



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA

**“Papel de la β -arrestina2 en la señalización del
Receptor para el Factor Liberador de Corticotropina
tipo 1 (CRF₁)”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. GABRIELA KARINA PARRA MERCADO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOQUÍMICA

Director de Tesis:

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

México, D. F.

Noviembre, 2015

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Transducción de Señales del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV IPN, bajo la dirección del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes y con el apoyo técnico y experimental del Dr. José Antonio Arias Montaña en los ensayos de determinación de AMPc endógeno, así como de la Bióloga Judith Hernández Aranda. Durante el desarrollo del mismo, la autora fue becaria del CONACYT (No. 296029). Este trabajo fue apoyado por el donativo 167673 SEP/CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Dedicaré este pequeño espacio a personas grandes que han contribuido en la realización de este proyecto, así como aquellas que siguen estando presentes en cada una de mis metas.

Quiero agradecer al Departamento de Bioquímica, en especial al Colegio de Profesores del mismo, por compartir un poco de sus conocimientos con nosotros, los alumnos. Y sobre todo, quiero agradecer al CINVESTAV y a CONACYT por ser las instituciones que permitieron que alcanzara otra meta.

Uno va creciendo poco a poco y son pocas las personas que van viendo esos cambios y para mí las personas más importantes a las que quiero dedicar este trabajo son mi familia, sin ustedes no podría estar aquí, siempre han sabido estar presentes en todo momento, muchas gracias.

Quiero darle las gracias al Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes por la enseñanza, por su paciencia, su comprensión y sobre todo la confianza que me ha brindado al darme la oportunidad de estar en su laboratorio y trabajar en este proyecto, muchas gracias por todo Dr.

También quiero agradecer al Dr. José Antonio Arias Montaña y al Dr. Agustín Guerrero Hernández por su asesoramiento y comentarios de este proyecto; al Dr. Richard Hauger de la Universidad de California en San Diego por permitirme estar en su laboratorio y a Sandy Braun por darme tips para el manejo del modelo celular; a Judith Hernández por enseñarme las técnicas necesarias para poder hacer los experimentos, así como el apoyo que me brindó como persona.

Y por último y no menos importante, a todas las personas que han puesto su granito de arena para ayudarme a seguir en esta carrera, mis amigos. Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio, sus opiniones y enseñanzas me han ayudado mucho, ustedes hicieron que la estancia en el laboratorio fuera la mejor, son mi segunda familia, muchas gracias de verdad. Mis compañeros y amigos de generación, chicos ustedes hicieron que esta meta sepa mejor, llegamos solos y acabamos juntos, no me cansaré de dar las gracias, ustedes son los mejores, gracias. Y claro, no puedo olvidar a mis amigos fuera del departamento, el apoyo recorrió kilómetros y kilómetros de distancia y aun así llegó intacto hasta aquí a mi lado, mil gracias.

INDICE

i.	ABREVIATURAS	i
ii.	LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	v
iii.	RESUMEN	vii
iv.	ABSTRACT	viii
I.	INTRODUCCIÓN	
	1.1 CRF.	1
	1.2 CRF y sus receptores.	4
	1.3 Agonistas de los receptores CRF ₁ y CRF ₂ .	6
	1.4 Señalización del receptor CRF ₁ .	7
	1.5 Regulación del receptor CRF ₁ .	9
	1.6 Arrestinas.	12
II.	ANTECEDENTES	
	2.1 Regulación del receptor CRF ₁ al estimularlo con CRF.	16
	2.2 Transactivación de receptores para factores de crecimiento por activación del receptor CRF ₁ .	19
	2.3 Transactivación del receptor de EGF inducido por el receptor CRF ₁ .	22
	2.4 Participación de la proteína β -arrestina2 en la señalización del receptor CRF ₁ .	25
III.	JUSTIFICACIÓN	26
IV.	HIPÓTESIS	27
V.	OBJETIVO GENERAL	28
VI.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
VII.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
	7.1 Cultivo celular.	30
	7.2 Transfección.	30
	7.3 Experimentos.	31

7.4 Determinación de AMPc endógeno.	32
7.5 Inmunodetección (Western Blot).	34
7.6 Anticuerpos.	34
7.7 Análisis.	37
VIII. RESULTADOS	
8.1 Las células MEF-KO- β -arrestina2 carecen de la proteína β -arrestina2.	38
8.2 El CRF promueve la fosforilación de ERK 1/2 respecto al tiempo post-transfección en células MEF WT- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF ₁ .	39
8.3 Las células MEF-WT- β -arrestina2 y KO- β -arrestina2 son funcionales.	40
8.4 β -arrestina2 participa en la activación de ERK 1/2 inducido por el receptor CRF ₁ .	42
8.5 Las células MEF-WT y MEF-KO- β -arrestina2 responden al estímulo con EGF.	44
8.6 La activación de ERK 1/2 inducida por CRF es bloqueada por el inhibidor del receptor de EGF.	46
8.7 La proteína β -arrestina2 participa en la activación de c-Src inducida por CRF.	48
8.8 La activación de ERK 1/2 inducida por CRF es bloqueada por el inhibidor de Src.	50
IX. DISCUSIÓN	52
X. CONCLUSIONES	58
XI. PERSPECTIVAS	59
XII. REFERENCIAS	60

ABREVIATURAS

7TM. Siete pases transmembranales.

β ARK. Cinasa de los receptores β -adrenérgicos.

β -arr1. β -arrestina1.

β -arr2. β -arrestina2.

AC. Adenilato ciclasa.

ACTH. Hormona adrenocorticotrópica.

AMPc. Adenosin monofosfato cíclico.

AP2. Proteína adaptadora 2.

AVP. Arginina vasopresina.

COS-7. Células de hígado de mono verde africano.

CREB. Elemento de respuesta con unión a AMPc.

CRF. Factor liberador de corticotropina.

CRF₁. Receptor para el factor liberador de corticotropina tipo 1.

CRF₂. Receptor para el factor liberador de corticotropina tipo 2.

CRF₃. Receptor para el factor liberador de corticotropina tipo 3.

DAG. Diacilglicerol.

DGK. Cinasa de diacilglicerol.

EC. Asa extracelular.

ECD. Dominio extracelular.

EGF. Factor de crecimiento epidermal.

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidermal.

ERK1/2. Cinasas reguladas por señales extracelulares.

ET-1. Endotelina 1

GFP. Proteína verde fluorescente.

GIRK. Canales de potasio rectificadores entrantes activados por proteínas G.

GR. Glucocorticoides.

Grb2. Proteína de unión al receptor para factor de crecimiento.

GRK. Cinasa de receptores acoplados a proteínas G.

GPCR. Receptor acoplado a proteínas G.

HA. Etiqueta de hemaglutinina.

HPA. Hipotálamo pituitaria adrenal.

HEK293. Células de riñón de embrión humano.

I κ B α . Inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas alfa.

IC. Asa intracelular.

JNK3. Cinasa del amino terminal de c-Jun tipo 3.

LPA. Ácido lisofosfatídico.

MAPK. Proteína cinasa activada por mitógenos.

Mdm2. Ligasa E3 de ubiquitina.

MEF. Células fibroblásticas de embrión de ratón.

MEK. Proteína cinasa de la cinasa activada por mitógenos.

MMPS. Metaloproteinasas de la matriz.

NSF. Proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida.

PDE4D. Fosfodiesterasa de AMPc.

PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PIP2. Fosfatidilinositol bifosfato.

PKA. Proteína cinasa A.

PKC. Proteína cinasa C.

PLC. Fosfolipasa C.

PP2A. Fosfatasa 2A.

Pyk2. Proteína cinasa de tirosina 2.

RGS. Dominio regulador de la señalización de la proteína G.

RTK. Receptor con actividad de cinasa de tirosinas.

SCP. Estrescopina.

Shc. Dominio con homología a Src 2.

Src. Proteína cinasa de tirosina.

SRP. Péptido relacionado a la estrescopina.

SVG. Sauvagina.

TNF. Factor de Necrosis Tumoral.

UCN1. Urocortina tipo 1.

UCN2. Urocortina tipo 2.

UCN3. Urocortina tipo 3.

URO1. Urotensina tipo 1.

URO2. Urotensina tipo 2.

URO3. Urotensina tipo 3.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1.1	Alineamiento de las secuencias peptídicas de los miembros de la familia de CRF.	1
Figura 1.1	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA).	3
Tabla 1.2	Constantes de inhibición de la familia de péptidos de CRF	6
Figura 1.2	Señalización del receptor CRF ₁ .	8
Figura 1.3	Regulación de un GPCR mediante la endocitosis en vesículas rodeadas de clatrina.	10
Figura 1.4	Estructura de las β -arrestinas.	14
Figura 1.5	Señalización de un GPCR.	15
Figura 2.1	Fosforilación del receptor HA-hCRF ₁ inducido por la estimulación con CRF.	16
Figura 2.2	Reclutamiento de β -arrestinas tras la activación del receptor HA-hCRF ₁ mediante CRF	17
Figura 2.3	Colocalización de β -arrestina con el receptor CRF ₁ .	18
Figura 2.4	Fosforilación del receptor de EGF inducido por agonistas de GPCRs.	19
Figura 2.5	Posibles mecanismos para la transactivación del receptor de EGF por GPCRs	21
Figura 2.6	Efecto del inhibidor AG1478 en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF ₁ .	22
Figura 2.7	Efecto del inhibidor AG1478 en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF ₁ .	23
Figura 2.8	Fosforilación de Src inducida por el receptor CRF ₁	23
Figura 2.9	Fosforilación en la tirosina 845 del receptor de EGF inducido por el receptor CRF ₁ .	24
Figura 2.10	Efecto de la sobreexpresión de β -arrestina2 en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF.	25
Figura 4.1	Modelo hipotético en la señalización del receptor CRF ₁ .	27
Figura 7.1	Células MEF.	30
Tabla 7.1	Preparación de muestras para determinación de la acumulación de AMPc.	33
Tabla 7.2	Anticuerpos y condiciones utilizados en el trabajo.	36
Figura 8.1	Expresión de β -arrestina1 y β -arrestina2 en células MEF WT y MEF KO- β -arrestina2.	38
Figura 8.2	Fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF-WT- β -	39

	arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF ₁ .	
Figura 8.3	Acumulación de AMPc endógeno en células MEF WT-β-arrestina2 y MEF KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁	40
Figura 8.4	Fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF-WT-β-arrestina2 y MEF-KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁	42
Figura 8.5	Fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁ , comparación entre ambas líneas celulares.	44
Figura 8.6	Fosforilación de ERK 1/2 inducida por EGF en las células MEF WT-β-arrestina2 y MEF KO-β-arrestina2.	46
Figura 8.7	Efecto del inhibidor del receptor de EGF en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en las células MEF-WT-β-arrestina2 y MEF-KO-β-arrestina2.	48
Figura 8.8	Efecto del inhibidor del receptor de EGF en la fosforilación de ERK 1/2 inducido por CRF en las células MEF-WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁ , comparación entre ambas líneas celulares.	47
Figura 8.9	Fosforilación de c-Src inducida por CRF en células MEF WT-β-arrestina2 y MEF KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁	49
Figura 8.10	Fosforilación de c-Src inducida por CRF en células MEF WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁ . Comparación entre ambas líneas celulares.	49
Figura 8.11	Efecto del inhibidor del receptor de Src en la fosforilación de ERK 1/2 inducido por CRF en las células MEFWT-β-arrestina2 y MEF-KO-β-arrestina2.	50
Figura 8.12	Efecto del inhibidor del receptor de Src en la fosforilación de ERK 1/2 inducido por CRF en las células MEF-WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF ₁ , comparación entre ambas líneas celulares.	51
Figura 9.1	Esquema sugerido de la señalización del receptor CRF ₁ en células MEF.	57

RESUMEN

El CRF es un neuropéptido generado como una respuesta neuroendócrina de adaptación al estrés. Actúa al unirse a sus receptores específicos, el CRF₁ y CRF₂, ambos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). El receptor CRF₁ se acopla a las proteínas G_{αs} y G_{αq}, vías que terminarán con la activación de PKA y PKC, respectivamente. Además, se ha reportado que el receptor CRF₁ puede activar la vía mitogénica de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) a través de la transactivación del receptor de EGF. La proteína β-arrestina2 participa en la regulación del receptor CRF₁; sin embargo, esta proteína se encuentra involucrada en la activación de diferentes vías transduccionales al activar diversas proteínas, como cinasas de la familia Src y cinasas pertenecientes a la vía de MAPK. Utilizando como modelo de estudio una línea celular de células fibroblásticas embrionarias provenientes de ratón knockout para la proteína β-arrestina2 (MEF KO-β-arrestina2) transfectadas con el receptor HA-CRF₁, hemos observado que la ausencia de β-arrestina2 promueve un estado de desensibilización que se refleja en un incremento en los niveles de AMPc generados en respuesta al CRF. Además, nuestros datos sugieren que la β-arrestina2 participa en la activación de las MAP cinasas ERK1/2 y de la cinasa Src inducida por el CRF. Por otra parte, tenemos evidencia de que las células MEF (WT y KO) responden al EGF en la activación de ERK1/2 y que el CRF activa a ERK1/2 a través de un mecanismo de transactivación del receptor de EGF. Finalmente, los resultados sugieren la participación de la cinasa Src en la activación de ERK 1/2 inducido por CRF.

ABSTRACT

CRF is a neuropeptide released as a neuroendocrine response to stress. It acts through its receptors, CRF₁ and CRF₂, members of the family G protein-coupled receptors (GPCR). CRF₁ receptor coupled to α -subunit Gs and Gq, which in turn activate PKA and PKC, respectively. It has been reported that CRF₁ receptor can activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway through transactivation of EGF receptor. β -arrestin2 is an adapter protein that participates in the regulation of CRF₁ receptor; however, this protein is involved in the activation of different transductional pathways because it is capable of activate proteins like Src and kinases from MAPK pathway. In this work, we used as study model a cellular line of embryonic fibroblast from mouse which has a knockout for β -arrestin2 (MEF KO- β -arrestin2) transfected with HA-hCRF₁ receptor. We found that the absence of β -arrestin2 promote a desensitization state reflected in an increase of the levels of cAMP produced in response to CRF. Besides, our data suggest that β -arrestin2 participates in the activation of MAP kinases ERK 1/2 and the Src kinase. In the other hand, we have evidence that the MEF (WT and KO) cells respond to EGF in the activation of ERK 1/2 and the CRF activates ERK 1/2 through the transactivation of EGFR. Finally, the results suggest the participation of Src in the activation of ERK 1/2 induced by CRF.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 CRF

El factor liberador de corticotropina o CRF (Corticotropin-Releasing Factor) es un neuropéptido de 41 aminoácidos, aislado y caracterizado en 1981 por Vale y colaboradores (1). Pertenece a una familia de diferentes péptidos, que incluye al CRF, a las urocortinas (UCN1, UCN2 y UCN3), a las urotensinas (URO1, URO2 y URO3), a sauvagina (SVG), a la estrescopina (SCP) y al péptido relacionado a la estrescopina (SRP) (Tabla 1.1). Estos péptidos están ampliamente distribuidos filogenéticamente, encontrando al CRF en todos los vertebrados, incluyendo a peces teleósteos, anfibios y mamíferos (2).

Peptide	Sequence	Length	Identity (%)
hCRF	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII	41	100
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
URO	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSRERAEQNRIIFDSV	40	43
SVG	ZGPPISIDLSELELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLDTI	40	48
hSRP	IVLSLDVPIGLLQIILEQARARAAREQATTNARILARV	38	34
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
hSCP	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAANAHLMAQI	38	32
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNLLFNIDKAKNLRAKAAANAQLMAQI	38	26

TRENDS in Pharmacological Sciences

Tabla 1.1. Alineamiento de las secuencias peptídicas de los miembros de la familia de CRF. En azul se encuentran los aminoácidos que son homólogos entre todos los péptidos de la familia. Puede observarse la similitud en las secuencias entre el péptido relacionado a estrescopina humano (SRP) y la urocortina III humana (UCNIII). De la misma manera, las secuencias de la estrescopina humana (SCP) y la UCNIII son iguales. Abreviaciones: h, humano; m, ratón; o, oveja; SVG, sauvagina; URO, urotensina I (3).

El CRF es expresado abundantemente en el sistema nervioso central, mayoritariamente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), corteza

cerebral, cerebelo y en el complejo amígdala-hipocampo, áreas relacionadas con la adaptación al estrés, el aprendizaje y la memoria (3). Sin embargo, también puede encontrarse en diferentes tejidos periféricos como en el corazón y en el sistema porta, la piel, los pulmones, riñón, hígado, tejido adiposo, testículos, ovarios e incluso en placenta (4).

La expresión del CRF es estimulada por diversos neurotransmisores, como la serotonina y acetilcolina [5] [6]; por diversos neuropéptidos, como son la arginina vasopresina y el neuropéptido Y (7), y por las citocinas: interleucinas 1 y 6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) (8) (9).

El CRF regula la respuesta adaptativa al estrés a través de la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). El eje HPA es responsable de la regulación autonómica, cardiovascular, endocrina, gastrointestinal, inmune y sobre funciones reproductivas y de comportamiento en respuesta a estrés (10). Una vez que se genera el estímulo estresante, el PVN secreta CRF y arginina vasopresina (AVP), los cuales viajan por el sistema porta hacia la glándula pituitaria, donde activarán a sus receptores específicos produciendo la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La hormona ACTH, a su vez, se dirige a la glándula suprarrenal a través del torrente sanguíneo, donde se unirá a sus receptores induciendo la síntesis y secreción de glucocorticoides, como el cortisol (Figura 1.1). Los glucocorticoides movilizan glucosa de los almacenes energéticos e incrementan el tono cardiovascular, entre otros efectos. Existe regulación negativa a través de los receptores de glucocorticoides (GR) que se encuentran en el PVN y en la glándula pituitaria, permitiendo regresar a nivel basal la respuesta del eje HPA (11).

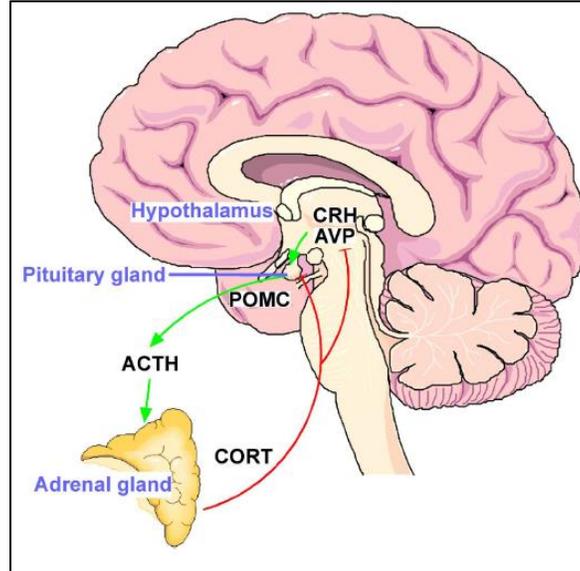


Figura 1.1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). El CRF y AVP son secretados por el hipotálamo en respuesta a un estímulo estresante. Estos viajan a través del torrente sanguíneo hasta la glándula pituitaria provocando la liberación de ACTH. Finalmente, ACTH produce la secreción de cortisol en la glándula suprarrenal.

1.2 CRF y sus receptores

El CRF ejerce sus efectos al unirse a sus receptores, el receptor CRF tipo 1 (CRF₁) y el receptor CRF tipo 2 (CRF₂). Un tercer receptor se encontró en el pez gato descrito como CRF₃; sin embargo, parece ser único para esta especie (12).

El CRF₁ y el CRF₂ pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), específicamente a la subclase B (3). La secuencia genómica del receptor CRF₁ para humanos fue encontrada en el cromosoma 17 (17q12-q22) (13). En humano, el gen que codifica al receptor CRF₁ consiste en 14 exones y 13 intrones (14).

La estructura de los receptores CRF₁ y CRF₂ es similar a los de los GPCRs y consiste en un dominio extracelular (ECD) en donde se encuentra el fragmento N-terminal. Además, tiene tres asas extracelulares (EC1-3); siete pases transmembranales (7TM); tres asas intracelulares (IC1-3), y un C-terminal. La región más variable entre los receptores tipo 1 y 2 es el dominio ECD con un 40% de homología. El resto de la secuencia se encuentra altamente conservada con ~80% de homología (15).

En humano, se expresan al menos ocho variantes de splicing del receptor CRF₁ (16), las cuales pueden ser divididas en tres grupos: receptores de tamaño completo (CRF_{1α, β}), receptores mutados en el C-terminal o en el dominio ECD (CRF_{1c, e}) y los receptores que tienen incompleto o carecen del dominio 7TM (CRF_{1d, e, f, g y h}) (15). La variante principal y funcional es la isoforma CRF_{1α}, la cual posee 415 aminoácidos (17).

El receptor CRF₂ expresa tres variantes de splicing funcionales, CRF_{2A-C}. Las variantes tienen en común 377 aminoácidos en el C-terminal, mientras que el extremo N-terminal difiere de una isoforma a otra. El receptor CRF_{2α} es la

variante de splicing que se expresa predominantemente en el cerebro de mamíferos (18).

Se ha encontrado el mRNA del receptor CRF₁ expresado abundantemente en la pituitaria anterior, la corteza cerebral, el cerebelo, la amígdala, el hipocampo y el bulbo olfatorio (19). En menor grado, también se ha reportado mRNA del receptor CRF₁ en testículos, ovarios y glándula adrenal (20).

Al contrario del receptor CRF₁, el mRNA del CRF₂ se encuentra expresado en mayor proporción a nivel periférico, particularmente en miocitos cardíacos, el tracto gastrointestinal, pulmón, ovario y músculo esquelético (21). El receptor CRF_{2A} se expresa en el núcleo paraventricular del hipotálamo, el septum lateral, la amígdala, el hipocampo y la retina (19). De acuerdo a la localización de ambos receptores, se podría decir que el receptor CRF₁ tiene un mayor papel en la regulación de las funciones del cerebro y de la pituitaria; mientras que el receptor CRF₂ puede ser más importante en la periferia.

1.3 Agonistas de los receptores CRF₁ y CRF₂

Homólogos del CRF y los péptidos parecidos a CRF (UCN, URO y SVG) se unen con alta afinidad al CRF₁ de mamíferos. Únicamente para anfibios, el receptor CRF₁ discrimina entre CRF, UCN, URO y SVG (18). UCN, SVG y URO se unen al receptor CRF₂ con una afinidad considerablemente más alta comparada con la del CRF (3). Se encontró que UCNII se une selectivamente al receptor CRF₂, mientras que la UCNIII se une al receptor CRF₂ con alta afinidad (22–24).

En la siguiente tabla 1.2, muestro las afinidades por los receptores CRF₁ y CRF₂ en el rango nanomolar de los péptidos relacionados al CRF.

Péptido	hCRF₁ (Ki, nM)	rCRF_{2A} (Ki, nM)	mCRF_{2B} (Ki, nM)
CRF (rata/humano)	3.30	42	47
UCN (humano)	0.40	0.30	0.50
UCN II (humano)	4600	1.70	0.50
UCN III (humano)	>10000	21.70	13.50

Tabla 1.2 Constantes de inhibición de la familia de péptidos de CRF. La constante de inhibición (Ki) es expresada en el orden de nanomolar (nM) para los receptores CRF₁ de humano (hCRF₁), CRF_{2A} de rata (rCRF_{2A}) y CRF_{2B} de ratón (mCRF_{2B}) (Adaptado de Reul, 2002 y Dautzenberg, 2004) (25,26).

1.4 Señalización del receptor CRF₁

Este trabajo se centra particularmente en la señalización del receptor CRF₁, el cual al ser activado por sus ligandos se acopla preferentemente a la proteína G_s. El acople con la proteína G_{as} da como resultado la estimulación de la adenilato ciclasa (AC), aumentando los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) y ésta a su vez fosforila diferentes proteínas citosólicas o nucleares como puede ser el factor de transcripción CREB(3,18,27).

Este receptor también puede acoplarse a la proteína G_{αq}, activando a la fosfolipasa C (PLC). La PLC hidroliza en la membrana plasmática al fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 se une a sus receptores en el retículo endoplásmico permitiendo la salida del ión calcio (Ca²⁺) de este organelo al espacio intracelular. El Ca²⁺ y el DAG pueden activar a diferentes isoformas de la proteína cinasa C (PKC) (3,26).

También se ha descrito que el receptor CRF₁ puede activar la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) mediante un mecanismo de transactivación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina, específicamente, al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Al ser activado el receptor de EGF, este inicia el reclutamiento de proteínas accesorias como Shc y Grb2. Grb2 se une al factor de intercambio de nucleótidos de guanina SOS permitiendo la activación de éste último. SOS promueve el intercambio de GDP por GTP de la proteína Ras. La unión de GTP a Ras permitirá que ésta pueda activar a la cinasa Raf-1, la cual fosforila a las cinasas de treonina y tirosina MEK 1 y a MEK 2 activándolas. Tanto MEK 1 como MEK 2 fosforilan a ERK 1 y a ERK 2, proteínas finales en la vía transduccional de las MAPK [datos no publicados Olivares-Reyes]. ERK 1 y ERK 2 (ERK 1/2) pueden activar o inactivar varios blancos incluyendo a factores transcripcionales, distintas

quinasas y fosfatasa entre otras proteínas, dando como resultado diferentes respuestas como es la proliferación celular y la transcripción génica (28).

En la figura 1.2 se muestran las vías de señalización activadas por el receptor CRF₁.

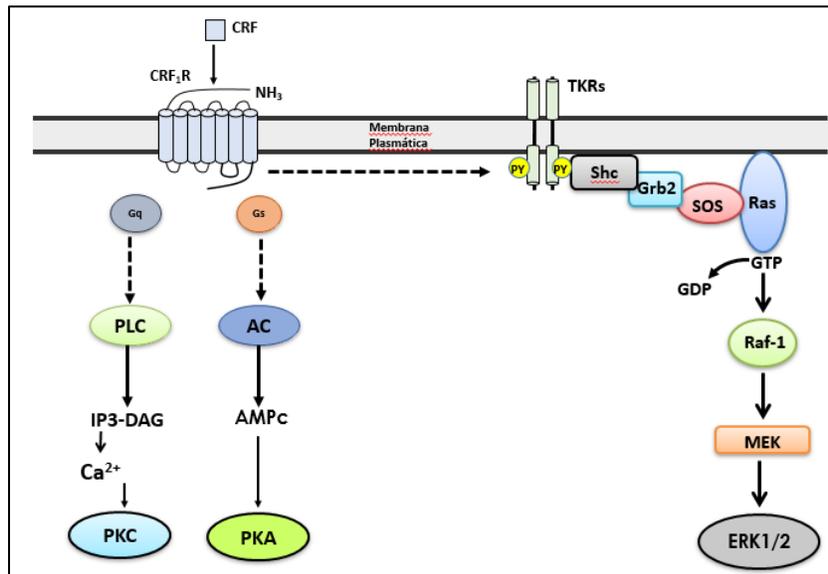


Figura 1.2 Señalización del receptor CRF₁. Cuando el receptor es activado por CRF, este permite el acople de las proteínas Gsa y Gqa resultando en la activación final de PKC y PKA. Además, el receptor puede activar la vía de las MAPK por medio de un mecanismo de transactivación de los receptores con actividad de cinasa de tirosina como el receptor de EGF.

1.5 Regulación del receptor CRF₁

La duración y la magnitud de las respuestas mediadas por los GPCRs dependen de una rápida regulación de la señal. Las primeras proteínas involucradas en la regulación de los GPCRs son las cinasas de los GPCR (GRK) y las arrestinas (29).

Los mamíferos expresan siete isoformas de GRK (GRK1-GRK7) divididas en tres subfamilias, según la similitud en sus secuencias. La subfamilia GRK1 consiste en la cinasa del receptor de rodopsina (GRK1) y GRK7; la subfamilia GRK2 consiste en las cinasas 1 y 2 de los receptores β 2 adrenérgicos (GRK2 y GRK3); y la subfamilia GRK4 que consiste de las cinasas GRK4-6 (30).

Todas las GRKs comparten un dominio regulador de la señalización de la proteínas G (RGS) con homología al dominio RH (dominio de homología a RGS) (31), un dominio de actividad de cinasa de serina y treonina similar al que presentan las cinasas de la familia AGC y un dominio de unión a la membrana plasmática (32).

Las arrestinas son una familia de cuatro proteínas citosólicas: arrestina 1 (arrestina visual), arrestina 2 (β -arrestina1), arrestina 3 (β -arrestina2) y arrestina 4. Las arrestinas son consideradas como proteínas de andamiaje o adaptadoras, ya que permiten el reclutamiento y activación de otras proteínas (33).

Un mecanismo de regulación de los GPCR es la endocitosis a través de vesículas recubiertas de clatrina. Este proceso se inicia cuando el ligando activa a su receptor, el cual es rápidamente fosforilado por las GRKs en residuos de serinas y treoninas de la tercera asa intracelular y la cola carboxílica. La fosforilación del receptor permite la interacción de la arrestina con el receptor, impidiendo estéricamente el acople de la proteína G al GPCR, lo que se conoce como desensibilización homóloga (34). La arrestina,

a su vez, hace posible el reclutamiento de diferentes proteínas involucradas en la formación de la vesícula endocítica como es clatrina (35) y AP2 (36). La vesícula recubierta de clatrina se termina de formar con la ayuda de la GTPasa dinamina, permitiendo la internalización de los receptores, (figura 1.3).

El tipo de internalización de los GPCRs permite que estos sean clasificados dentro de dos clases basados en la interacción con la arrestina (figura 1.3). Los receptores clase A se unen preferentemente a la β -arrestina2 y lo hacen de una manera transitoria, dándole a los receptores la característica de tener un rápido reciclamiento a la membrana plasmática. En contraste, los receptores clase B poseen afinidades similares tanto para la β -arrestina1 como a la β -arrestina2. La unión del receptor clase B con la arrestina forma un complejo estable dirigiendo al receptor hacia su degradación (37).

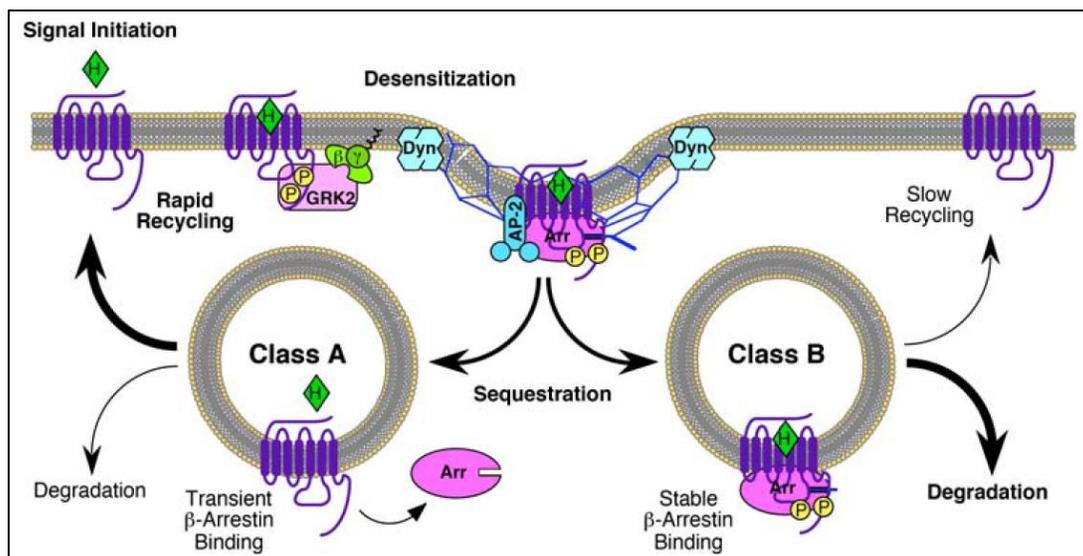


Figura 1.3 Regulación de un GPCR mediante la endocitosis en vesículas rodeadas de clatrina. La regulación de los GPCRs a través de la endocitosis en vesículas rodeadas de clatrina inicia con la activación del receptor, siguiendo con la fosforilación del mismo por acción de las GRKs. La fosforilación del receptor permitirá el reclutamiento de la arrestina, la cual a su vez interacciona con proteínas involucradas en la formación de la vesícula. La internalización de los receptores hace posibles su clasificación dentro de dos tipos dependiendo de la unión que presenten estos con la arrestina. Los receptores clase A

presentan una unión transitoria con la arrestina; mientras que los receptores clase B tienen una unión estable con la arrestina (Tomado de Kendall, 2009) (38).

Existen trabajos que sugieren que el receptor CRF₁ se internaliza por medio de endocitosis en vesículas recubiertas de clatrina, ya que al utilizar una solución hipertónica de sacarosa y una dominante negativa de dinamina se inhibe la internalización del mismo (39–42).

De acuerdo a los resultados publicados por Dautzenberg y colaboradores, así como Teli y colaboradores, en la desensibilización homóloga del receptor CRF₁ participan principalmente las cinasas GRK3 y GRK6 (43–45); sin embargo, al transfectar una dominante negativa de GRK2 en células tumorales de la glándula pituitaria AtT-20, se observó que se inhibía la desensibilización del receptor CRF₁ (46), sugiriendo también la participación de la GRK2 en la desensibilización homóloga del receptor.

Por otro lado, Oakley y colaboradores en el 2007 utilizaron células HEK293 transfectadas con el receptor CRF₁ para estudiar el reclutamiento de β -arrestina1 y de β -arrestina2 al estimular el receptor con CRF. Sus resultados sugieren que el receptor CRF₁ recluta preferentemente a β -arrestina2 y que esta asociación se lleva a cabo de forma transitoria, perteneciendo a los receptores clase A (41).

1.6 Arrestinas

La primera arrestina en ser descrita fue la arrestina 1. En 1977 Wacker y colaboradores encontraron un antígeno soluble de la retina, involucrado en la uveítis alérgica (47). Por el mismo tiempo, Kühn y colaboradores identificaron una proteína de 48 kDa que junto con la cinasa del receptor de rodopsina se unían al fotoreceptor en una forma dependiente a la luz (48). Años más tarde, Pfister y colaboradores demostraron que el antígeno soluble encontrado en la retina corresponde a la proteína de 48 kDa identificada por Kühn (49). Un año después, Zuckerman y colaboradores encontraron que la proteína de 48 kDa descrita por Kühn reprimía o “arrestaba” la actividad de fosfodiesterasa de GMPc inducida por la activación del fotoreceptor, por lo que se le puso el nombre de arrestina (50).

La identificación de la proteína β -arrestina1 ocurrió al buscar un cofactor necesario para la desensibilización homóloga de los receptores β -adrenérgicos. Se sabía que para que se llevara a cabo la desensibilización homóloga de los receptores β -adrenérgicos era necesaria la presencia de una cinasa específica para dichos receptores (GRK), llamada en ese entonces Bark; y un cofactor el cual se unía al receptor fosforilado. El cofactor fue clonado y encontraron que codificaba para una proteína de 418 aminoácidos. Dicha proteína era homóloga a la arrestina presente en la retina, por lo que se decidió llamarla β -arrestina (34).

Tiempo después, Attramadal y colaboradores clonaron otra proteína de 410 aminoácidos perteneciente a la misma familia de las arrestinas, a la cual se le denominó β -arrestina2 (51).

En contraste con la arrestina encontrada en la retina, β -arrestina1 y β -arrestina2 tienen una mayor afinidad por el receptor β -adrenérgicos

fosforilado que por el receptor de rodopsina fosforilado (51). Ahora se sabe que las proteínas β -arrestina1 y β -arrestina2 se encuentran expresadas de forma ubicua y que ambas se pueden unir a diferentes tipos de receptores.

La arrestina 4, también conocida como X-arrestina, fue identificada al expresar genes en el cromosoma X específicos de la retina (52). Esta arrestina se expresa principalmente en los conos de la retina y en los pinealocitos (53).

Las cuatro arrestinas comparten una estructura formada 2 dominios de hojas β antiparalelas conectadas a través de una región de visagra y una α -hélice corta en el N-terminal (54).

En la figura 1.4 se muestra una representación de la estructura de las β -arrestinas. Ambas poseen un dominio N y un dominio C, cada uno compuesto de un sándwich de 7 hojas β antiparalelas, encargados del reconocimiento del receptor activo. Contienen un núcleo polar (polar core, P) compuesto predominantemente de argininas, el cuál reconoce los residuos fosforilados del receptor. Presentan dos dominios regulatorios R en los extremos de los dominios N y C. El dominio R2, posee el sitio de fosforilación para β -arrestina1 (Ser412), así como el motivo LIEF y el motivo RXR, motivos de unión a clatrina y AP2 respectivamente. En el dominio C se encuentra el motivo de unión a inositol hexafosfato (IP6), además sitios de unión a otras proteínas que participan en la regulación de los receptores como NSF y Mdm2. Presentan sitios de unión a proteínas transduccionales como son Src, JNK3 y proteínas pertenecientes a la vía de las MAPKs (55).

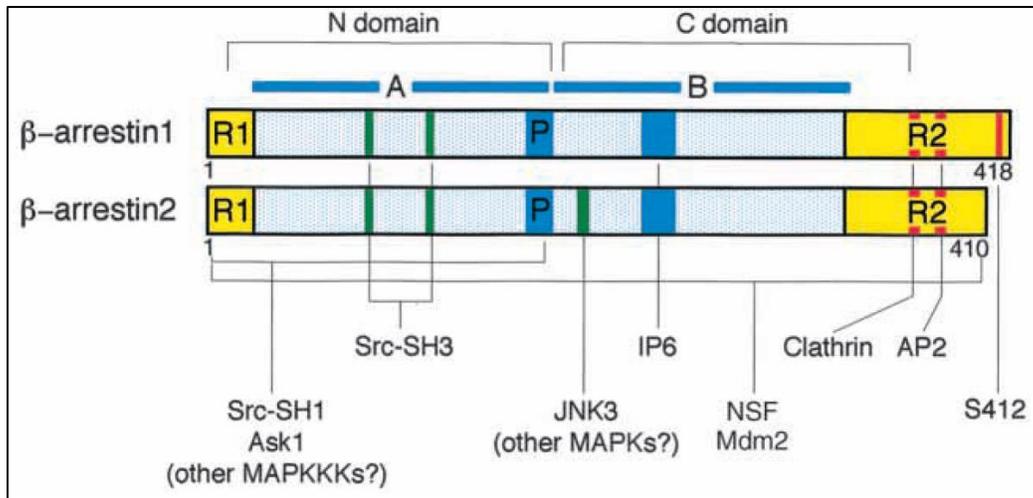


Figura 1.4 Estructura de las β -arrestinas. Las β -arrestinas presentan 2 dominios principales N y C, así como un núcleo polar (P). Los dominios N y C participan en el reconocimiento del receptor activo; mientras que el P contribuye con el reconocimiento del receptor fosforilado. Ambas proteínas poseen, además, sitios de unión a proteínas involucradas en la regulación de los GPCRs (clatrina, AP2, NSF y Mdm2), así como también, sitios de unión a diferentes proteínas transduccionales como son Src, JNK3 y proteínas pertenecientes a la vía de las MAPKs (Tomado de Luttrell 2002) (55).

Además de participar en la endocitosis de los receptores, las β -arrestinas reclutan a proteínas de diferentes vías transduccionales permitiendo la activación de éstas y generando, por ende, respuestas dependientes de β -arrestina. Existe evidencia del reclutamiento de proteínas como las pertenecientes a la familia de cinasas de tirosina tipo no receptor, como cSrc, Hck, Fgr y Yes, las cuales son reclutadas por las β -arrestinas en la señalización de diferentes receptores. Además, las β -arrestinas pueden reclutar componentes de la cascada de la vía de las MAPK, modulando y activando a Raf, MEK y ERK 1/2, así como también activan y modulan ASK1, MKK4 y JNK3. También reclutan a la ubiquitin ligasa E3 (Mdm2); fosfodiesterasas de AMPc, PDE4D3/5; cinasas de diacilglicerol, (DGK); al factor nuclear de inhibición Kb ($I\kappa B\alpha$); al estimulador de la disociación de Ral-GDP (Ral-GDS); cofilina; así como a la fosfatasa 2ª de Ser/Thr (PP2A) (Figura 1.5) (54).

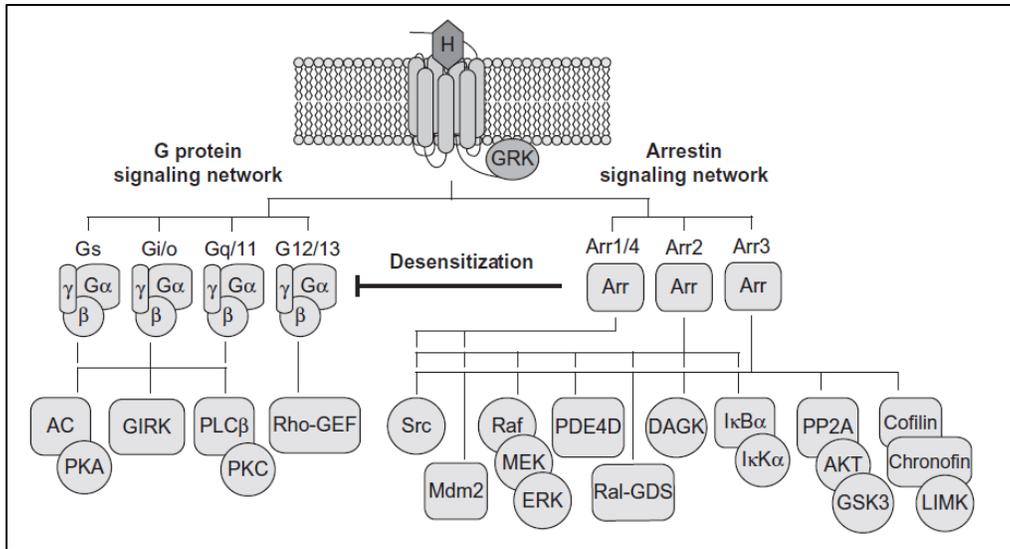


Figura 1.5 Señalización de un GPCR. Un GPCR activado genera al menos dos vías de señalización: una vía dependiente de la proteína G, mediante el acople de Gs/Gi/Gq/G12/13 y la activación subsecuente de las vías de señalización dependientes de segundos mensajeros (Gs-adenilato ciclasa (AC)-PKA y fosfolipasa C β (PCL β)-PKC) y activación de pequeñas GTPasas como Rho-GEF y otros efectores, incluyendo a los rectificadores entrantes de canales de potasio acoplados a proteínas G (GIRK); y otra vía dependiente de arrestina, mediante el reclutamiento y activación de diferentes proteínas transduccionales como Src, la ubiquitin ligasa E3 (Mdm2), componentes de la vía de señalización de las MAPK (Raf, MEK y ERK 1/2), fosfodiesterasas de AMPc, PDE4D3/5, cinasas de diacilglicerol, (DGK), al factor nuclear de inhibición Kb (I κ B α), al estimulador de la disociación de Ral-GDP (Ral-GDS), cofilina; así como a la fosfatasa 2^a (PP2A) (Tomado de Luttrell 2013) (54).

El reclutamiento de diferentes proteínas transduccionales por parte de las β -arrestinas facilitan al menos tres funciones en las células: incrementar la eficiencia de la señalización entre componentes sucesivos de una cascada enzimática; asegurar la fidelidad de la señal al disminuir el “cross talk” entre cascadas; y la localización de la señal en un lugar específico de la célula (56).

II. ANTECEDENTES

2.1 Regulación del receptor CRF₁ al estimularlo con CRF.

Al pertenecer a la familia de los GPCR, la activación del receptor CRF₁ por CRF y UCN, permite el acople de la proteína Gs, lo que conlleva a la activación de la adenilato ciclasa y al incremento en los niveles de AMPc celular. En presencia continua de elevadas concentraciones de estímulo, es necesario apagar la señalización del receptor a través del proceso conocido como desensibilización homóloga (57). La desensibilización homóloga inicia con la fosforilación del receptor activo por acción de las GRKs, por lo que fue interesante evaluar la fosforilación del receptor HA-hCRF₁ transfectado en células COS-7 después de ser estimulado durante 5 minutos con CRF de ovino a una concentración de 1 μ M, encontrándose un aumento significativo en la fosforilación del receptor HA-hCRF₁ después del tratamiento (Figura 2.1) (58).

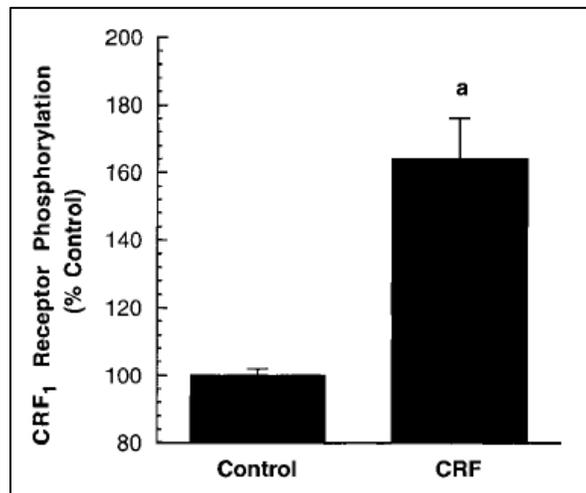


Figura 2.1 Fosforilación del receptor HA-hCRF₁ inducido por la estimulación con CRF. Células COS-7 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ fueron estimuladas durante 5 minutos con CRF 1 μ M.

El siguiente evento importante en la desensibilización homóloga es el reclutamiento de arrestina al receptor activado; por lo que Oakley y

colaboradores evaluaron, mediante microscopía confocal, el reclutamiento de las construcciones β -arrestina1-GFP y β -arrestina2-GFP a la membrana plasmática después de estimular células HEK293 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ con CRF a una concentración de 200 nM a diferentes tiempos de estímulo. Sus resultados (Figura 2.2), muestran que el reclutamiento de β -arrestina2 es más rápido que el de β -arrestina1 al activar al receptor HA-hCRF₁ con CRF (41).

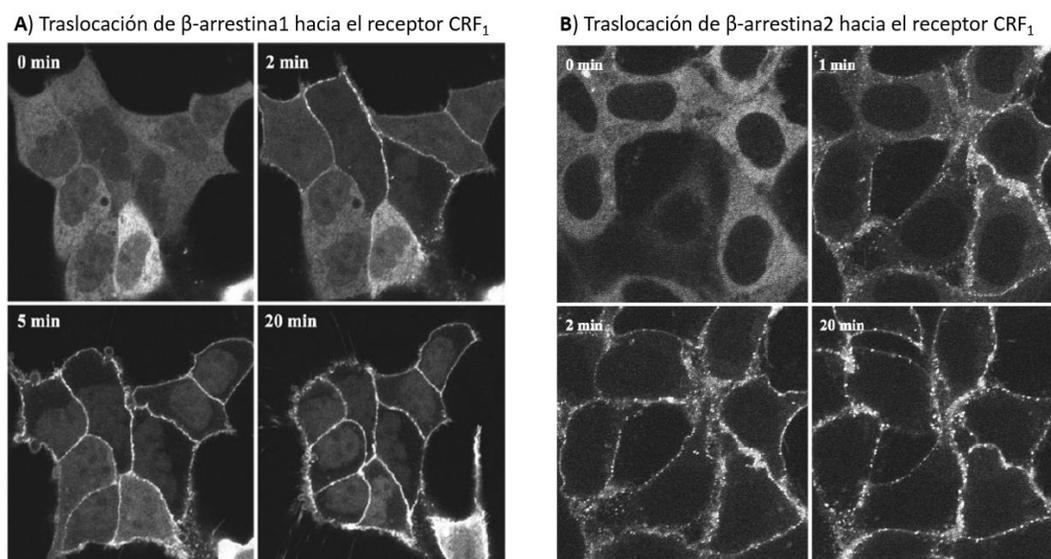


Figura 2.2 Reclutamiento de β -arrestinas tras la activación del receptor HA-hCRF₁ mediante CRF. Imágenes de microscopía confocal que describen la translocación de β -arrestina1-GFP (A) y β -arrestina2-GFP (B) del citosol a la membrana plasmática de células HEK293 que expresan al receptor HA-hCRF₁. Se presenta una lenta movilización de β -arrestina1-GFP después de 2, 5 y 20 minutos de tratamiento con CRF 200 nM comparada con la movilización dado por β -arrestina2-GFP después de 20 segundos, 40 segundos y 20 minutos de tratamiento con CRF 200 nM.

En el mismo trabajo de Oakley y colaboradores del 2007, se evaluó la colocalización de β -arrestina2-GFP y del receptor HA-hCRF₁ después del tratamiento de 30 minutos con CRF a 200 nM en células HEK293 que expresan al receptor HA-hCRF₁. Las imágenes de microscopía confocal de la Figura 2.3 muestran que tras el estímulo con CRF, la proteína β -arrestina2-

GFP se transloca a la membrana plasmática y colocaliza con el receptor HA-hCRF₁. Cabe señalar, que en la imagen se pueden observar marcas del receptor HA-hCRF₁ en el interior de la célula que no colocalizan con la señal de β -arrestina2-GFP (flechas), sugiriendo que el receptor HA-hCRF₁ pertenece a la clase A ya que al ser internalizado presenta una unión transitoria con la arrestina (37,41).

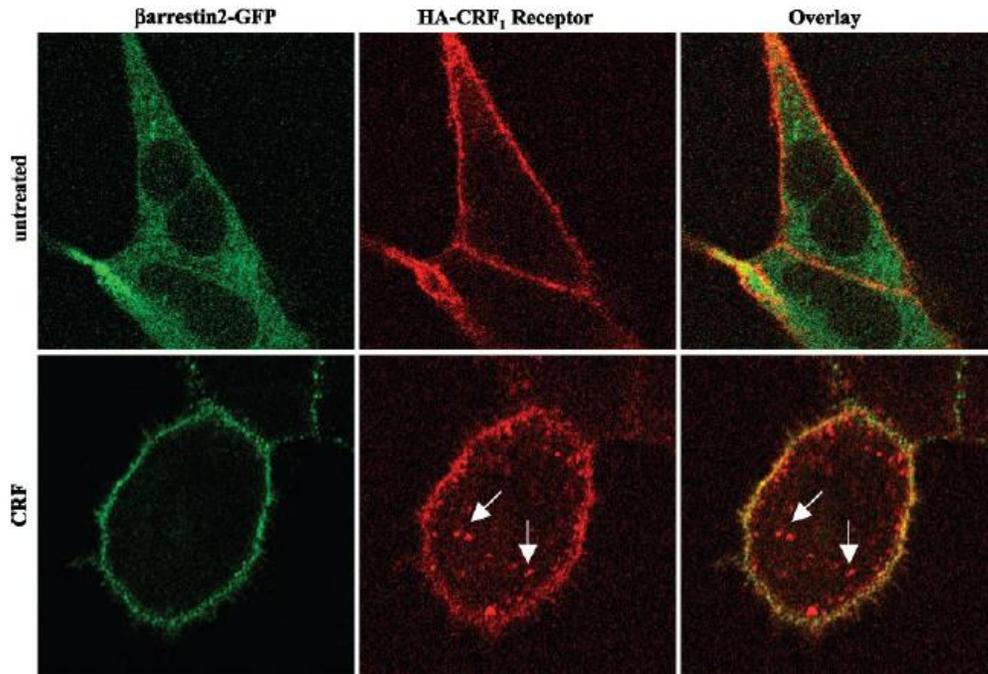


Figura 2.3 La imagen muestra la colocalización de β -arrestina2-GFP y el receptor HA-hCRF₁ en la membrana plasmática (overlay), pero no después de internalizado por CRF. La distribución de β -arrestina2-GFP y el receptor HA-hCRF₁ después del tratamiento con CRF 200 nM durante 30 minutos en células HEK293 transfectadas con dicho receptor.

2.2 Transactivación de receptores para factores de crecimiento por activación del receptor CRF₁.

Los GPCRs tienen la habilidad de aprovechar la activación de la vía mitogénica (MAPK) inducida por receptores para factores de crecimiento, a través de un mecanismo conocido como transactivación. La primera evidencia de la comunicación entre un GPCR y un receptor con actividad de cinasa de tirosina (RTK) fue propuesta por Daub y colaboradores, quienes demostraron que la estimulación con varios agonistas de GPCRs (ácido lisofosfatídico, endotelina-1 y trombina) en células Rat-1 promueve la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), figura 2.4. Esta activación fue inhibida cuando las células fueron tratadas con AG 1478, un inhibidor de la actividad de cinasa del EGFR (59).

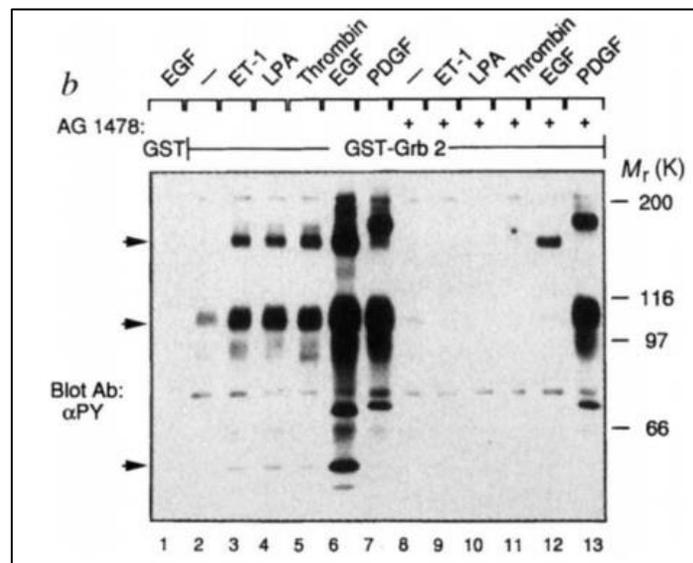


Figura 2.4 Fosforilación del receptor de EGF inducido por agonistas de GPCRs. Fosforilación en residuos de tirosina del EGFR después del tratamiento de 5 minutos con 25 μ M de ácido lisofosfatídico (LPA), 100 nM de endotelina-1 (ET-1), 2 U/mL de trombina, 10

ng/mL de EGF o 30 ng/mL de PDGF, en presencia o ausencia de 250 nM de AG 1478 por 10 minutos.

Desde entonces la transactivación de receptores con actividad de cinasas de tirosina por GPCRs se ha demostrado en varios trabajos, y no solamente del receptor de EGF, sino también para otros receptores para factores de crecimiento incluyendo al receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (60), receptores para el factor de crecimiento vascular endotelial (61), el receptor para el factor de crecimiento parecido a la insulina (62), y receptores para el factor de crecimiento de fibroblastos (63).

Centrándonos en la transactivación del receptor de EGF por los GPCRs se han descrito, hasta el momento, dos posibles mecanismos por los cuales se lleve a cabo la transactivación, figura 2.5. El primer mecanismo depende de la activación de metaloproteasas de la matriz (MMPs) como ADAM. Las MMPs son capaces de liberar al medio extracelular ligandos de EGF (como es el HB-EGF, EGF unido a heparina y neuregulinas) permitiendo que puedan interactuar y activar al EGFR y a otros receptores de la familia del EGFR. La transactivación del EGFR dependiente de metaloproteasas ha sido descrita para diferentes tipos celulares, así como para diferentes ligandos como angiotensina II (64), hormona liberadora de gonadotropina (65), leptina (66), prostaglandinas (67), entre otros.

El segundo mecanismo por el cual es posible que se lleve a cabo la transactivación del EGFR es por medio de la activación de cinasas de tirosina que fosforilen directamente al EGFR o proteínas que participen en este proceso, entre las que se encuentran Src (68–70), PKC (71), proteína cinasa de tirosina 2 (Pyk2) (68) y arrestinas (72,73).

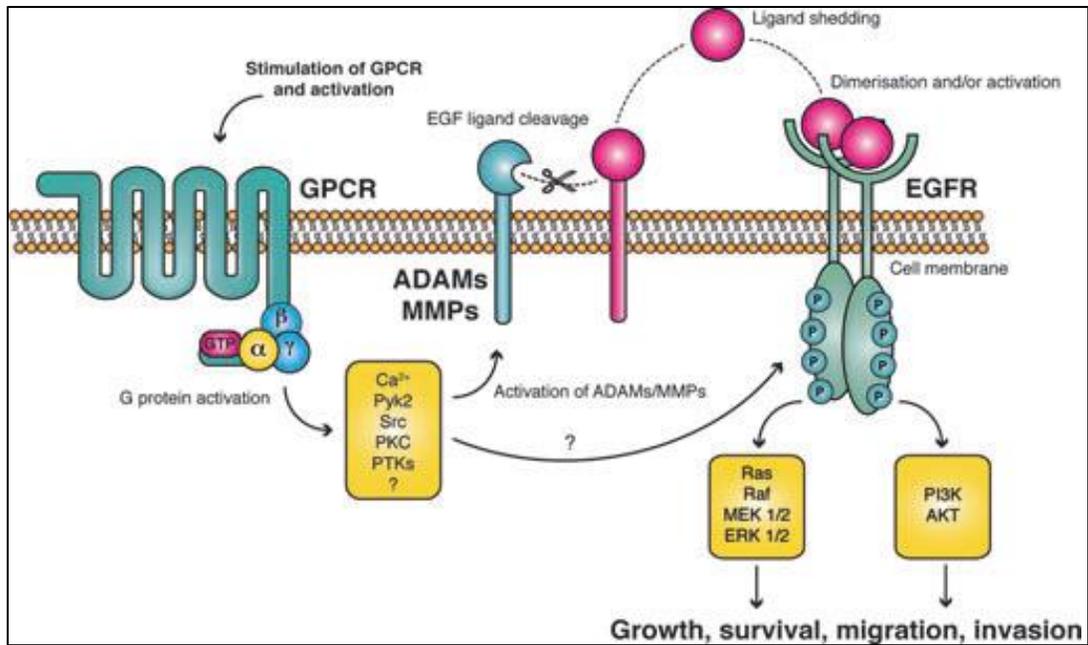


Figura 2.5 Posibles mecanismos para la transactivación del receptor de EGF por GPCRs. La transactivación del EGFR puede ocurrir por dos posibles mecanismos: uno dependiente de la activación de metaloproteasas que liberan al medio extracelular el ligando para la activación del EGFR; y uno dependiente de la activación de cinasas que fosforilen y activen directamente al receptor de EGFR (Tomado de George 2013) (66).

2.3 Transactivación del receptor de EGF inducido por el receptor CRF₁

Como ya se mencionó, la participación de receptores para factores de crecimiento en la señalización de los GPCRs constituye un mecanismo común en las acciones mitogénicas de los GPCRs. Punn y colaboradores observaron que al estimular células HEK 293-R1 α con 100 nM de UCN I durante 5 minutos, en presencia del pretratamiento con el inhibidor de la actividad de cinasa del receptor de EGF, AG 1478 (1 μ M, 30 minutos), la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF₁ disminuye, concluyendo la participación del receptor de EGF en la señalización del receptor CRF₁ en estas células, figura 2.6 (28).

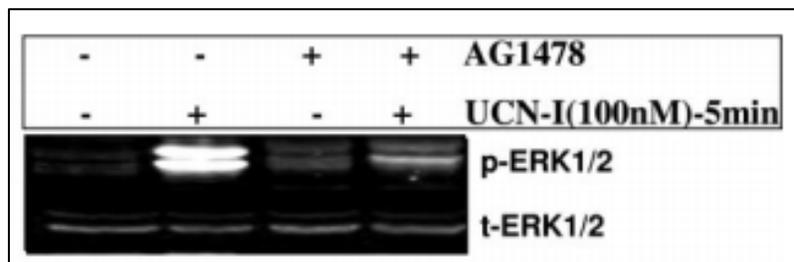


Figura 2.6 Efecto del inhibidor AG 1478 en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF₁. Fosforilación de ERK 1/2 inducida por un estímulo de 5 minutos con 100 nM de UCN I en células HEK 293-R1 α en presencia o ausencia del pretratamiento con AG1478 (1 μ M, 30 minutos) (28).

De igual forma, los datos no publicados de Olivares-Reyes y colaboradores sugieren la participación del EGFR en la activación de ERK 1/2 inducido por el receptor CRF₁. Esto se demostró en células COS-7 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ y estimuladas durante 10 minutos con 100 nM de CRF en presencia o ausencia del pretratamiento con 100 nM de AG 1478 por 30 minutos. Se observa que la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF

disminuye significativamente cuando se inhibe al receptor de EGF (figura 2.7).

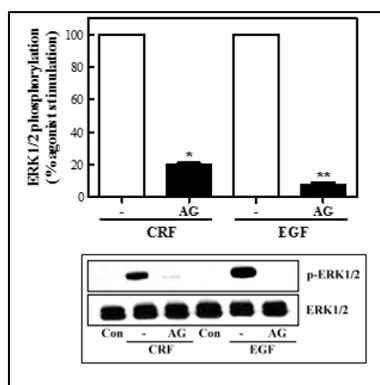


Figura 2.7 Efecto del inhibidor AG 1478 en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF₁. Fosforilación de ERK 1/2 inducida por un estímulo de 10 minutos con CRF 100 nM en células COS-7 en presencia o ausencia del pretratamiento con AG1478 (100 nM, 30 minutos).

Como ya se mencionó, la transactivación del receptor de EGF por un GPCR puede deberse a la activación de alguna proteína que pueda activar o fosforilar directamente al EGFR por lo que Olivares-Reyes y colaboradores evaluaron la activación de la cinasa Src tras estimular con 100 nM de CRF células COS-7 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁. Encontraron que en la señalización del receptor CRF₁ se encuentra activada la cinasa Src, como puede observarse en la figura 2.8.

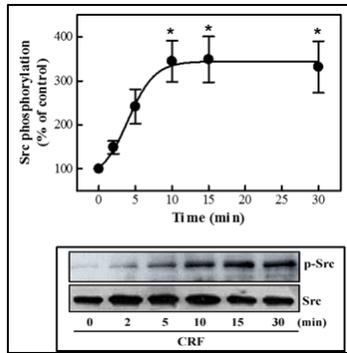


Figura 2.8 Fosforilación de Src inducida por el receptor CRF₁. Células COS-7 que expresan al receptor HA-hCRF₁ fueron estimuladas con CRF 100 nM evaluando la fosforilación de Src.

Al encontrar de forma activa a Src en la señalización del receptor CRF₁ y sabiendo que podría estar fosforilando directamente al EGFR, se evaluó la fosforilación en la tirosina 845 del receptor EGF, posición fosforilada únicamente por la cinasa Src (74,75). Se encontró que esta fosforilación está presente en el receptor de EGF inducido por CRF, sugiriendo que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la transactivación del receptor de EGF por CRF₁ es a través de la participación de la cinasa Src (Fig. 2.9).

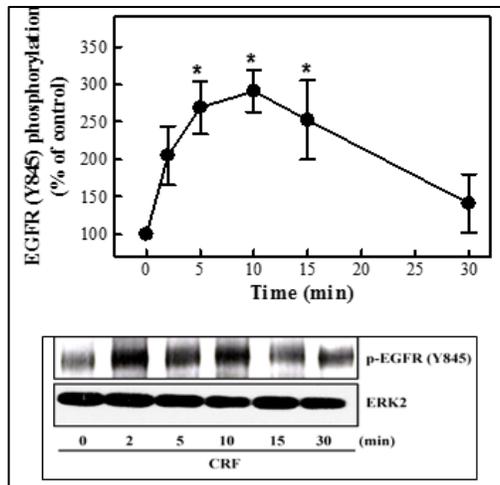


Figura 2.9 Fosforilación en la tirosina 845 del receptor de EGF inducido por el receptor CRF₁. Células COS-7 que expresan al receptor HA-hCRF₁ fueron estimuladas con CRF 100 nM, evaluando la fosforilación del receptor de EGF en la tirosina 845.

2.4 Participación de la proteína β -arrestina2 en la señalización del receptor CRF₁

La unión de β -arrestina2 al GPCR permite activar vías transduccionales al reclutar diferentes proteínas, promoviendo una respuesta independiente de la generada con proteínas Gs. Utilizando el mismo modelo celular, Olivares-Reyes evaluó la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF 100nM al sobreexpresar β -arrestina2 en las células COS-7 (figura 2.10). La sobreexpresión de β -arrestina2 aumenta la fosforilación de ERK 1/2, sugiriendo que la β -arrestina2 participa en la señalización del receptor CRF₁.

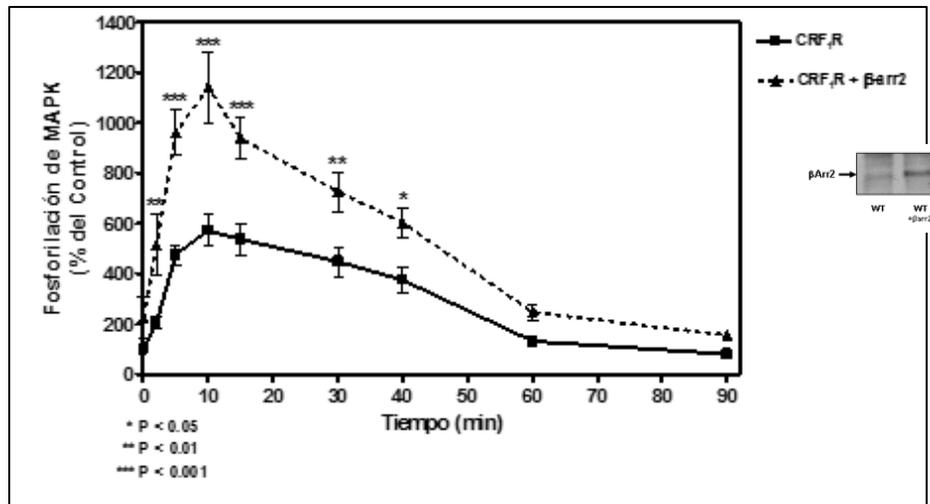


Figura 2.10 Efecto de la sobreexpresión de β -arrestina2 en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF. Células COS-7 fueron co-transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ y β -arrestina2 y estimuladas con CRF 100 nM donde se evaluó la fosforilación de ERK 1/2.

III. JUSTIFICACIÓN

Además de la función de desensibilización del sistema y el papel en la internalización de los receptores, la proteína β -arrestina2 puede estar involucrada en la activación de varias vías transduccionales.

En distintos modelos celulares, se ha comprobado que la vía transduccional de las MAPK se encuentra activada en la señalización del receptor CRF₁. En antecedentes del laboratorio se encontró que la vía de las MAPK inducida por CRF₁, es mediada por la transactivación del receptor de EGF en células COS-7.

Aunado a lo anterior, se sabe que en la señalización inducida por el receptor CRF₁ se encuentra activada la cinasa Src; sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo dicha activación.

Por tal motivo, en el presente trabajo se pretende determinar la participación de la proteína β -arrestina2 en la activación de las MAPK dependiente de la cinasa Src.

IV. HIPÓTESIS

La activación de la cinasa Src en la señalización del receptor para el Factor Liberador de Corticotropina tipo 1 (CRF₁) es mediada por la proteína β -arrestina2.

En la figura siguiente se muestra el modelo propuesto para la señalización del receptor CRF₁.

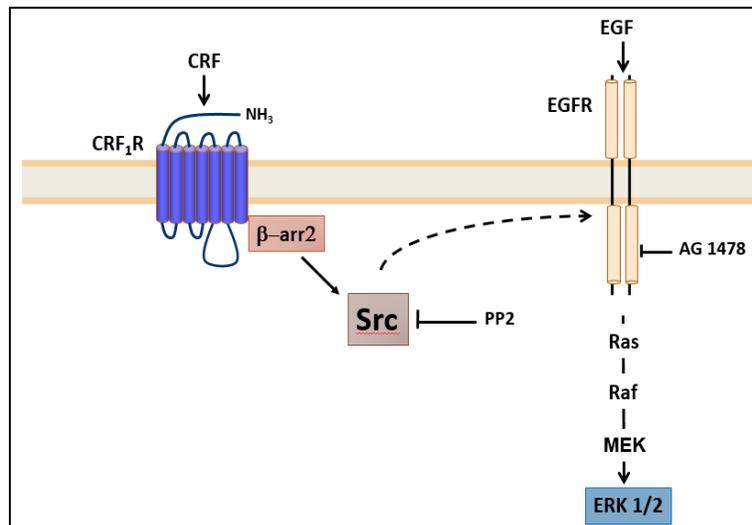


Figura 4.1 Modelo hipotético en la señalización del receptor CRF₁. Al activar el receptor CRF₁ con CRF se inicia el mecanismo de regulación en donde se une la proteína β -arrestina2. A su vez, β -arrestina2 provoca la activación de la cinasa Src, la cual promueve la transactivación del receptor de EGF. La transactivación del receptor de EGF activará finalmente la vía de señalización de las MAPK finalizando con la activación de ERK 1/2.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la β -arrestina2 como mediadora de la activación de la cinasa Src en la señalización del receptor CRF₁, mediante el uso de células MEF-WT y MEF-KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la presencia o ausencia de la proteína β -arrestina2 en las células MEF-WT y MEF-KO- β -arrestina2.
- Evaluar la funcionalidad del sistema mediante la determinación de AMPc producido por un estímulo con CRF en las células MEF-WT y MEF-KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF1. Realizar la caracterización de los cultivos celulares.
- Determinar la fosforilación de ERK 1/2 y Src por la activación del receptor CRF₁ en células MEF-WT.
- Mediante el uso de inhibidores, examinar la participación de Src y del receptor de EGF en la fosforilación de ERK 1/2 por la activación del receptor CRF₁ en células MEF-WT.
- Determinación la participación de β -arrestina2 en la fosforilación de ERK 1/2 y Src por la activación del receptor CRF₁ en células MEF-KO- β -arrestina2.
- Mediante el uso de inhibidores, examinar la participación de Src y del receptor de EGF en la fosforilación de ERK 1/2 por la activación del receptor CRF₁ en células MEF-KO- β -arrestina2.

VII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 Cultivo celular

En este proyecto se utilizaron células fibroblásticas de embrión de ratón (MEF) originadas de ratones wild type (WT) y knock out (KO) para la proteína β -arrestina2 y provenientes del laboratorio del Dr. Robert Lefkowitz de la Universidad Duke en Carolina del Norte, Estados Unidos (76).

Las células se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, a una temperatura de 37° C, en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂.

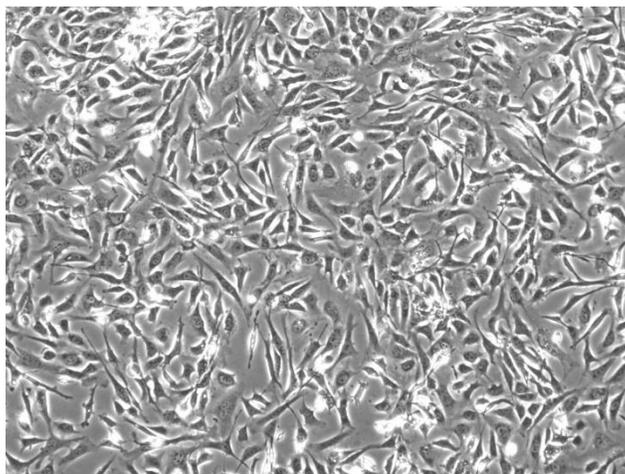


Figura 7.1 Células MEF.

7.2 Transfección

Debido a que las células MEF-WT y KO- β -arrestina2 no expresan endógenamente el receptor CRF₁, las células se transfectaron de forma transitoria con el receptor HA-hCRF₁, obtenido y transfectado previamente en células COS-7 por Hauger y colaboradores (58), utilizando la siguiente metodología:

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 10 cm hasta que alcanzaron una confluencia de ~70%. En un tubo nuevo de 15 mL se preparó la mezcla de transfección, adicionando 4 mL de medio DMEM sin suero por cada caja de cultivo de 10 cm a transfectar. Se agregaron 16 μ L de lipofectamina 2000 (*Invitrogen, número de catálogo 11668*) por cada 4 mL de medio sin suero, teniendo cuidado de no tocar las paredes del tubo. Se mezcló con vórtex y se incubó el tubo por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.75 μ g de plásmido pcDNA3.1 que contiene la secuencia del receptor HA-hCRF₁ por cada mL de medio sin suero en el tubo. Se mezcló lentamente y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se les retiró el medio a las cajas de cultivo, se lavaron con 2 mL de medio DMEM sin suero y se les agregó 4 mL de la mezcla de transfección. Se incubaron las células durante 6 horas a una temperatura de 37°C y 5% CO₂ y, finalmente, se retiró la mezcla de transfección de las cajas de cultivo y se adicionó medio DMEM completo.

7.3 Experimentos

Después de la transfección, las células MEF-WT y KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ fueron resembradas en cajas de cultivo de 6 o 24 pozos, según el tipo de experimento a realizar. Las células se mantuvieron en medio DMEM completo y después de cuarenta y ocho horas post-transfección se realizaron los experimentos. Se realizaron dos tipos de experimentos:

Curso temporal estimulando con 100 nM de CRF de rata/humano (*Bachem, número de catálogo H2435*) por 0, 2, 5, 10, 30 y 60 minutos. Para este experimento, se les retiró el medio completo a las cajas de cultivo de 6 pozos y se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas. Pasado este tiempo, se inició con los estímulos. Una vez terminados los experimentos, se detuvo

la reacción en frío y se lavaron los pozos con buffer de fosfatos (PBS) frío (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4); las células se lisaron con buffer Laemmli 1x (SDS 20%, β-mercaptoetanol 10% y agua).

Uso de inhibidores. Se usaron dos tipos de inhibidores: el compuesto AG 1478 (*Calbiochem, número de catálogo 658552*) el cual es un inhibidor de la actividad de cinasa del receptor de EGF, a una concentración de 100 nM y adicionándolo 30 minutos antes del tratamiento el cual consistió en un estímulo de 10 minutos, ya sea con EGF (*Calbiochem, número de catálogo 13247-051*) a una concentración de 10 ng/mL o con CRF 100 nM; y el compuesto PP2 (*Calbiochem, número de catálogo 529573*), el cual es un inhibidor competitivo de la cinasa c-Src, a una concentración de 20 μM y agregándolo 30 minutos antes del estímulo con CRF 100 nM. Para este experimento, el medio completo de las cajas de cultivo de 6 pozos se cambió por medio sin suero y después de 6 horas, se adicionó el inhibidor y después se estimuló con el ligando correspondiente. Una vez terminados los experimentos, se detuvo la reacción en frío y se lavaron los pozos con buffer de fosfatos (PBS) frío y las células se lisaron con buffer Laemmli 1x.

7.4 Determinación de AMPc endógeno

Se realizó la determinación de AMPc por medio de un ensayo de competencia con [³H]-AMPc. En este ensayo se realizó la determinación de AMPc a diferentes concentraciones de CRF las cuales fueron 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 nM. La metodología para este ensayo fue la siguiente:

Células MEF (WT y KO-βarrestina2) transfectadas con el receptor CRF₁ fueron sembradas en cajas de cultivo de 24 pozos hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. Se aspiró el medio de cada pozo y se agregó 250 μL de solución KRH conteniendo 1 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). Las

cajas de cultivo se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Se adicionó CRF en las concentraciones indicadas en volúmenes de 11 µL (se ajustó el volumen de los controles con 11 µL con agua mili-Q y se adicionó 11 µL de forskolina 250 µM como control positivo). Se incubaron las cajas de cultivo en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Se retiró el medio de incubación para después detener la reacción adicionando 250 µL de HCl 0.1 N frío. Se colocaron las cajas de cultivo sobre hielo durante 15 minutos. Se adicionó 25 µL de NaOH 1N y 100 µL de solución Tris-HCl 1 M, pH 7.2. Se revisó el pH de las muestras (debe de estar cercano a 7). Las cajas se centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Se preparó AMPc (1 mM), la subunidad regulatoria de PKA (a una concentración de 0.5 UI/muestra) y [³H]-AMPc (10 nM) en un buffer de incubación que contiene 50 mM Tris-HCl, 100 nM NaCl, 5 mM EDTA y 5 mg/mL de BSA pH 7.0 a 4°C. Las muestras se prepararon en tubos tipo binding, de acuerdo a la tabla 7.1:

	Buffer de incubación (µL)	AMPc (µL)	Muestra (µL)	[³ H]-AMPc (µL)	PKA (µL)
Unión máxima	50	-	-	50	25
Unión mínima	-	50	-	50	25
Muestra	-	-	50	50	25

Tabla 7.1 Preparación de muestras para determinación de la acumulación de AMPc.

Posteriormente, las muestras se dejaron incubando a 4°C durante 2.5 horas, para después filtrarlas utilizando un sistema Brandel Harvesters en papel Withman GF/B, previamente empapados de polietilenimina al 0.3% haciendo

tres lavados con agua desionizada. La radioactividad retenida en los filtros fue determinada por contador de centelleo.

7.5 Inmunodetección (Western Blot)

Para la detección de las proteínas β -arrestina1, β -arrestina2, pERK 1/2, pSrc, ERK2 y β -tubulina se utilizó la técnica de Western Blot, siguiendo la metodología siguiente:

Las muestras fueron sonicadas dando pulsos a 40 Khz durante 20 segundos (*Sonios Vibra Cell, Ultrasonic Processor*). Se calentaron a 99° durante 5 minutos con agitación de 950 rpm (*Thermomixer Comfort Eppendorf*), después se centrifugaron a 14500 rpm por 5 minutos (*MiniSpinPLUS Eppendorf*). Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% para llevar a cabo una electroforesis a un voltaje de 120V. Posteriormente, se realizó una transferencia semiseca (Trans Blot SD, Transfer Cell, BIO-RAD) a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) durante 1 hora a 15 V. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBS (Tris Base 20 mM, NaCl 137 mM) con Tween 20 al 0.1% (TBST) (v/v) durante una hora. Se incubó con el anticuerpo primario toda la noche, siguiendo tres lavados con TBST al 0.1% de 10 minutos cada uno. Se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora y se volvieron a lavar las membranas con TBST 0.1%, tres veces por 10 minutos cada uno. Las membranas se revelaron con un kit de quimioluminiscencia.

7.6 Anticuerpos

Detección de β -arrestina2.

Para detectar la presencia de las β -arrestinas, se utilizó el anticuerpo policlonal que reconoce la secuencia peptídica

RLVIRKVQFAPEKPGPQPSAETTRHFLMSDRSLHLEASLDKELYHGEPL, la cual se encuentra tanto en la proteína β -arr1 como en la β -arr2. El anticuerpo se usó a una dilución 1:5000 en TBST 0.1%. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-rabbit a una dilución 1:8000 en leche al 2% con TBST 0.1%.

Detección de fosfo-ERK 1/2-Thr202/Tyr204.

Para detectar el estado de fosforilación de ERK 1/2, se utilizó el anticuerpo policlonal que reconoce los residuos treonina 202 y tirosina 204 de ERK 1 (treonina 185 y tirosina 187 en ERK2), a una dilución 1:20000 en TBST 0.1%. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-rabbit a una dilución 1:16500 en leche al 2% con TBST 0.1%.

Detección de fosfo-Src-Tyr416.

Para detectar el estado de fosforilación de c-Src, se utilizó el anticuerpo policlonal que reconoce al residuo tirosina 416, a una dilución 1:16000 en TBST 0.1%. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-rabbit a una dilución 1:11000 en leche al 2% con TBST 0.1%.

Detección de ERK 2.

Con la finalidad de usar ERK 2 como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal, a una dilución 1:11000. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-rabbit a una dilución 1:11000.

Detección de β -tubulina.

Con la finalidad de usar β -tubulina como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal, a una dilución 1:11000. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-mouse a una dilución 1:11000.

En la tabla 7.2 se encuentran resumidas las condiciones y las características de los anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas antes mencionadas.

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Compañía, número de catálogo
β -arrestina1/2	1:5000 en TBST0.1%	1:8000 en leche al 2% con TBST 0.1%	Novus biologicals, NB300-587
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	1:20000 en TBST0.1%	1:16500 en leche al 2% con TBST 0.1%	Cell signaling, 9101
p-Src Tyr416	1:16000 en TBST0.1%	1:11000 en leche al 2% con TBST 0.1%	Cell signaling, 2101
ERK 2	1:11000 en leche al 5% con TBST0.1%	1:11000 en leche al 5% con TBST0.1%	Santa Cruz Biotechnology, 154
β -tubulina	1:11000 en leche al 5% con	1:11000 en leche al 5% con	Santa Cruz Biotechnology,

	TBST0.1%	TBST0.1%	5274
--	----------	----------	------

Tabla 7.2 Anticuerpos y condiciones utilizados en el trabajo.

7.7 Análisis

Los autoradiogramas fueron escaneados y las cuantificaciones se realizaron con el programa imageJ. Los valores obtenidos del área bajo la curva de cada pico fueron utilizados para hacer las gráficas con el programa GraphPad Prism 5, realizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por un post-análisis de Dunnett, para los resultados de los cursos temporales.

Para comparar los resultados obtenidos de las células MEF WT y las de MEF KO- β -arrestina2 se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido por un post-análisis de Bonferroni.

Los resultados obtenidos en la expresión de β -arrestina1 y β -arrestina2 se analizaron mediante una prueba t no pareada.

Los resultados de los experimentos en donde se usaron los inhibidores se analizaron utilizando una prueba no paramétrica, seguido de un post-análisis de Dunns.

VIII. RESULTADOS

8.1 Las células MEF KO- β -arrestina2 carecen de la proteína β -arrestina2.

Dentro de la caracterización de los cultivos, se llevó a cabo la identificación de la proteína β -arr2 tanto en las células MEF WT- β -arrestina2 y MEF-KO- β -arrestina2 por medio de la técnica de western blot.

Se utilizó un anticuerpo que reconoce a la β -arrestina1 y a la β -arrestina2, como se muestra en la imagen, las células MEF KO- β -arr2 no expresan la proteína β -arr2. De manera interesante, se observa un incremento en los niveles de la proteína β -arr1 en las células MEF KO.

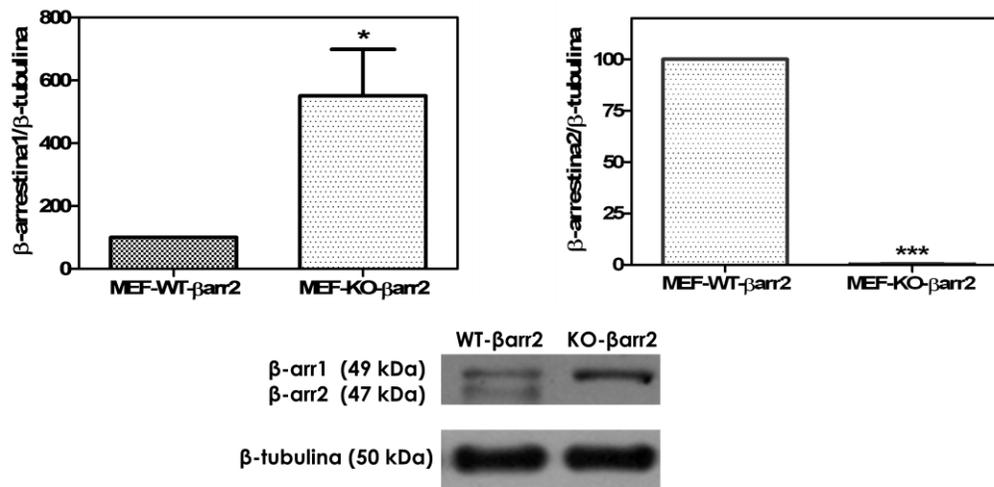


Figura 8.1 Expresión de β -arrestina1 y β -arrestina2 en células MEF WT y MEF KO- β -arrestina2. Muestras de lisados de células MEF WT y MEF KO- β -arrestina2 se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y por medio de la técnica de western blot se identificaron las proteínas β -arrestina1 (β -arr1) y β -arrestina2 (β -arr2), (n=4). Los datos fueron analizados por un prueba t no pareada, * $p < 0.05$ vs MEF WT- β -arrestina2 *** $p < 0.001$ vs MEF WT- β -arrestina2.

8.2 El CRF promueve la fosforilación de ERK 1/2 respecto al tiempo post-transfección en células MEF WT- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁.

Con el fin de saber si la transfección fue exitosa, las células MEF WT- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ fueron estimuladas con CRF 100 nM después de 24, 36 y 48 horas de transfección observándose una mayor fosforilación de ERK 1/2 a las 48 horas post-transfección (Fig. 8.2). Por lo anterior se decidió llevar a cabo todos los experimentos a partir de 48 horas después de realizada la transfección del receptor CRF₁.

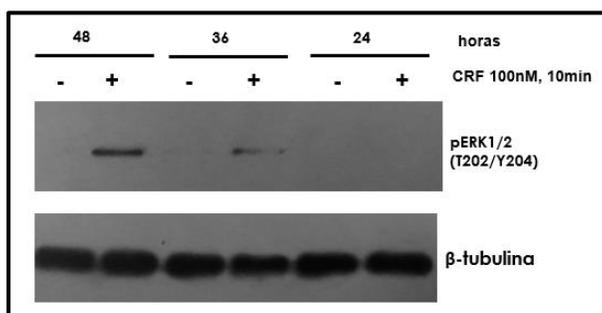


Figura 8.2 Fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF-WT- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁. Muestras obtenidas 24, 36 y 48 horas después de transfección de lisados de células MEF-WT- β -arrestina2 se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y por medio de la técnica de Western Blot se identificaron las proteínas ERK 1/2 fosforilado en los residuos de treonina 202/tirosina 204 y β -tubulina como control de carga, (n=1).

8.3 Las células MEF-WT- β -arrestina2 y KO- β -arrestina2 son funcionales.

Con el fin de evaluar la funcionalidad del sistema, se llevó a cabo la determinación de AMPc producido en respuesta al estímulo con CRF en células MEF WT- β -arrestina2/HA-hCRF₁R y KO- β -arrestina2/HA-hCRF₁R. El receptor CRF₁ se acopla a la subunidad α_s de la proteína G, lo que provoca la activación de la adenilato ciclasa y por lo tanto la producción de AMPc. Al estimular las células MEF WT- β -arrestina2 y KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ con concentraciones crecientes de CRF (0.1 nM -10 μ M) y cuantificar la acumulación de AMPc podemos evaluar la funcionalidad del sistema transfectado.

Como puede observarse en la figura 8.3, en las células MEF-WT- β -arrestina2 aumenta 637% (respecto al basal) los niveles de AMPc al estimularlas con 10 μ M de CRF, obteniéndose una EC50 de 1300 nM. En el caso de las células MEF KO- β -arrestina2, los niveles de AMPc aumentan un 2855% (respecto al basal) al ser estimuladas con 10 μ M de CRF, resultando una EC50 de 680 nM. Se puede observar una mayor producción de AMPc generado por CRF en las células MEF-KO- β -arrestina2 significativamente diferente a partir de 1 μ M de CRF.

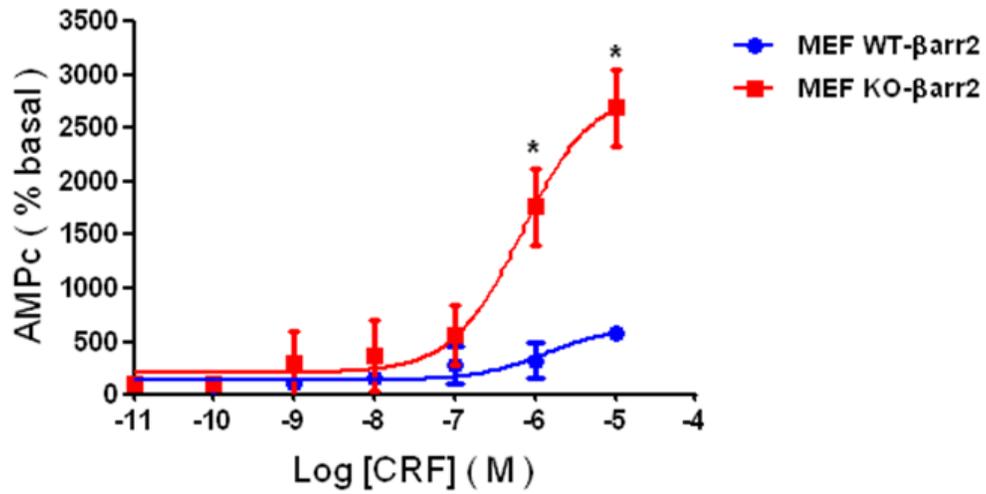


Figura 8.3 Acumulación de AMPc endógeno en células MEF WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes (0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM y 10 μM) de CRF para después cuantificar la acumulación de AMPc generado (n=6, para células MEF WT-β-arrestina2; n=5 para las células MEF KO-β-arrestina2). Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de un post-análisis de Bonferroni y se muestran como la media ± Desv estándar, *p<0.05 vs MEF WT-β-arrestina2.

8.4 β -arrestina2 participa en la activación de ERK 1/2 inducido por el receptor CRF₁.

De acuerdo a los antecedentes presentados, la activación del receptor CRF₁ por CRF o UCN-1 promueve la activación de ERK 1/2, mecanismo que de acuerdo a datos previos del laboratorio involucra la participación de la proteína β -arr2. Para evaluar la participación de esta proteína en las acciones del CRF, se hizo un curso temporal (0, 2, 5, 10, 30 y 60 minutos) estimulando con 100 nM de CRF tanto las células MEF-WT- β -arrestina2 como las células MEF-KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁ determinando la fosforilación de ERK 1/2 en Thr202/Tyr204, residuos que al ser fosforilados indican que las ERK 1/2 se encuentran activadas.

Como se muestra en la figura 8.4, a partir de los 5 minutos de estímulo con CRF se observa una fosforilación significativa de ERK 1/2 en las células MEF WT- β -arrestina2 y a partir de los 5 min en las células MEF KO- β -arrestina2. Cuando se compara el efecto de CRF entre las células WT y KO se puede observar una clara diferencia en la magnitud y la temporalidad del efecto entre ambas líneas celulares (Fig 8.5), siendo mayor y sostenido el efecto en las células WT, alcanzando la respuesta máxima a los 5 min y disminuyendo en función del tiempo, pero nunca retornando al nivel basal. Por el contrario, el CRF induce una respuesta rápida y transitoria que disminuye a partir de los 10 minutos llegando hasta el nivel basal después de 60 minutos de estímulo. Estos datos sugieren que hay dos posibles mecanismos involucrados en la activación de ERK 1/2: uno dependiente de β -arr2 y otro independiente de ésta, posiblemente dependiente de la señalización de las proteínas G activadas por el receptor CRF₁.

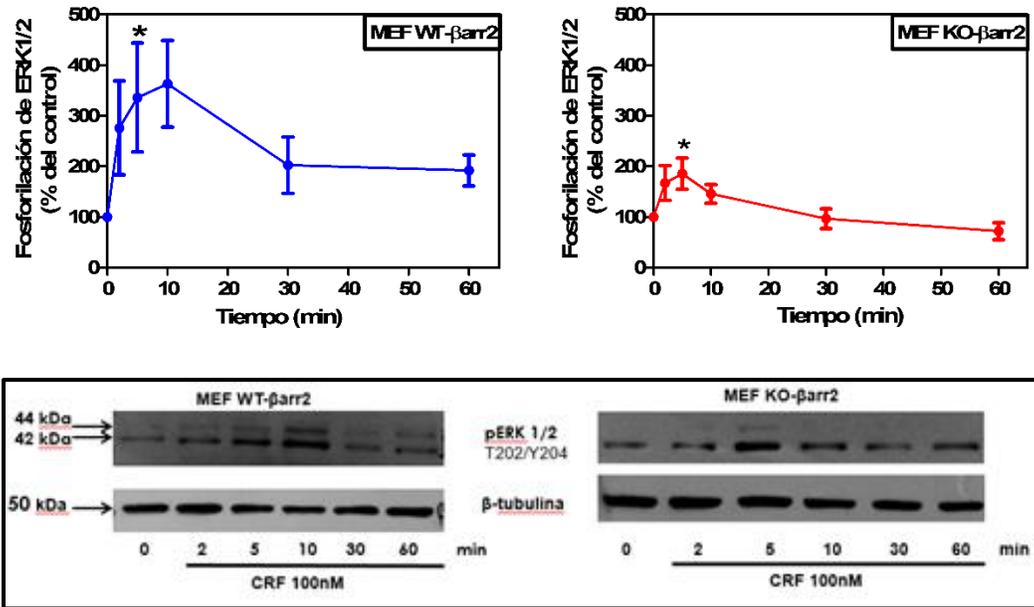


Figura 8.4 Fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF-WT- β -arrestina2 y MEF-KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁. Células MEF WT- β -arrestina2 (panel izquierdo) y MEF KO- β -arrestina2 (panel derecho) fueron estimuladas con CRF 100 nM a los 2, 5, 10, 30 y 60 minutos. (n=9, para células MEF WT- β -arrestina2; n=10 para las células MEF KO- β -arrestina2) Los datos fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un post-análisis de Dunnet y se muestran como la media \pm SEM, *p<0.05 vs control.

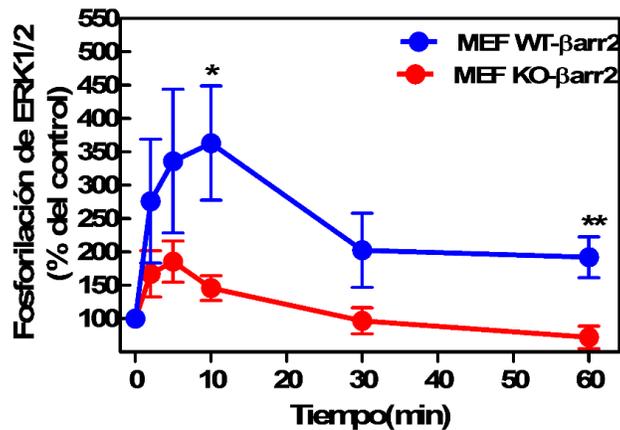


Figura 8.5 Fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF WT- β -arrestina2 y KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁, comparación entre ambas líneas celulares. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de un post-análisis de Bonferroni y se muestran como la media \pm SEM, *p<0.05 vs MEF WT- β -arrestina2.

8.5 Las células MEF-WT y MEF-KO- β -arrestina2 responden al estímulo con EGF.

En otros modelos celulares, se ha descrito la transactivación del receptor de EGF como parte del mecanismo responsable de la activación de las ERK 1/2 por acción del CRF/CRF₁R. Con la finalidad de evaluar si las células MEF WT y MEF-KO responden a EGF, estas fueron transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ y estimuladas con 10 ng/mL de EGF durante 10 minutos, evaluando la fosforilación de ERK 1/2. Como se observa en la figura 8.6, el EGF induce la fosforilación de las ERK 1/2 (250 \pm 37% en células WT y 243 \pm 34% en células KO), efecto de similar magnitud en ambos tipos celulares. Esta respuesta fue inhibida totalmente por el pre-tratamiento de 30 minutos con el inhibidor específico del receptor de EGF, AG 1478, a una concentración de 100 nM (94 \pm 18% en células WT y 97 \pm 28% en las KO, figura 8.6). Ambos tipos celulares presentan una respuesta significativamente igual (utilizando la prueba estadística Bonferroni), lo que nos sugiere que la proteína β -arr2 no participa en la vía de señalización de las MAPK por acción del EGF.

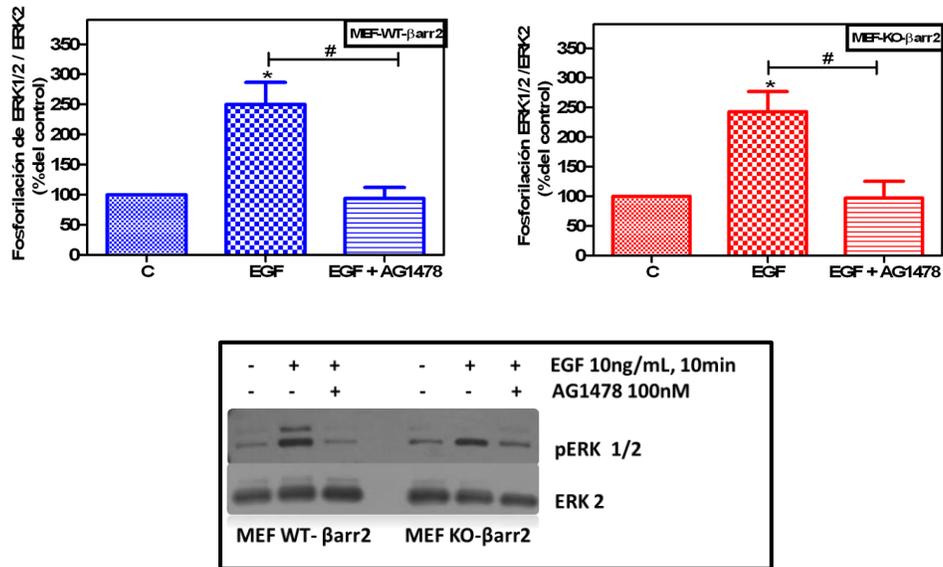


Figura 8.6 Fosforilación de ERK 1/2 inducida por EGF en las células MEF WT-β-arrestina2 y MEF KO-β-arrestina2. Células MEF WT-β-arrestina2 (panel izquierdo) y MEF KO-β-arrestina2 (panel derecho) transfectadas con el receptor CRF₁ fueron pretratadas durante 30 minutos con 100 nM de AG 1478 y posteriormente estimuladas con 10 ng/mL de EGF durante 10 minutos, para finalmente evaluar la fosforilación de ERK1/2 (n=4, para ambos tipos celulares). Los datos fueron analizados con una prueba no paramétrica, seguido de un post-análisis de Dunns y se muestran como la media ± SEM, *p<0.05 vs control, # p<0.05 vs CRF.

8.6 La activación de ERK 1/2 inducida por CRF es bloqueada por el inhibidor del receptor de EGF.

Al demostrar que las células MEF-WT y -KO responden al EGF y que este efecto depende de la activación del receptor para EGF, se evaluó la dependencia de la transactivación del receptor de EGF en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células MEF WT y KO transfectadas con el receptor HA-hCRF₁. Las células fueron pretratadas durante 30 minutos con 100 nM de AG 1478 y estimuladas por 10 minutos con 100 nM de CRF. En las figuras 8.7 y 8.8 se puede observar como en ambos tipos celulares, la activación de ERK 1/2 ($165 \pm 8\%$ en células WT y $126 \pm 19\%$ en las KO) es bloqueada al utilizar el inhibidor del receptor de EGF ($107 \pm 15\%$ en células WT y $105 \pm 20\%$ en las KO), sugiriendo que en la señalización del receptor CRF₁, la activación de ERK 1/2 depende e independiente de β -arr2 es debida a la transactivación del receptor de EGF.

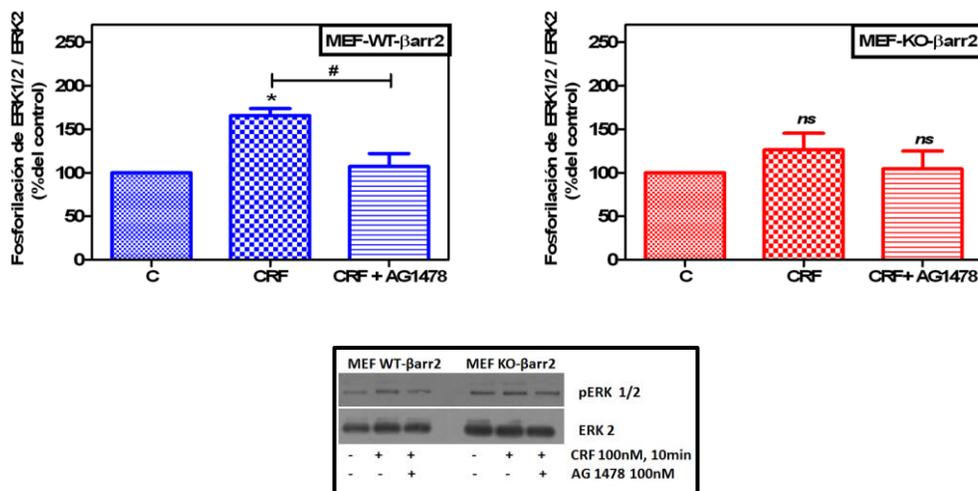


Figura 8.7 Efecto del inhibidor del receptor de EGF en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF en las células MEF-WT- β -arrestina2 y MEF-KO- β -arrestina2. Células MEF-WT (panel izquierdo) y MEF-KO (panel derecho) transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ fueron pretratadas durante 30 minutos con 100 nM de AG 1478 y posteriormente estimuladas con 100 nM de CRF por 10 minutos, para finalmente evaluar la fosforilación de ERK 1/2. (n=4,

para ambos tipos celulares). Los datos fueron analizadas con una prueba no paramétrica seguido de un post-análisis de Dunns y se muestran como la media \pm SEM, * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs CRF ns: no significativo.

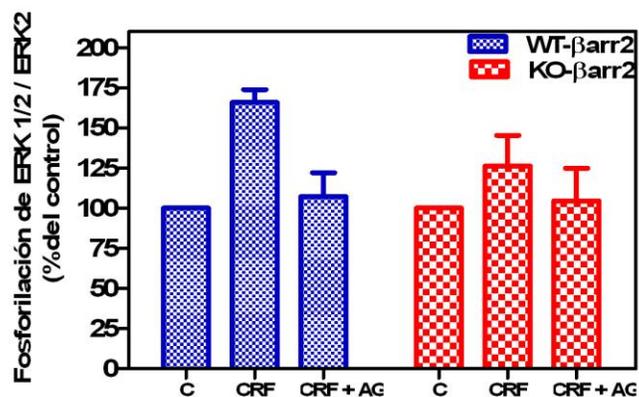
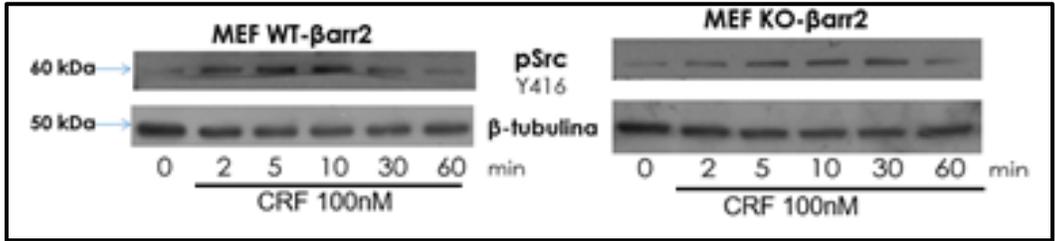
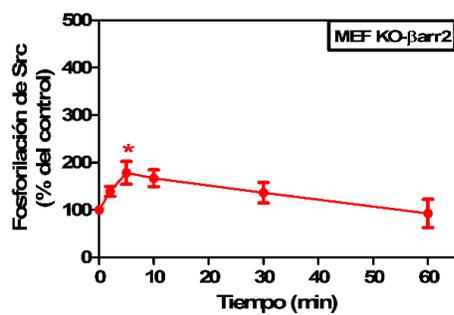
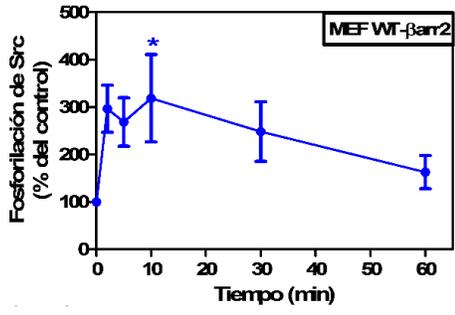


Figura 8.8 Efecto del inhibidor del receptor de EGF en la fosforilación de ERK 1/2 inducido por CRF en las células MEF-WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁, comparación entre ambas líneas celulares. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de un post-análisis de Bonferroni y se muestran como la media \pm SEM, ns: no significativo, C: control, AG: AG1478.

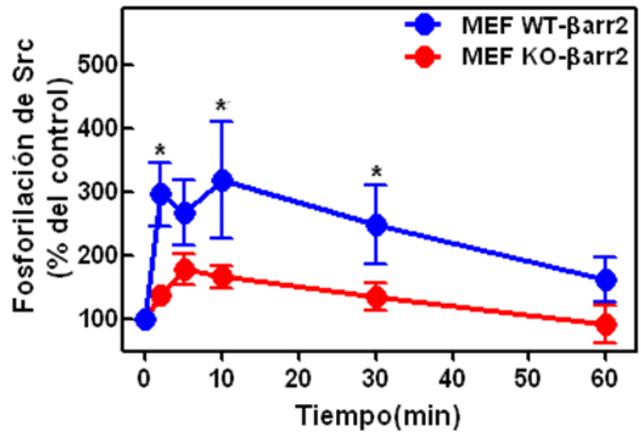
8.7 La proteína β -arrestina2 participa en la activación de c-Src inducida por CRF.

Al bloquear la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF con el inhibidor del receptor de EGF, nos sugiere que en este modelo existe transactivación del receptor de EGF en la señalización del receptor CRF₁. Por tal motivo, se planteó la posibilidad de que al igual que en el modelo utilizado por Olivares-Reyes (figuras. 2.8 y 2.9), la transactivación del receptor de EGF se lleve a cabo debido a la activación de una cinasa de tirosinas capaz de fosforilar y activar al receptor de EGF, por lo que se evaluó la activación de Src al identificar su estado activo con la fosforilación en la tirosina 416. Se realizó un curso temporal (0, 2, 5, 10, 30 y 60 minutos) estimulando con 100 nM de CRF células MEF-WT y KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ y se evaluó la fosforilación de c-Src. Como puede observarse en la figura 8.9, existe fosforilación significativa a partir de los 10 minutos en las células MEF-WT, mientras que en las células MEF KO- β -arrestina2 es a partir de los 5 minutos, por lo que se sugiere que hay activación de Src de forma dependiente de β -arr2 y en menor grado una forma independiente de la arrestina.

Al comparar el efecto de CRF en las células WT y KO, se puede observar una diferencia en la magnitud y temporalidad del efecto en ambos tipos celulares (figura 8.10) teniendo un efecto mayor y sostenido hasta los 30 minutos de tratamiento en las células WT. En las células KO se observa un efecto rápido y transitorio. Estos datos sugieren dos posibles mecanismos por los cuales el receptor CRF₁ activa a Src: uno dependiente de β -arr2 y otro independiente de ésta.



8.9 Fosforilación de c-Src inducida por CRF en células MEF WT-β-arrestina2 y MEF KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁. Células MEF WT-β-arrestina2 (panel izquierdo) y MEF KO-β-arrestina2 (panel derecho) fueron estimuladas con CRF 100nM a los 2, 5, 10, 30 y 60 minutos (n=5, para células MEF WT-β-arrestina2; n=4 para las células MEF-KO-β-arrestina2). Los datos fueron analizadas con ANOVA de una vía seguido de un post-análisis de Dunnet y se muestran como la media ± SEM, *p<0.05 vs control.



8.10 Fosforilación de c-Src inducida por CRF en células MEF WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁, comparación entre ambas líneas celulares. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de un post-análisis de Bonferroni y se muestran como la media ± SEM, *p<0.05 vs MEF WT-β-arrestina2.

8.8 La activación de ERK 1/2 inducida por CRF es bloqueada por el inhibidor de Src.

Con los resultados obtenidos se sugiere que en la señalización del receptor CRF₁, β -arrestina2 participa en la activación de ERK 1/2 y Src; sin embargo, no se conoce la dependencia de Src en la activación de ERK 1/2, por lo que las células MEF WT y KO- β -arrestina2 transfectadas con el receptor HA-hCRF₁ fueron incubadas durante 30 minutos con el inhibidor de Src, PP2, a una concentración de 20 μ M para después estimular las células con CRF 100 nM por 10 minutos, encontrando que la fosforilación de ERK 1/2 ($249 \pm 72\%$ en las WT y $153 \pm 14\%$ en las KO) es inhibida por completo en ambas líneas celulares ($90 \pm 45\%$ en las WT y $36 \pm 8\%$ en las KO, figuras 8.11 y 8.12). Estos resultados sugieren que Src participa en la activación de ERK 1/2, tanto de forma dependiente como independiente de β -arrestina2.

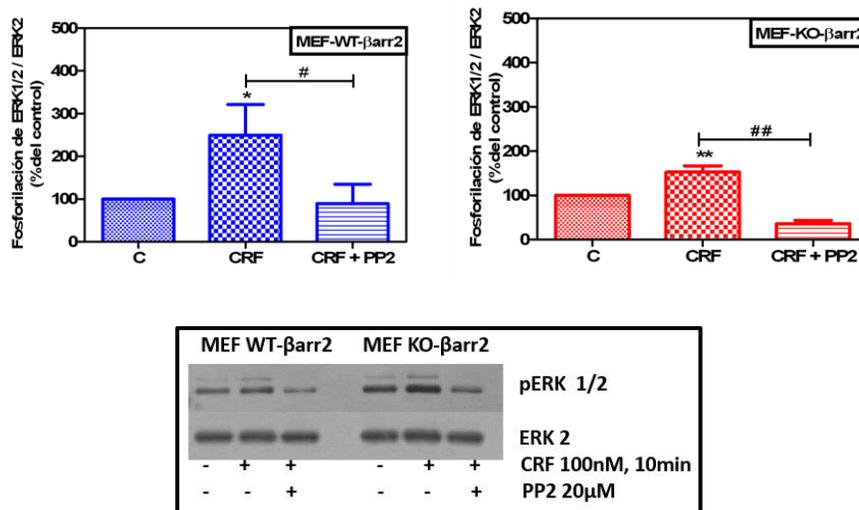


Figura 8.11 Efecto del inhibidor del receptor de Src en la fosforilación de ERK 1/2 inducido por CRF en las células MEFWT- β -arrestina2 y MEF-KO- β -arrestina2. Células MEF-WT (panel izquierdo) y MEF-KO (panel derecho) transfectadas con el receptor CRF₁ fueron pretratadas durante 30 minutos con PP2C 20 μ M y posteriormente estimuladas con CRF 100nM durante 10 minutos, para finalmente evaluar la fosforilación de ERK1/2. (n=5, para células MEF WT- β -arrestina2; n=4 para las células MEF KO- β -arrestina2) Los datos fueron

analizadas con una prueba no paramétrica, seguido de un post-análisis de Dunns y se muestran como la media \pm SEM, * $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.005$ vs control, # $p < 0.05$ vs CRF, ## $p < 0.005$ vs CRF.

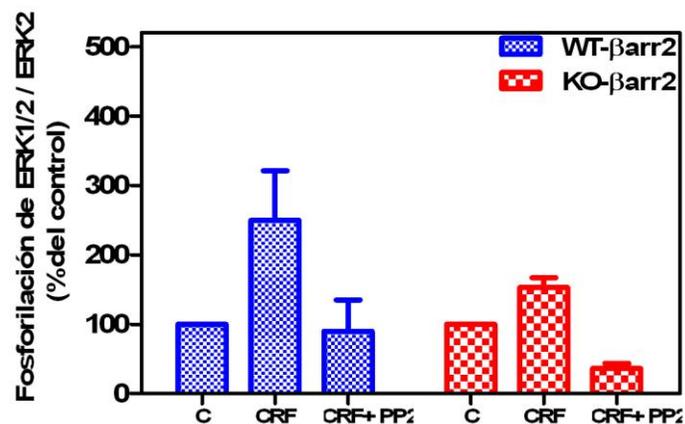


Figura 8.12 Efecto del inhibidor del receptor de Src en la fosforilación de ERK 1/2 inducido por CRF en las células MEF-WT-β-arrestina2 y KO-β-arrestina2 transfectadas con el receptor CRF₁, comparación entre ambas líneas celulares. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de un post-análisis de Bonferroni y se muestran como la media \pm SEM, C: control.

IX. DISCUSIÓN

El CRF es un neuropéptido de 41 aminoácidos sintetizado en el hipotálamo. Este regula la respuesta adaptativa al estrés a través de la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). El eje HPA es responsable de la regulación autonómica, sobre el comportamiento, cardiovascular, endocrina, gastrointestinal, inmune y sobre funciones reproductivas en respuesta a estrés (15). Este neuropéptido actúa a través de unirse a sus receptores CRF₁ y CRF₂, ambos pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los receptores CRF₁ y CRF₂ se expresan en cerebro y tejidos periféricos, aunque el primero se encuentra en mayor medida en cerebro, mientras que el segundo es mayor su expresión en tejidos periféricos y se ha visto que las acciones de ambos se contraponen en algunos tipos celulares (77). Este proyecto se enfoca en la señalización del receptor CRF₁, el cual, al ser activado por su ligando permite el acople de la proteína Gs, lo que conlleva a la activación de la adenilato ciclasa (AC) y así aumentar los niveles de AMPc. En algunos modelos celulares como en HEK293, Y79 y HT22 (78–80) se ha visto que este receptor puede acoplarse a la proteína Gq y activar a diferentes isoformas de PKC. Además, se sabe que este receptor puede activar la vía mitogénica de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK), finalizando con la activación de ERK 1/2 a través de la transactivación del receptor de EGF (28). La duración y la magnitud de las respuestas mediadas por los GPCRs dependen de una rápida regulación de la señal. Las primeras proteínas involucradas en la regulación de los GPCRs son las cinasas de los GPCR (GRK) y las arrestinas (33). La proteína β -arrestina2 participa en la regulación de la señal del receptor CRF₁ (41) al unirse al receptor activo, previamente fosforilado por GRKs, lo que produce el desacople de la proteína G al impedir estéricamente el acople de la subunidad α de la proteína G, proceso conocido como desensibilización del sistema. En el presente trabajo se describió la participación de la proteína β -arrestina2 en los mecanismos involucrados en la activación de las MAPKs

ERK 1/2 por activación del receptor CRF₁, utilizando células fibroblásticas embrionarias provenientes de un ratón knockout de β -arrestina2 (MEF KO- β -arr2). Mediante el uso de un anticuerpo que reconoce a las proteínas β -arrestina1 y β -arrestina2 se determinaron los niveles de expresión de éstas en ambas líneas celulares. Se observó en las células KO una disminución de los niveles de expresión de la proteína β -arr2 y un aumento en la expresión de la β -arr1. El aumento en los niveles de expresión de la proteína β -arr1 encontrados en este trabajo, no coinciden con lo reportado por otros autores utilizando las mismas células (76,81); sin embargo, la sobreexpresión de la β -arr1 al parecer no desempeña ningún efecto compensatorio en la señalización mediada por el receptor CRF₁. Esto se puede deducir por el hecho de que las células carentes de β -arr2 presentan una menor respuesta en los parámetros evaluados como en la activación de ERK 1/2, Src y en la transactivación del receptor de EGF por activación del receptor CRF₁ (82). Es interesante notar que como consecuencia de la ausencia de β -arr2 se observa un incremento en los niveles basales de ERK 1/2 fosforilado. Este incremento es consistente con lo observado en otros reportes donde utilizan estas mismas células (83, Datos no publicados de Hauger y col.). Hasta este momento, desconocemos cuál es la razón por lo que los niveles basales se encuentran incrementados en las células provenientes del animal KO- β -arr2. Es posible que esto se deba a que se encuentre activa alguna cinasa encargada de regular a ERK 1/2 por la ausencia de la β -arrestina; sin embargo, esto tendrá que determinarse posteriormente.

Uno de los primeros resultados obtenidos fue la determinación de AMPc producido al estimular las células con CRF. Este ensayo se llevó a cabo tanto en células MEF-WT como en células KO- β -arrestina2 con la finalidad de evaluar si el sistema transfectado es funcional. Los resultados mostraron que hay un aumento dependiente de la concentración en la producción de AMPc en ambas líneas celulares, concordando con datos publicados sobre la activación de la vía Gs-AC-AMPc en la señalización del receptor CRF₁ (77).

Es interesante observar que existe una clara diferencia entre los niveles obtenidos de AMPc en las células WT y en las KO- β -arrestina2; la ausencia de la proteína β -arrestina2 aumenta 4.5 veces los niveles de AMPc inducidos por CRF. Esto puede deberse a que el proceso de desensibilización del sistema se ve alterado al no estar presente la arrestina. La desensibilización de los GPCRs implica la participación de GRKs, las cuales fosforilan en residuos de serina y treonina de la cola carboxílica del receptor y el reclutamiento de la arrestina (29,34); Oackley y colaboradores mostraron que al estimular al receptor CRF₁ con CRF, β -arrestina2 se recluta rápidamente a la membrana plasmática; mientras que β -arrestina1 se recluta más lentamente (41). La ausencia de β -arrestina2 indicaría que el sistema no se desensibiliza de manera adecuada provocando una constante activación de AC reflejado en los niveles de AMPc. El mismo se ha observado por la ausencia de β -arrestina2 en la señalización del receptor CRF2, Hauger y colaboradores, han observado que la ausencia de la proteína β -arrestina2 modifica la respuesta causada por las proteínas G, utilizando el mismo modelo celular (MEF-WT y KO- β -arrestina2) transfectadas con dicho receptor. Ellos determinaron la acumulación de AMPc producido al estimular las células con UCNII y observaron también un aumento de aproximadamente 3 veces en los niveles de AMPc en las células KO- β -arrestina2 (81). De igual manera, la ausencia de la β -arrestina2 promueve niveles mayores de AMPc inducidos por la activación de los receptores β ₂-adrenérgicos con isoproterenol en este mismo modelo celular (76).

Además de participar en la regulación de los receptores, β -arrestina2 está involucrada en la señalización de GPCRs (54,55). Ésta puede activar varias proteínas transductoras como es Src, ERK 1/2, JNK, Akt, entre otras (54), provocando respuestas dependientes de β -arrestina2. Al estimular tanto a las células MEF-WT como a las células MEF-KO- β -arrestina2 con CRF se observó que existe activación de ERK 1/2 en este modelo celular; este resultado concuerda con trabajos ya reportados en otros modelos celulares

como en células CHO (84), cardiomiocitos (85), células HEK293 (28), HT22 (79), incluso en modelos *in vivo* de neuronas hipotalámicas (86), sugiriendo que la activación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF₁ es un mecanismo común en la señalización de dicho receptor. En nuestro modelo, la ausencia de β -arrestina2 disminuyó la activación de estas cinasas; sin embargo, no fue bloqueada totalmente, por lo tanto, se puede proponer que existe una activación dependiente de β -arrestina2 y otra independiente de ésta, que en un principio, dependería de la señalización dependiente de las proteínas G. Bonfiglio y colaboradores encontraron que existen dos fases de activación de ERK 1/2, una a tiempos cortos (0 a 12 minutos de estímulo) dependiente de AMPc; y otra a tiempos largos (20 a 60 minutos) dependiente de la internalización del receptor CRF₁, específicamente, de la activación de B raf-MEK-ERK 1/2 mediada por la asociación con β -arrestina2 (79); de la misma manera, Adomeit y colaboradores observaron que al estimular al receptor B₂ de bradikinina en células COS-7, la activación de ERK 1/2 depende de PKC, la cual media la transactivación del receptor de EGF (71); de esta forma, en nuestro modelo podrían estar ocurriendo mecanismos de activación de ERK 1/2 mediados por AMPc, por PKC, por asociación directa de cinasas de la familia de las MAP con β -arrestina2 o el reclutamiento de cinasas de la familia de Src por β -arrestina2; sin embargo, faltan datos con los cuales se puedan apoyar estos mecanismos. De cualquier forma, nuestros resultados sugieren que la activación de ERK 1/2, dependiente e independiente de β -arrestina2, se lleva a cabo a través de un mecanismo de transactivación del receptor de EGF.

La transactivación de RTKs mediadas por GPCRs ha sido ampliamente descrita (59–63). Recientemente se ha estudiado la participación de las β -arrestinas en la transactivación mediada por GPCRs, tal es el caso del trabajo de Tilley y colaboradores en donde la transactivación del receptor de EGF mediado por el receptor β 1-adrenérgico depende del reclutamiento de β -arrestina1 y/o β -arrestina2 (73); de la misma manera, Esposito y

colaboradores determinaron que el efecto cardioprotector causado por UROII se debe a la transactivación del receptor de EGF mediada por β -arrestina1 y β -arrestina2 (72).

La transactivación del receptor de EGF en la señalización del receptor CRF₁, es un mecanismo ya descrito por Punnett y colaboradores (28), así como en datos no publicados de Olivares-Reyes; no obstante de acuerdo a los modelos celulares utilizados por ellos, la activación de ERK 1/2 es mediada por diferentes mecanismos como son PKC, PI3K, mecanismos dependientes de endocitosis del receptor CRF₁ y dependiente de proteínas G. Así mismo, se ha demostrado la transactivación del receptor de EGF; estos datos sugieren que el mecanismo de activación de ERK 1/2 mediado por el receptor CRF₁ puede ser dependiente del modelo celular.

En relación con lo anterior, se han descrito dos mecanismos por lo que se puede llevar a cabo la transactivación de los RTKs: uno mediado por la acción de metaloproteinasas de matriz y otro mediado por la activación de cinasas encargadas de fosforilar directamente al receptor. Una de las cinasas que pueden estar participando en la transactivación del receptor de EGF es la cinasa c-Src (68,69). Por otra parte, Yuan y colaboradores mostraron que al estimular células de músculo cardiaco HL-1 con urocortina existe una asociación de Src con el receptor CRF₁, además de la activación de dicha cinasa, propiciando la activación río abajo de ERK 1/2; asimismo encontraron que esta activación era bloqueada al utilizar el inhibidor de la cinasa Src, PP2 (87). Nuestros resultados sugieren que β -arrestina2 participa en la activación de Src y, ésta a su vez, está involucrada en la activación de ERK 1/2 inducido por CRF. En relación con lo anterior, Wang y colaboradores utilizaron células MEF que no presentan a la proteína β -arrestina1 ni a la proteína β -arrestina2 para estudiar la participación de estas proteínas en la activación de Src y de ERK 1/2 inducida por el receptor α_2 -adrenérgico, encontrando que es necesaria la presencia de β -arrestina1 y/o

β -arrestina2 para la activación de Src y ERK 1/2 (88), similar a lo que observamos en nuestros datos.

Por otra parte, se encontró que existe una menor activación de Src de forma independiente a β -arrestina2 y de acuerdo a trabajos de Lutrell y colaboradores con los receptores β_2 -adrenérgicos, la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G podría estar promoviendo también la activación de Src (70,89) por lo que podría estar ocurriendo algo similar en este modelo; sin embargo, hasta el momento no contamos con evidencia experimental que sugiera este mecanismo.

Por lo anterior, se sugiere que en las células MEF la señalización del receptor CRF_1 inducido por CRF promueve el acople de la proteína Gs generando la activación de la AC y así un aumento en los niveles de AMPc, activando finalmente a PKA. Esta vía podría estar involucrada en un menor grado en la activación de Src. Por otra parte, el receptor CRF_1 es regulado permitiendo la asociación de β -arrestina2 al receptor. De esta manera se propicia el reclutamiento de la cinasa Src, la cual transactivará al receptor de EGF y finalmente activará las MAP cinasas ERK 1/2 (figura 9.1).

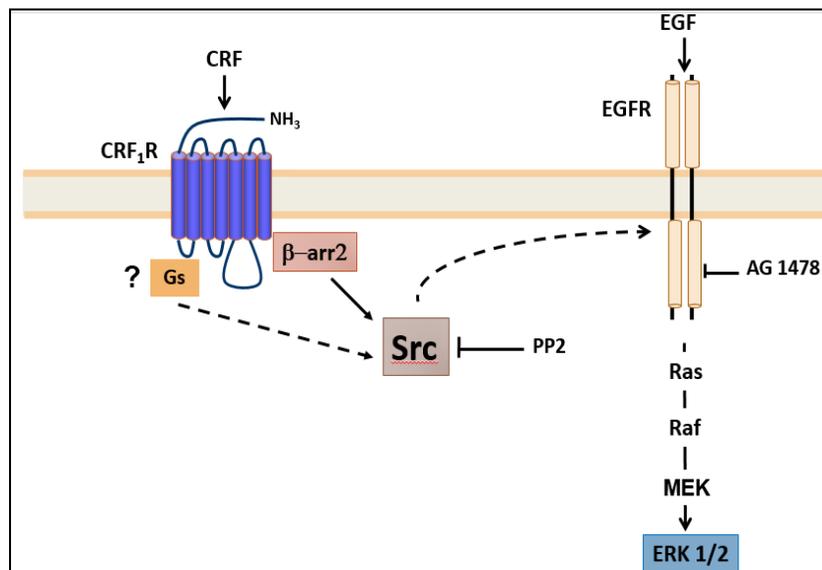


Figura 9.1 Esquema sugerido de la señalización del receptor CRF_1 en células MEF.

X. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que en el modelo celular estudiado, la expresión del receptor CRF₁ se acopla a la proteína Gs generando vías de señalización que involucra al AMPc. Además, el reclutamiento de β -arrestina2 promueve la activación de la vía de las MAPK ERK 1/2. De manera interesante, nuestros datos sugieren que la activación de ERK 1/2 involucra la transactivación del receptor de EGF posiblemente a través de la participación de la vía β -arrestina2/Src.

XI.PERSPECTIVAS

- Determinar la participación de Src en la transactivación del receptor de EGF inducido por el receptor CRF₁ mediante la búsqueda por Western Blot del receptor de EGF fosforilado en la tirosina 845.
- Mediante inmunoprecipitación identificar si hay interacción directa entre β -arr2 y Src en la señalización del receptor CRF₁.
- Determinar si la respuesta dependiente de β -arr2 inducida por el receptor CRF₁ observada en el trabajo es debida a ésta proteína mediante la sobreexpresión de β -arr2 en las células MEF KO- β -arr2.
- Evaluar si existe participación de la proteína β -arr1 en la activación de ERK 1/2 y Src inducida por el receptor CRF₁ mediante el uso de células MEF provenientes de un ratón knockout de la proteína β -arr1.
- Determinar la posible participación de las proteínas G en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por el receptor CRF₁.

XII. REFERENCIAS

1. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981;213(4514):1394–7.
2. Ronan PJ, Summers CH. Molecular signaling and translational significance of the corticotropin releasing factor system [Internet]. 1st ed. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc; 2011. 235-292 p.
3. Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: Yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(2):71–7.
4. Boorse GC, Denver RJ. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Gen Comp Endocrinol*. 2006;146(1):9–18.
5. Laflamme N, Feuvrier E, Richard D, Rivest S. Involvement of serotonergic pathways in mediating the neuronal activity and genetic transcription of neuroendocrine corticotropin-releasing factor in the brain of systemically endotoxin-challenged rats. *Neuroscience*. 1999;88(1):223–40.
6. Ohmori N. Effect of acetylcholine on corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of conscious rats. *Endocrinology*. 1995;136(11):4858–63.
7. Itoi K, Helmreich DL, Lopez-Figueroa MO, Watson SJ. Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine. *J Neurosci*. 1999;19(13):5464–72.
8. Turnbull a V, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999;79(1):1–71.

9. Slominski A, Zbytek B, Pisarchik a., Slominski RM, Zmijewski M a., Wortsman J. CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):780–91.
10. Manuscript A. NIH Public Access. *Changes.* 2012;29(6):997–1003.
11. Murgatroyd C, Spengler D. Epigenetics of early child development. *Front Psychiatry.* 2011;2(APR):1–15.
12. Arai M, Assil IQ, Abou-Samra a. B. Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: A novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology.* 2001;142(1):446–54.
13. Polymeropoulos Mihael, Torres Rosarelis, Yanovski Jack, Chandrasekharappa Settara LD. The Human Corticotropin-Releasing Factor Receptor (CRHR) Gene Maps to Chromosome 17q12-q22. 1995.
14. Chen R, Lewis K a, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(19):8967–71.
15. Zmijewski M a., Slominski AT. Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(1):1–13.
16. Slominski AT, Zmijewski M a., Pisarchik A, Wortsman J. Molecular cloning and initial characterization of African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) corticotropin releasing factor receptor type 1 (CRF1) from COS-7 cells. *Gene.* 2007;389(2):154–62.
17. Perrin MH, Fischer WH, Kunitake KS, Craig a G, Koerber SC, Cervini L a, et al. Expression, purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(34):31528–34.
18. Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Hauger RL, Moreau JL. Molecular biology of the CRH receptors - In the mood. *Peptides.* 2001;22(5):753–60.

19. Sánchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *J Comp Neurol*. 1999;408(3):365–77.
20. Palchoudhuri MR, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg FM. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*--cloning, functional expression and tissue distribution. *Eur J Biochem*. 1998;258(1):78–84.
21. Lovenberg Timothy, Chalmers Derek, Liu Changlu DSE. CRF2a and CRF ~ P receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues . *Communications*. 1995;(January):4139–42.
22. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias C a, et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2843–8.
23. Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount a, Kunitake K, Donaldson C, et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7570–5.
24. Hsu SY, Hsueh a J. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med*. 2001;7(5):605–11.
25. Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2002;2(1):23–33.
26. Dautzenberg FM, Gutknecht E, Linden I Van Der, Olivares-Reyes JA, Dürrenberger F, Hauger RL. Cell-type specific calcium signaling by corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) and 2a (CRF2(a)) receptors: phospholipase C-mediated responses in human embryonic kidney 293 but not SK-N-MC neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2004;68(9):1833–44.

27. Dautzenberg FM, Higelin J, Teichert U. Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Eur J Pharmacol.* 2000;390(1-2):51–9.
28. Punj A, Levine M a, Grammatopoulos DK. Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1 α -mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: the critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation. *Mol Endocrinol.* 2006;20(12):3179–95.
29. Lefkowitz RJ. *G Protein-coupled Receptors.* 1998;18677–81.
30. Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* 1995;9(2):175–82.
31. Siderovski DP, Hessel a, Chung S, Mak TW, Tyers M. A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr Biol.* 1996;6(2):211–2.
32. Benovic JL, Deblasi A, Stone WC, Caron MG, Lefkowitz RJ. I(s-Adrenergic. 1989;
33. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18677–80.
34. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. I-Arrestin : A Protein That Regulates [I-Adrenergic. 1990;(7):1–4.
35. Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich V V, Penn RB, Gagnon a W, et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 1996. p. 447–50.
36. Laporte S a., Oakley RH, Holt J a., Barak LS, Caron MG. The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol*

Chem. 2000;275(30):23120–6.

37. Oakley RH, Laporte S a., Holt J a., Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem.* 2000;275(22):17201–10.
38. Kendall RT, Luttrell LM. Diversity in arrestin function. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(18):2953–73.
39. Perry SJ, Junger S, Kohout T a, Hoare SRJ, Struthers RS, Grigoriadis DE, et al. Distinct conformations of the corticotropin releasing factor type 1 receptor adopted following agonist and antagonist binding are differentially regulated. *J Biol Chem.* 2005;280(12):11560–8.
40. Holmes KD, Babwah A V, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SSG. Differential regulation of corticotropin releasing factor 1 α receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem.* 2006;96(4):934–49.
41. Oakley RH, Olivares-reyes JA, Hudson CC, Flores-vega F, Dautzenberg FM, Hauger RL. Carboxyl-terminal and intracellular loop sites for CRF 1 receptor phosphorylation and β -arrestin-2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses. 2007;0603:209–22.
42. Rasmussen TN, Novak I, Nielsen SM. Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of β -arrestin 1 recruitment. *Eur J Biochem.* 2004;271(22):4366–74.
43. Dautzenberg FM, Braun S, Hauger RL. GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(4):R935–46.
44. Dautzenberg FM, Wille S, Braun S, Hauger RL. GRK3 regulation during CRF- and urocortin-induced CRF1 receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(3):303–8.
45. Teli T, Markovic D, Levine M a, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK.

- Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1alpha signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. *Mol Endocrinol.* 2005;19(2):474–90.
46. Kageyama K, Hanada K, Moriyama T, Nigawara T, Sakihara S, Suda T. G protein-coupled receptor kinase 2 involvement in desensitization of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 1 by CRF in murine corticotrophs. *Endocrinology.* 2006;147(1):441–50.
 47. Wacker WB, Donoso L a, Kalsow CM, Yankeelov J a, Organisciak DT. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol.* 1977;119(6):1949–58.
 48. Kühn H. Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry.* 1978;17(21):4389–95.
 49. Pfister C, Chabre M, Plouet J, Tuyen V V, De Kozak Y, Faure JP, et al. Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science.* 1985;228(4701):891–3.
 50. Zuckerman R, Cheasty JE. A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett.* 1986;207(1):35–41.
 51. Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, et al. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem.* 1992;267(25):17882–90.
 52. Murakami a, Yajima T, Sakuma H, McLaren MJ, Inana G. X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.* 1993;334(2):203–9.
 53. Craft CM. The arrestin superfamily: Cone arrestins are a fourth family. *FEBS Lett.* 1995;362(2):247–55.

54. Luttrell LM, Miller WE. Arrestins as regulators of kinases and phosphatases [Internet]. 1st ed. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2013. 115-147
55. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 3):455–65.
56. Burack WR, Shaw AS. Signal transduction: Hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(2):211–6.
57. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. B-Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(9):521–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>
58. Hauger RL, Smith RD, Braun S, Dautzenberg FM, Catt KJ. Rapid agonist-induced phosphorylation of the human CRF receptor, type 1: a potential mechanism for homologous desensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(2):572–6.
59. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich a. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature.* 1996. p. 557–60.
60. Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC. Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor ?? receptor: Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem.* 2000;275(21):15926–32.
61. Seye CI, Yu N, González F a., Erb L, Weisman G a. The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem.* 2004;279(34):35679–86.
62. Oligny-Longpre G, Corbani M, Zhou J, Hogue M, Guillon G, Bouvier M. PNAS Plus: Engagement of -arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(17):E1028–37.

63. Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW. Thrombin- and Factor Xa-Induced DNA Synthesis Is Mediated by Transactivation of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res*. 2004;94(3):340–5.
64. Ohtsu H, Dempsey PJ, Frank GD, Brailoiu E, Higuchi S, Suzuki H, et al. ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(9):133–8.
65. Shah BH, Farshori MP, Catt KJ. Neuropeptide-induced Transactivation of a Neuronal Epidermal Growth Factor Receptor Is Mediated by Metalloprotease-dependent Formation of Heparin-binding Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem*. 2004;279(1):414–20.
66. George AJ, Hannan RD, Thomas WG. Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches. *FEBS J*. 2013;280(21):5258–68.
67. Tveteraas IHI, Müller KMK, Aasrum MM, Ødegård JJ, Dajani OO, Guren TT, et al. Mechanisms involved in PGE2-induced transactivation of the epidermal growth factor receptor in MH1C1 hepatocarcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31(1):72.
68. Andreev J, Galisteo ML, Kranenburg O, Logan SK, Chiu ES, Okigaki M, et al. Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem*. 2001;276(23):20130–5.
69. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer H. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor1. *Kidney Int* [Internet]. 2000;58(2):549–58.
70. Luttrell LM, Rocca GJ Della, Biesen T Van, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. G_s Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the. *Biochemistry*. 1997;272(7):4637–44.

71. Adomeit a, Graness a, Gross S, Seedorf K, Wetzker R, Liebmann C. Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol.* 1999;19(8):5289–97.
72. Esposito G, Perrino C, Cannavo A, Schiattarella GG, Borgia F, Sannino A, et al. EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by β -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(4):577–89.
73. Tilley DG, Kim IM, Patel P a., Violin JD, Rockman H a. B-Arrestin Mediates B1-Adrenergic Receptor-Epidermal Growth Factor Receptor Interaction and Downstream Signaling. *J Biol Chem.* 2009;284(30):20375–86.
74. Tice D a, Biscardi JS, Nickles a L, Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1415–20.
75. Mueller KL, Powell K, Madden JM, Eblen ST, Boerner JL. EGFR Tyrosine 845 Phosphorylation-Dependent Proliferation and Transformation of Breast Cancer Cells Require Activation of p38 MAPK. *Transl Oncol [Internet].* 2012;5(5):327–34.
76. Kohout T a, Lin FS, Perry SJ, Conner D a, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1601–6.
77. Hauger RL, Risbrough V, Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Dautzenberg FM. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1179:120–43.
78. Berger H, Heinrich N, Wietfeld D, Bienert M, Beyermann M. Evidence that corticotropin-releasing factor receptor type 1 couples to Gs- and Gi-proteins through different conformations of its J-domain. *Br J Pharmacol.* 2006;149(7):942–7.
79. Bonfiglio JJ, Inda C, Senin S, Maccarrone G, Refojo D, Giacomini D, et

- al. B-Raf and CRHR1 internalization mediate biphasic ERK1/2 activation by CRH in hippocampal HT22 Cells. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2013;27(3):491–510.
80. Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine M a., Kanellopoulou K a., Hillhouse EW. Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: Evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem*. 2001;76(2):509–19.
81. Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Hernandez-Aranda J, Hudson CC, Gutknecht E, et al. Desensitization of human CRF2(a) receptor signaling governed by agonist potency and ??arrestin2 recruitment. *Regul Pept*. 2013;186:62–76.
82. Strungs EG, Luttrell LM. Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential [Internet]. 2014. 225-257 p.
83. Schmid CL, Raehal KM, Bohn LM. Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on beta-arrestin-2 interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(3):1079–84.
84. Brar BK, Chen A, Perrin MH, Vale W. Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2 β by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology*. 2004;145(4):1718–29.
85. Latchman DS. Urocortin protects against ischemic injury via a MAPK-dependent pathway. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11(5):167–9.
86. Echenique C, Mu MB, Reul JM, Deussing JM, Wurst W, Sillaber I, et al. MAPK in specific brain areas. 2005;102(17):6183–8.
87. Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, Abounit K, Stephanou A, Barry SP, et al. Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;325(1-2):1–7.
88. Wang Q, Lu R, Zhao J, Limbird LE. Arrestin serves as a molecular switch, linking endogenous α 2-adrenergic receptor to SRC-dependent,

but not SRC-independent, ERK activation. J Biol Chem. 2006;281(36):25948–55.

89. Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem. 1996;271(32):19443–50.