace al Ca_v2.2 y al interaccionar con D1R se transloque en mayor cantidad a la membrana. Las observaciones donde el mutante A204E, SPA y PTx ocluyen la disminución de las corrientes Ca_v2.2 serían validas en este modelo ya que la actividad constitutiva de GHSR cursaría por la misma vía de señalización y solo se encontraría aumentado su nivel debido a una mayor inserción de GHSR en la membrana plasmática. A continuación planteo algunos experimentos que me permitirían corroborar esta hipótesis:

- investigar la densidad de receptores en la membrana celular mediante *Western Blots* o técnicas de imágenes de fluorescencia confocal. Estudiar si varía la densidad de GHSR por la coexpresión de D1R.

- investigar si la disminución de corriente es debido a cambios en la densidad de $Ca_v2.2$ mediante *Western Blots* o corrientes de *gating* (corriente originada por el movimiento del sensor de voltaje).

- investigar si la coexpresión de GHSR desplaza la interacción D1R- $Ca_v2.2$ mediante coimmunoprecipitación o FRET, observando los cambios en las interacciones entre D1R y $Ca_v2.2$ por la presencia de GHSR.

En caso de que la densidad de GHSR no estuviera aumentada en la membrana plasmática otra posible explicación para nuestra observación sería que la interacción con D1R genere cambios conformacionales en GHSR estabilizando su estado basalmente activo.



Esquema 4. Modelo propuesto para el efecto de la heterodimerización de D1R y GHSR sobre los canales $Ca_v2.2$. La heterodimerización de D1R y GHSR no altera la actividad dependiente de agonista de cada GPCR sobre el $Ca_v2.2$ (izquierda). La presencia de D1R exagera el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los $Ca_v2.2$ (derecha).

Los trabajos publicados sobre la heterodimerización de D1R y GHSR abordan el impacto de esta interacción sobre la actividad evocada por agonista de ambos receptores (Jiang *et al.*, 2006; Schellekens *et al.*, 2013; Kern *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2016). Los principales blancos de estudio son el efecto canónico de GHSR sobre la movilización de calcio intracelular o la modificación de AMPc por la activación de D1R (Jiang *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2016). Por otro lado en la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ dependiente de agonista participan Gq para GHSR y Gs para D1R. La inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por GHSR mediante Gq creemos que dependería de segundos mensajeros y es independiente del voltaje (Lopez Soto *et al.*, 2015) mientras que la inhibición de $Ca_v2.2$ por la activación de D1R por agonistas tiene una componente dependiente y otra independiente de voltaje, algo no común para Gs (Kisilevsky *et al.*, 2008). Entre los efectos informados para el heterodímero D1R-GHSR están la exacerbación del aumento de AMPc dependiente de agonista de D1R por la coactivación de GHSR por ghrelina (Jiang *et al.*, 2006) y el menor aumento de calcio intracelular producido por ghrelina en presencia de D1R (Schellekens *et al.*, 2013). Por otro lado también se reportaron nuevas vías de señalización en presencia de los heterómeros como la movilización de calcio intracelular por la activación de D1R acoplado ahora a Gq (Kern *et al.*, 2015) y el aumento de AMPc por ghrelina dependiente de Gs (Navarro *et al.*, 2016). En nuestro estudio no observamos modificaciones del nivel de inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad evocada de D1R ni de GHSR. A pesar de no haber encontrado cambios en los niveles de inhibición de la corriente por ghrelina o dopamina, sería importante evaluar si las vías utilizadas por los GPCRs cuando están coexpresados son las mismas. Por otro lado, también sería interesante combinar el uso de los agonistas para evaluar posibles cambios en las vías de señalización activadas cuando ambos receptores son coexpresados y el efecto final sobre las corrientes. El acople de D1R a Gq que se informó cuando se coexpresan D1R con GHSR también se propone para los heterómeros de este GPCR con otros, como por ejemplo el D2R. De este modo, sería interesante ensayar la participación de Gq en la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina en presencia de los heterodímeros D1R-GHSR.

Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis muestran la importancia de estudiar la actividad constitutiva de los GPCRs. Numerosos trabajos con una impronta bioquímica han caracterizado la actividad constitutiva de D1R a través de la proteína Gs (Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo esta actividad ha sido escasamente considerada en los estudios que investigan el impacto celular o fisiológico de la heterodimerización de D1R con GHSR (Jiang *et al.*, 2006; Schellekens *et al.*, 2013; Kern *et al.*, 2015) y en el estudio de la interacción entre D1R y $Ca_v2.2$ (Kisilevsky *et al.*, 2008). Este último trabajo muestra que la coexpresión de D1R y $Ca_v2.2$

aumenta la cantidad de proteína $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática, algo que podría estar relacionado con la tendencia de D1R a aumentar los niveles de corrientes basales en nuestros experimentos de las **figuras 4 y 5**. Para otros GPCRs relevantes se han encontrado agonistas inversos endógenos capaces de modular su actividad, como son la proteína relacionada con Agouti (AGRP, agonista inverso del receptor de melanocortinas) o el péptido antimicrobiano expresado en hígado 2 (LEAP2, agonista inverso del receptor de ghrelina) (Adan, 2006; M'Kadmi *et al.*, 2019). En el caso de D1R sabemos por la bibliografía que algunas drogas sintéticas que se utilizan como antipsicóticos funcionan como agonistas inversos (Martin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2014). Estas drogas podrían usarse como punto de partida para identificar sustancias endógenas putativas que funcionaran reduciendo la actividad basal de D1R. En el caso de nuestros resultados creemos que la exacerbación de la actividad constitutiva de GHSR sería independiente de la actividad constitutiva de D1R ya que ni el bloqueo de la actividad de Gs ni Gq, las dos proteínas G que podrían asociarse a D1R revierten el efecto producido por la heterodimerización de los GPCRs sobre las corrientes basales $Ca_v2.2$ (**figura 6**). Además, la inhibición de la proteína Gi/o por PTx fue suficiente para ocluir totalmente la disminución de las corrientes $Ca_v2.2$. Esta proteína G es la que hemos descrito anteriormente como responsable de la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de GHSR a concentraciones molares del receptor más altas (Lopez Soto *et al.*, 2015). Una observación interesante de nuestros resultados es que cada vez que el efecto de la heterodimerización fue ocluido, ya sea por el reemplazo de GHSR por A204E o la preincubación con PTX o SPA, las corrientes no volvieron al nivel que muestran con D1R solo (**figuras 4 y 5**). Esta pérdida de la tendencia de D1R a aumentar las corrientes basales podría explicarse por la pérdida de la interacción D1R- $Ca_v2.2$ en presencia de GHSR (con su actividad constitutiva bloqueada por PTX o SPA) o A204E.

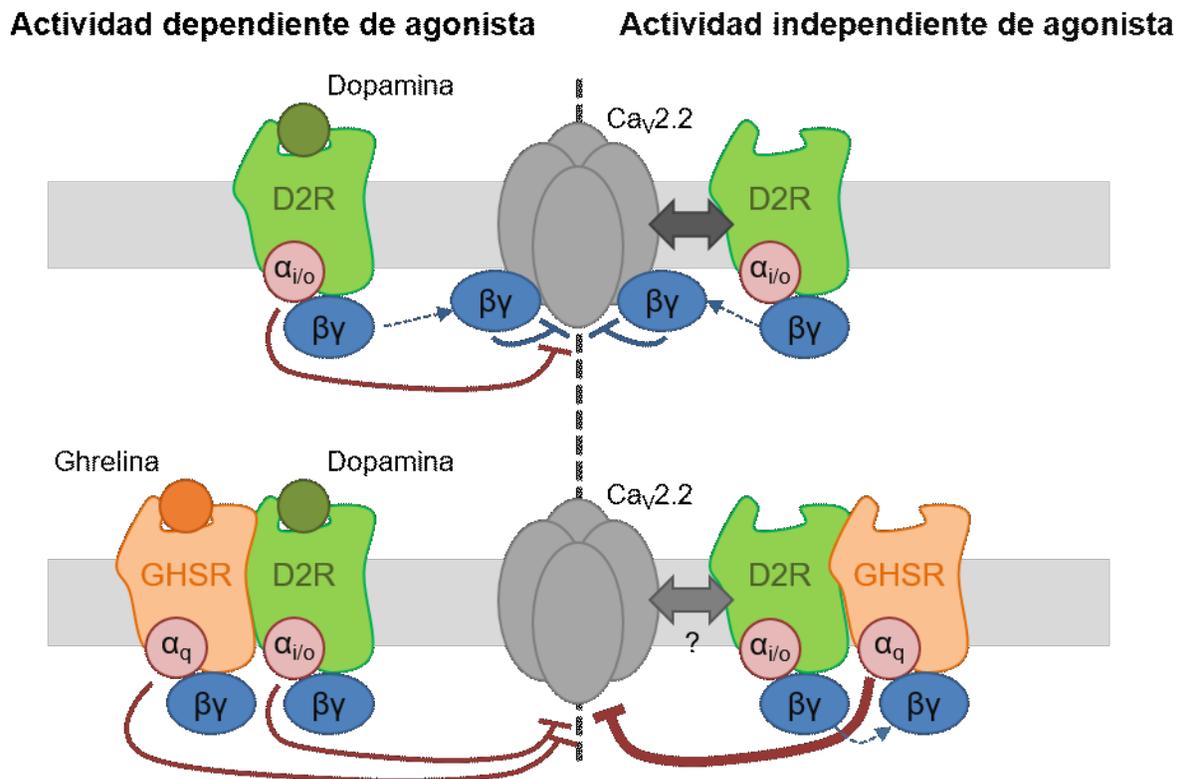
D1R y GHSR se coexpresan en neuronas granulares del giro dentado (principalmente glutamatérgicas) e interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Zigman *et al.*, 2006; Gangarossa *et al.*, 2012; Mani *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2015; Martinez Damonte *et al.*, 2018). Las neuronas del giro dentado participan de la plasticidad sináptica implicada en la formación de la memoria hipocampal (Hainmueller & Bartos, 2020; Takehara-Nishiuchi, 2020). En un trabajo previo de nuestro laboratorio demostramos que la actividad constitutiva de GHSR inhibe las corrientes $Ca_v2.2$ del hipocampo y las corrientes postsinápticas dependientes de calcio inhibitorias (IPSC, del inglés *inhibitory postsynaptic currents*) pero no excitatorias (EPSC, del inglés *excitatory postsynaptic currents*) (Martinez Damonte *et al.*, 2018). Creemos que esto se debe a que la liberación de GABA se encuentra mejor acoplada a las corrientes $Ca_v2.2$ que a las $Ca_v2.1$ y a que estas son más sensibles a mecanismos de modulación por GPCRs, en especial a la actividad

constitutiva de GHSR. En este contexto, podemos proponer que la heterodimerización de D1R y GHSR controla la liberación de neurotransmisores en este tipo neuronal, ya que la formación del heterómero produciría una disminución más severa de las corrientes $Ca_v2.2$. En Martínez Damonte *et al.* mostramos que la inhibición de las IPSC en cultivos neuronales de hipocampo aumenta con la maduración del cultivo neuronal primario o la infección lentiviral de los mismos con el propósito de aumentar la cantidad de GHSR que se exprese. De esta forma, cambios en la expresión de GHSR, como sucede en el hipotálamo causado por un desbalance energético (Kim *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2018), o por la modulación de la actividad constitutiva del GHSR mediante el agonista inverso endógeno LEAP2 (M'Kadmi *et al.*, 2019) serían mecanismos regulatorios de la actividad sináptica del hipocampo. La formación de heterómeros puede alterar cualquiera de las vías de señalización de los GPCR implicados, por lo que el efecto sobre procesos complejos como la neurotransmisión es difícil de predecir. Así, sería interesante estudiar si la liberación de GABA y glutamato se modifican por la formación de heterodímeros D1R-GHSR y cual es el rol de $Ca_v2.2$, de otros subtipos de Ca_v e inclusive de otras proteínas sinápticas en este mecanismo.

Interacción entre D2R y GHSR

Los resultados de esta tesis indican que D2R y GHSR interactúan físicamente en nuestras condiciones experimentales (**figuras 7 y 8**). Esta interacción no modifica la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad evocada por agonista de GHSR (**figura 9**), mientras que la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ producida por la activación de D2R por su agonista es menor en presencia de GHSR (**figura 10**). Esta disminución es provocada específicamente por GHSR, depende de su actividad constitutiva y se revierte inhibiendo Gq (**figuras 10,12 y 13**). En este mecanismo encontramos que la causa de la menor inhibición por dopamina de las corrientes $Ca_v2.2$ reside en la pérdida de la vía dependiente de $G\beta\gamma$ en presencia de D2R-GHSR (**figuras 11 y 14**). Por otro lado, la coexpresión de D2R y GHSR disminuye las corrientes basales $Ca_v2.2$ de forma dependiente de la actividad constitutiva de GHSR e involucrando a Gq y $G\beta\gamma$ (**figuras 15 a 20**). Finalmente pudimos replicar en neuronas nuestro resultado respecto de la reducción de la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad evocada por agonista de D2R por la coexpresión de GHSR. Así, observamos un menor efecto inhibitorio de un agonista específico para D2R sobre las corrientes de calcio nativas de neuronas hipotalámicas en cultivo sobreexpresando ambos GPCRs (**figura 24**), mientras que las corrientes basales nativas no

sufrieron cambios significativos (**figura 27**). Un resumen grafico de nuestros resultados se muestra a continuación (**Esquema 5**).



Esquema 5. Modelo propuesto para el efecto de la heterodimerización de D2R y GHSR sobre los canales $Ca_v2.2$. La heterodimerización de D2R y GHSR reduce el efecto de la actividad dependiente de agonista de D2R sobre $Ca_v2.2$ en presencia de GHSR por pérdida de la actividad $G\beta\gamma$ mientras que la actividad dependiente de agonista de GHSR sobre el $Ca_v2.2$ no se altera por la presencia de D2R (izquierda). Por otro lado la heterodimerización ocluye la inhibición tónica de las corrientes $Ca_v2.2$ por $G\beta\gamma$ producida por la actividad independiente de agonista de D2R y aumenta el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los $Ca_v2.2$ posiblemente exacerbando la activación basal de Gq (derecha).

La inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad dependiente de ghrelina de GHSR no se modificó en presencia de D2R y sus valores fueron similares a los reportados en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Lopez Soto *et al.*, 2015). En los experimentos realizados en neuronas transducidas con partículas lentivirales para sobreexpresar los GPCRs observamos que el efecto de ghrelina sobre las corrientes de calcio nativas parece tener una tendencia (sin

ser significativo) a ser menor en neuronas sobreexpresando D2R y GHSR que en aquellas que solo sobreexpresan GHSR (**figura 24**). A partir de esta observación sería importante aumentar el tamaño muestral para decidir si el efecto es menor y también sería interesante realizar en el sistema heterólogo de expresión y en las neuronas curvas dosis-respuesta a ghrelina y calcular las EC_{50} en presencia o ausencia de D2R para determinar si la tendencia observada se debe a cambios en la afinidad de GHSR por su ligando en los distintos sistemas experimentales. En estudios previos demostramos que $Ca_v2.2$ no es el único subtipo de Ca_v sensible a ghrelina (Lopez Soto *et al.*, 2015; Mustafa *et al.*, 2017; Mustafa *et al.*, 2019) entonces otra posible explicación para la tendencia observada en neuronas (**figura 24**) es que el efecto de ghrelina sobre los distintos subtipos de Ca_v varíe en presencia de D2R contribuyendo a la heterogeneidad del efecto. En los trabajos que estudian el impacto funcional de la formación de heterodímeros D2R-GHSR no se informan alteraciones en la actividad dependiente de agonista de GHSR en concordancia con los resultados que obtuvimos en esta tesis cuando ensayamos el $Ca_v2.2$ en forma aislada (Kern *et al.*, 2012; Damian *et al.*, 2018).

Por otro lado, el efecto inhibitorio de la actividad dependiente de agonista de D2R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ disminuyó en presencia de GHSR (**figura 10**). Kisilevsky *et al.* demostraron que la inhibición del canal $Ca_v2.2$ por la activación por agonista de D2R depende de G_i/o y de $G\beta\gamma$ (Kisilevsky & Zamponi, 2008). En base a nuestros resultados proponemos que la disminución de la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina se debe a la pérdida de la participación de $G\beta\gamma$ en la inhibición del canal para lo cual se requiere que GHSR este activo constitutivamente. Kern *et al.* mostraron que cuando D2R y GHSR heterodimerizan la actividad dependiente de agonista de D2R aumenta la concentración de calcio intracelular (Kern *et al.*, 2012). En este trabajo evalúan el mecanismo de esta vía anómala de D2R en presencia de GHSR utilizando un siRNA para silenciar a la proteína Gq y esta maniobra no evita el aumento de calcio por dopamina en presencia de los dos GPCRs por lo que concluyen que este efecto no depende de Gq. Sin embargo existen contradicciones en este reporte. Por un lado si bien los autores realizan controles (midiendo el segundo mensajero IP1) para verificar que la actividad basal de GHSR mediante Gq es abolida por el siRNA no realizan este experimento control en células expresando ambos receptores. Por otro lado, ghrelina sigue liberando una cantidad apreciable de calcio de retículo en presencia del siRNA (~60% del control) en células expresando ambos receptores. Nosotros pensamos que quizás el siRNA utilizado redujo parcialmente la concentración de Gq modificando la disponibilidad de esta proteína en la célula lo cual podría reducir la actividad constitutiva de GHSR. Sin embargo, al exponer los heterodímeros a dopamina o ghrelina, la proteína Gq remanente sería suficiente para señalizar y aumentar el calcio

intracelular. Quizás también otra proteína de la familia de Gq pueda tomar el lugar de la proteína Gq silenciada (Krumins & Gilman, 2006). En base a los trabajos que citamos a continuación y a nuestras propias observaciones nosotros pensamos que la movilización de calcio intracelular por dopamina observada por estos autores cuando D2R forma dímeros con GHSR estaría dada por: la activación de D2R que escinde la Gi/o acoplada aumentando la cantidad del dímero Gβγ libre que, de alguna manera, provoca la exacerbación de la actividad basal de Gq acoplada a GHSR activando río abajo PLC y liberando, finalmente, calcio del retículo (Ross, 1989; Quitterer & Lohse, 1999). En este contexto, Damian *et al.* evaluaron la presencia de FRET y demostraron que cuando D2R y GHSR están coexpresados las proteínas Gi y Gq interaccionan físicamente (Damian *et al.*, 2018). Estos autores observaron que la activación de D2R, pero no la de GHSR, en el heterodímero aumenta el FRET entre Gi y Gq. Por otro lado, SPA al igual que ghrelina tampoco cambia el FRET entre las proteínas G. Anteriormente estos autores habían demostrado que este agonista inverso evita que el complejo GHSR-Gq se forme (Damian *et al.*, 2015). Al igual que en nuestros experimentos, la implicancia de la actividad constitutiva fue estudiada reemplazando GHSR por mutantes puntuales. Uno de los mutantes carece de dicha actividad, F279L, y otros dos mutantes la poseen, M213K y S123A (Kern *et al.*, 2012). Si bien los autores afirman que la actividad constitutiva no afecta el efecto de dopamina sobre la movilización de calcio intracelular en presencia de GHSR los resultados de este trabajo son difíciles de interpretar. Por un lado el grado de FRET entre D2R y los mutantes es variado y por el otro, el mutante sin actividad constitutiva no reduce totalmente, aunque si parcialmente, el aumento de calcio intracelular por dopamina. Nuestros resultados muestran que el reemplazo de GHSR por el mutante puntual sin actividad constitutiva, A204E, revierte la disminución de la inhibición de las corrientes Ca_v2.2 por dopamina (**figura 10**). Si bien nosotros concluimos entonces que la actividad constitutiva de GHSR es requerida para la disminución del efecto de dopamina, no indagamos sobre la capacidad de A204E para heterodimerizar con D2R en nuestras condiciones, experimento que se encuentra pendiente. Por otro lado nuestros experimentos utilizando SPA, como alternativa para abolir la actividad constitutiva, apoyan nuestra conclusión sobre el rol de esta actividad de GHSR en el mecanismo. Sería oportuno sin embargo también ensayar la presencia de FRET entre el D2R y GHSR en presencia de SPA.

En esta tesis realizamos un experimento control para demostrar la especificidad de la interacción entre D2R y GHSR reemplazando GHSR por otro GPCR acoplado a Gq. En este experimento utilizamos el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) (**figura 13**) y encontramos que coexpresar este GqPCR con D2R no cambia la acción de dopamina sobre Ca_v2.2 indicando la especificidad de GHSR en el proceso. Indagando en la bibliografía notamos que esta

conclusión es aún más fuerte ya que AT1R no solo se acopla a Gq sino que además posee cierto grado de actividad constitutiva (Petrel & Clauser, 2009) y tiene la capacidad de heterodimerizar con D2R (Martinez-Pinilla *et al.*, 2015). La formación de estos heterodímeros no altera la producción de AMPc por dopamina mientras que sí impacta en las vías canónicas intracelulares activadas por angiotensina II (algo que no alcanzamos a probar en nuestro sistema experimental). En conjunto estos resultados indican que al formar oligómeros los GPCRs y las proteínas G asociadas adquieren características particulares con consecuencias variables y difíciles de predecir a nivel celular.

La heterodimerización de D2R y GHSR no solo reduce el efecto de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ sino que además modifica su vía de señalización dramáticamente. Esto se puede observar claramente en los experimentos donde inhibimos la actividad de $G\beta\gamma$ mediante un péptido buffer que lo secuestra, MAS-GRK2-ct (Kammermeier & Ikeda, 1999; Raingo *et al.*, 2007). MAS-GRK2-ct reduce en más de un 70% la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por dopamina en células que solo expresan $Ca_v2.2$ y D2R, como se espera para un GPCR acoplado a G_i/o . Por otro lado la pequeña inhibición que produce dopamina en presencia de D2R y GHSR es insensible a esta maniobra (**figura 14**). Otro dato que apoya esta idea es que en la curva dosis-respuesta a dopamina (**figura 11**) la coexpresión de D2R y GHSR modifica el máximo de inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ sin un efecto claro sobre la EC_{50} . Sin embargo debo aclarar que la dispersión en los datos de la zona de las concentraciones intermedias es alta, por lo que no podemos descartar una posible diferencia en la EC_{50} al aumentar el tamaño muestral. Si solo cambiara el máximo de inhibición por dopamina en presencia de D2R y GHSR, entonces dopamina se comportaría como agonista parcial de D2R para el efecto particular de inhibir las corrientes de calcio (Wacker *et al.*, 2017). Esto nos indicaría que la formación de los dímeros modifica las vías intracelulares activadas y no la capacidad de dopamina de unirse al receptor. Por otro lado sobre la imposibilidad de $G\beta\gamma$ de inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ en presencia de D2R y GHSR proponemos dos alternativas: 1- como mencionamos antes la proteína Gq activada constitutivamente por GHSR podría secuestrar $G\beta\gamma$ reduciendo su actividad sobre $Ca_v2.2$ y 2- la formación de los dímeros D2R y GHSR podría competir con la interacción física de $Ca_v2.2$ con D2R descrita anteriormente (Kisilevsky & Zamponi, 2008), reduciendo tal vez el contacto $Ca_v2.2$ - $G\beta\gamma$. Experimentos de FRET o coimmunoprecipitación entre D2R y $Ca_v2.2$ serían útiles para investigar si GHSR interfiere con esta interacción.

Un resultado que obtuvimos al ensayar D2R en forma aislada de GHSR y que creo que vale la pena discutir es el obtenido en la **figura 22**. En esta figura observamos que la sola coexpresión de D2R inhibe tónicamente las corrientes $Ca_v2.2$ en forma dependiente de $G\beta\gamma$ y, por ende, del

voltaje. Basados en el reporte de Kisilevsky *et al.* mostrando que D2R aumenta el tráfico de $Ca_v2.2$ hacia la membrana plasmática nosotros esperábamos que las corrientes basales $Ca_v2.2$ fueran mayores en presencia de D2R (Kisilevsky & Zamponi, 2008). Sin embargo, no observamos cambios significativos de las corrientes basales por la coexpresión de $Ca_v2.2$ y D2R (**figura 16**). Por otro lado al indagar sobre la actividad constitutiva de D2R encontramos un trabajo de revisión que cuestiona la posibilidad de que D2R posea actividad constitutiva (Zhang *et al.*, 2014). Nuestros resultados muestran que la aplicación de un prepulso libera inhibición tónica cuando $Ca_v2.2$ está coexpresado con D2R pero no cuando está solo, apoyando la idea de que D2R activa constitutivamente $G\beta\gamma$. Sin embargo al comparar la corriente basal de $Ca_v2.2$ en presencia de D2R coexpresando o no MAS-GRK2-ct no observamos diferencias significativas (**figura 20**). Una posible explicación a esta observación es que la interacción entre D2R y $Ca_v2.2$ y el consecuente aumento del tráfico del canal también dependan de la actividad constitutiva de D2R y al inhibir los dos efectos (la inhibición tónica y el aumento del tráfico) en forma crónica por la expresión del buffer de $G\beta\gamma$ no observemos diferencias.

En cuanto a que sucede con la actividad constitutiva de D2R cuando este dimeriza con GHSR teníamos como antecedente el trabajo de (Evans *et al.*, 2010). En este reporte la heterodimerización del receptor de nociceptina, ORL-1, y los de opioides reduce la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ por nociceptina. La causa de esta reducción es que los canales están inhibidos en forma tónica por $G\beta\gamma$ cuando se forman los dímeros. En base a esto nosotros esperábamos encontrar que la reducción de la inhibición dependiente de dopamina sobre el $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D2R y GHSR se correspondiera con una mayor inhibición tónica de las corrientes. Para nuestra sorpresa, encontramos que la inhibición tónica de las corrientes $Ca_v2.2$ mediada por $G\beta\gamma$ en presencia de D2R desaparecía cuando se coexpresaban D2R y GHSR. En conjunto nuestros resultados nos permiten postular que la actividad constitutiva de D2R existe y tiene dos posibles efectos sobre el $Ca_v2.2$: aumentar la densidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática como fue observado por (Kisilevsky & Zamponi, 2008), e inhibir tónicamente las corrientes (**figura 22**). Esto podría ser confirmado con experimentos para evaluar la cantidad de canal $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática y compararla con el nivel de corriente iónica en presencia o no de MAS-GRK2-ct o un inhibidor de la proteína Gi/o (toxina pertussis). Por otro lado el efecto de un inhibidor rápido de Gi/o como N-etilmaleimida (NEM) (Shapiro *et al.*, 1994) o de $G\beta\gamma$ como el compuesto M119 (Bonacci *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2008) nos permitirían evaluar el aumento de la corriente en tiempo real ya que afectaría la inhibición tónica pero no modificaría el número de canales en la membrana, en forma análoga al efecto del prepulso despolarizante. Por último, en la **figura 16**, observamos que al aumentar la relación

molar de D2R:Ca_v2.2 de 0,1 a 0,5 los niveles de corriente tienden a disminuir. Esto podría deberse a que un aumento de la cantidad de GPCR correlacione con un aumento en la actividad constitutiva y nos indicaría que la inhibición tónica de las corrientes Ca_v2.2 en este caso superaría el efecto de aumento del tráfico de canal a la membrana plasmática. Este “desbalance” a altos niveles de expresión de D2R produciría mayor inhibición de las corrientes dependiente de Gβγ explicando la tendencia observada.

Tanto la coexpresión de D2R y GHSR como de D1R y GHSR disminuyen las corrientes basales Ca_v2.2 (**figura 16 y 4**). En ambos casos la preincubación con SPA y el reemplazo de GHSR por A204E ocluyen la reducción de la corriente (**figura 17, 4 y 5**). Una diferencia entre los efectos de D1R-GHSR y D2R-GHSR es que la disminución de la corriente basal por D1R-GHSR parece ser mayor. Para la disminución de la corriente por D1R-GHSR la relación molar GPCR:Ca_v2.2 = 0,1 fue suficiente para obtener niveles de corrientes casi nulos, mientras que este efecto al coexpresar D2R y GHSR se alcanza recién a una relación molar de 0,5. Otra diferencia importante se encuentra en las vías de señalización. Por un lado el efecto producido por D2R-GHSR requiere de la activación constitutiva de la proteína Gq para la reducción de las corrientes basales Ca_v2.2 (**figura 18**) mientras que la disminución de estas corrientes por la coexpresión de D1R y GHSR depende de la actividad constitutiva de GHSR acoplada a la proteína Gi/o (**figura 6**). En el trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que la actividad constitutiva de GHSR inhibe el tráfico de Ca_v2.2 hacia la membrana cuando el receptor se encuentra a altas relaciones molares respecto del canal por una vía que involucra a Gi/o, mientras que la activación aguda de GHSR por ghrelina inhibe las corrientes a través de Gq (Lopez Soto *et al.*, 2015). La coexpresión de D1R y GHSR exacerbaría la vía natural de la actividad constitutiva de GHSR sobre Ca_v2.2 mientras que la de D2R y GHSR activarían una nueva vía que también modula negativamente las corrientes Ca_v2.2 de forma crónica. En el caso de D2R y GHSR evaluamos el rol de Gβγ en la acción basal de ambos GPCRs sobre Ca_v2.2. Encontramos que inhibir Gβγ ocluye la disminución de la corriente (**figura 20**) y nuestra propuesta es que los dímeros Gβγ liberados de Gi/o por la actividad constitutiva de D2R son transferidos a GHSR, exacerbando la activación basal de la proteína Gq acoplada a este GPCR que entonces es capaz de inhibir la corriente basal de Ca_v2.2 por un mecanismo que aún no conocemos.

Por último estudiamos el efecto dependiente e independiente de agonista sobre corrientes Ca_v nativas de neuronas hipotálamicas transducidas con D2R, GHSR o ambos receptores. Al igual que en células HEK293T, observamos una disminución de la inhibición de las corrientes por un agonista de D2R en la condición sobreexpresando ambos receptores (**figura 24**). Por otro

lado, la inhibición de las corrientes ghrelina tuvo una tendencia a disminuir en esta condición (diferencia estadísticamente no significativa, **figura 24**). Además los niveles de corriente basal de las neuronas no se afectaron por la sobreexpresión de D2R ni GHSR (**figura 27**). Estos resultados que discrepan con lo obtenido en los experimentos de expresión heteróloga en HEK293T abren la incógnita sobre si las actividades dependiente e independiente de agonista de los GPCRs coexpresados sobre los $Ca_v2.2$ pueden extrapolarse a los otros subtipos de Ca_v . Sería interesante repetir este experimento y evaluar la proporción de corriente Ca_v nativa sensible a toxinas específicas para los distintos subtipos de Ca_v .

En resumen, demostramos que la coexpresión de D2R y GHSR impacta sobre las corrientes recombinantes $Ca_v2.2$ y las corrientes Ca_v nativas de manera diferente a lo esperado para cada GPCR por separado. Nuestros resultados sugieren que el efecto de dopamina sobre los canales presinápticos puede ser modulado por la presencia del GHSR en la terminal presináptica. Dado que D2R se localiza en las terminales dopaminérgicas (Beaulieu & Gainetdinov, 2011), este efecto podría reducir el *feedback* negativo de dopamina y por ende, incidir sobre su liberación. Además, ya que D2R y GHSR se expresan en otros tipos neuronales, como GABAérgicas (Wang *et al.*, 2014; Lopez Soto *et al.*, 2015) y colinérgicas (Momiyama & Koga, 2001), este mecanismo podría modificar también el efecto de dopamina sobre la liberación de otros neurotransmisores. Este mecanismo podría incidir en el efecto anorexigénico de dopamina originado en las neuronas hipotalámicas de ratón, donde la coexpresión de ambos GPCRs es necesaria para que se produzca la liberación de calcio desde depósitos intracelulares y la consecuente activación transcripcional (Kern *et al.*, 2012). La modulación diferencial de los $Ca_v2.2$ por dopamina en estas neuronas podría contribuir modificando la comunicación neuronal en este circuito que controla el apetito.

Una pregunta importante que se genera a partir de nuestro estudio es cómo las neuronas controlan este mecanismo regulatorio de las corrientes $Ca_v2.2$. Una posibilidad es que esta regulación sea moderada por cambios en los niveles de formación de los distintos heterómeros y que esto ocurra a partir de cambios en el nivel de expresión de los GPCRs como se describe en (Fernandez *et al.*, 2018) para GHSR, en (Johnson & Kenny, 2010) para D2R y en (Alsio *et al.*, 2010) para D1R. Por otro lado, la modificación de la actividad constitutiva del GHSR también impactaría sobre este mecanismo. En este contexto, el péptido LEAP2 recientemente reportado adquiere importancia dado que se propone que actúa como un agonista inverso natural del GHSR (M'Kadmi *et al.*, 2019). Por último el posible rol de la actividad constitutiva de D2R y D1R abre la posibilidad de que agonistas inversos de estos GPCRs existan naturalmente y modulen este proceso.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

. El efecto de la actividad dependiente de agonista de D1R y GHSR sobre los $Ca_v2.2$ no se modifica por la coexpresión de ambos receptores.

. La coexpresión de D1R y GHSR reduce la corriente basal $Ca_v2.2$ en forma dependiente de la actividad constitutiva de GHSR y de la proteína Gi/o

. El efecto de la actividad dependiente de ghrelina de GHSR sobre las corrientes $Ca_v2.2$ no se modifica por la presencia de D2R.

. El efecto de la actividad dependiente de dopamina de D2R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ se reduce en presencia de GHSR en forma dependiente de la actividad constitutiva de GHSR y de la proteína Gq. Este efecto se caracteriza por la reducción de la eficacia de dopamina para inhibir las corrientes $Ca_v2.2$ y por la pérdida de la vía canónica de inhibición a través de $G\beta\gamma$.

. La coexpresión de D2R y GHSR reduce la corriente basal $Ca_v2.2$ en forma dependiente de la actividad constitutiva de GHSR, de la proteína Gq y de la subunidad $G\beta\gamma$

. La sola expresión de D2R produce la inhibición tónica de la corriente basal $Ca_v2.2$ mediada por la subunidad $G\beta\gamma$ y dependiente de voltaje y este efecto es ocluido por la coexpresión de GHSR

. La sobreexpresión de D2R y GHSR en neuronas hipotalámicas reduce el efecto inhibitorio de dopamina sobre las corrientes Ca_v nativas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adan, R.A. (2006) Constitutive receptor activity series: endogenous inverse agonists and constitutive receptor activity in the melanocortin system. *Trends in pharmacological sciences*, **27**, 183-186.
- Agosti, F., Lopez Soto, E.J., Cabral, A., Castrogiovanni, D., Schioth, H.B., Perello, M. & Raingo, J. (2014) Melanocortin 4 receptor activation inhibits presynaptic N-type calcium channels in amygdaloid complex neurons. *The European journal of neuroscience*, **40**, 2755-2765.
- Aira, Z., Barrenetxea, T., Buesa, I., Garcia Del Cano, G. & Azkue, J.J. (2016) Dopamine D1-like Receptors Regulate Constitutive, mu-Opioid Receptor-Mediated Repression of Use-Dependent Synaptic Plasticity in Dorsal Horn Neurons: More Harm than Good? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **36**, 5661-5673.
- Alsio, J., Olszewski, P.K., Norback, A.H., Gunnarsson, Z.E., Levine, A.S., Pickering, C. & Schioth, H.B. (2010) Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience*, **171**, 779-787.
- 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.
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M. & Bouvier, M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 3684-3689.
- Arias-Montano, J.A., Floran, B., Floran, L., Aceves, J. & Young, J.M. (2007) Dopamine D(1) receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels. *Synapse*, **61**, 310-319.
- Bean, B.P. (1989a) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol*, **51**, 367-384.
- Bean, B.P. (1989b) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature*, **340**, 153-156.
- Beaulieu, J.M. & Gainetdinov, R.R. (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, **63**, 182-217.
- Beavo, J.A. & Brunton, L.L. (2002) Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 710-718.

- 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.
- Bennett, K.A., Tehan, B., Lebon, G., Tate, C.G., Weir, M., Marshall, F.H. & Langmead, C.J. (2013) Pharmacology and structure of isolated conformations of the adenosine A(2)A receptor define ligand efficacy. *Molecular pharmacology*, **83**, 949-958.
- Berke, J.D. & Hyman, S.E. (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, **25**, 515-532.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.
- Bitar, K.G., Bowers, C.Y. & Coy, D.H. (1991) Effect of substance P/bombesin antagonists on the release of growth hormone by GHRP and GHRH. *Biochemical and biophysical research communications*, **180**, 156-161.
- Bolte, S. & Cordelieres, F.P. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, **224**, 213-232.
- Bonacci, T.M., Mathews, J.L., Yuan, C., Lehmann, D.M., Malik, S., Wu, D., Font, J.L., Bidlack, J.M. & Smrcka, A.V. (2006) Differential targeting of Gbetagamma-subunit signaling with small molecules. *Science*, **312**, 443-446.
- Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A.O., Marcellino, D., Ciruela, F., Agnati, L.F. & Fuxe, K. (2010) Dopamine D2 and 5-hydroxytryptamine 5-HT(2)A receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochemical and biophysical research communications*, **401**, 605-610.
- Borroto-Escuela, D.O., Van Craenenbroeck, K., Romero-Fernandez, W., Guidolin, D., Woods, A.S., Rivera, A., Haegeman, G., Agnati, L.F., Tarakanov, A.O. & Fuxe, K. (2011) Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochemical and biophysical research communications*, **404**, 928-934.
- Bouvier, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 274-286.
- Bowers, C.Y. (1977) Effects of the enkephalins and enkephalin analogs on release of pituitary hormones in vitro. *Proceedings of the Sixth International Conference on Endocrinology*, **287**.
- Bowers, C.Y., Reynolds, G.A., Durham, D., Barrera, C.M., Pezzoli, S.S. & Thorner, M.O. (1990) Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **70**, 975-982.
- Brown, J.H. & Makman, M.H. (1972) Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate formation in intact retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**, 539-543.

- 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. (2011) Voltage-gated calcium channels and disease. *Biofactors*, **37**, 197-205.
- Calin-Jageman, I. & Lee, A. (2008) Ca(v)1 L-type Ca²⁺ channel signaling complexes in neurons. *Journal of neurochemistry*, **105**, 573-583.
- Canti, C. & Dolphin, A.C. (2003) CaVbeta subunit-mediated up-regulation of CaV2.2 currents triggered by D2 dopamine receptor activation. *Neuropharmacology*, **45**, 814-827.
- Cantrell, A.R., Smith, R.D., Goldin, A.L., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1997) Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **17**, 7330-7338.
- Cao, Y.Q. & Tsien, R.W. (2010) Different relationship of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels to channel-interacting slots in controlling neurotransmission at cultured hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 4536-4546.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology*, **16**, 521-555.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K. & Stevens, R.C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **318**, 1258-1265.
- Chin, K.V., Yang, W.L., Ravatn, R., Kita, T., Reitman, E., Vettori, D., Cvijic, M.E., Shin, M. & Iacono, L. (2002) Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **968**, 49-64.
- Chronwall, B.M., Dickerson, D.S., Huerter, B.S., Sibley, D.R. & Millington, W.R. (1994) Regulation of heterogeneity in D2 dopamine receptor gene expression among individual melanotropes in the rat pituitary intermediate lobe. *Molecular and cellular neurosciences*, **5**, 35-45.
- Chung, H. & Park, S. (2016) Ghrelin regulates cell cycle-related gene expression in cultured hippocampal neural stem cells. *J Endocrinol*, **230**, 239-250.
- Clapham, D.E. & Neer, E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **37**, 167-203.
- Cools, A.R. & Van Rossum, J.M. (1976) Excitation-mediating and inhibition-mediating dopamine-receptors: a new concept towards a better understanding of electrophysiological, biochemical, pharmacological, functional and clinical data. *Psychopharmacologia*, **45**, 243-254.
- Cordeaux, Y., Nickolls, S.A., Flood, L.A., Graber, S.G. & Strange, P.G. (2001) Agonist regulation of D(2) dopamine receptor/G protein interaction. Evidence for agonist selection of G protein subtype. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 28667-28675.

- Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J.A. & Herve, D. (2001) Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *Journal of neurochemistry*, **76**, 1585-1588.
- Costa, T. & Cotecchia, S. (2005) Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, **26**, 618-624.
- Costa, T. & Herz, A. (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 7321-7325.
- 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.
- Damian, M., Pons, V., Renault, P., M'Kadmi, C., Delort, B., Hartmann, L., Kaya, A.I., Louet, M., Gagne, D., Ben Haj Salah, K., Denoyelle, S., Ferry, G., Boutin, J.A., Wagner, R., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Marie, J., Floquet, N., Gales, C., Mary, S., Hamm, H.E. & Baneres, J.L. (2018) GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 4501-4506.
- 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 Logu, F. & Geppetti, P. (2019) Ion Channel Pharmacology for Pain Modulation. *Handb Exp Pharmacol*, **260**, 161-186.
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A. & Campbell, K.P. (1997) Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **385**, 446-450.
- Delay, J., Deniker, P. & Harl, J.M. (1952) [Therapeutic method derived from hiberno-therapy in excitation and agitation states]. *Ann Med Psychol (Paris)*, **110**, 267-273.
- Deval, E., Friend, V., Thirant, C., Salinas, M., Jodar, M., Lazdunski, M. & Lingueglia, E. (2006) Regulation of sensory neuron-specific acid-sensing ion channel 3 by the adaptor protein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 1796-1807.
- Di Chiara, G. & Bassareo, V. (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current opinion in pharmacology*, **7**, 69-76.
- 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.

- Dolphin, A.C. (1995) The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Experimental physiology*, **80**, 1-36.
- Dolphin, A.C. (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol*, **19**, 237-244.
- Drinnan, S.L., Hope, B.T., Snutch, T.P. & Vincent, S.R. (1991) G(olf) in the basal ganglia. *Molecular and cellular neurosciences*, **2**, 66-70.
- 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.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M. & McDonald, J.H. (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American journal of physiology. Cell physiology*, **300**, C723-742.
- Dziedzicka-Wasylewska, M., Faron-Gorecka, A., Andrecka, J., Polit, A., Kusmider, M. & Wasylewski, Z. (2006) Fluorescence studies reveal heterodimerization of dopamine D1 and D2 receptors in the plasma membrane. *Biochemistry*, **45**, 8751-8759.
- 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.
- Exton, J.H. (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **36**, 481-509.
- Ferguson, S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, **53**, 1-24.
- Fernandez, G., Cabral, A., Andreoli, M.F., Labarthe, A., M'Kadmi, C., Ramos, J.G., Marie, J., Fehrentz, J.A., Epelbaum, J., Tolle, V. & Perello, M. (2018) Evidence Supporting a Role for Constitutive Ghrelin Receptor Signaling in Fasting-Induced Hyperphagia in Male Mice. *Endocrinology*, **159**, 1021-1034.
- Ferrada, C., Moreno, E., Casado, V., Bongers, G., Cortes, A., Mallol, J., Canela, E.I., Leurs, R., Ferre, S., Lluís, C. & Franco, R. (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *British journal of pharmacology*, **157**, 64-75.
- Florentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P. & Missale, C. (2008) Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Molecular pharmacology*, **74**, 59-69.

- Freund, N., Thompson, B.S., Sonntag, K., Meda, S. & Andersen, S.L. (2016) When the party is over: depressive-like states in rats following termination of cortical D1 receptor overexpression. *Psychopharmacology*, **233**, 1191-1201.
- Friedman, E., Jin, L.Q., Cai, G.P., Hollon, T.R., Drago, J., Sibley, D.R. & Wang, H.Y. (1997) D1-like dopaminergic activation of phosphoinositide hydrolysis is independent of D1A dopamine receptors: evidence from D1A knockout mice. *Molecular pharmacology*, **51**, 6-11.
- 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. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 107-144.
- Gallardo, C.M., Darvas, M., Oviatt, M., Chang, C.H., Michalik, M., Huddy, T.F., Meyer, E.E., Shuster, S.A., Aguayo, A., Hill, E.M., Kiani, K., Ikpeazu, J., Martinez, J.S., Purpura, M., Smit, A.N., Patton, D.F., Mistlberger, R.E., Palmiter, R.D. & Steele, A.D. (2014) Dopamine receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *Elife*, **3**, e03781.
- Gandini, M.A., Souza, I.A., Raval, D., Xu, J., Pan, Y.X. & Zamponi, G.W. (2019) Differential regulation of Cav2.2 channel exon 37 variants by alternatively spliced mu-opioid receptors. *Mol Brain*, **12**, 98.
- Gangarossa, G., Longueville, S., De Bundel, D., Perroy, J., Herve, D., Girault, J.A. & Valjent, E. (2012) Characterization of dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus*, **22**, 2199-2207.
- Gerfen, C.R. & Surmeier, D.J. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*, **34**, 441-466.
- Gingrich, J.A. & Caron, M.G. (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci*, **16**, 299-321.
- Grandy, D.K., Litt, M., Allen, L., Bunzow, J.R., Marchionni, M., Makam, H., Reed, L., Magenis, R.E. & Civelli, O. (1989a) The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *American journal of human genetics*, **45**, 778-785.
- Grandy, D.K., Marchionni, M.A., Makam, H., Stofko, R.E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J.B., Burke-Howie, K.J., Bunzow, J.R., Server, A.C. & et al. (1989b) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 9762-9766.
- Grandy, D.K., Zhou, Q.Y., Allen, L., Litt, R., Magenis, R.E., Civelli, O. & Litt, M. (1990) A human D1 dopamine receptor gene is located on chromosome 5 at q35.1 and identifies an EcoRI RFLP. *American journal of human genetics*, **47**, 828-834.
- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H. & Howard, A.D. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, **48**, 23-29.

- Gurnett, C.A., De Waard, M. & Campbell, K.P. (1996) Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron*, **16**, 431-440.
- Hainmueller, T. & Bartos, M. (2020) Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat Rev Neurosci*.
- Hamilton, T.J., Wheatley, B.M., Sinclair, D.B., Bachmann, M., Larkum, M.E. & Colmers, W.F. (2010) Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 18185-18190.
- Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B.K. (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*, **25**, 4-12.
- Hille, B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends in neurosciences*, **17**, 531-536.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibanez, C.F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S. & Fuxe, K. (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 18091-18097.
- Hofmann, F., Biel, M. & Flockerzi, V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 399-418.
- 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.
- Hopf, F.W., Cascini, M.G., Gordon, A.S., Diamond, I. & Bonci, A. (2003) Cooperative activation of dopamine D1 and D2 receptors increases spike firing of nucleus accumbens neurons via G-protein betagamma subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 5079-5087.
- Horvath, G.L., Langhoff, P. & Latz, E. (2016) Toll-Like Receptor Interactions Measured by Microscopic and Flow Cytometric FRET. *Methods Mol Biol*, **1390**, 41-64.
- Hosey, M.M., Chien, A.J. & Puri, T.S. (1996) Structure and regulation of L-type calcium channels a current assessment of the properties and roles of channel subunits. *Trends Cardiovasc Med*, **6**, 265-273.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberatore, 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.

- Howick, K., Griffin, B.T., Cryan, J.F. & Schellekens, H. (2017) From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. *International journal of molecular sciences*, **18**.
- Ikeda, S.R. & Dunlap, K. (1999) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **33**, 131-151.
- 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-releasing hormone receptor (GHRHR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *Clinical endocrinology*, **74**, 223-233.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Jay, S.D., Ellis, S.B., McCue, A.F., Williams, M.E., Vedvick, T.S., Harpold, M.M. & Campbell, K.P. (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, **248**, 490-492.
- 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.
- Jiang, H., Betancourt, L. & Smith, R.G. (2006) Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Molecular endocrinology*, **20**, 1772-1785.
- Jiang, L., O'Leary, C., Kim, H.A., Parish, C.L., Massalas, J., Waddington, J.L., Ehrlich, M.E., Schutz, G., Gantois, I., Lawrence, A.J. & Drago, J. (2015) Motor and behavioral phenotype in conditional mutants with targeted ablation of cortical D1 dopamine receptor-expressing cells. *Neurobiology of disease*, **76**, 137-158.
- Johnson, P.M. & Kenny, P.J. (2010) Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature neuroscience*, **13**, 635-641.
- Jones, L.P., Patil, P.G., Snutch, T.P. & Yue, D.T. (1997) G-protein modulation of N-type calcium channel gating current in human embryonic kidney cells (HEK 293). *The Journal of physiology*, **498 (Pt 3)**, 601-610.
- Jones, S.W. & Elmslie, K.S. (1997) Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *The Journal of membrane biology*, **155**, 1-10.
- Joost, P. & Methner, A. (2002) Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0063.
- Josselyn, S.A. & Nguyen, P.V. (2005) CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **4**, 481-497.

- Juhasz, J.R., Hasbi, A., Rashid, A.J., So, C.H., George, S.R. & O'Dowd, B.F. (2008) Mu-opioid receptor heterooligomer formation with the dopamine D1 receptor as directly visualized in living cells. *European journal of pharmacology*, **581**, 235-243.
- 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.
- Kebabian, J.W. & Calne, D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277**, 93-96.
- Kebabian, J.W., Petzold, G.L. & Greengard, P. (1972) Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**, 2145-2149.
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E. & Smith, R.G. (2012) Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*, **73**, 317-332.
- Kern, A., Mavrikaki, M., Ullrich, C., Albarran-Zeckler, R., Brantley, A.F. & Smith, R.G. (2015) Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell*, **163**, 1176-1190.
- Khan, Z.U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., de la Calle, A. & Goldman-Rakic, P.S. (1998) Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 7731-7736.
- Kim, J. & Kita, H. (2013) Short-term plasticity shapes activity pattern-dependent striato-pallidal synaptic transmission. *Journal of neurophysiology*, **109**, 932-939.
- Kim, M.S., Yoon, C.Y., Park, K.H., Shin, C.S., Park, K.S., Kim, S.Y., Cho, B.Y. & Lee, H.K. (2003) Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport*, **14**, 1317-1320.
- 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.
- 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.
- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K. & Kreitzer, A.C. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, **466**, 622-626.
- Krumins, A.M. & Gilman, A.G. (2006) Targeted knockdown of G protein subunits selectively prevents receptor-mediated modulation of effectors and reveals complex changes in non-targeted signaling proteins. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 10250-10262.

- Lacerda, A.E., Kim, H.S., Ruth, P., Perez-Reyes, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., Birnbaumer, L. & Brown, A.M. (1991) Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel. *Nature*, **352**, 527-530.
- Lacomme, M., Laborit, H., Le Lorier, G. & Pommier, M. (1952) [Obstetric analgesia potentiated by associated intravenous dolosal with RP 4560]. *Bull Fed Soc Gynecol Obstet Lang Fr*, **4**, 558-562.
- Lauckner, J.E., Hille, B. & Mackie, K. (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 19144-19149.
- Leaney, J.L. & Tinker, A. (2000) The role of members of the pertussis toxin-sensitive family of G proteins in coupling receptors to the activation of the G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5651-5656.
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lanca, A.J., O'Dowd, B.F. & George, S.R. (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 35671-35678.
- Lehmann, D.M., Seneviratne, A.M. & Smrcka, A.V. (2008) Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. *Molecular pharmacology*, **73**, 410-418.
- Leung, P.K., Chow, K.B., Lau, P.N., Chu, K.M., Chan, C.B., Cheng, C.H. & Wise, H. (2007) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal*, **19**, 1011-1022.
- Li, M., West, J.W., Lai, Y., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1992) Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron*, **8**, 1151-1159.
- Liu, Y.F., Jakobs, K.H., Rasenick, M.M. & Albert, P.R. (1994) G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G₀ and G_{i2} in GH4C1 pituitary cells. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 13880-13886.
- Lledo, P.M., Homburger, V., Bockaert, J. & Vincent, J.D. (1992) Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron*, **8**, 455-463.
- 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. *J Gen Physiol*, **146**, 205-219.
- 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. *J Med Chem*, **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.
- Maggio, R., Vogel, Z. & Wess, J. (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 3103-3107.
- Mani, B.K., Walker, A.K., Lopez Soto, E.J., Raingo, J., Lee, C.E., Perello, M., Andrews, Z.B. & Zigman, J.M. (2014) Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. *The Journal of comparative neurology*, **522**, 3644-3666.
- Marcellino, D., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, S.R., Lluís, C., Fuxe, K. & Franco, R. (2008) Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 26016-26025.
- Marchetti, C., Carbone, E. & Lux, H.D. (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **406**, 104-111.
- Martin, M.W., Scott, A.W., Johnston, D.E., Jr., Griffin, S. & Luedtke, R.R. (2001) Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *European journal of pharmacology*, **420**, 73-82.
- Martinez-Pinilla, E., Rodriguez-Perez, A.I., Navarro, G., Aguinaga, D., Moreno, E., Lanciego, J.L., Labandeira-Garcia, J.L. & Franco, R. (2015) Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochemical pharmacology*, **96**, 131-142.
- 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.
- McDonald, J.H. & Dunn, K.W. (2013) Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy. *J Microsc*, **252**, 295-302.
- 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.
- McNay, E.C. (2007) Insulin and ghrelin: peripheral hormones modulating memory and hippocampal function. *Current opinion in pharmacology*, **7**, 628-632.
- Mochida, S. (2018) Presynaptic calcium channels. *Neurosci Res*, **127**, 33-44.

- Momiyama, T. & Koga, E. (2001) Dopamine D(2)-like receptors selectively block N-type Ca(2+) channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol*, **533**, 479-492.
- Moore, R.A., Straube, S., Wiffen, P.J., Derry, S. & McQuay, H.J. (2009) Pregabalin for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007076.
- Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepulveda, M., Navarro, G., Casado, V., Cortes, A., Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P.J., Canela, E.I., Lluís, C., Moratalla, R., Ferre, S., Ortiz, J. & Franco, R. (2011) Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 5846-5854.
- Murphy, B.J., Rossie, S., De Jongh, K.S. & Catterall, W.A. (1993) Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na⁺ channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 27355-27362.
- Mustafa, E.R., Cordisco Gonzalez, S. & Raingo, J. (2019) Ghrelin Selectively Inhibits CaV3.3 Subtype of Low-Voltage-Gated Calcium Channels. *Mol Neurobiol*.
- 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.
- Navarro, G., Aguinaga, D., Angelats, E., Medrano, M., Moreno, E., Mallol, J., Cortes, A., Canela, E.I., Casado, V., McCormick, P.J., Lluís, C. & Ferre, S. (2016) A Significant Role of the Truncated Ghrelin Receptor GHS-R1b in Ghrelin-induced Signaling in Neurons. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 13048-13062.
- Neely, A. & Hidalgo, P. (2014) Structure-function of proteins interacting with the alpha1 pore-forming subunit of high-voltage-activated calcium channels. *Front Physiol*, **5**, 209.
- Neve, K.A. (2010) *The dopamine receptors*. Humana Press, New York, NY.
- Nickolls, S.A. & Strange, P.G. (2003) Interaction of the D2short dopamine receptor with G proteins: analysis of receptor/G protein selectivity. *Biochemical pharmacology*, **65**, 1139-1150.
- Nishi, A., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Higashi, H., Nairn, A.C. & Greengard, P. (2000) Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 12840-12845.
- Nishi, A., Snyder, G.L. & Greengard, P. (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **17**, 8147-8155.

- O'Dowd, B.F., Ji, X., Alijaniaram, M., Rajaram, R.D., Kong, M.M., Rashid, A., Nguyen, T. & George, S.R. (2005) Dopamine receptor oligomerization visualized in living cells. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 37225-37235.
- Ohara, K., Haga, K., Berstein, G., Haga, T., Ichiyama, A. & Ohara, K. (1988) The interaction between D-2 dopamine receptors and GTP-binding proteins. *Molecular pharmacology*, **33**, 290-296.
- Overton, M.C. & Blumer, K.J. (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Current biology : CB*, **10**, 341-344.
- Painson, J.C., Wenger, T., Lagace, G., Masson, N.D. & Collu, R. (1994) Cellular distribution of G protein Go alpha in pituitary lactotrophs: effects of dopamine. *Journal of neuroendocrinology*, **6**, 447-455.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**, 739-745.
- 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.
- Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews*, **83**, 117-161.
- Perez-Reyes, E. (2010) G protein-mediated inhibition of Cav3.2 T-type channels revisited. *Molecular pharmacology*, **77**, 136-138.
- Pergolizzi, J.V., Jr. & Raffa, R.B. (2019) Safety And Efficacy Of The Unique Opioid Buprenorphine For The Treatment Of Chronic Pain. *J Pain Res*, **12**, 3299-3317.
- Petrel, C. & Clauser, E. (2009) Angiotensin II AT1 receptor constitutive activation: from molecular mechanisms to pathophysiology. *Mol Cell Endocrinol*, **302**, 176-184.
- Proft, J. & Weiss, N. (2015) G protein regulation of neuronal calcium channels: back to the future. *Molecular pharmacology*, **87**, 890-906.
- Puig, M.V., Antzoulatos, E.G. & Miller, E.K. (2014) Prefrontal dopamine in associative learning and memory. *Neuroscience*, **282**, 217-229.
- Quitterer, U. & Lohse, M.J. (1999) Crosstalk between Galpha(i)- and Galpha(q)-coupled receptors is mediated by Gbetagamma exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 10626-10631.
- Raino, J., Castiglioni, A.J. & Lipscombe, D. (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nature neuroscience*, **10**, 285-292.

- Rangel-Barajas, C., Coronel, I. & Floran, B. (2015) Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis*, **6**, 349-368.
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F. & George, S.R. (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 654-659.
- Rediger, A., Piechowski, C.L., Yi, C.X., Tarnow, P., Strotmann, R., Gruters, A., Krude, H., Schoneberg, T., Tschop, M.H., Kleinau, G. & Biebermann, H. (2011) Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 39623-39631.
- Rhee, S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, **70**, 281-312.
- Robishaw, J.D. & Berlot, C.H. (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 206-209.
- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R.C. & Patel, Y.C. (2000) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 7862-7869.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C. & Kobilka, B.K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, **318**, 1266-1273.
- Ross, E.M. (1989) Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron*, **3**, 141-152.
- Sadana, R. & Dessauer, C.W. (2009) Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neuro-Signals*, **17**, 5-22.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006) The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc*, **2006**.
- Scarselli, M., Novi, F., Schallmach, E., Lin, R., Baragli, A., Colzi, A., Griffon, N., Corsini, G.U., Sokoloff, P., Levenson, R., Vogel, Z. & Maggio, R. (2001) D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 30308-30314.
- Schellekens, H., van Oeffelen, W.E., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2013) Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 181-191.
- Schioth, H.B. & Fredriksson, R. (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*, **142**, 94-101.

- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M. & Wong, K. (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*, **261**, 717-719.
- Shapiro, M.S., Wollmuth, L.P. & Hille, B. (1994) Modulation of Ca²⁺ channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **14**, 7109-7116.
- Shi, L., Bian, X., Qu, Z., Ma, Z., Zhou, Y., Wang, K., Jiang, H. & Xie, J. (2013) Peptide hormone ghrelin enhances neuronal excitability by inhibition of Kv7/KCNQ channels. *Nat Commun*, **4**, 1435.
- Siehler, S. (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British journal of pharmacology*, **158**, 41-49.
- Simms, B.A. & Zamponi, G.W. (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, **82**, 24-45.
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F. & Dascal, N. (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, **253**, 1553-1557.
- Skibicka, K.P., Shirazi, R.H., Rabasa-Papio, C., Alvarez-Crespo, M., Neuber, C., Vogel, H. & Dickson, S.L. (2013) Divergent circuitry underlying food reward and intake effects of ghrelin: dopaminergic VTA-accumbens projection mediates ghrelin's effect on food reward but not food intake. *Neuropharmacology*, **73**, 274-283.
- Smith, R.D. & Goldin, A.L. (1997) Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **17**, 6086-6093.
- So, C.H., Varghese, G., Curley, K.J., Kong, M.M., Alijaniam, M., Ji, X., Nguyen, T., O'Dowd B, F. & George, S.R. (2005) D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Molecular pharmacology*, **68**, 568-578.
- So, C.H., Verma, V., Alijaniam, M., Cheng, R., Rashid, A.J., O'Dowd, B.F. & George, S.R. (2009) Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Molecular pharmacology*, **75**, 843-854.
- So, C.H., Verma, V., O'Dowd, B.F. & George, S.R. (2007) Desensitization of the dopamine D1 and D2 receptor hetero-oligomer mediated calcium signal by agonist occupancy of either receptor. *Molecular pharmacology*, **72**, 450-462.
- Striessnig, J., Koschak, A., Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Nguyen, N.K., Busquet, P., Pelster, G. & Singewald, N. (2006) Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochemical Society transactions*, **34**, 903-909.
- Suh, B.C. & Hille, B. (2008) PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys*, **37**, 175-195.

- Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z. & Shen, W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences*, **30**, 228-235.
- Szidonya, L., Cserzo, M. & Hunyady, L. (2008) Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol*, **196**, 435-453.
- Takahashi, T. & Momiyama, A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, **366**, 156-158.
- Takehara-Nishiuchi, K. (2020) Neurobiology of systems memory consolidation. *The European journal of neuroscience*.
- Tao, Y.X. (2008) Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, **120**, 129-148.
- Tao, Y.X., Huang, H., Wang, Z.Q., Yang, F., Williams, J.N. & Nikiforovich, G.V. (2010) Constitutive activity of neural melanocortin receptors. *Methods Enzymol*, **484**, 267-279.
- 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.
- Tiberi, M. & Caron, M.G. (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 27925-27931.
- Van Craenenbroeck, K. (2012) GPCR oligomerization: contribution to receptor biogenesis. *Subcell Biochem*, **63**, 43-65.
- Verma, V., Hasbi, A., O'Dowd, B.F. & George, S.R. (2010) Dopamine D1-D2 receptor Heteromer-mediated calcium release is desensitized by D1 receptor occupancy with or without signal activation: dual functional regulation by G protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 35092-35103.
- Wacker, D., Stevens, R.C. & Roth, B.L. (2017) How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*, **170**, 414-427.
- Wang, Q., Liu, C., Uchida, A., Chuang, J.C., Walker, A., Liu, T., Osborne-Lawrence, S., Mason, B.L., Mosher, C., Berglund, E.D., Elmquist, J.K. & Zigman, J.M. (2014) Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab*, **3**, 64-72.
- Watts, V.J., Wiens, B.L., Cumbay, M.G., Vu, M.N., Neve, R.L. & Neve, K.A. (1998) Selective activation of Galphao by D2L dopamine receptors in NS20Y neuroblastoma cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**, 8692-8699.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews*, **85**, 1159-1204.

- Wickman, K. & Clapham, D.E. (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiological reviews*, **75**, 865-885.
- Wu, J. & Hablitz, J.J. (2005) Cooperative activation of D1 and D2 dopamine receptors enhances a hyperpolarization-activated inward current in layer I interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 6322-6328.
- Yamada, E., Endoh, T. & Suzuki, T. (2002) Angiotensin II-induced inhibition of calcium currents via G(q/11)-protein involving protein kinase C in hamster submandibular ganglion neurons. *Neurosci Res*, **43**, 179-189.
- Yamazaki, M., Aizawa, S., Tanaka, T., Sakai, T. & Sakata, I. (2012) Ghrelin increases intracellular Ca(2)(+) concentration in the various hormone-producing cell types of the rat pituitary gland. *Neuroscience letters*, **526**, 29-32.
- Yin, Y., Li, Y. & Zhang, W. (2014) The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *International journal of molecular sciences*, **15**, 4837-4855.
- Yu, B. & Simon, M.I. (1998) Interaction of the xanthine nucleotide binding G α mutant with G protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 30183-30188.
- Zamponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J. & Snutch, T.P. (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α 1 subunit. *Nature*, **385**, 442-446.
- 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, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C. & Tiberi, M. (2014) Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. *Advances in pharmacology*, **70**, 175-214.
- 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.
- Zhou, Q.Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., Van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R. & Civelli, O. (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*, **347**, 76-80.
- Zhuang, X., Belluscio, L. & Hen, R. (2000) G(olf) α mediates dopamine D1 receptor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, RC91.
- Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B. & Elmquist, J.K. (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of comparative neurology*, **494**, 528-548.