



Armando, Natalia Giannina

# Caracterización de los mecanismos celulares y componentes moleculares involucrados en la $\beta$ γ señalización y el tráfico del CRHR2± en entornos neuronales



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Armando, N. G. (2021). *Caracterización de los mecanismos celulares y componentes moleculares involucrados en la señalización y el tráfico del CRHR2± en entornos neuronales.* (Tesis de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2914>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Caracterización de los mecanismos celulares y componentes moleculares involucrados en la señalización y el tráfico del CRHR2 $\alpha$ en entornos neuronales**

*TESIS DOCTORAL*

**Natalia Giannina Armando**

ng.armando14@gmail.com

### **Resumen**

La hormona liberadora de la corticotrofina (CRH) y sus péptidos relacionados, las urocortinas (UCNs) ejercen un rol clave en la respuesta neuroendocrina y comportamental frente al estrés. CRH regula la actividad en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y además se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central donde funciona como un neuromodulador, integrando aspectos comportamentales y afectivos de la respuesta a estrés. Por otro lado, las UCNs también se encuentran en el sistema nervioso central, pero su expresión es más restringida en comparación con CRH. Se ha demostrado que la desregulación del sistema CRH/CRHR1, se encuentra asociada a patologías relacionadas con el estrés, la ansiedad y la depresión. Sin embargo, este sistema cuenta también con un receptor de alta afinidad para las UCNs, el CRHR2. Este receptor y el accionar de sus ligandos es un terreno que se encuentra en exploración y del que aún se conoce poco.

Tanto el CRHR1 como el CRHR2 son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) de clase B. Los GPCRs son los mediadores de las respuestas celulares a una gran cantidad de estímulos, lo que los convierte en blanco del estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de muchas patologías.

Respecto al accionar de los GPCRs, existe una vía canónica donde se acoplan a proteínas G heterotriméricas que, a su vez, desatan la regulación de múltiples proteínas efectoras. Hoy en día se conoce un nuevo paradigma en la señalización de los GPCRs que involucra mecanismos independientes de las proteínas G y la señalización desde endosomas luego de la internalización del receptor. Recientemente, nuestro laboratorio demostró que el CRHR1 mediante la activación por CRH, cumple con el nuevo paradigma en la señalización de los GPCRs. Se sabe que la activación de los receptores de CRH produce un incremento de los niveles intracelulares de AMPc (de sus siglas Adenosín Monofosfato Cíclico), la consecuente activación de la quinasa de proteína A (PKA) y la entrada de calcio. Nuestro laboratorio ha demostrado que el CRHR1 estimulado por CRH, activa ERK1/2 en dos fases mediante mecanismos diferentes y presenta una señalización sostenida de la respuesta de AMPc mediada por una adenilil ciclasa soluble (sAC) en entornos neuronales. La fase más

tardía de ERK1/2 en este entorno celular depende de la endocitosis y se efectúa desde los endosomas. Decidimos ampliar estos conocimientos al otro receptor de CRH en el cerebro, el CRHR2 $\alpha$ .

En este trabajo nos focalizamos en estudiar con profundidad las vías de señalización activadas por el CRHR2 $\alpha$  en un entorno celular neuronal ya que la mayoría de los trabajos con los que contamos hoy en día se han realizado en líneas celulares periféricas. Para responder a esto, generamos un sistema celular utilizando la línea celular neuronal hipocampal de ratón HT22 que expresa de manera estable el CRHR2 $\alpha$ . Por otro lado, de manera comparativa, utilizamos las células de insulinoma de ratón MIN6 que expresan los receptores de CRH de manera endógena y que corresponden a un entorno celular periférico (células  $\beta$  pancreáticas).

En primer lugar, utilizando diferentes herramientas de biología molecular, describimos el perfil de activación de ERK1/2 al estimular el CRHR2 $\alpha$  utilizando diferentes ligandos. A su vez, demostramos que el ERK1/2 se activa río abajo del AMPc que proviene de ambas fuentes generadoras (tmACs y sAC) en el entorno celular hipocampal, mientras que en las células MIN6, el perfil de activación de ERK1/2 es similar pero la estimulación del CRHR2 $\alpha$  no evoca la respuesta del segundo mensajero. Caracterizamos además la respuesta de Akt y de CREB gatillada por las UCNs mediante el CRHR2 $\alpha$ , siendo la fosforilación de Akt dependiente sólo del AMPc generado por sAC, y CREB dependiente de ambas fuentes de AMPc. Por otro lado, las UCNs son capaces de generar un aumento en la actividad de PKA en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . El aumento en la fosforilación tanto de CREB como de ERK1/2 dependen de esta quinasa, mientras que sobre Akt tiene un efecto inhibitorio. A su vez describimos la inducción en la expresión de *c-fos* generada por ambos receptores de CRH, tanto en las células HT22 como el cultivo primario de neuronas de hipocampo y de corteza.

En segundo lugar, observamos cambios morfológicos en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  evocados por la activación del CRHR2 $\alpha$  dependiente del ligando, ya que las UCN1 y 3 son capaces de generarlos mientras que la UCN2 no tiene esta capacidad. Sólo el AMPc generado por sAC participa en este proceso de diferenciación, así como también participa la PKA/CREB y probablemente *c-fos*.

Finalmente, nos propusimos estudiar el tránsito del CRHR2 $\alpha$  en las células HT22. Observamos un comportamiento particular, donde en condiciones basales el receptor se encuentra mayormente dentro de la célula, luego de 6 minutos de estímulo la cantidad en membrana aumenta y luego de 30 minutos vuelve a niveles basales. En base a este resultado profundizamos el estudio en la endocitosis y el reciclado del receptor, donde al bloquear ambos procesos, aumenta la activación de ERK1/2 y disminuye la de Akt, lo que nos sugiere un posible *crosstalk* entre estos efectores.

Palabras clave: GPCR, CRH y UCNs, CRHR2 $\alpha$ , AMPc, ERK1/2, neuronas hipocampales



**“Caracterización de los mecanismos celulares y componentes moleculares involucrados en la señalización y el tráfico del CRHR2 $\alpha$  en entornos neuronales”**

Lic. Natalia Giannina Armando

Tesis presentada para optar por el título  
de Doctora en Ciencia y Tecnología

**Directora:** Dra. Susana Iris Silberstein Cuña

**Consejera de estudios:** Dra. Valeria Segatori

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires –  
CONICET – *Partner Institute of the Max Planck Society*

Buenos Aires, 2021

Gracias a Susana, no sólo por la confianza y el aprendizaje del día a día, sino por enseñarme lo que es la palabra Sororidad. Gracias a la Universidad Nacional de Quilmes, enseñanza pública, gratuita y de calidad que me permite seguir formándome. Gracias eternas a mis amigues, no hace falta nombrarles una por una, sino recordarles que jamás me suelten la mano, que yo se las voy a tener agarradita para siempre. Gracias a Alan con quien tuve la suerte de compartir el anexo de esta tesis como excusa entre cervezas y fulbito. A mi copilota en esta aventura, Paulita, nunca me voy a cansar de agradecer que te tuve al lado mío todos estos años, orgullosa y feliz de ser la copilota en la tuya. Al Lelito, que no le hacen falta títulos ni doctorados para demostrar lo que te enseña la vida. A mi primo-hermano Gabo, te admiro mucho primo. A Chimu y a Fantu mis compañeros gatunos. A mi trípode humano, mi mamá Norita y mi colega favorita Roma, cada logro que consiga siempre va a ser por y para ustedes, pero ahora lo hago por alguien más, desde hace dos años y para la eternidad, para vos Olita.

*Aunque me fuercen yo nunca voy a decir,  
Que todo el tiempo por pasado fue mejor,  
Mañana es mejor.*

## Tabla de Contenidos

<b>Abreviaturas</b> .....	12
<b>Introducción</b> .....	14
El sistema CRH.....	14
1 ¿Qué es el estrés? .....	14
1.1 CRH y su familia de péptidos relacionados.....	15
1.2 La importancia del sistema CRH en el hipocampo.....	20
2 Los receptores de CRH pertenecen a la subfamilia de GPCRs de clase B .....	21
2.1 La importancia del estudio de los GPCRs.....	21
2.2 Receptores de CRH.....	23
2.3 Características estructurales del CRHR2 $\alpha$ .....	26
3 Mecanismos de señalización de los CRHRs .....	28
3.1 Regulación mediada por endocitosis .....	29
3.2 Señalización sostenida en GPCRs .....	32
3.3 La respuesta de AMPc y su relevancia como regulador de procesos celulares ..	34
3.3.1 Clasificación de Adenilil Ciclasas .....	35
3.3.2 Rol de AMPc en la proliferación y diferenciación celular .....	37
3.4 Efectores río abajo del AMPc .....	38
3.4.1 Activación de ERK1/2.....	39
3.4.2 Activación de Akt.....	40
3.4.3 Activación y regulación transcripcional de CREB .....	42
4 <i>Immediately early genes</i> (IEGs) .....	44

<b>Objetivos</b> .....	48
<b>Materiales y Métodos</b> .....	50
1 Líneas celulares .....	50
1.1 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo .....	51
2 Transfecciones transitorias de líneas celulares .....	52
2.1 Transfección de DNA.....	52
2.2 Generación de líneas estables por dilución clonal .....	53
3 Cultivos primarios neuronales .....	53
3.1 Animales.....	53
3.2 Preparación y mantenimiento de cultivos primarios de hipocampo y corteza.....	54
4 Estímulos y agentes farmacológicos .....	54
4.1 Estímulos.....	54
4.2 Agentes farmacológicos .....	55
5 <i>Western Blot</i> .....	56
5.1 Preparación de los extractos celulares .....	56
5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado .....	56
5.3 Anticuerpos utilizados.....	58
6 Manejo de plásmidos .....	58
6.1 Clonados .....	60
6.1.1 Construcción pcDNA3.1(+)/Zeo-CRHR2 $\alpha$ .....	60
6.2 Preparación de bacterias competentes.....	60
6.3 Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos .....	61

6.4 Preparación de plásmidos a pequeña escala (mini-preparaciones) .....	61
6.5 Análisis de plásmidos por enzimas de restricción .....	62
6.6 Preparación de plásmidos a gran escala (maxi/mega-preparaciones) .....	62
7 RNA, transcripción reversa y PCR .....	63
7.1 Purificación de RNA.....	63
7.2 Transcripción reversa .....	63
7.3 PCR de punto final.....	64
7.4 PCR en tiempo real o cuantitativa.....	64
7.5 <i>Primers</i> utilizados .....	65
8 Microscopía confocal y análisis de la localización subcelular del CRHR1 y CRHR2 $\alpha$	67
9 FRET espectral para la determinación de AMPc y actividad de PKA .....	68
10 Análisis de la endocitosis de CRHR2 $\alpha$ mediante citometría de flujo .....	69
11 Análisis de los cambios morfológicos .....	69
12 Tratamiento estadístico de los datos .....	70
<b>Resultados</b> .....	72
1 Generación de clones estables de expresión para el CRHR2 $\alpha$ en la línea celular hipocampal HT22.....	72
2 Tanto las UCNs como CRH activan ERK1/2 a través del CRHR2 $\alpha$ en la línea celular hipocampal HT22-CRHR2 $\alpha$ y en la línea de células $\beta$ pancreáticas MIN6 .....	76
2.1 ERK1/2 es activado en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ utilizando CRH o las UCNs .	77
2.3 ERK1/2 es activado con un perfil similar al obtenido en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ en las células MIN6 utilizando CRH o las UCNs.....	79
3 Curvas concentración-respuesta y cálculo de EC <sub>50</sub> de los ligandos en las líneas celulares HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	80

4 Participación del AMPc y sus fuentes generadoras en el contexto celular HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	82
4.1 CRH y las UCNs generan una respuesta de AMPc en la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ , pero no en las MIN6. ....	83
4.2 CREB y Akt se activan mediante la estimulación del CRHR2 $\alpha$ tanto en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ como en las MIN6.....	85
4.3 Tanto las tmACs como sAC participarían en la generación de AMPc mediada por CRHR2 $\alpha$ en el contexto celular hipocampal .....	89
4.4 Ambas fuentes generadoras de AMPc son necesarias para la señalización río abajo del receptor en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	90
4.4.1 sAC es necesaria para la activación de ERK1/2 dependiente de UCN1 y UCN3 .....	90
4.4.2 sAC es la única fuente de AMPc involucrada en la activación de Akt dependiente de UCN3 y UCN1 .....	92
4.4.3 Tanto tmACs como sAC son necesarias para la fosforilación de CREB dependiente de UCN3.....	94
5 Participación de PKA en la señalización mediada por el CRHR2 $\alpha$ .....	95
6 Mediadores de AMPc en la activación de ERK1/2 y de Akt.....	96
6.1 Los EPACs participarían en la fosforilación de ERK1/2 y de Akt generada mediante la UCN3 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . ....	98
7 Inducción de <i>c-fos</i> en líneas celulares y cultivos primarios de neuronas dependiente de CRH y las UCNs .....	98
7.1 CRH y las UCNs inducen la expresión de <i>c-fos</i> de manera diferencial en las células HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	99
7.2 CRH induce la expresión de <i>c-fos</i> en cultivos primarios hipocampales, pero no en corticales de embriones de ratón.....	101
7.3 La inducción de <i>c-fos</i> mediada por los receptores de CRH dependería no sólo de la actividad neuronal sino también del ligando.....	104

8 La activación del CRHR2 $\alpha$ induce la diferenciación en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ ..	105
8.1 UCN1 y 3 estimulan la diferenciación de la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ mientras que la UCN2 no tiene efecto.....	105
8.2 Los cambios morfológicos generados por la activación del CRHR2 $\alpha$ dependen del AMPc generado por sAC en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	106
9 Rol de PKA en la señalización y los cambios morfológicos en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	107
9.1 PKA participa en la activación de CREB en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	107
9.2 La inhibición de PKA reduce la neuritogénesis en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ ..	109
10 Localización del CRHR2 $\alpha$ en la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	110
10.1 La cantidad de receptor aumenta en la membrana plasmática de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ luego de 6 minutos de estimulación.....	111
10.2 El péptido señal no clivable dirige el tránsito del CRHR2 $\alpha$ en el contexto celular de las células HT22 .....	113
10.3 El CRHR2 $\alpha$ en las células HT22 se encuentra en el retículo endoplasmático en condiciones basales .....	115
10.4 Efecto de la endocitosis en la señalización del CRHR2 $\alpha$ disparada por la UCN3 .....	116
10.4.1 El bloqueo de la endocitosis y del reciclado en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ genera efectos opuestos en la activación de los efectores ERK1/2 y Akt.....	116
<b>Conclusiones</b> .....	120
<b>Discusión</b> .....	122
Caracterización de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ y puesta a punto del sistema en las células HT22 .....	122
Los perfiles de activación de ERK1/2, Akt y CREB no dependen de los ligandos que activan el CRHR2 $\alpha$ .....	123

La generación de AMPc mediante el CRHR2 $\alpha$ depende del contexto celular .....	125
Tanto sAC como las tmACs estarían involucradas en la generación de AMPc en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	126
Diferentes roles de sAC río abajo del CRHR2 $\alpha$ en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .....	128
PKA participa en la fosforilación de ERK1/2, Akt y CREB mediada por el CRHR2 $\alpha$	129
CRH y las UCNs inducen la transcripción de <i>c-fos</i> tanto en las células HT22 como en cultivo primario neuronal.....	131
La activación del CRHR2 $\alpha$ promueve la diferenciación de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ la cual es ligando y fuente de AMPc dependiente.....	134
El CRHR2 $\alpha$ presenta un tránsito no convencional en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ ...	138
<b>Perspectivas</b> .....	141
<b>Anexo</b> .....	146
<b>Bibliografía</b> .....	155

## Abreviaturas

AC: Adenilil Ciclasa

AMPC: Adenosín Monofosfato cíclico

CREB: De sus siglas en inglés, *cAMP Response Element-Binding*

CRH: Hormona liberadora de corticotrofina, de sus siglas en inglés, *Corticotropin-Releasing Hormone*

CRH-BP: Proteína de unión a CRH, de sus siglas en inglés, *CRH-Binding Protein*

CRHR1: Receptor de CRH de tipo 1

CRHR2: Receptor de CRH de tipo 2

EPAC: De sus siglas en inglés, *Exchange Protein Activated by cAMP*

ERK1/2: De sus siglas en inglés, *Extracelular signal-Regulated Kinases*

Fks: Forskolina

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G, de sus siglas en inglés *G-Protein Coupled Receptor*

IEGs: Genes de expresión inmediata temprana, de sus siglas en inglés: *Immediately Early Genes*

PDEs: Fosfodiesterasas, de sus siglas en inglés, *Phosphodiesterases*

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa, se sus siglas en inglés, *Phosphoinositide 3-kinase*

PKA: Proteína quinasa A

PKB/Akt: Proteína quinasa B

sAC: Adenilil ciclasa soluble

tmACs: Adenilil ciclasa transmembrana

UCN: Urocortina

# INTRODUCCIÓN

## **Introducción**

### **El sistema CRH**

#### **1 ¿Qué es el estrés?**

Los organismos vivos necesitan de manera indispensable contar con mecanismos que les permitan afrontar situaciones de estrés. Por el 1950 se describió el Síndrome de Adaptación General (SAG), hoy, mejor conocido como síndrome del estrés. Hans Selye lo describió como la respuesta de un individuo para afrontar cualquier situación que implique un cambio (Selye, 1950). Encontrar un consenso que abarque todas las áreas en las que el estrés está involucrado no es tarea fácil, sin embargo, existe común acuerdo en que el sistema de respuesta a estrés de un organismo es activado tanto por estímulos externos como internos (estímulos estresores) y que éstos producen cambios bioquímicos, funcionales y comportamentales inmediatos, como así también modificaciones a largo plazo que son necesarias para la supervivencia del individuo.

Una visión más actual de este fenómeno involucra a los factores genéticos junto con los estímulos del entorno y afirma que el riesgo de enfermedad está determinado por la interacción entre la predisposición genética y los factores ambientales, que a menudo se manifiestan a través de marcas epigenéticas, es decir, modificaciones químicas del DNA sin cambios en la secuencia de nucleótidos. En este contexto, el estrés ha surgido como el factor ambiental más prominente causalmente involucrado en la etiología de los trastornos psiquiátricos. En consecuencia, el campo de la investigación sobre el estrés se centra en la comprensión de cómo la diversidad de factores ambientales a corto y a largo plazo, genera una respuesta adaptativa en el cuerpo (Deussing & Chen 2018).

Entonces, consideramos que es de suma importancia estudiar este fenómeno de una manera global. En nuestro caso nos interesamos en profundizar acerca de los mecanismos moleculares que regulan los neuropéptidos como CRH y las UCNs en un entorno neuronal.

## 1.1 CRH y su familia de péptidos relacionados

CRH es un péptido de 41 aminoácidos, aislado y caracterizado inicialmente por Vale y sus colaboradores a partir de extractos hipotalámicos conocido por su capacidad de estimular la secreción de ACTH y, por lo tanto, activar el eje hipotálamico-hipofisario-adrenal (HPA), el principal sistema neuroendócrino de la respuesta a estrés (Spiess *et al.*, 1981; Hillhouse & Grammatopoulos, 2006). Otros péptidos que se encuentran dentro de la familia CRH en mamíferos son: urocortina 1 (UCN1) (Vaughan *et al.*, 1995), urocortina 2 (UCN2) (Reyes *et al.*, 2001) y urocortina 3 (UCN3) (Hsu & Hsueh 2001). Estas hormonas peptídicas y sus receptores, CRHR1 y CRHR2 de los cuales hablaremos más adelante, están presentes de forma ubicua en todos los tejidos de mamíferos y juegan un papel clave en los efectos centrales y locales mediados por el estrés.

En términos evolutivos, existen varias hipótesis acerca del origen de la familia de CRH la cual se sostiene evolutivamente antes de los tetrápodos y teleósteos lo que indica su importancia en el mantenimiento de la homeostasis (Chang & Hsu 2004). La hipótesis más aceptada es la conocida como 2R o 2WGD (de sus siglas en inglés *2 Rounds* y *2 Whole Genome Duplication*). Ésta afirma que, partiendo de un gen, en una primera ronda de duplicación del genoma completo, surgen dos genes parálogos, uno será asociado a CRH y UCN1 y el otro a UCN2 y 3. En una segunda ronda de duplicación, estas dos secuencias divergirán en otras dos nuevas secuencias parálogas, dando lugar a CRH y las 3 urocortinas. Para el caso de los receptores el concepto es el mismo, pero con algunas diferencias: en la primera ronda de duplicación dónde un gen diverge en dos secuencias parálogas una dará una estructura temprana del CRHR1 y la otra el CRHR2. En una segunda ronda de duplicación los receptores estarán maduros y surgirían los parálogos según las reglas de la genética. Se cree que estos dos genes se extinguieron ya que no han tenido función en la evolución de los cordados (Lovejoy *et al.*, 2014, On *et al.*, 2019). En la figura 1 se esquematiza cómo sería la evolución de los genes previamente explicada.

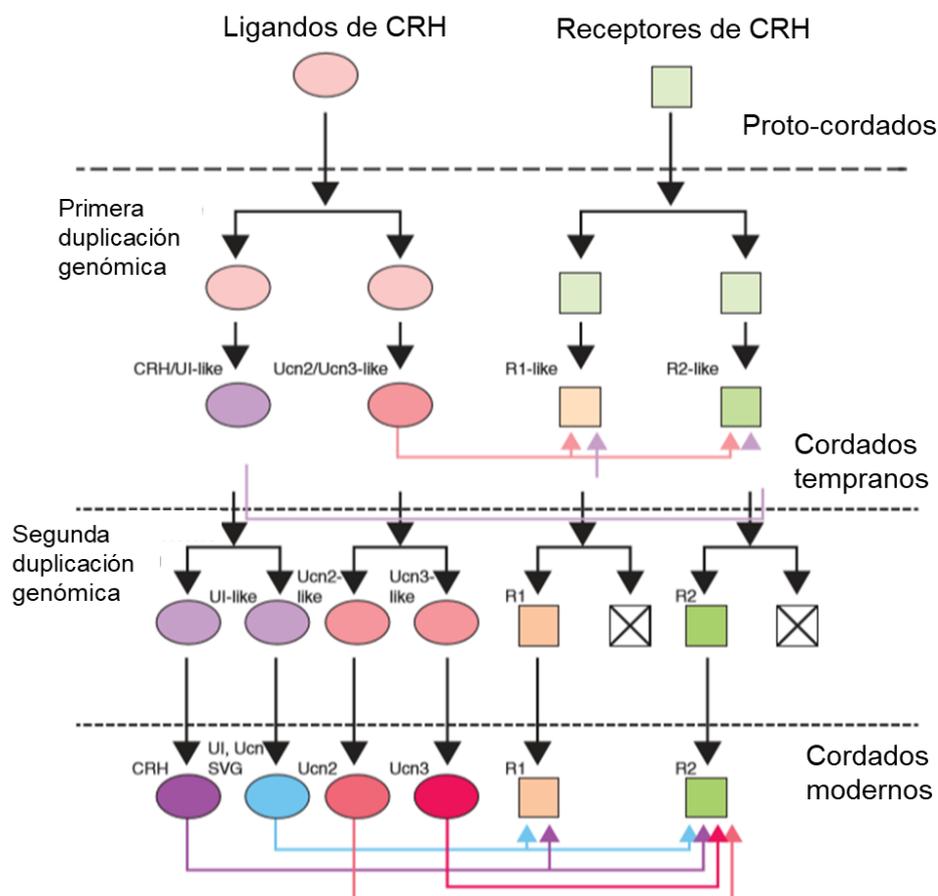


Figura 1: **Esquema de la co-evolución de CRH, sus receptores y sus péptidos relacionados.** Las líneas punteadas corresponden a los eventos de duplicación genómica, las flechas de colores a la afinidad de los ligandos por los receptores, las líneas con flechas negras corresponden a la dirección y la selección evolutiva. UI: Urotensina, SVG: Sauvagina, Ucn: Urocortina. Modificado de Lovejoy *et al.*, 2014.

Desde el inicio de su descripción, se anticipaba que CRH tendría funciones importantes en los circuitos extrahipotalámicos. Hoy, es considerado un componente maestro de la respuesta integrada a estrés, orquestando una variedad de mecanismos que regulan aspectos comportamentales y fisiológicos de la respuesta. Más aún, la desregulación de los mecanismos asociados a la señalización por CRH están implicados en el desarrollo de patologías asociadas al estrés como ansiedad y depresión (Holsboer & Ising 2010) (Figura 2). En la periferia, la hormona CRH tiene un papel inmunomodulador, generando una respuesta proinflamatoria.

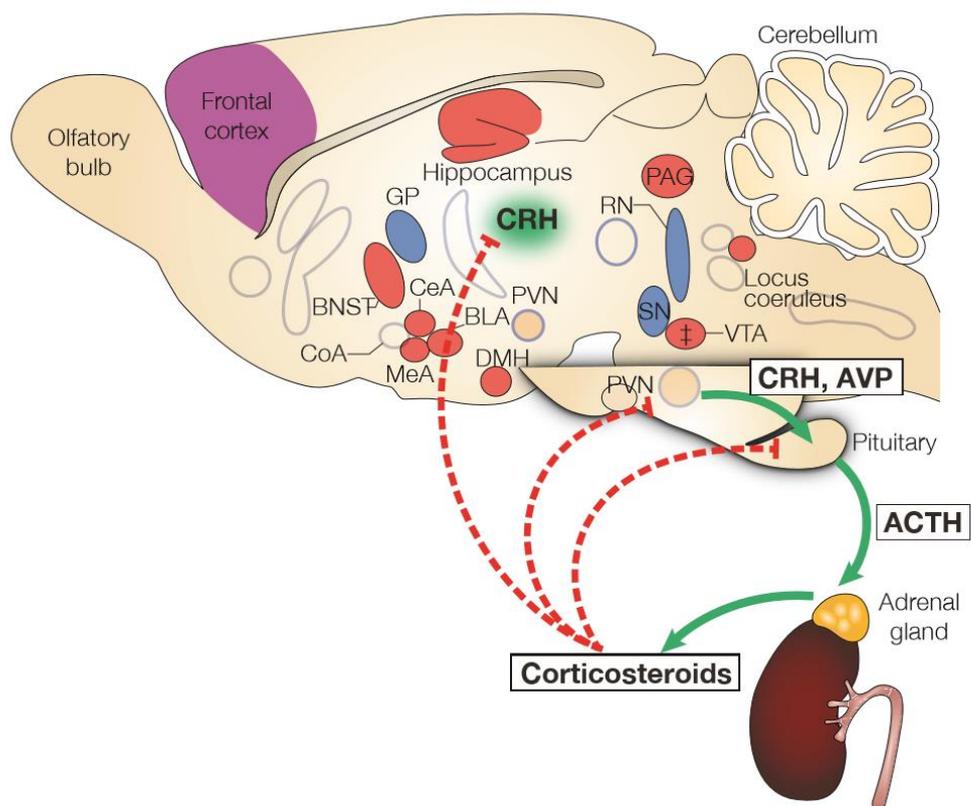


Figura 2: **Acción de CRH / CRHR1 a niveles fisiológicos.** En el eje HPA: CRH y AVP son secretados por el PVN hipotalámico y activan la liberación de ACTH desde los corticótrofos hipofisarios que, a su vez, impulsan la síntesis y liberación de corticosteroides de la corteza suprarrenal. Los corticosteroides ejercen una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la secreción de la hormona supresora de la hipófisis. La expresión de CRH en los circuitos extrahipotalámicos actúa como un neuromodulador que orquesta una respuesta humoral y conductual compleja al estrés. El efecto de la activación de CRHR1 en el comportamiento depende del área del cerebro analizada. La relevancia de este receptor yace en el control de un delicado equilibrio entre ciertos circuitos para una respuesta adecuada al estrés y la desregulación del sistema puede conducir a trastornos relacionados con el estrés. BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CeA, núcleo central de la amígdala; CoA, núcleo cortical de la amígdala; DMH, hipotálamo dorsomedial; GP, globo pálido; MA, núcleo medial de la amígdala; PAG, gris periacueductal; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; RN, núcleos de rafe; SN, sustancia negra; VTA, área tegmental ventral. Tomado de Inda, Armando, *et al.*, 2017.

Adentrándonos en los patrones de expresión de estos neuropéptidos, en el cerebro, se sabe que CRH está distribuido de una manera ubicua mientras que las urocortinas se encuentran en zonas más restringidas, esto se sostiene tanto en roedores como en humanos. CRH está fuertemente expresado en el hipotálamo y en el núcleo

paraventricular (PVN) donde regula la actividad del eje HPA como se ha comentado anteriormente (Merchenthaler *et al.*, 1982; Cummings *et al.*, 1983; Sakanaka *et al.*, 1987). Además, se encuentra en el bulbo olfatorio, en la corteza del núcleo accumbens, en el neocórtex, córtex piriforme, en interneuronas del hipocampo, en la amígdala central y en diferentes divisiones del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) así como también ampliamente en el complejo olivar superior (Alon *et al.*, 2009, Itoi *et al.*, 2014, Kono *et al.*, 2017). En la periferia, se encuentra en la placenta en la etapa gestacional y en el tracto gastrointestinal, así como también en distintos tipos celulares de la piel (Majzoub & Karalis, 1999; Slominski *et al.*, 2007; Buckinx *et al.*, 2011).

La UCN1 se encuentra expresada en el núcleo de Edinger-Westphal, en el núcleo supraóptico y en el complejo olivar superior. El sitio con mayor cantidad de neuronas productoras de UCN1 es el septum lateral (Kozicz *et al.*, 2002), y así como CRH también se encuentra en el tracto gastrointestinal (Harada *et al.*, 1999, Muramatsu *et al.*, 2000).

Hasta el día de hoy, sigue siendo un gran debate describir la expresión de la UCN2 en el cerebro ya que la primera descripción que se realizó fue en cerebro de rata, pero luego esos resultados no se pudieron reproducir en ratones (Reyes *et al.*, 2001, Tanaka *et al.*, 2003). Se cree que la expresión basal de UCN2 está cerca de los límites de detección de las técnicas con las que se cuenta para este tipo de análisis. Los primeros datos acerca de la expresión de esta urocortina fueron demostrados por hibridación *in situ* de RNA mensajero y se encontró en el núcleo paraventricular, núcleos supraópticos, núcleo arcuato, locus coeruleus, y otros núcleos motores del cerebro, así como también en el asta central espinal (Chen *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2004). Además se ha reportado en meninges (Reyes *et al.*, 2001). Muchos trabajos han demostrado la expresión de la UCN2 en el cerebro por RT-PCR, pero no han determinado en que región o área de este. En la periferia, se lo ha encontrado en el músculo esquelético y la piel y se ha detectado en el corazón, cardiomiocitos, donde actúa tanto de manera paracrina como autocrina (J. Li *et al.*, 2013; Deussing & Chen, 2018)

Finalmente, para la UCN3, la mayor información sobre su expresión y acción es en la periferia. Se la ha detectado en células de la cripta y caliciformes del intestino

(Deussing *et al.*, 2010, Grün *et al.*, 2015). Por otro lado, en células del páncreas esta urocortina está fuertemente expresada (Parrish Waters *et al.*, 2015, Parra-Mercado *et al.*, 2019) y de hecho se la considera como un marcador específico de la diferenciación de las células en células pancreáticas. Particularmente en el cerebro, se la ha encontrado en el área preóptica medial (MePO), en la amígdala media (MeA), en el BNST, en el hipotálamo, en el núcleo ventral premamilar, en el núcleo parabraquial y en el núcleo olivar superior (Lewis *et al.*, 2001, Deussing *et al.*, 2010). Se considera que es el ligando de mayor afinidad para el CRHR2 en el cerebro, porque se ha encontrado que las fibras positivas para UCN3 co-localizan con sitios de expresión de este receptor (C. Li *et al.*, 2003)

En la figura 3 se pueden ver los patrones de expresión representados en un cerebro murino.

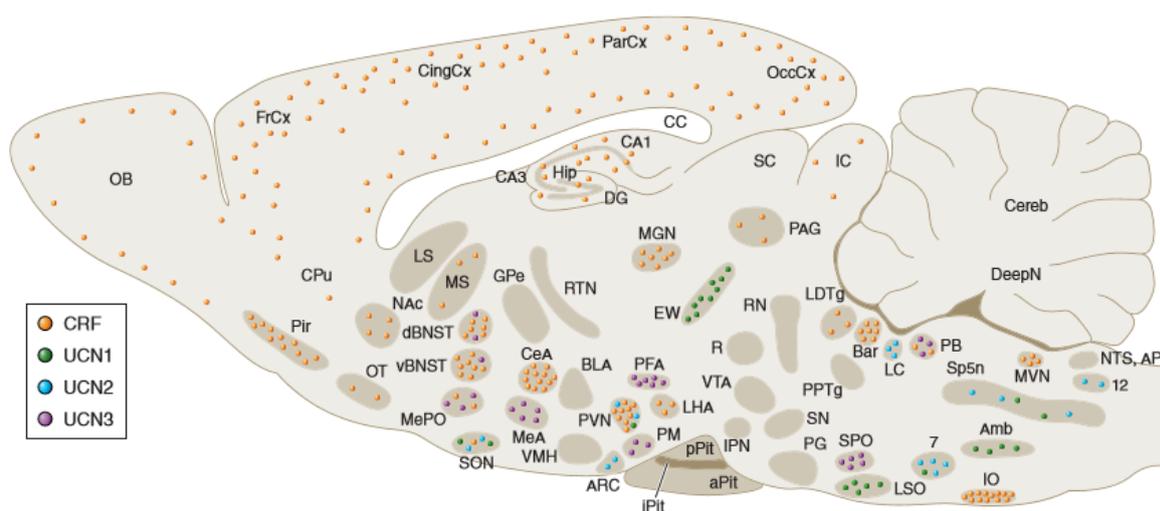


Figura 3: **Corte sagital de cerebro murino con los sitios de expresión de mRNA que se han documentado para CRH (CRF) y sus péptidos relacionados.** En puntos anaranjados se muestra CRH, en verde la UCN1, en celeste la UCN2 y en violeta la UCN3. Amb, núcleo ambiguo, AP, área postrema; arc, núcleo arqueado, ; Bar, núcleo de Barrington; BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal (d, dorsal; v, ventral); CA1, cornu ammonis subcampo 1; CA3, cornu ammonis subcampo 3; CC, cuerpo calloso; CeA, amígdala central; Cereb, cerebelo; CingCx, corteza cingulada; CPU, putamen caudado; DeepN, núcleo profundo del cerebelo; DG, giro dentado; EW, núcleo de Edinger Westphal; FrCx, corteza frontal; GPe, globo pálido externo; Hip, hipocampo; IC, colículo inferior; IO, oliva inferior; IPN, núcleo interpeduncular; LC, locus coeruleus; LH, hipotálamo lateral; LS, septum lateral; LSO, oliva lateral superior; LTDg, núcleo laterodorsal terminal; MeA, amígdala media;

MePO, área preóptica medial; MGN, núcleo geniculado medial; MS, septum medio; MVN, núcleo vestibular medial; NAc, núcleo accumbens; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; OccCx, corteza occipital; OT, tubérculo olfatorio; PAG, sustancia gris periacueductal; ParCx, corteza parietal; PB, núcleo parabranchial; PFA, área perifornical; PG, pontino gris; Pir, corteza piriforme; Pit, pituitaria (p, lóbulo, lóbulo anterior, intermedio, lóbulo posterior); PM, núcleo premamilar; PPTg, núcleo tegmental pedunculopontino; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; R, núcleo rojo; RN, núcleo raphe; RTB, núcleo del tálamo reticular; SC, colículo superior; SN, sustancia negra; Sp5n, núcleo de la espina trigeminal; SPO, núcleo paraolivar superior; VMH, hipotálamo ventromedial, VTA, área tegmental ventral. Tomado de Deussing & Chen, 2018.

## 1.2 La importancia del sistema CRH en el hipocampo

CRH se expresa en diferentes regiones del hipocampo, se lo ha encontrado en las interneuronas en ratones adultos así como también en axones de neuronas piramidales gabaérgicas (Yuncaí Chen *et al.*, 2012). Por otro lado, el CRHR1, así como también el CRHR2, se encuentran en este tipo de neuronas piramidales, pero el CRHR2 se expresa en menor cantidad, estos resultados se obtuvieron utilizando hibridación *in situ*. CRH puede tener funciones excitatorias o inhibitorias dependiendo de donde se libere, desde las interneuronas, forma parte de elementos presinápticos inhibitorios, mientras que, desde las espinas dendríticas de las neuronas piramidales, forma parte de los elementos postsinápticos excitatorios (Yuncaí Chen *et al.*, 2012). El mecanismo de acción más común en el hipocampo para CRH es de naturaleza excitatorio, donde luego de una situación de estrés, CRH se libera rápidamente, activa sinapsis excitatorias que evocan la plasticidad sináptica. Esta plasticidad está íntimamente relacionada con el aprendizaje y la memoria. Se ha demostrado que CRH se encuentra implicado en estas funciones dirigidas por el hipocampo. Por otro lado, tanto el aprendizaje como la memoria se encuentran fuertemente afectados por las situaciones de estrés. Se conoce que un estrés agudo, de algunos minutos puede mejorar la memoria ya que al aumentar la liberación de CRH, aumenta la plasticidad sináptica. El mecanismo no se conoce en su totalidad pero se lo relaciona con el sistema CRH ya que se ha demostrado usando ratones KO para el CRHR1 que esta plasticidad depende de este receptor (Regev & Baram 2014). También se ha descrito que el estrés crónico genera una deformación en el desarrollo de las dendritas piramidales en esta estructura (Maras & Baram 2012).

Los mecanismos implicados en el proceso de la memoria y el aprendizaje dependen también de otras estructuras como la amígdala y la VTA. Se cree que CRH orquesta una respuesta que incluye la actividad de glucocorticoides y mineraloides para que ésta tenga una armonía temporal que termine afectando la expresión de ciertos genes (Yunca Chen *et al.*, 2012).

## **2 Los receptores de CRH pertenecen a la subfamilia de GPCRs de clase B**

### 2.1 La importancia del estudio de los GPCRs

Tanto CRH como las UCNs señalizan a través de dos GPCRs de clase B, CRHR1 y CRHR2, por lo que se considera estrictamente necesario el estudio de ambos para poder entender y describir los procesos relacionados con estos péptidos.

Las células tienen la capacidad de percibir cambios en el ambiente externo y en organismos pluricelulares, pueden ejecutar mecanismos que les permiten comunicarse entre ellas mediante señales específicas. Estas características otorgan a las células la capacidad de mantener la homeostasis más allá de los cambios que sufra el entorno. Para que este proceso sea exitoso, es fundamental que las células puedan adaptarse rápidamente a los cambios en el entorno y de alguna manera responder. Una gran cantidad de procesos fisiológicos están regulados por la activación de receptores que responderán mediante múltiples vías de señalización de acción coordinada y específica. Es por esto que una amplia variedad de patologías han sido relacionadas con el control inadecuado de la señalización celular y esto depende de cómo los receptores transducen las señales del ambiente externo e interno de las células. Todos los tipos celulares tienen sistemas transmembrana que comparten dos elementos básicos: un receptor capaz de reconocer las señales extracelulares y un efector que puede generar una respuesta intracelular dependiente del receptor.

Los receptores acoplados a proteína G, conocidos como GPCRs por sus siglas en inglés (*G protein-coupled receptors*) son de gran importancia en las funciones regulatorias. Los GPCRs son la familia de proteínas más grande del proteoma humano, con más de 800 miembros (~4% del genoma, Schiöth & Lagerström, 2008). Siendo los responsables de reconocer y responder frente a una gran variedad de señales extracelulares como por ejemplo neurotransmisores, lípidos, hormonas

peptídicas, moléculas de pequeño tamaño, iones y estímulos sensoriales, estos receptores se transforman en uno de los componentes esenciales de las células eucariotas. Frente a este rol clave de los GPCRs, se han convertido en el blanco de una gran variedad de drogas de la industria farmacéutica para el tratamiento de patologías asociadas a la alteración en la señalización activada por los mismos. Se cree que entre el 30 y 40% de las drogas actuales en el mercado, están dirigidas a GPCRs (Drews, 2000, Hopkins & Groom, 2002, Kumari *et al.*, 2015). Esto nos lleva a pensar que el estudio tanto estructural como de los mecanismos activados río debajo de estos receptores, es fundamental para comprender el accionar de las enfermedades, así también como para el desarrollo de nuevos tratamientos.

La clasificación más reconocida de estos receptores es respecto a la homología de secuencia y los divide en 5 clases:

- Rodopsina (Clase A):
- Secretina y adhesión (Clase B)
- Glutamato (Clase C)
- *Frizzled/taste* receptor 2 (TAS2)

Los de clase A son los más abundantes y estudiados en la mayoría de los organismos, de hecho el receptor  $\beta$ 2-adrenérgico ( $\beta$ 2AR), es el modelo para el estudio general de los GPCRs tanto en estructura como en farmacología y transducción de señales (Rosenbaum *et al.*, 2009, Rasmussen *et al.*, 2011).

Ampliamente reconocidos por sus siete dominios transmembrana desde donde captan las señales por su dominio amino-terminal y las transmiten hacia el interior de la célula por su dominio carboxilo terminal, los GPCRs señalizan utilizando diferentes proteínas G. Luego de la activación por sus ligandos de afinidad, estos receptores generan un cambio conformacional que los ubica en la posición activa, desde la cual pueden interactuar mediante la proteína G heterotrimérica conformada por el complejo  $G\alpha$ - $G\beta$ - $G\gamma$ . La proteína  $G\alpha$  contiene un sitio de intercambio de GDP a GTP el cual se activa al estar unido al GPCR con su ligando. Este intercambio genera la disociación de la proteína  $G\alpha$  y el complejo  $G\beta$ - $G\gamma$ , los cuales pueden interactuar con diferentes proteínas de manera independiente y activar diferentes vías de señalización como la generación de AMPc, calcio, diacilglicerol, entre otras. Una vez que la subunidad  $G\alpha$  produce la hidrólisis de GTP a GDP, nuevamente puede

reensamblarse el complejo en la membrana plasmática (Rosenbaum, Rasmussen, & Kobilka 2009). En la figura 4 se resumen los procesos previamente descritos.

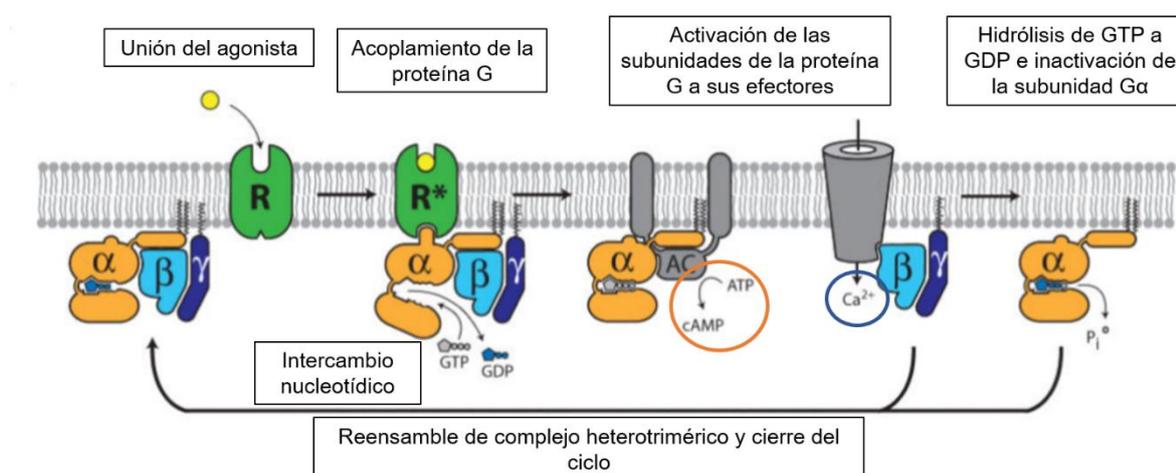


Figura 4: **Activación de las proteínas G:** Luego de la unión del agonista al GPCR, se produce un cambio conformacional del mismo que permite la unión al complejo  $G\alpha-G\beta-G\gamma$  el cual estabiliza el estado activo del GPCR. Esta unión permite el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$  permitiendo la separación del complejo. Luego de la hidrólisis (GTP a GDP), permite que el complejo se reensamble y se cierre el ciclo. Modificado de Rasmussen *et al.*, 2011.

La desensibilización de la respuesta es el concepto clásico relacionado con la endocitosis de los GPCRs. En la vía canónica, se sugiere que esta desensibilización comienza con formación del endosoma temprano, lo cual disminuye la cantidad de receptores en la membrana. Este mecanismo comienza con la fosforilación de las colas citoplasmáticas de los receptores mediante, generalmente, las proteínas GRKs (de sus siglas en inglés *G protein-coupled receptor kinase*) que favorece la unión de las  $\beta$ arrestinas. A su vez, este mecanismo de internalización es dependiente de clatrina y dinamina (Moore, Milano, & Benovic 2007). Una vez endocitado, la vía canónica sugiere que los GPCRs suelen tener un rápido reciclado para volver a estar disponible en la membrana plasmática o ir a degradación mediante lisosomas.

## 2.2 Receptores de CRH

Como se ha descrito al inicio de esta sección, tanto CRH como las UCNs utilizan 2 receptores GPCRs de clase B (CRHR1 y CRHR2) para ejercer sus funciones dentro de las células, focalizaremos ahora en las particularidades de éstos.

Los receptores de CRH están codificados por diferentes genes y a nivel aminoacídico tienen un 70% de homología (Figura 5). El mayor sitio de divergencia es el amino terminal donde difieren en un 40% (Dautzenberg & Hauger 2002). Se conocen diferentes variantes de *splicing* para el CRHR1, siendo la  $\alpha$  la única conocida con función, la predominante en el cerebro y la que se encuentra en el sistema nervioso central. Por otro lado, se conocen tres variantes de *splicing* para el CRHR2 cuya mayor divergencia está en el amino terminal, en humanos se encontraron las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y sólo las primeras dos en ratones. Estas isoformas difieren además en los patrones de expresión en tejidos, en humanos el CRHR2 $\beta$  y CRHR2 $\gamma$  se han encontrado en el cerebro y el CRHR2 $\alpha$  en corazón, músculo esquelético y piel (Kishimoto *et al.*, 1995, Valdenaire *et al.*, 1997, Kostich *et al.*, 2014). En ratones el patrón es inverso, siendo el CRHR2 $\alpha$  el que se encuentra con mayores niveles de expresión en cerebro y el CRHR2 $\beta$  se encuentra en tejidos de la periferia (Lovenberg *et al.*, 1995; A. Chen *et al.*, 2005). Respecto a los patrones de expresión decidimos trabajar con la isoforma  $\alpha$  del CRHR2.

Un dato importante para esta Tesis Doctoral es acerca de la expresión del CRHR2 $\alpha$  en células  $\beta$ . En el 2011 el grupo de Vale y sus colaboradores demostró que el CRHR2 $\alpha$  se expresa en bajos niveles en células pancreáticas de ratón y también en la línea celular derivada de insulinoma de ratón MIN6. Además, pudieron observar que luego de estimular estas células con dexametasona, la expresión del CRHR2 $\alpha$  aumentaba y la del CRHR1, quien también se expresa de manera endógena en estos tipos celulares, disminuía (Huising *et al.*, 2011). Estos resultados son contradictorios respecto a lo observado cuando el CRHR2 $\alpha$  se expresa en las células HEK293, y se tratan con los mismos estímulos. Por otro lado, estos efectos parecen ser dependientes de la isoforma del CRHR2 ya que otros grupos han visto que en la línea celular de corazón de rata Ar7s -que expresa el CRHR2 $\beta$ - tratada con dexametasona, decrecía la expresión del receptor (Coste *et al.*, 2000).

Se ha encontrado una variante de *splicing* para el CRHR2 $\alpha$ , conocida como la isoforma soluble (sCRH-R2 $\alpha$ ), que contiene el dominio de unión a ligando extracelular pero esta proteína está truncada y carece de los dominios transmembrana. Se cree que tiene funciones regulatorias sobre CRH siendo capaz de secuestrar ligando que se encuentre libre (Evans & Seasholtz 2009).

Otro jugador dentro de este sistema es la proteína de unión de CRH o CRH-BP de sus siglas en inglés (*CRH-binding protein*). CRH-BP es una glicoproteína de 37 KDa que no tiene relación estructural con los receptores de CRH. Respecto a su localización celular, se cree que es una proteína secretada ya que no tiene secuencia de anclaje a la membrana plasmática y además captura CRH y UCN1 que no tienen la capacidad de permear la membrana y entrar a la célula. Originalmente fue encontrada en hígado en humanos, y en la corteza del cerebro en rata y ratón, hoy en día se sabe que se encuentra ampliamente distribuida en cerebro de roedores y que co-localiza con CRH en varias áreas incluyendo el hipocampo y la corteza cerebral (Westphal & Seasholtz, 2006, Slater, Yarur, *et al.*, 2016)

CRH-BP tiene la capacidad de asociarse a CRH y a la UCN1 con alta afinidad, y a UCN2 y 3 con baja afinidad, por lo tanto, una de las funciones que se proponen para esta proteína es la de secuestrar CRH y por lo tanto cumplir un rol inhibitorio sobre la neurohormona. Por otro lado, se ha demostrado que el CRHR2 y la CRH-BP co-localizan en áreas como la VTA del cerebro murino y que podría tener un rol de *scaffold* sobre el receptor llevándolo hacia la membrana plasmática (Paula G Slater, Cerda, *et al.*, 2016).

El CRHR1 fue cristalizado completo por primera vez en presencia de un antagonista en el año 2013 (Hollenstein *et al.*, 2013) lo que aportó información inicial acerca de la arquitectura de los GPCRs de clase B. En el caso del CRHR2, aún no se cuenta con la cristalografía completa pero sí de secciones como por ejemplo el dominio estructural del amino terminal (ECD1), que como es sabido para los GPCRs de clase B, es de gran tamaño. Para la estructura de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del CRHR2 se cuentan con estudios del ECD1 utilizando diferentes técnicas (Grace *et al.*, 2007, Pal *et al.*, 2010), que permiten realizar un análisis más profundo acerca de las diferencias en las afinidades de los ligandos a los receptores. En la actualidad, se conocen estas afinidades, que han sido calculadas en experimentos bioquímicos siendo CRH entre 10 y 40 veces más afín al CRHR1 que al CRHR2 dependiendo el sistema de estudio. La UCN1 activa a ambos receptores con afinidades similares y las UCN2 y 3, serían selectivas para el CRHR2 revisado en (Deussing & Chen 2018). En la figura 5 se esquematizan las estructuras de los receptores CRHR1 y CRHR2 $\alpha$  junto con sus ligandos del alta afinidad.

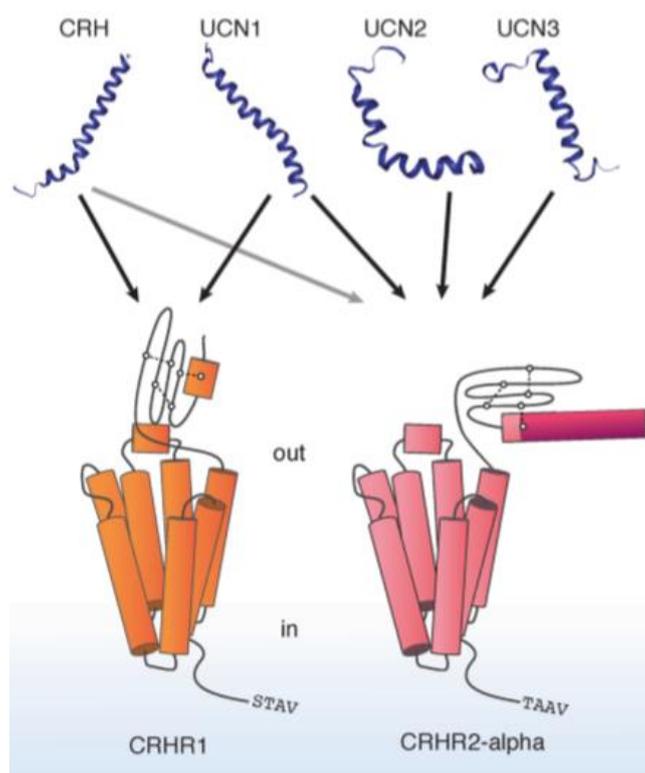


Figura 5: **Receptores de CRH y péptidos relacionados.** Representación de los receptores basados en datos estructurales. En el cerebro encontramos al CRHR1 y al CRHR2 $\alpha$ . Nótese en ambos casos, el gran tamaño del dominio extracelular del amino-terminal, siendo ésta una de las características de los GPCRs de clase B. Además, se observa el pseudopéptido señal del CRHR2 $\alpha$ . Por otro lado, en el dominio carboxilo terminal se aprecia otra diferencia: CRHR1 cuenta con una secuencia PDZ (STAV) que en el CRHR2 $\alpha$  está ausente (TAAV). En azul se observan los 4 ligandos de los receptores, las flechas representan la afinidad a los mismos, siendo la gris la de menor afinidad. Tomado de Inda, Armando, *et al.*, 2017.

### 2.3 Características estructurales del CRHR2 $\alpha$

En el año 2006, Rutz y sus colaboradores, utilizando herramientas de la ingeniería genética y de microscopía, demostraron que el CRHR2 $\alpha$  cuenta con una secuencia no convencional en su amino terminal, un péptido señal no clivable o pseudopéptido señal. Éste fue el primero descrito para las proteínas de membrana de las células eucariotas, habiendo sido encontrado en citomegalovirus y priones (Rutz *et al.*, 2006). El CRHR1 cuenta con un péptido señal clivable que es removido durante su síntesis en el retículo endoplasmático (ER de sus siglas en inglés *Endoplasmic Reticulum*). Se cree que solo entre el 5 y 10% de los GPCRs poseen péptidos señales, el 90-95%

de estos receptores no poseen este tipo de dominios en el amino terminal y una de las hélices transmembrana del receptor maduro (generalmente la primera) funciona como mediador del anclado e inserción en el ER (Heijne, 1992).

Este péptido señal no convencional que posee el CRHR2 $\alpha$  le otorga diferencias clave en la señalización y el tránsito de este GPCR. El grupo de Schülein en el año 2010, realizó un trabajo de comparación entre el CRHR1 y el CRHR2 intercambiando los amino terminales entre éstos. Demostraron que en células HEK293 el pseudopéptido señal regula de manera negativa la cantidad de receptor en la membrana plasmática y aumenta la cantidad de receptor no plegado en compartimentos intracelulares. Además observaron que la respuesta de AMPc era sostenida con concentraciones crecientes de ligando y eso sucedía por la presencia de este péptido señal no convencional que inhibe la actividad de la proteína G inhibitoria (G<sub>i</sub>) y por lo tanto bloquea la inhibición de las adenilil ciclasas (Schulz *et al.*, 2010)

Por otro lado, también de la mano de Schülein y de Teichmann en el año 2012, se demostró que el pseudopéptido señal no permite que el CRHR2 $\alpha$  forme homodímeros. Utilizando técnicas de microscopía FRET y otras como co-inmunoprecipitación, observaron que este receptor se encuentra como monómero, en contraste con el CRHR1 que forma homodímeros en la membrana plasmática (Teichmann *et al.*, 2012).

Respecto al dominio carboxilo terminal, el CRHR2 $\alpha$  contiene una secuencia aminoacídica TAAV, siendo esta diferente a la que tiene el CRHR1 que cuenta con un dominio PDZ (STAV). Esta diferencia resulta clave en la interacción con proteínas como MAGUKs y RGS, ya que interactúan con dominios PDZ como el que contiene el CRHR1 y no con el CRHR2 $\alpha$  (Slater, Yarur, *et al.*, 2016, Deussing & Chen, 2018). Por otro lado se sabe que las proteínas que se unen al PDZ son citoplasmáticas y funcionan como adaptadores estructurales en procesos de señalización que involucran complejos proteicos incluyendo a las  $\beta$ -arrestinas (Hanahan, 1983, Romero G., 2016). Teniendo en cuenta esta diferencia, los CRHRs probablemente tengan una regulación diferente respecto a la señalización y al tránsito intracelular.

En la actualidad lo que se conoce sobre el CRHR1 y la regulación por el motivo PDZ es acerca del reciclado y la endocitosis después de la estimulación. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína asociada a la sinapsis 97 (SAP97 de su nombre en

inglés) interactúa con el dominio carboxilo terminal del CRHR1 modulando su endocitosis (Dunn *et al.*, 2013). Por otro lado, el dominio PDZ permite la interacción y formación de dímeros con otros receptores, por ejemplo el CRHR1 puede interactuar con el receptor de serotonina 5HT<sub>2A</sub> (Magalhaes *et al.*, 2010).

### **3 Mecanismos de señalización de los CRHRs**

La principal vía de señalización que utilizan los receptores de CRH es el acople a proteínas Gs que resulta en el aumento del segundo mensajero AMPc como se explicará en varios ítems a lo largo de la Introducción y Resultados de esta Tesis. Las vías convencionales que utilizan estos receptores incluyen la activación de PKA, así como también, a través de otras proteínas G estimulan calcio e inositol trifosfato (Lovejoy *et al.*, 2014). Sin embargo, dependiendo de varios factores, se ha observado que estos receptores pueden tomar caminos alternativos y unirse de manera promiscua a otras proteínas G. Se conocen al menos 5 tipos diferentes de proteínas G (Gs, Gi, Gq/11, Go y Gz), además pueden interactuar con proteínas de andamiaje como  $\beta$ -arrestinas y proteínas relacionadas con el tráfico celular, lo que resulta en una gran variedad de posibles rutas y respuestas celulares que depende, sobre todo, del contexto celular, y esto no nos sorprende ya que es una característica de los GPCRs en general y de los de Clase B en particular (Grammatopoulos *et al.*, 2001, Wootten *et al.*, 2016).

Entonces, un factor clave para entender los procesos celulares y que resulta de suma importancia para comprender la línea de trabajo de esta Tesis, es el contexto celular donde se está investigando o dónde se quiere investigar ya que es determinante para la señalización en el sistema CRH.

En línea con lo anterior, algunos trabajos sugieren que las funciones de estos receptores podrían resultar antagónicas siempre y cuando estén expresados en las mismas células analizadas. Por ejemplo, Gourcerol y sus colaboradores, demostraron que tanto en células del colon de roedores donde los CRHRs se expresan de manera constitutiva, como en HEK293 sobre-expresándolos, la activación del CRHR2, en este caso analizan la isoforma  $\beta$ , disminuye la actividad del CRHR1. Este fenómeno lo vieron tanto en la expresión de efectores como ERK1/2, segundos mensajeros como AMPc, y acciones fisiológicas como la contracción del colon y la diarrea en los

animales (Gourcerol *et al.*, 2011). Por otro lado, retomando el trabajo de Huising, allí demuestran que al aumentar la expresión del CRHR2, disminuye la de CRHR1, lo cual podría estar ligado a la funcionalidad del mismo (Huising *et al.*, 2011).

Varios estudios han demostrado que los receptores de CRH pueden activar la generación de AMPc luego de ser estimulados (Teli *et al.*, 2005, Pioszak *et al.*, 2008, Inda *et al.*, 2016). Luego del desarrollo de nuevas técnicas para el estudio espacio-temporal de este segundo mensajero, se pudo demostrar que el perfil de la respuesta de generación de AMPc depende del contexto celular para el CRHR1 (Inda *et al.*, 2016). Aún se desconoce si lo mismo sucede en diferentes contextos celulares donde se exprese el CRHR2 $\alpha$ .

### 3.1 Regulación mediada por endocitosis

La organización de los GPCRs en la membrana plasmática está regulada por diferentes interacciones, ya sean receptor-receptor, receptor-lípidos y receptor-proteínas, que restringen y deciden los movimientos que existirán entre la membrana plasmática y el GPCR en cuestión. Algunos GPCRs comienzan a señalizar desde la membrana y otros puede actuar desde otras partes membranosas de las células como el aparato de Golgi o el ER. El tipo de interacción y la localización del receptor va a determinar la especialización necesaria para coordinar diferentes procesos (Weinberg & Puthenveedu, 2019).

Inicialmente, la endocitosis fue descrita como un mecanismo celular que transporta moléculas del medio extracelular hacia el interior de la célula. Focalizando en la endocitosis de los receptores de membrana, la visión tradicional de este proceso consiste en desensibilizar la respuesta de los receptores de la membrana plasmática una vez que ya tuvieron contacto con su agonista y gatillaron sus señales específicas (Weinberg & Puthenveedu, 2019).

Luego de inicializado el proceso de endocitosis ya sea de manera constitutiva o mediada por ligando, los componentes internalizados de la membrana plasmática pueden ser reciclados o destinados a degradación. Entonces, la endocitosis regula constantemente la composición de la membrana plasmática y la exocitosis es la encargada de enviar señales y respuestas al medio extracelular. Por otro lado, la gran cantidad de mecanismos de internalización y la compleja red intracelular de

compartimentos membranosos que existen en las células demuestran la complejidad y la importancia de estos procesos.

Hoy en día, teniendo en cuenta la gran cantidad de evidencias acumuladas, es aceptado que la endocitosis no sólo es un proceso de transporte de moléculas, sino que es una de claves fundamentales en la regulación de la señalización celular (Sigismund *et al.*, 2012). El paradigma clásico sostiene que la internalización de los GPCRs pone fin a la señalización que se realiza desde la membrana plasmática, luego del reclutamiento de proteínas como  $\beta$ -arrestinas. Sin embargo, hoy se conoce que a pesar de que este proceso coincida con la atenuación de las vías de señalización, no significa que sea la regla en todos los casos (Inda, Armando, *et al.*, 2017). Podrían nombrarse al menos tres diferentes roles de la endocitosis: 1- Segregar los GPCRs a un dominio endocítico especializado, 2- Regular estos dominios mediante los GPCRs, y 3- Generar consecuencias en la señalización que difieren tanto entre receptores como entre ligandos que actúan sobre el mismo receptor (Weinberg & Puthenveedu, 2019), y esta última resulta de suma importancia en nuestro trabajo.

El trabajo acumulado en los últimos años acerca de los mecanismos que regula la endocitosis y la importancia de estos ha llevado a desarrollar nuevas técnicas para comprenderlos con mayor claridad. Gracias al gran avance tecnológico, se ha propuesto que la relación entre la endocitosis y los sistemas de transducción de señales es mucho más compleja de lo que se creía (Figura 6). No sólo la endocitosis es el inicio de una cascada de señales en base a moléculas del medio extracelular, sino que estos inicios tienen cinéticas precisas y en sitios de acción definidos, generando que la respuesta biológica esté finamente controlada. Además, luego de la creciente evidencia de que la señalización puede continuar luego de la formación del endosoma y no sólo en la membrana plasmática, revolucionó la comprensión general del proceso de la endocitosis (Roshanak Irannejad & Von Zastrow 2014).

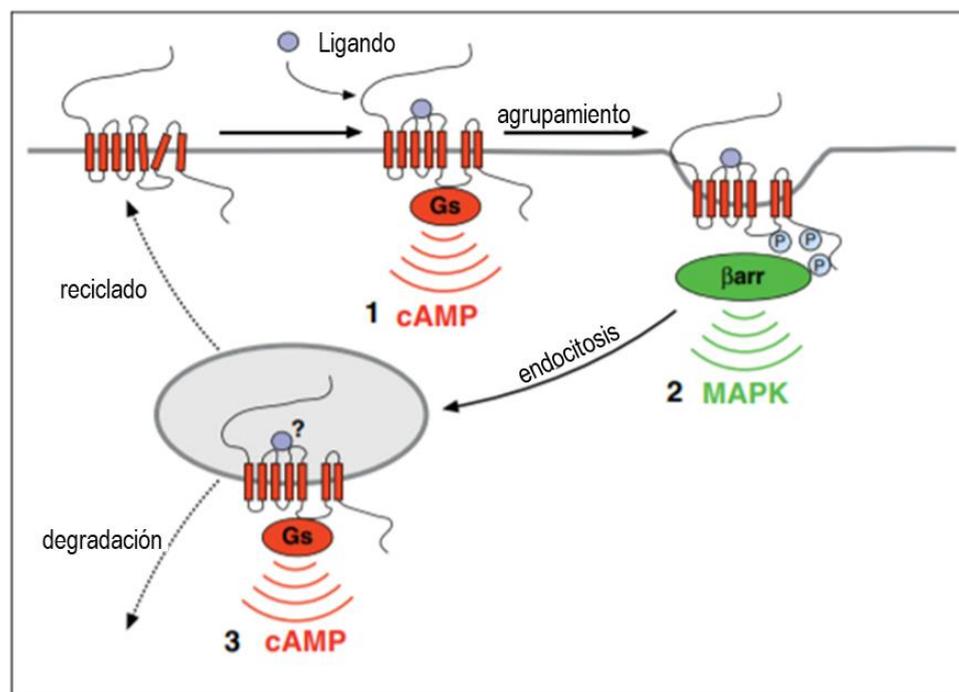


Figura 6: **Modelo propuesto para la endocitosis de los GPCRs utilizando como ejemplo el receptor beta-adrenérgico (β2AR).** 1) El acoplamiento β2AR-Gs promueve la producción de AMPc en la membrana plasmática. (2) La formación del complejo β2AR-arrestinas, se acumula y activa vías de señalización independientes de proteínas G. La activación de la MAP quinasa mediante βarrestinas ocurre durante la formación de los hoyos de clatrina. (3) se produce el acoplamiento de β2AR-Gs nuevamente en la membrana del endosoma temprano, promoviendo una fase discreta de producción de AMPc a partir de endosomas. El "?" Indica que actualmente se desconoce si la señal del endosoma requiere que el agonista continúe unido al receptor. Modificado de Irannejad & Von Zastrow, 2014.

Se cree que los mecanismos de endocitosis para el CRHR2α son similares a los involucrados en el proceso comandado por el CRHR1 el cual está mayormente estudiado. Para el análisis de estos receptores, hoy en día aún no existen anticuerpos que sean lo suficientemente robustos para poder estudiarlos de manera endógena. Por este motivo, en general la manera de abordar su estudio es sobre-expresarlos en algún modelo celular que cumpla con los requisitos del contexto que queremos estudiar. Utilizando células HT22, se ha demostrado para el CRHR1 que luego de 5 minutos de estimulación con CRH, el receptor internaliza y se mantiene en compartimentos intracelulares al menos por 30 minutos, donde se forman acúmulos de receptor dentro de la célula conocidos como *clusters* de endocitosis (Inda *et al.*, 2016). Respecto al CRHR2α luego de la estimulación con UCN2 o 3, se observó una

rápida internalización, mediada por  $\beta$ -arrestina2 y por el reclutamiento de dinamina y clatrina luego de la fosforilación de las colas citoplasmáticas del receptor (Hauger *et al.*, 2013). Sin embargo, respecto al CRHR2 $\alpha$  este terreno se encuentra poco explorado en contextos fisiológicos y como se ha expresado anteriormente, este receptor no contiene un dominio PDZ como el CRHR1 el cual se conoce regula procesos de endocitosis y señalización al unirse con otras proteínas. Esta diferencia hace que sea dificultosa la generación de supuestos acerca de estos procesos para el CRHR2 $\alpha$ .

### 3.2 Señalización sostenida en GPCRs

Un nuevo paradigma se evidenció por primera vez cuando se descubrió que el receptor Ste2p en *Saccharomyces cerevisiae* continuaba señalizando desde compartimentos intracelulares y que esto dependía de la proteína G $\alpha$  y generaba una fase tardía de señalización (Slessareva *et al.*, 2006). En el caso de células en mamíferos, tres trabajos independientes que estudiaban los mecanismos de activación de diferentes receptores han demostrado una respuesta prolongada en la señalización de GPCRs. Para el receptor de TSH, usando ratones transgénicos que expresan sensores de FRET para AMPc, observaron que la activación del receptor en células foliculares de la tiroides generaba una respuesta prolongada de AMPc relacionada con la endocitosis. Además, se demostró que el TSHR internalizaba con la subunidad Gs y las adenilil ciclasas transmembranas (tmAC) en compartimentos endosomales (Calebiro *et al.*, 2009). Resultados similares fueron encontrados para el receptor de la hormona paratiroidea (PTH) (Ferrandon *et al.*, 2009). Por otro lado, para el receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P1R), se observó también un efecto de señalización prolongada pero esta vez asociado a la proteína G inhibitoria (Gi) (Mullershausen *et al.*, 2009). Esta evidencia de señalización prolongada fue llamada vía no canónica, ya que se consideraba que la activación aguda de las proteínas G estaba restringida a la membrana plasmática, siendo esta la vía clásica. Hoy en día, se sabe que esta manera de señalizar es utilizada por varios GPCRs, incluyendo receptores de hormonas peptídicas y sería considerada una generalidad más que una excepción. El receptor de glucagon (GLP1R) (Kuna *et al.*, 2013), el receptor del polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria tipo 1 (PACAP1R) (Merriam *et al.*, 2013), el receptor de vasopresina (V2R) (Feinstein *et al.*, 2013), receptores de monoamina como los receptores de dopamina (Kotowski *et al.*, 2011) y el  $\beta$ 2AR (R

Irannejad *et al.*, 2013, Tsvetanova & von Zastrow, 2014) utilizarían la vía no canónica para continuar su señalización dentro de la célula.

Las  $\beta$ -arrestinas no sólo terminan la actividad GEF al unirse a los GPCRs, ni tampoco son sólo adaptadores endocíticos, sino que también tienen participación en la señalización. Se conoce que las  $\beta$ -arrestinas pueden unirse a más de 20 proteínas quinasa y promover la activación de por ejemplo MAPKs, serina-treonina quinasas como ERK1/2, p38 y quinasas de c-Jun N terminal (DeWire *et al.*, 2007). El nuevo paradigma de señalización y la participación de las  $\beta$ -arrestinas tanto en la endocitosis como en la señalización, las han relacionado como posibles reguladoras de la activación de efectores desde compartimientos endocíticos (Eichel & von Zastrow, 2018).

Trabajos recientes de nuestro laboratorio de la mano de la Dra. Carolina Inda, han demostrado que el receptor de tipo 1 de CRH (CRHR1), luego de ser activado por el ligando, genera una respuesta de AMPc prolongada y que la misma viene acompañada de la endocitosis. Utilizando una línea celular hipocampal de ratón que expresa de manera estable al CRHR1 y cultivos primarios de hipocampo de ratón, se utilizó un sensor de FRET para medir la generación de AMPc en tiempo real (Inda *et al.*, 2016). Inda y sus colaboradores, pudieron demostrar que la fuente de AMPc involucrada en esta respuesta prolongada no era la clásica adenilil ciclasa transmembrana (tmAC), sino que el segundo mensajero provenía de una fuente no convencional llamada adenilil ciclasa soluble (sAC) (ver más adelante).

Teniendo en cuenta todas estas evidencias, se considera que es necesario reevaluar la señalización de muchos receptores con una visión mucho más compleja ya que este nuevo paradigma no sólo cambia la forma de estudiar la internalización de los receptores, sino también los métodos ya que se necesita una resolución temporal y espacial para estudiar este tipo de fenómenos. De esta manera se introducen en el campo los sensores basados en la visualización, los cuales permiten estudiar con mayor resolución y en tiempo real los diferentes estadios de los mecanismos de activación y tráfico de los GPCRs. Gracias a estas nuevas tecnologías, se pudo demostrar que la internalización no sólo significa la finalización de la cascada de señales activada por ese GPCR, sino que también puede seguir activo una vez

internalizado y generar una señalización prolongada en el tiempo (Irannejad & Von Zastrow, 2014, Vilardaga *et al.*, 2014, Pavlos & Friedman, 2016).

### 3.3 La respuesta de AMPc y su relevancia como regulador de procesos celulares

Muchas de las funciones biológicas dirigidas por los receptores de CRH en el sistema nervioso central se relacionan con la capacidad de generar AMPc. En 1958 se describió por primera vez a la molécula adenosina 3', 5' monofosfato o AMPc la cual funcionaba como mediadora de la adrenalina (Rall *et al.*, 1956, Rall, 1958). Años después, se descubrió la acción enzimática sobre ATP, siendo la encargada de ejercer una reacción de ciclación generando AMPc (adenilil ciclasa, Sutherland *et al.*, 1962). A continuación se describió la enzima responsable de su degradación (fosfodiesterasa, Sutherland, 1962). Luego de encontrar a esta molécula involucrada en la señalización de múltiples hormonas y procesos, se decidió nombrarla como "segundo mensajero" siendo el primer mensajero las hormonas (Sutherland *et al.*, 1965; Sutherland y Robison, 1966).

El amplio rango y la gran variedad de procesos celulares que regula el AMPc han abierto un campo emocionante para explorar su función como segundo mensajero. La primera pregunta que surge respecto a la acción del AMPc, es una que aún no ha sido del todo contestada, ¿Cómo es posible que una sola molécula pueda regular tantos procesos, a menudo fisiológicamente opuestos, en el mismo momento? La respuesta más inmediata surgió al comprender la existencia de microdominios de AMPc donde esta molécula se encuentra sumamente regulada a niveles subcelulares para asegurar la acción precisa que ejercerá (Buxton & Brunton 1983).

Por otro lado, además de los microdominios de AMPc, otra respuesta a la forma de regular diferentes procesos en el mismo momento es gracias a la existencia de más de una fuente generadora del segundo mensajero con diferentes patrones de expresión y propiedades regulatorias. Estas fuentes son las adenilil ciclasas transmembrana y la adenilil ciclasa soluble (tmACs y sAC respectivamente), quienes no sólo funcionarían como generadoras de AMPc sino también como reclutas dentro de su microambiente de componentes de señalización y moléculas estructurales contribuyendo a la regulación espacio temporal de las señales (Cooper & Tabbasum 2014).

Por otro lado, y como se viene remarcando a lo largo de la introducción de esta Tesis, el contexto celular aparenta ser clave en la toma de decisiones de la célula a la hora de activar o no una cascada de señalización mediante una determinada vía. Nuestro laboratorio ha demostrado que dependiendo del contexto donde el CRHR1 está expresado puede activar al AMPc de manera sostenida (HT22-CRHR1), o en forma aguda (AtT20) o no activarlo (3T3L1-CRHR1) (Inda *et al.*, 2016).

### 3.3.1 Clasificación de Adenilil Ciclasas

La primera fuente de AMPc descrita es aquella que se encuentra integrada en la membrana plasmática de las células, las llamadas adenilil ciclasas transmembrana o tmACs. En mamíferos se conocen 9 isoformas de tmACs altamente conservadas a nivel estructural (AC1-AC9) las cuales se regulan por diferentes mecanismos pero todas dependientes de proteínas G y activables por forskolina, molécula permeable a la membrana plasmática que activa AMPc independientemente de un estímulo (Willoughby & Cooper 2007). La estructura de las tmACs cuenta con un extremo amino-terminal variable, seguido con un dominio de 6 hélices transmembrana, un dominio catalítico C1 seguido de otras 6 hélices transmembrana y finalmente otro dominio catalítico conocido como C2 hacia el extremo carboxilo terminal (Figura 7). Las diferencias entre enzimas se encuentran fuera de estos dominios catalíticos y transmembrana y son los que definen sus diferentes regulaciones y modos de accionar.

La segunda fuente de AMPc es conocida como no convencional y su nombre es adenilil ciclasa soluble o sAC como se mencionó previamente. Esta variante es la décima de las adenilil ciclasas (AC10) la cual carece de dominios transmembrana pero conserva ambos dominios catalíticos y cuya conservación a nivel evolutivo es mayor que la que presentan las tmACs (Yanqiu Chen *et al.*, 2000). La primera descripción de sAC fue en testículo de rata en 1975 (Braun & Dods 1975) pero fue hasta el 1999 que se logró su clonación donde se conoció su estructura y su bioquímica (Buck *et al.*, 1999). Hoy en día se conoce que sAC se encuentra expresada de manera ubicua en los tejidos de mamíferos (Stiles, Kapiloff, & Goldberg 2014) y que existen varias isoformas pero que la única que parecería ser activa es conocida como sAC truncada o sAC<sub>t</sub> (Buck *et al.*, 1999, Jaiswal & Conti, 2001). sAC<sub>t</sub> se encuentra constitutivamente activa por sus dos dominios catalíticos y no parecería

tener una secuencia regulatoria en su extremo carboxilo terminal. Se la ha encontrado en citoplasma, así como también asociada a dominios transmembrana, mitocondria y núcleo donde formaría sus propios microdominios de señalización (Kamenetsky *et al.*, 2006). sAC se activa directamente por calcio, el cual es necesario para su actividad catalítica, y por bicarbonato que aumenta la tasa catalítica favoreciendo el intercambio entre producto y sustrato (Litvin *et al.*, 2003, Steegborn *et al.*, 2005, Kleinboelting *et al.*, 2014). Por otro lado, esta molécula no es sensible a la acción de proteínas G heterotriméricas y no se conocen proteínas regulatorias o modificaciones postraduccionales que cumplan una funcional similar a la que ejercen las proteínas G en las tmACs, pero existen evidencias que relacionan la regulación intramolecular por el amino terminal en isoformas que lo poseen (Kamenetsky *et al.*, 2006, Tresguerres *et al.*, 2011).

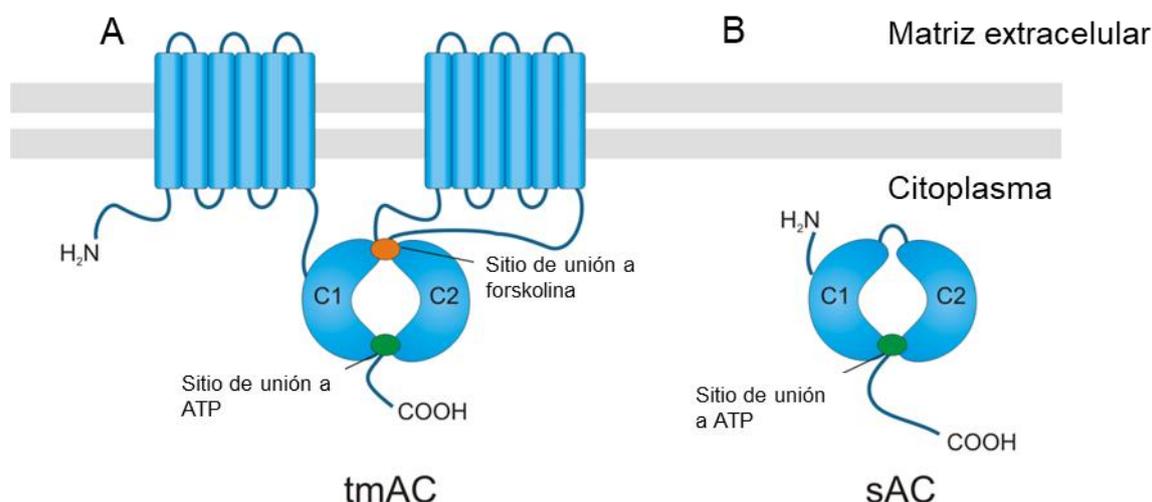


Figura 7: **Esquema de las estructuras de las fuentes de AMPc.** A) Representación de las adenilil ciclasas transmembrana (tmACs) con sus dos dominios catalíticos, nombrados como C1 y C2, y sus dos dominios transmembrana. B) Representación de la adenilil ciclasa soluble (sAC) con sus dos dominios catalíticos C1 y C2. Modificado de Tresguerres *et al.*, 2011.

Originalmente se pensaba que la señalización vía AMPc activada por GPCRs sólo dependía de las tmACs, hoy en día se ha demostrado que sAC también participa en la vías activadas por estos receptores (Halm *et al.*, 2010, Ivonnet *et al.*, 2015). De hecho, nuestro laboratorio ha demostrado la participación de sAC en la señalización activada por CRH y mediada por CRHR1 en las líneas celulares HT22-CRHR1 y AtT20 como se ha comentado en la sección 3.2. Nuestros estudios revelaron que las

dos fuentes de AMPc están involucradas en dos escenarios diferentes con alta relevancia fisiológica utilizando las células anteriormente nombradas y otra línea neuroendócrina llamada AtT20. Por otro lado, hemos podido demostrar que las diferentes fuentes de AMPc regulan diversos mecanismos moleculares: tanto las tmACs como sAC son necesarias para la activación rápida y aguda del efector ERK1/2 pero sólo sAC es crítica para la fase sostenida de activación de este efector (Inda *et al.*, 2016) o para regular la neuritogenesis activada por CRH/CRHR1 en las células HT22-CRHR1 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017).

Finalmente, la función de sAC asociada a GPCRs es completamente dependiente del contexto celular. CRHR1 puede utilizar a sAC para señalizar en un contexto neuronal hipocampal, pero no en el contexto celular de una línea derivada de fibroblastos expresando el CRHR1 (3T3L1-CRHR1) (Inda *et al.*, 2016).

### 3.3.2 Rol de AMPc en la proliferación y diferenciación celular

Siendo la proliferación y la diferenciación procesos supuestamente antagónicos, es difícil comprender que una misma molécula pueda regular ambos dependiendo del ligando o contexto celular. El AMPc sigue siendo el mensajero estrella para decidir cuál de estos efectos opuestos se llevará a cabo. La primera evidencia sobre esto fue en embriones de pollo donde el aumento de AMPc promovía la elongación de axones (Roisen *et al.*, 1972). Este descubrimiento abrió las puertas a gran cantidad de estudios que se dedicaron a entender la función de AMPc en el crecimiento axonal, la polarización celular, y otro rol clave a nivel neurobiológico, la capacidad neuritogénica de las neuronas (Cai *et al.*, 2001; Shewan *et al.*, 2002).

Cuando una neurona entra en el proceso de diferenciación una gran variedad de mecanismos se activan: cambios morfológicos, arresto del crecimiento, cambios bioquímicos, aumento de la excitabilidad eléctrica y la expresión de ciertos genes específicos. Uno de los genes que se activan durante estos procesos es CREB, y su rol ha sido y sigue siendo investigado. Respecto a ERK1/2, se sabe que la diferenciación celular dependiente de AMPc, implica a este efector en ciertos estadios o tipos celulares (Grewal, York, & Stork 1999; Grewal *et al.* 2000; Patterson *et al.* 2001; Vogt Weisenhorn *et al.* 2001; Zanassi *et al.* 2001)

El uso de modelos celulares como las células PC12 (derivada de feocromocitoma de rata) y Neuro2A (derivada de neuroblastoma murino) permitió observar que la

neuritogénesis está acompañada del arresto en la proliferación celular. A su vez, han sido importantes para aproximar los mecanismos involucrados en la elongación de neuritas y en las vías de señalización que podrían estar involucradas en la integración de señales extracelulares respecto al estímulo en el contexto fisiológico (Vaudry *et al.*, 2002).

Se ha demostrado en diferentes modelos experimentales que el AMPc inhibe la proliferación celular. En estos modelos se identificaron mecanismos dependientes e independientes de ERK1/2, donde el AMPc inhibe la proliferación sin inhibir a ERK1/2 aunque en algunos casos lo utiliza para lograr el arresto de este proceso. Por el contrario, el AMPc puede tener acción antiproliferativa mediante la inhibición de ERK1/2 mediada por factores de crecimiento. Finalmente el AMPc también puede estimular la proliferación a través de ERK1/2 en numerosos modelos celulares (Stork & Schmitt 2002).

El rol de CRHR1/CRH en la proliferación y diferenciación celular ya ha sido estudiado previamente. Se logró evidenciar que este sistema no siempre tiene el mismo rol, sino que depende del estadio de diferenciación y del contexto celular. En células SK-N-SH que corresponden a neuroblastoma, y en otros linajes celulares tumorales como corticotrofos, endometrio y mama, CRH tiene una acción antiproliferativa (Melzig, 1994; Graziani *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2014; Stuhr *et al.*, 2014; Pozzoli *et al.*, 2015) mientras en otros modelos como el de cáncer de piel y gástricos tiene efecto proliferativo (Arbiser *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2013).

Nuestro laboratorio ha demostrado que en las células HT22-CRHR1, CRH estimula la diferenciación celular mediante el AMPc generado por sAC. A su vez, se produce un arresto en la proliferación celular y estos procesos son independientes de la activación de ERK1/2 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). El rol del CRHR2 en este tipo de procesos aún se desconoce.

### 3.4 Efectores río abajo del AMPc

Diversos estudios a lo largo de los años han caracterizado minuciosamente la señalización de los GPCRs acoplados a proteínas G y se conoce que uno de los mayores mensajeros activados por esta vía es AMPc generado por tmACs. Toda la información acumulada, resume que las hormonas en general utilizan a AMPc seguido por la activación de la proteína quinasa A (PKA) para ejercer sus funciones

metabólicas y esto le otorga al AMPc un rol principal en la regulación de gran parte de los procesos biológicos de las células. En la siguiente sección se detallan las vías río abajo de AMPc que se consideran importantes para contextualizar esta Tesis.

### 3.4.1 Activación de ERK1/2

Las cascadas de las MAP quinasas (MAPKs) consisten en un bloque que contiene la función de 3 quinasas: MAPKKK-MAPKK-MAPK que activan una gran cantidad de procesos diversos en las células eucariotas. Hasta el día de hoy, se han caracterizado seis grupos diferentes de MAPKs en mamíferos siendo ERK1 y ERK2 (de sus siglas en inglés *Extracellular signal-Regulated Kinases*) uno de los más importantes tanto en el estudio de la señalización en cáncer como en estrés (Dhillon *et al.*, 2007). Las mismas son proteínas conservadas de 44 y 42 KDa respectivamente que comparten un 84% de homología en sus secuencias, pero poco se sabe acerca de sus acciones específicas particulares ya que ambas de expresan de manera ubicua y su selectividad por los sustratos es la misma. La actividad desregulada de ERK1/2 está asociada a enfermedades como cáncer, desórdenes inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas (Lawrence *et al.*, 2008, Tartaglia & Gelb, 2010).

Particularmente para los receptores de CRH, se le ha otorgado gran importancia biológica a la vía MAPK ERK1/2. Fisiológicamente, ERK1/2 se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y se le otorga un rol fundamental como regulador de procesos moleculares clave como el aprendizaje, la memoria, la neuroplasticidad y la respuesta a estrés (Refojo *et al.*, 2005; Bonfiglio *et al.*, 2011). En la línea celular neuroendócrina AtT20, la activación de ERK1/2 dependiente de AMPc es crítica para la expresión de POMC, siendo éste el precursor de ACTH (Kovalovsky *et al.*, 2002; Van Kolen *et al.*, 2010). Además, la administración intracerebroventricular de CRH activa ERK1/2 regiones específicas del cerebro que están involucradas en procesar información y en aspectos comportamentales de la respuesta a estrés como el hipocampo, y la amígdala basolateral (Damián Refojo *et al.*, 2005).

Este descubrimiento nos lleva a pensar sobre el tipo de vías de señalización activadas en, por ejemplo, el hipocampo, y mediadas por ERK1/2. Lo que se conoce acerca de los mecanismos moleculares en ese contexto celular, sumamente importante para la respuesta a estrés, es utilizando la ya mencionada línea celular HT22-CRHR1 como

modelo. El perfil temporal de fosforilación de ERK1/2 en un contexto neuronal hipocampal en respuesta a CRH es bifásico, con un primer pico de activación entre 3-6 minutos después de la estimulación y una segunda fase que mantiene la activación al menos por 60 minutos después de la adición de CRH (J J Bonfiglio *et al.*, 2013). Además, en este contexto hipocampal, la activación de ERK1/2 es dependiente de los niveles de AMPc en respuesta a CRH (Bonfiglio *et al.*, 2013, Inda *et al.*, 2016). En este caso, el efecto de AMPc sobre ERK1/2 es estimulador, pero existen otros contextos celulares que tienen una respuesta contraria a la observada en células hipocampales. Por ejemplo, en contextos neuroendocrinos (Kovalovsky *et al.*, 2002, Van Kolen *et al.*, 2010) o en sistemas neuronales (Bonfiglio *et al.*, 2013, Inda *et al.*, 2016) el incremento de AMPc, está relacionado con un aumento en la fosforilación de ERK1/2 y en fibroblastos, como las células 3T3L1, la activación de AMPc está desacoplada de la fosforilación de ERK1/2 (Emery *et al.*, 2014; Inda *et al.*, 2016).

Por otro lado en las células derivadas de fibroblastos previamente mencionadas 3T3L1-CRHR1 (Inda *et al.*, 2016) y en HEK293 expresando el CRHR1 o el CRHR2 (Grammatopoulos *et al.*, 2000, Markovic *et al.*, 2008, Markovic *et al.*, 2011) ERK1/2 es activado en respuesta al estímulo con CRH o con UCNs pero de manera independiente del AMPc. La complejidad de este sistema no termina aquí, sino que también en sistemas celulares donde AMPc regula la fosforilación de ERK1/2, existen cascadas de señalización y funciones de CRH a través del AMPc que son independientes de ERK1/2 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). A su vez, se conoce que el AMPc puede operar vía PKA o a través de EPACs (de sus siglas en inglés *Exchange Protein Activated by cAMP*) y en nuestro sistema, se ha visto para el CRHR1 y para el CRHR2 $\beta$  que esta señalización existe en diferentes contextos celulares (Van Kolen *et al.*, 2010, Markovic *et al.*, 2011, Inda *et al.*, 2016).

### 3.4.2 Activación de Akt

El estudio de Akt comenzó principalmente por su extrema relación con la oncogénesis. En 1991 se clonó por primera vez una proteína oncogénica viral llamada *v-akt* y por bioinformática se supuso que poseía actividad de quinasa y que esa actividad estaba directamente relacionada con la tumorigénesis (Ahmed *et al.*, 1993). Hoy en día se conoce que Akt pertenece a una familia de 3 proteínas altamente

conservadas: Akt1, Akt2 y Akt3. Estas, pertenecen a la familia de las proteínas quinasas B (PKB). La cantidad de estudios acerca de las funciones de Akt ha aumentado radicalmente con el correr de los años ya que se la relacionó con la proliferación, supervivencia, tamaño, metabolismo, invasión y angiogénesis no sólo en células tumorales sino también en células sanas (Bellacosa *et al.*, 2005). La desregulación en la transcripción de Akt perturba la regulación de tantos procesos que ha sido designada como una de las moléculas principales en la vías de señalización destacadas en cánceres en humanos (Hanahan & Weinberg, 2000), pero además se la ha relacionado con la diabetes, enfermedades cardiovasculares y Alzheimer. Esta alta relación respecto a Akt y la amplia variedad de enfermedades ha abierto la puerta a comprender en detalle las vías de señalización en las que Akt está implicada para descubrir nuevos posibles blancos terapéuticos para fármacos utilizados en el tratamiento de todas estas patologías previamente mencionadas.

Respecto a las vías de señalización, Akt está en la vía de PI3K (de sus siglas en inglés, *Phosphoinositide 3-kinase*), donde uno de sus tantos sustratos que se encuentra río abajo de su activación, es el factor de transcripción FOXO el cual regula una amplia variedad de genes respecto a la longevidad de los organismos y la supresión tumoral. mTOR (de sus siglas en inglés: *mammalian target of rapamycin*) es otro sustrato importante de Akt, el cual se encuentra involucrado en una gran variedad de procesos: activa la síntesis de proteínas relacionadas con supervivencia, proliferación y tamaño celular (Testa & Tsichlis 2005).

Se ha encontrado que las 3 isoformas de Akt se encuentran expresadas en cerebro, siendo Akt1 y Akt2 las más abundantes. Estudios previos han demostrado que Akt cumple un rol en la protección neuronal, donde actúa como regulador de procesos como la apoptosis. Además, se conoce que Akt puede activar a la microglía la cual es vital para la supervivencia celular y el mantenimiento de la integridad del DNA. Por otro lado, Akt regula la activación de GSK-3 $\beta$ , un factor pro-apoptótico, en las neuronas, lo que afirma su efecto neuroprotector (Chong *et al.*, 2005; Facci *et al.*, 2003).

En la actualidad, se ha relacionado a Akt y su regulación con el proceso de endocitosis. Varios trabajos en diferentes GPCRs como los receptores de quimiocinas (CXCRs) y los receptores tirosina-quinasa (RTKs), han demostrado que Akt tiene

actividad desde el lado interno de la membrana plasmática, que se encuentra relacionado con las Rab5 (siendo este un marcador de endosoma temprano), así como también con Rab7 (marcador de endosoma tardío). Esto nos resulta importante, ya que Akt tiene una amplia gama de sustratos, y al participar activamente de la endocitosis, la regulación de este proceso resultaría ser aún más compleja y delicada de lo que se cree. Por otro lado, al formar parte de los endosomas, Akt podría señalar desde microdominios de membrana que hoy en día se conocen claramente gracias a las nuevas tecnologías en *imaging* y microscopía (English *et al.*, 2018, Sugiyama *et al.*, 2019).

Existe una gran variedad de trabajos en señalización celular que correlacionan la fosforilación de ERK1/2 y de Akt de diferentes maneras, tanto positivas como negativas. Particularmente en el cerebro, se ha demostrado que la vía PI3K y la de las MAPK en modelos de cerebros de ratón isquémicos son antagónicas, donde al activar Akt, la cantidad de ERK1/2 activado disminuye y esto se debe a que pAkt fosforila a la quinasa Raf-1 lo cual bloquea la vía de activación ERK1/2 (Zhou *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha visto que Akt puede ser activado por diferentes GPCRs en el cerebro. Uno de ellos es el receptor de cannabinoides CD1 el cual activa la fosforilación de Akt luego de ser estimulado con THC, en áreas del cerebro como el hipocampo, el cerebelo y el estriado. Se cree que en este caso la acción de Akt es proteger a las células de estas estructuras de entrar en apoptosis y que a diferencia del trabajo anterior, esta acción en el hipocampo no depende de las MAPK (Ozaita, Puighermanal, & Maldonado 2007).

La función que puede cumplir Akt en el Eje HPA todavía no está clara, los reportes que existen hoy en día sugieren que la depresión y el estrés crónico disrumpen la señalización vía BDNF incluyendo ERK1/2, Akt y CREB (Tomita *et al.*, 2013). Por esto y por la relevancia biológica de Akt, consideramos que debe ser incluido como un efector clave dentro del estudio de los mecanismos moleculares en la respuesta de estrés y el sistema CRH.

### 3.4.3 Activación y regulación transcripcional de CREB

Como en la mayoría de los procesos celulares, el aumento intracelular del AMP conlleva a la inducción de proteínas específicas (Wicks, 1969). Luego de varios años de estudio, se identificó una secuencia nucleotídica conocida como CRE como un

elemento de respuesta a AMPc (CRE, de sus siglas en inglés *cAMP response element*) en el gen de la somatostatina, luego se purificó al factor de transcripción capaz de unirse a CRE, conocido como CREB, y así se sentaron las bases del efecto de AMPc a largo plazo y cómo se involucra en mecanismos transcripcionales de la célula (Montminy *et al.*, 1986, Montminy & Bilezikjian, 1988, Lonze & Ginty, 2002).

Para ser activado, CREB necesita ser fosforilado en su aminoácido Ser133 y esta acción depende de quinasas, entre ellas PKA, quinasas dependientes de calcio/calmodulina, ERK1/2, Akt, p38, Ca<sup>+2</sup>, entre otros (Alberini, 2009). Una vez fosforilado, CREB inicia programas transcripcionales complejos que de hecho aún no se conocen por completo los mecanismos que definen la especificidad según estimulación y contexto celular. Los genes sobre los que CREB puede actuar son cientos y pueden accionar diversas funciones, desde metabólicas hasta estructurales (Lonze & Ginty 2002). Dentro de todos los procesos en los que CREB está involucrado, la memoria y el aprendizaje fueron dos a los que se ha prestado especial atención. Se demostró que es un factor en el que convergen varias vías de señalización dependientes de la actividad neuronal, comenzando por el aumento de AMPc que depende de GPCRs, luego el aumento de calcio por canales dependientes de voltaje o ligando, la activación de RTKs por factores de crecimiento y la regulación de proteínas asociadas a la plasticidad celular (Benito & Barco 2010).

A nivel neuronal, la fosforilación de CREB es esencial para responder a nivel transcripcional a múltiples señales externas. Por otro lado, CREB como factor de transcripción está íntimamente relacionado con la plasticidad sináptica, junto con otros como AP-1 y Erg, mientras que éstos se distinguen de aquellos que se relacionan con el desarrollo neuronal como Hex GATA y SOX (Alberini, 2009). Se destaca esta característica, ya que como se explicó en la sección 1.2 de esta introducción, CRH/CRHR1 está involucrado en la plasticidad sináptica en el hipocampo y por lo tanto en la memoria y el aprendizaje. La fosforilación en la serina 133 de CREB, también se relaciona con estos procesos, por lo tanto, es un buen blanco de estudio para explorar las vías de señalización del sistema CRH en un entorno hipocampal.

En el caso de la activación vía CRH, utilizando las células HT22-CRHR1 se demostró que la fosforilación de CREB es independiente de la quinasa ERK1/2 pero dependiente de ambas fuentes de AMPc, sAC y tmAC (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017).

#### **4 *Immediately early genes* (IEGs)**

Los primeros IEGs fueron descritos para células no neuronales buscando genes que estuvieran relacionados con factores de crecimiento y con la regulación del ciclo celular. Fue así como se encontraron los primeros genes que se activaban rápidamente luego de agregar factores de crecimiento a las células. *c-fos* y *c-myc* fueron los primeros descritos, el primero se transcribe rápidamente luego de unos minutos de estimular las células con estos factores y el segundo precede a la transcripción de *c-fos* (Sheng & Greenberg, 1990). En general todos los IEGs comparten algunas características, su expresión es baja o indetectable en células quiescentes pero su expresión aumenta rápidamente luego de un estímulo sin depender de la síntesis de proteínas (Stiles *et al.*, 2014, Bahrami & Drabløs 2016). El tiempo de vida media de estos mRNA es muy corto, aproximadamente 10-15 minutos para *c-fos* por lo que significa que la regulación de estos genes está muy controlada.

En el sistema nervioso, los IEGs cumplen un rol central ya que, al tener una regulación extremadamente fina, se los relacionó directamente con uno de los procesos más sincronizados de la biología: la sinapsis. La primera vez que fue sugerida esta relación fue en 1985 utilizando las células PC12 (feocromocitoma de médula suprarrenal de rata) que al ser estimuladas por neurotransmisores o por pulsos eléctricos, aumentaba la transcripción de los IEGs (Greenberg *et al.*, 1985, Greenberg *et al.*, 1986). Fue así como las PC12 se convirtieron en un sistema de estudio muy utilizado para delimitar los primeros descubrimientos de estos genes relacionados con el sistema nervioso.

Los IEGs se pueden clasificar en dos clases según su función, la primera se la conoce como RTFs (por sus siglas en inglés, *Regulatory Transcriptional Function*). Estos genes regulan otros genes que se encuentran río abajo de ellos mismos. La segunda clase es conocida como IEGs efectores, siendo ellos mismos quienes influyen en los procesos celulares directamente. Hoy en día las nuevas tecnologías como catFISH han abierto nuevas puertas y se ha podido relacionar a los IEGs con la temporalidad de los procesos, ya que por ejemplo algunos IEGs como *Homer-1<sup>a</sup>*, *Arc*, y *egr1* en

neuronas, aparecen rápidamente en el núcleo luego de la activación neuronal, acto seguido, son transferidos al citoplasma. Esta diferencia temporal compartimental puede ser analizada por marcación de los mRNA y dar nueva información sobre la activación neuronal en diferentes lapsos de tiempo siguiendo al IEG en cuestión (Minatohara *et al.*, 2016).

La expresión de los IEGs se ha utilizado ampliamente para el estudio de la actividad hipocampal ya que se puede relacionar su función con la región del hipocampo en la que se estén expresando. Los más comúnmente utilizados para el estudio del comportamiento y la actividad hipocampal son *c-fos*, *c-jun* y *zif-268* dentro de los RTFs y *Homer-1A* y *Arc* dentro de los IEGs efectores (Kubik *et al.*, 2007).

Por otro lado, estudios actuales involucran a los IEGs con la plasticidad neuronal y con los diferentes tipos de formación de memoria. El hipocampo, ha sido declarado como centro de la formación de la memoria, y se ha demostrado que al aplicar ciertos *tests* representativos, la expresión de IEGs aumenta drásticamente en las neuronas activadas (aproximadamente un 40% del total de las neuronas de la zona estudiada) (Minatohara *et al.*, 2016).

Desde hace varios años, *c-fos* se utiliza como indicador para estudiar circuitos neuronales luego de aplicar diferentes estímulos ya que se utiliza como marcador de neuronas activadas. Se conoce la expresión de *c-fos* en muchas estructuras del cerebro, sin embargo su función en el hipocampo resulta ser una de las más importantes junto con otros IEGs que se co-expresan frente a diferentes estímulos (Minatohara *et al.*, 2016). Particularmente en el sistema CRH, se lo ha empleado como indicador de actividad neuronal en el cerebro luego de inyecciones con el neuropéptido. Por ISH se identificaron las zonas donde se encontraba el transcripto de *c-fos* luego de estimular por diferentes maneras, y se las correlacionaron con las zonas donde se encontraron los transcriptos de los receptores (Dubé *et al.*, 2000, Bittencourt & Sawchenko, 2000). Por otro lado, mediante la misma técnica se ha demostrado que luego de una exposición a estrés en ratas, aumenta la expresión de *c-fos* y de otro IEG llamado NGFI-B en el eje HPA (Smith *et al.*, 1997). De esta manera se puede relacionar al sistema CRH con la expresión de *c-fos*.

Nuestro laboratorio involucró a *c-fos* en la diferenciación celular activada por el AMPc generado al estimular con CRH las células HT22-CRHR1 que como se ha

mencionado al inicio de esta Introducción, corresponden a una línea celular neuronal de hipocampo de ratón. A su vez, este gen es dependiente de la activación de CREB en este contexto celular. Es esperable que se activen IEGs en la diferenciación neuronal, por lo que estos descubrimientos refuerzan la utilización de las células HT22 como reflejo de las células hipocampales (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017).

# OBJETIVOS

## Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo es caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la señalización de CRH y las UCNs mediada por el CRHR2 $\alpha$  en el sistema nervioso central donde el sistema CRH cumple un rol crucial en la respuesta frente al estrés y en el desarrollo de patologías asociadas.

Teniendo en cuenta la importancia del contexto celular en la señalización de los receptores de CRH, decidimos utilizar como modelo neuronal hipocampal a las células HT22, expresando de manera estable el CRHR2 $\alpha$  (células HT22-CRHR2 $\alpha$ ).

Nos propusimos para este trabajo los siguientes **objetivos particulares**:

- Determinar el perfil de activación de ERK1/2 mediado por el CRHR2 $\alpha$  tras ser estimulado con CRH y las UCNs.
- Caracterizar la activación de otros efectores como Akt y CREB dependientes de la activación del CRHR2 $\alpha$ .
- Analizar la participación de AMPc y sus dos fuentes generadoras (tmACs y sAC), así como también la de PKA en la activación de los efectores río abajo del CRHR2 $\alpha$  en un entorno neuronal.
- Investigar si las UCNs tienen la capacidad de generar cambios morfológicos en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  y de ser así estudiar vías de señalización que participen en el proceso.
- Estudiar el tránsito celular y la endocitosis del CRHR2 $\alpha$  dependiente de las UCNs.
- Comparar los resultados obtenidos en la línea HT22-CRHR2 $\alpha$  con otros sistemas celulares periféricos y en cultivos primarios neuronales para comprender la dependencia del contexto en los mecanismos estudiados.

Nuestra **hipótesis de trabajo** sostiene que las vías de señalización activadas por el sistema UCNs/CRHR2 $\alpha$  son dependientes del contexto celular, y del ligando que participe en cada proceso. La descripción de los efectores participantes en estas vías en un contexto neuronal, contribuirán a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la acción del sistema CRH.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Materiales y Métodos

### 1 Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

**HT22:** Esta línea celular corresponde a un subclon de la línea HT4, la cual deriva de un cultivo primario de hipocampo de ratón. Fue cedida generosamente por el Dr. Dietmar Spengler (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Múnich, Alemania). Durante la Tesis de Licenciatura del Dr. Juan José Bonfiglio por RT-PCR se determinó que esta línea celular no expresa niveles detectables del CRHR1 y a su vez en esta Tesis se determinó vía PCR en tiempo real (RT-qPCR) que tampoco expresa niveles detectables de CRHR2 (Juan José Bonfiglio, 2008).

**MIN6:** Esta línea celular fue creada a partir de un tumor pancreático (insulinoma) en un ratón transgénico que expresa el antígeno T grande de SV40 en las células beta. Esta línea fue cedida generosamente por el Dr. Marcelo Perone. Descripciones previas demuestran que esta línea celular expresa el CRHR1 y el CRHR2 $\alpha$  (Huising *et al.*, 2011). Durante esta Tesis doctoral se corroboraron estos resultados por PCR.

**HT22-CRHR1:** Durante la Tesis de Licenciatura del Dr. Juan José Bonfiglio se generaron clones estables derivados de HT22 que expresaran el receptor de CRHR1 de ratón fusionado a un *tag* c-Myc en el N-terminal (Juan José Bonfiglio, 2008). Dado que no existen anticuerpos comerciales que reconozcan de forma fiable al CRHR1, se eligió esta construcción para poder detectarlo mediante anticuerpos contra el epítotope c-Myc (Bonfiglio *et al.*, 2013). La funcionalidad del receptor fue verificada en el mismo trabajo.

**HT22-CRHR2:** En esta Tesis, se generaron clones estables de la construcción FLAG-hCRHR2 $\alpha$  a partir de la transfección de pcDNA3-FLAG-hCRHR2 $\alpha$  cedida gentilmente por el Dr. Hausch y la selección con geneticina 400  $\mu$ g/ml. Después de 14 días de tratamiento con antibiótico las colonias se aislaron y se subcultivaron. Se verificó la expresión del receptor por RT-PCR y *Western Blot* y se eligieron clones con diferentes niveles de expresión para trabajar. La funcionalidad de CRHR2 $\alpha$  en este entorno celular se demuestra en este trabajo. Cabe aclarar que se utilizó el CRHR2 $\alpha$  humano, siendo este extremadamente similar al del ratón y demostrando actividad biológica al expresarlo en las células HT22.

**HT22-CRHR2-Epac-S<sup>H187</sup>**: Con la construcción Epac-S<sup>H187</sup> (Klarenbeek *et al.*, 2015), que se subclonó en el plásmido pcDNA3.1/Zeo(+) durante la Tesis Doctoral de María Carolina Inda (Inda, 2017). Se transfectaron las células HT22-CRHR2 $\alpha$  y se seleccionaron los clones estables con zeocina 100  $\mu$ g/ml (Invitrogen). Después de 14 días de tratamiento con antibiótico las colonias se aislaron y se subcultivaron.

### **Transfecciones transitorias:**

**HT22-CRHR2-AKAR4**: A partir de la construcción de AKAR4 (Allen & Zhang 2006), se transfectaron de manera transitoria las células HT22-CRHR2 $\alpha$  y antes de las 48 h de la transfección se realizaron los experimentos que se describen.

**MIN6-Epac-S<sup>H187</sup>**: A partir de la construcción de Epac-S<sup>H187</sup> previamente mencionada, se transfectaron de manera transitoria las células MIN6 y antes de las 48 h de la transfección se realizaron los experimentos que se describen.

**HT22-PS-CRHR2 $\alpha$** : A partir de la construcción PS-CRHR2 $\alpha$ , se transfectaron de manera transitoria las células HT22 parentales. A las 48 h luego de la transfección se realizaron los experimentos que se describen debajo.

**HT22-CRHR2- ECFP-ER y ECFP-Golgi**: A partir de las construcciones comerciales ECFP-ER y ECFP-Golgi, se transfectaron de manera transitoria las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . A las 48 h luego de la transfección se realizaron los experimentos que se describen debajo.

En la tabla 1 se detallan la procedencia de los plásmidos utilizados en este trabajo.

### 1.1 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio esencial mínimo de cultivo DMEM baja glucosa para las células HT22 y alta glucosa para las MIN6 (Invitrogen) suplementado con bicarbonato de sodio 2,4 g/l, HEPES 2,2 g/l, suero fetal bovino (SFB) previamente deplegado por calor a 65°C durante 30 min (5% para HT22, 10% para MIN6), penicilina 100U/ml, estreptomycin 100mg/ml, glutamina 4 mM. El medio de cultivo de los clones estables para CRHR1 o CRHR2 también contuvo el agente selectivo geneticina 200 $\mu$ g/ml para asegurar la presencia del receptor y/o la presencia de Epac-S<sup>H187</sup> y/o la doble expresión de receptores con

zeocina 50 µg/ml. Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96hs de una dilución 1:20 para las HT22 o 1:10 para las MIN6. Tanto para el mantenimiento, como para el plaqueo de las células en cada experimento, las mismas fueron lavadas con PBS y despegadas en presencia de tripsina (1X, Invitrogen) por 1 min a 37°C.

## **2 Transfecciones transitorias de líneas celulares**

### 2.1 Transfección de DNA

Las células HT22-CRHR1 o HT22-CRHR2α y las MIN6 fueron sembradas al 80% de confluencia. 24 h más tarde fueron transfectadas utilizando Lipofectamina y PLUS Reagent (Invitrogen) según instrucciones del fabricante.

Brevemente, para las células HT22-CRHR1 ó HT22-CRHR2α y MIN6 en una placa de 60 mm de diámetro, se preparó un tubo de poliestireno en el cual se colocaron 4 µg de plásmido, 4 µl de PLUS Reagent y 250 µl de OptiMEM, y en otro, 30 µl de Lipofectamina, y 250 µl de OptiMEM, por placa. Transcurridos 15 min, se transfirieron 280 µl del tubo con Lipofectamina al tubo con DNA, se mezcló vigorosamente y se incubó por 15 min para que se formaran los complejos entre el polication y el DNA. Luego se agregó la mezcla a la placa, previamente lavada con PBS para eliminar trazas de suero, con 2,5 ml de optiMEM. Para las distintas placas se escaló el procedimiento de forma proporcional. Se incubó a las células durante 3 h a 37°C y a 5%CO<sub>2</sub> para la transfección y luego se reemplazó el medio por medio completo de crecimiento. 24 h después de la transfección las células se sembraron en placas de 6 pocillos para los ensayos de *Western Blot*, de 12 pocillos para los ensayos de cambios morfológicos a la densidad adecuada, de 24 pocillos para los ensayos de microscopía. En general, los experimentos se realizaron 48 h después de la transfección. Como control de transfección general, el plásmido de interés se co-transfectó con un vector de expresión de proteínas fluorescentes. Cuando se llevaron a cabo experimentos de visualización (*imaging*), sólo se analizaron las células co-transfectadas con el reportero fluorescente.

## 2.2 Generación de líneas estables por dilución clonal

Las células HT22 se sembraron y se transfectaron de la misma manera que se describió en el punto 2.1 de esta sección. A las 24 horas de haber realizado la transfección, se levantaron las células con tripsina y se contaron en una cámara de Neubauer. Se realizaron las diluciones para obtener media célula por pocillo de una placa de 96 pocillos. Se sembraron 200  $\mu$ l de la dilución previamente mencionada por pocillo en medio DMEM completo con la adición de la presión de selección, en este caso antibióticos. Para la generación de las células HT22-CRHR2 $\alpha$  se utilizó geneticina 400  $\mu$ g/ml (Invitrogen) y para la generación de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ -Epac-S<sup>H187</sup> se utilizó zeocina 100  $\mu$ g/ml (Invitrogen). Se le realizó un cambio de medio fresco con antibiótico una vez por semana. En aquellos pocillos en que las células replicaron (aproximadamente luego de dos semanas), se dejaron crecer hasta un 30% de confluencia y se levantaron con tripsina para sembrarlos en un pocillo de mayor tamaño, en este caso una placa de 24 pocillos. En cada pocillo se sembró una colonia individual. Luego de llegar a un 80% de confluencia se levantaron nuevamente y se sembraron los clones en una placa de 6 pocillos (o de 12 pocillos si el crecimiento es lento). Luego de completar esta placa se sembraron en placas de 10 cm de diámetro y se mantuvieron las células con DMEM con la mitad de concentración de la presión de selección para mantener estables los clones. Luego se probó en diferentes tipos de experimentos la expresión de nuestra proteína de interés.

## **3 Cultivos primarios neuronales**

### 3.1 Animales

Los ratones fueron criados en condiciones estándar de laboratorio (temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad  $55\% \pm 5\%$ ) con comida y agua *ad libitum*. Su manejo y uso experimental en el instituto Max Planck de Psiquiatría en Múnich, fue realizado bajo las normas y protocolos aprobados de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Gobierno de Bavaria (Alemania) y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso animal del Instituto Max Planck de Psiquiatría (Múnich, Alemania). Para los animales utilizados en el IBioBA se siguieron las normas y protocolos aprobados de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de

laboratorio CICUAL y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso animal del instituto de Biomedicina de Buenos Aires partner de la Sociedad Max Planck.

Los animales utilizados fueron ratones *wild type* CD1.

### 3.2 Preparación y mantenimiento de cultivos primarios de hipocampo y corteza

Se prepararon cultivos neuronales hipocampales y corticales a partir de embriones de ratones CD1 (E16.5-17.5). Brevemente, las madres se sacrificaron por sobredosis de isoflurano. Los embriones fueron extraídos rápidamente, se sacaron los cerebros y se disectó el hipocampo o parte de la corteza en medio de disección (HBSS suplementado con HEPES 1M y glutamina 200 mM, penicilina 100U/ml y esptreptomicina 100mg/ml). Se disgregó el tejido con tripsina 0,25% por 15 min a 37°C y luego mecánicamente con una pipeta pasteur de vidrio con la punta pulida. Se cosecharon las células por centrifugación 5 min a 800g. Las células fueron cultivadas en medio Neurobasal-A suplementado con B27 2%, GlutaMAX-I 0,5 mM (Gibco) incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron sobre cubreobjetos previamente lavados con cloroformo y etanol absoluto y cubiertos con poli-D-lisina 50 µg/ml (Sigma) y laminina 5 µg/ml (Invitrogen).

## **4 Estímulos y agentes farmacológicos**

### 4.1 Estímulos

Se describen a continuación los distintos estímulos utilizados en este trabajo. Salvo que se aclare lo contrario, se trató con los distintos compuestos en medio OptiMEM y por los tiempos indicados en las figuras. Los tratamientos basales se realizaron con el vehículo de las drogas.

- CRH humano/rata (Bachem Biochemica): Ligando del receptor GPCR CRHR1 (y CRHR2 con menor afinidad). Se realizaron curvas concentración-respuesta entre 0,01 nM y 1 µM, y en general se eligió la concentración de trabajo 100 nM en las células HT22-CRHR1 en los casos de microscopía se utilizó la concentración 10 nM (Puesto a punto en la Tesis doctoral de la Dra. Carolina Inda). Cabe destacar que las secuencias de CRH de ratón, de humano y de rata son idénticas.

- UCNs humano/rata (Bachem Biochemica): La UCN1 es ligando de los receptores CRHR1 y CRHR2 con afinidades similares, las UCN 2 y 3 son ligandos selectivos del CRHR2. Se realizaron las curvas concentración-respuesta para cada ligando y se seleccionó 100 nM como concentración general de trabajo. Cabe destacar que las UCNs de ratón, de humano y de rata presentan alta similitud de secuencia.

- Forskolina (Sigma): diterpenoide permeable obtenido de *Coleus forskohlii* que activa a las adenilil ciclasas transmembrana. Concentraciones utilizadas 10-50  $\mu$ M.

En aquellos experimentos donde se analizaron los niveles de fosfo-proteínas en respuesta a estímulos (pERK1/2, pAKT, pCREB), las células se hambreadon de suero en medio OptiMEM por al menos 5 h antes del estímulo.

#### 4.2 Agentes farmacológicos

En todos los casos, se preincubó con los distintos agentes farmacológicos 15-60 min antes del estímulo preparado en presencia del agente farmacológico empleado en el ensayo. Las concentraciones utilizadas estuvieron dentro de los rangos de acción y teniendo en cuenta la toxicidad. La concentración empleada en muchos casos es la que se utilizó previamente en la literatura, aunque para algunos compuestos hubo que ponerla a punto para las células HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$ . Como tratamiento control se utilizó el vehículo de los distintos compuestos.

- H89 (371962, Calbiochem): inhibidor de PKA ( $K_i = 48$  nM). Inhibe otras quinasas sólo a concentraciones más elevadas de la utilizada: CaM quinasa 2 ( $K_i = 29.7$   $\mu$ M), casein quinasa 1 ( $K_i = 38.3$   $\mu$ M), quinasa de la cadena liviana de miosina ( $K_i = 28.3$   $\mu$ M), proteína quinasa C ( $K_i = 31.7$   $\mu$ M) y ROCK-II ( $IC_{50} = 270$  nM). Concentración utilizada 10  $\mu$ M.
- ESI09 (SML0814; Sigma-Aldrich): inhibidor específico de EPAC1 ( $IC_{50} = 3,2$   $\mu$ M) y EPAC2 ( $IC_{50} = 1,4$   $\mu$ M), que no tiene efecto sobre PKA a concentración 25  $\mu$ M. Concentración utilizada 5  $\mu$ M.
- 2',5'-dideoxiadenosina (2',5'-ddA, 288104, Calbiochem): inhibidor no competitivo de las tmACs ( $IC_{50} = 3$   $\mu$ M). Concentración final utilizada 50-100  $\mu$ M

- KH7 (3834, Tocris Bioscience): inhibidor específico de la sAC (IC<sub>50</sub> = 3 - 10  $\mu$ M *in vivo*). Inerte hacia las tmACs *in vitro* y en cultivos celulares hasta concentraciones 300 $\mu$ M. Concentración final utilizada 7,5-15  $\mu$ M.
- 2-hidroxiestradiol (2-HE, 13019; Cayman Chemical): inhibidor específico de sAC (IC<sub>50</sub>= 2  $\mu$ M *in vitro*), que no tiene efecto sobre las tmACs hasta concentraciones 100  $\mu$ M. Concentración final utilizada 20-40  $\mu$ M.
- DYNGO4-a (ab120689; Abcam): inhibidor específico de dinamina (IC<sub>50</sub> = 200-400 nM *in vitro*). Inhibe la endocitosis (IC<sub>50</sub> = 5,5  $\mu$ M).
- 4-aminopiridina (A78403 Sigma-Aldrich): Bloqueador específico de canales de K<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub>= 0.5-3 mM *in vitro*). El bloqueo de los canales de K<sup>+</sup> evita la repolarización de la membrana neuronal por lo tanto se mantiene despolarizada, es decir, activada. Concentración final utilizada 2,5 mM.
- Bicuculina (14343 Sigma-Aldrich): Antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (IC<sub>50</sub>= 30 $\mu$ M *in vitro*). Concentración final utilizada 50  $\mu$ M.
- Brefeldina A (B7651 Sigma-Aldrich): Inhibidor de transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi por disrupción reversible del mismo. Concentración utilizada 360 nM.

## **5 Western Blot**

### 5.1 Preparación de los extractos celulares

Una vez finalizado el tiempo de incubación del estímulo, se colocó la placa sobre hielo, se removió el medio de estimulación y las células se lavaron con PBS frío. Las células fueron lisadas en Laemmli buffer 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10% glicerol y 5% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol), sonicadas en un sonicador Bioruptor (Next Gen Diagenode). Los lisados fueron calentados a 95°C por 5 min antes de sembrarlos en geles de poliacrilamida.

### 5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado

Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida 8-12% desnaturalizantes en buffer Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS). Para la identificación de los tamaños moleculares, se utilizó el marcador de peso molecular

*Broad Precision Marker* (BioRad). Se realizó la corrida electroforética hasta que cayó el frente de corrida. Una vez finalizada, en general se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro a 100 V durante 1 h en buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 20% metanol). Luego, se tiñeron las membranas con rojo Ponceau para corroborar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana y comparar cualitativamente las masas sembradas en cada calle. Se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con solución de bloqueo *Blocking Buffer* (Li-Cor Biosystems) o TBS-Tween 0,05% (Tris 25 mM pH7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) con 5% m/v de leche descremada para bloquear el pegado inespecífico. Teniendo en cuenta que la leche tiene fosfatasa, para la inmunodetección de fosfoproteínas, la solución de bloqueo realizada con leche descremada fue inactivada calentándola durante 1 h a 60°C.

La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante la noche a 4°C en agitación. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en TBS-Tween 0,05% con BSA 5%. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 min con TBS-Tween 0,05%. Luego, según el tipo de revelado elegido:

- Para revelar por quimioluminiscencia, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a peroxidasa de rabanito (HRP) (Bio-Rad) en una dilución 1:3000 en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego de tres lavados de 10 min con TBS-Tween 0,05% y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Dura (Pierce) utilizando un equipo digital G:BOXCHEMI-XT4 (Syngene).

- Para revelar por fluorescencia, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a los fluoróforos IRDye700DX o IRDye800CW (Li-Cor Biosystems) en una dilución 1:6000-1:10000 en solución de bloqueo *Blocking Buffer* por 1 h a RT en agitación. Luego de tres lavados de 10 min con TBS-Tween 0,05% y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el equipo Odyssey Fc *Imaging System* (Li-Cor Biosystems). Las señales inmunoreactivas fueron analizadas de forma digital utilizando el programa ImageJ (NIH). Los niveles de fosfoproteínas fueron relativizados a los niveles de proteína total en la misma membrana.

### 5.3 Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron:

- anti-c-Myc (9E10, sc-40, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-fosfo-ERK1/2 (E-4, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-total-ERK1/2, (9102, Cell Signaling)
- anti-fosfo-CREB (06-519, EMD Millipore)
- anti-total-CREB (9104, Cell Signaling)
- anti-fosfo-AKT (4058, Cell Signaling)
- anti-total-AKT (2920, Cell Signaling)
- anti-FLAG (F3165, Sigma-Aldrich)
- anti- $\beta$ -actina (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-GAPDH (6C5, ab8245, Abcam)
- anti-ratón acoplado a IRDye700DX (LI-COR)
- anti-conejo acoplado a IRDye700DX (LI-COR)
- anti-ratón acoplado a IRDye680LT (LI-COR)
- anti-conejo acoplado a IRDye680LT (LI-COR)
- anti-ratón acoplado a HRP (170-6516, BioRad)
- anti-conejo acoplado a HRP (170-6515, BioRad)
- anti-ratón, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (A21202, Molecular Probes)
- anti-conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (A21206, Molecular Probes)
- anti-conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 555 (A31570, Molecular Probes)
- anti-ratón, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 647 (A21235, Molecular Probes)
- anti-conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 647 (A21245, Molecular Probes)

## **6 Manejo de plásmidos**

En este trabajo se utilizaron los plásmidos detallados en la Tabla 1:

<b>Plásmidos</b>	<b>Descripción</b>	<b>Origen</b>
------------------	--------------------	---------------

pcDNA3.1(+)/Zeo	Vector de expresión en células eucariotas	Invitrogen
pcDNA3-c-Myc-mCRHR1	Vector de expresión de CRHR1 de ratón con etiqueta c-Myc en el extremo N terminal	Dr. Wolfgang Wurst, Instituto Max Planck de Psiquiatría, Alemania
Venus	Vector de expresión de la proteína fluorescente amarilla Venus	Dr. Takeharu Nagai, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Japón
mTurquoise	Vector de expresión de la proteína fluorescente cyan mTurquoise	Dr. Theodorus Gadella, Citología Molecular, Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Holanda
mTurquoise2-EPACcp173Venus-Venus (Epac-S <sup>H187</sup> )	Vector de expresión del biosensor de AMPc basado en FRET Epac-S <sup>H187</sup>	Dr. Kees Jalink, Departamento de Biología Celular, The Netherlands Cancer Institute, Holanda
AKAR4	Vector de expresión del biosensor de la actividad de PKA basado en FRET AKAR4	Dr. Jin Zhang, Departamento de Farmacología y Ciencias Moleculares, Johns Hopkins University, Estados Unidos
pcDNA3-FLAG-hCRHR2 $\alpha$	Vector de expresión de CRHR2 $\alpha$ humano con etiqueta FLAG en el extremo N terminal	Dr. Félix Hausch, Instituto Max Planck de Psiquiatría, Alemania
pECFP-ER	Vector de expresión eucariota que posee la	Clontech

	proteína calreticulina fusionada a la proteína fluorescente CFP.	
pECFP-Golgi	Vector de expresión eucariota que posee la $\beta$ -1,4-Galactosiltransferasa fusionada a la proteína fluorescente CFP.	Clontech
PS-FLAG-CRHR2 $\alpha$	Vector de expresión eucariota que posee el CRHR2 $\alpha$ de ratón con el péptido señal del virus de la influenza.	Dr. Jan Deussing, Instituto Max Planck de Psiquiatría, Alemania

Tabla 1: **Listado de los plásmidos utilizados en este trabajo.** Se detalla el nombre con el que se lo identifica, su descripción y de dónde se obtuvo.

## 6.1 Clonados

### 6.1.1 Construcción pcDNA3.1(+)/Zeo-CRHR2 $\alpha$

Se subclonó la construcción FLAG-hCRHR2 $\alpha$  del vector de expresión cedida por el Dr. Hausch en el plásmido pcDNA3.1(+)/Zeo cuya resistencia para células eucariotas es zeocina. Se digirió el vector original y el vector destino con las enzimas EcoR1 y Xho1 siguiendo las instrucciones de su fabricante (Promega). Se purificaron tanto el inserto como el vector destino (Kit de purificación QIAGEN) y se ligaron los fragmentos con la enzima ligasa 4 siguiendo el protocolo de su fabricante (Invitrogen). Se transformaron bacterias con el plásmido generado y una vez seleccionados los clones positivos, se chequearon por restricción enzimática (Ver inciso 6.3 y 6.5 de esta sección).

## 6.2 Preparación de bacterias competentes

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 2001). Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  fueron utilizadas como fuente de

bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libres de antibiótico suficientemente diluidas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16 h. Una colonia fue picada y crecida durante 16 h en 5 ml de medio LB en agitación (200 rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200 ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 nM frío. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El pellet fue resuspendido en 5ml de CaCl<sub>2</sub> 100 nM e incubado en hielo por 30 min. Posteriormente, 300 µl de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos *ependorf* con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 30%. Finalmente, las bacterias fueron conservadas a -80°C.

### 6.3 Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 2001) modificado a partir del original de Hanahan (Hanahan, 1983). Se tomaron 50 µl de bacterias competentes DH5α de eficiencia al menos  $1 \times 10^6$  colonias/ml, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez descongeladas se agregaron entre 50 ng y 1 µg de plásmido, y se las incubó 30 min en hielo. Rápidamente, se les aplicó un shock térmico de 90 s a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo. Luego, se agregaron 700µl de medio LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C. Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500 µl), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquearon en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

### 6.4 Preparación de plásmidos a pequeña escala (mini-preparaciones)

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim, 1979). Tubos de vidrio conteniendo 3ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés o de glicerol guardados. Los cultivos fueron crecidos por 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Luego, 1,5 ml de cultivo fueron trasvasados a tubos tipo *ependorf* y centrifugados a 2000 rpm, 5 min. El pellet celular fue resuspendido en

300 µl de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 µg/ml). Luego, 300 µl de P2 (NaOH 0,2 N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de P3 (KAcO 3 M pH 5,2) fría, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700 µl del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70%. El pellet finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O.

### 6.5 Análisis de plásmidos por enzimas de restricción

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron analizados mediante mapeo por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos. Para ello varias mini preparaciones de DNA plasmídico fueron verificadas simultáneamente. 2-3 µl de DNA plasmídico proveniente de minipreparaciones fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3 µl de DNA plasmídico, 2 µl de buffer de restricción, 0,5 U de la enzima de restricción elegida y H<sub>2</sub>O hasta completar 20 µl de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h a 37°C. Luego las bandas obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0,6-2% en buffer TBE (Tris-HCl 25 mM, Ácido Bórico 100 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente, las bandas fueron observadas en un transiluminador UV y documentadas de forma digital.

### 6.6 Preparación de plásmidos a gran escala (maxi/mega-preparaciones)

Los plásmidos chequeados fueron sujetos a amplificaciones a gran escala para obtener una masa suficiente para los experimentos de transfecciones mediante el uso de columnas de afinidad (QIAGEN). Brevemente, 250 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés o stock guardados con glicerol a -80°C. Los cultivos fueron crecidos por 16 h aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm y luego cosechados por centrifugación (6000 g por 15 min a 4°C). El pellet celular fue resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10

mM) con RNAsa A (50 µg/ml). Se lisaron las células por desnaturalización alcalina agregando 10ml de P2 (NaOH 0,2N; SDS 1%) y manteniendo por 5min a temperatura ambiente. Luego, se neutralizó el lisado con 10 ml de P3 (KAcO 3 M pH 5,2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 20000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado en un embudo con gasa y volcado en una columna QIAGEN-tip 500 (para maxipreparaciones) o tip-2500 (para megapreparaciones). La columna fue eluida por gravedad y lavada dos veces con 30 ml de buffer de lavado QC. Finalmente, el DNA retenido en la columna fue eluído con 15 ml buffer de elución QF. El DNA del eluído fue precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000 g. El DNA precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% y el pellet fue secado al aire durante 20 min y resuspendido en H<sub>2</sub>O. La calidad del DNA plasmídico se verificó por geles de agarosa y la concentración final se cuantificó por absorbancia con un Nanodrop (Thermo Scientific).

## **7 RNA, transcripción reversa y PCR**

### 7.1 Purificación de RNA

Para aislar RNA tanto a partir de líneas celulares como de cultivos primarios o tejido de cerebro se utilizó el reactivo *Trizol Reagent* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para las líneas celulares, las muestras se lisaron en el reactivo, que combina fenol y tiocianato de guanidina, inhibiendo la actividad RNAsa. Luego, se agregó cloroformo que permite la separación del homogenato en fases acuosa y orgánica. El RNA que quedó en la fase acuosa y se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua MilliQ. Para las muestras de neuronas se utilizó un kit de extracción de RNA (QIAGEN). Para resuspender el RNA, las muestras se congelaron a -80°C; una vez congeladas, se descongelaron a 55°C durante 15min y se agitaron vigorosamente con vórtex, colocándolas en hielo. El RNA se cuantificó utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific). Para controlar la integridad del RNA extraído, se corrieron geles de agarosa 1%*m/v*.

### 7.2 Transcripción reversa

Para la obtención de DNA copia (cDNA) a partir de RNA, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT, Promega). Se desnaturalizó el RNA incubándolo 5 min a 65°C y pasándolo inmediatamente a hielo para evitar la formación de estructuras secundarias. Luego, se realizó la transcripción reversa (RT) incubando 1 µg de RNA, 500 µM de dNTPs (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 20 U de RNAsin (Promega), 5 µM de oligo-dT, 300 U de la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT y buffer apropiado en un volumen final de 20 µl a 37°C durante 1 h. Se inactivó la enzima incubando 5 min a 95°C.

### 7.3 PCR de punto final

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en 25 µl de volumen final. Se utilizaron 1-2 µl de la reacción de RT que contiene el cDNA que actúa como molde de la reacción de PCR. A cada tubo de reacción se le agregaron: 2,5 µl de buffer de PCR sin MgCl<sub>2</sub>, 1-2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de la dilución 10 µM de la mezcla de *primers* forward y reverse, 0,5 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, Invitrogen); 0,3 µl de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µl, PBL); H<sub>2</sub>O c.s.p. 25 µl volumen final. Para las reacciones de clonado se utilizó la enzima Platinum Taq DNA polimerasa HiFi (Invitrogen). Los programas utilizados fueron ajustados según los *primers* utilizados y el amplicón: 5 min a 95°C, 30-40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55-68°C y elongación 68/72°C (1 min/kpb de producto). Los productos de PCR se analizaron en general por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

### 7.4 PCR en tiempo real o cuantitativa

Todas las reacciones de RT-qPCR fueron realizadas en 25µl de volumen final de forma similar a las PCR de tiempo final en el caso de las muestras provenientes de células o tejido. Como molde se utilizaron 5µl de una dilución 1:10-50 de la reacción de RT. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante el agregado de Sybr Green 1:30000 (Roche) a la mezcla de reacción, que se realizó en el ciclador CFX96 *touch real-time* (BioRad). Para el caso de las muestras de cDNA provenientes de cultivo primario se realizaron las RT-qPCR utilizando *master mix (FastStart essential DNA green master, ROCHE)* a la que sólo se le adicionan los *primers* a la misma concentración que para las PCR a tiempo final y el molde (1-2 µl del cDNA obtenido). El volumen final utilizado fue de 10µl. El programa que se utilizó en todos los casos

fue el siguiente: 5min a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 56-65°C y 15s a 72°C, efectuándose la lectura de la fluorescencia al finalizar cada ciclo. Se realizó una curva de disociación térmica (curva de *melting*) para evaluar la especificidad de la reacción. Además, para determinar que sólo existiera un producto de la reacción, alícuotas de los productos de RT-qPCR fueron analizadas en geles de agarosa 1.5-2% teñidos con bromuro de etidio, corroborándose también la identidad del producto en función del tamaño esperado. Para cada uno de los productos analizados, se realizó una curva de temperatura de hibridación y de concentración de magnesio para determinar las condiciones óptimas de reacción. En cada experimento se realizó una curva de calibración con diluciones al medio seriadas a partir de una mezcla de los cDNA de las reacciones de RT, para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR y estimar la cantidad inicial relativa de molde en cada muestra. Las cantidades relativas iniciales del producto de interés fueron normalizadas en cada caso a los valores obtenidos para el cDNA de *Hprt* por el método de Ct.

### 7.5 Primers utilizados

Se utilizaron los pares de *primers* detallados en la Tabla 2. Se diseñaron utilizando los programas *Beacon Designer* y *Primer3*, las bases de datos *PrimerBank* (Harvard University), *MousePrimerDepot* (NIH) o secuencias previamente reportadas en bibliografía.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño de amplicón</b>	<b>Temperatura de hibridación</b>
<i>c-fos</i> (RT-qPCR)	<i>sense:</i> ATCGGCAGAAGGGGCAAAGTAG <i>antisense:</i> GCAACGCAGACTTCTCATCTTCAAG	172 pb	60 °C
<i>Hprt</i> (RT-qPCR)	<i>sense</i> TGGGCTTACCTCACTGCTTTCC <i>antisense</i> CCTGGTTCATCATCGCTAATCACG	139 pb	60 °C

<i>β-actina</i>	<i>sense:</i> GTGGGCCGCTCTAGGCACCA <i>antisense:</i> CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG	290 pb	60 °C
<i>mCrhr1</i> (RT-qPCR)	<i>sense:</i> CTTCTCCTTCTGGGGCTGA <i>antisense:</i> AGGTGCCAATGAGGTCCA	124 pb	60 °C
<i>mCrhr1</i>	<i>sense:</i> CAACATGTAGGTGATGCCAG <i>antisense:</i> GGTGTGCCTTTCCCCATCATT	278 pb	56 °C
<i>mCrhr2</i>	<i>sense:</i> CCGTTCCCTTCGACCACTAAAC <i>antisense:</i> GGCGTGGTGGTCCTGCCAGCG	378 pb	60 °C
<i>mCrhr2</i> (RT-qPCR)	<i>sense:</i> TACAGAGAGTGCCTGGAGAA <i>antisense:</i> ATGAGGGCGATTCCGGTAATG	190 pb	60 °C
<i>hCrhr2</i>	<i>sense:</i> GCCCATTTTGGATGACAAGC <i>antisense:</i> GCCTTCACTGCCTTCCTGTA	636 pb	60 °C
<i>hCrhr2α</i> (RT-qPCR)	<i>sense:</i> GACGCGGCACTGCTCCACAG <i>antisense:</i> GCATTCCGGGTCGTGTTGT	233 pb	60 °C

Tabla 2: Listado de las secuencias de los *primers* empleados para el estudio transcripcional de diferentes genes de interés. En todos los casos se muestra el nombre del gen y las secuencias de cada primer en sentido 5' a 3'.

Los pares de *primers* fueron analizados utilizando el *Primer-BLAST* para evaluar su especificidad. Se eligieron secuencias que hibridarán en exones distintos tanto para

PCR a tiempo final como para *real time* PCR. Particularmente para esta última, se tuvo en cuenta que el producto de la reacción amplificara productos entre 75-250 pb aproximadamente.

## **8 Microscopía confocal y análisis de la localización subcelular del CRHR1 y CRHR2 $\alpha$**

Las células o cultivos primarios neuronales se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio (18mm) en placas de 12 pocillos o en cubreobjetos de 12 mm para plazas de 24 pocillos previamente lavados con alcohol 70% y agua miliQ. A las 24 horas del plaqueo las células se preincubaron y/o estimularon por los tiempos correspondientes en cada experimento. Para el caso de las neuronas, se sembraron el día 0 y se dejaron madurar hasta el día 18-21 antes de pasar al tratamiento. Finalizado el tratamiento, tanto las líneas celulares como las neuronas se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Cuando fue necesario, se permeabilizaron las células con 0,01% de Tritón X-100 en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron los cubreobjetos con solución de SFB 5% en PBS o BSA 5% durante una hora a temperatura ambiente para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos. Para las inmunomarcaciones, se incubaron los cubreobjetos durante 2 h en cámara húmeda con la dilución de anticuerpo en medio de bloqueo (1:250 de anti-FLAG, la concentración de anticuerpo fue optimizada a lo largo de esta Tesis), seguido de tres lavados con PBS-Tween 0,05%. Luego se incubó durante una hora en cámara húmeda con los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Fluor 488 o 647 en una dilución 1:500. Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05%, y se realizó la tinción con DAPI (1:5000). Por último, los vidrios se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Mowiol. En todos los casos se realizaron los controles de autofluorescencia (sin anticuerpo), de secundario (sin anticuerpo primario) y de primario (con las HT22 parentales sin el epitope FLAG). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal LSM 710 (Zeiss) mediante el programa ZEN Black 2011. Se utilizaron los objetivos C-Apochromat 40x/1.2 o LD CApochromat 63X/1.15 de inmersión en aceite y corrección por temperatura. Las imágenes fueron obtenidas a 1024x1024, 8 bit, tiempo de escaneo por píxel de 4,6  $\mu$ s. En cada caso, se analizaron entre 15 a 20 células seleccionadas de manera azarosa. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ZEN Black 2011 y el Fiji de ImageJ.

## 9 FRET espectral para la determinación de AMPc y actividad de PKA

Las células HT22, HT22-CRHR2 $\alpha$  o MIN6, expresando de forma estable o transitoria las proteínas fluorescentes o los sensores de FRET (AKAR4 y Epac-S<sup>H187</sup>) fueron sembradas en pocillos con fondo de vidrio (dos Santos Claro *et al.*, 2019). La adquisición de las imágenes se realizó en un microscopio confocal invertido LSM 710 (Zeiss), equipado con una platina automática, una cámara de incubación para controlar la temperatura y el CO<sub>2</sub> y un sistema *Definite Focus* (Zeiss) para mantener el foco a lo largo del experimento. Se utilizó el programa ZEN Black 2011 (Zeiss) para el control del microscopio. Se utilizó un objetivo de inmersión de agua 40X con corrección por temperatura (C-Apochromat NA 1.2) y se adquirieron fotografías de 1024 × 1024 píxeles, 16 bits, tiempo de escaneo por píxel 3,15  $\mu$ s y *pinhole* abierto (600  $\mu$ m).

La determinación de los espectros de emisión de las proteínas fluorescentes Cerulean, mTurquoise2 y Venus se realizó utilizando los láseres de 405 nm o 488 nm para excitar a la muestra y el modo de detección Lambda, usando el detector QUASAR de 32 canales, configurado con un ancho de canal de 9,7 nm.

Para los experimentos de FRET, las células se iluminaron con el láser de diodo de 405 nm (30 mW, 2% de potencia, ganancia 550-650) y un espejo dicróico de 405 nm. La emisión fue captada entre las longitudes de onda 413 y 723 nm, cada 15 s, durante el tiempo de duración de cada experimento. Se verificó en cada experimento que las imágenes no estuvieran saturadas. Para la determinación de los espectros de emisión de referencia y para los experimentos se utilizó medio DMEM sin rojo fenol, para reducir la fluorescencia de fondo, y suplementado con HEPES 20 mM, para controlar el pH durante el experimento. Las adquisiciones se realizaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Aproximadamente 2,5 min (10 ciclos) después de iniciar el experimento, se agregó el estímulo correspondiente a la concentración indicada. En algunos casos, las células se preincubaron 15 min con distintos compuestos y en otros, los inhibidores se agregaron después del estímulo en el *time course*. En los experimentos de FRET espectral, se utilizó la función *Linear unmixing* para la deconvolución espectral a partir de los espectros de emisión de referencia de los distintos fluoróforos. La cuantificación de las imágenes se realizó con el programa Fiji. Se sustrajo la señal de fondo y luego, se midieron a nivel de célula única las intensidades del dador y el aceptor de FRET

para cada tiempo. El cociente FRET/dador fue calculado y normalizado a los niveles basales, previo a la estimulación, de cada célula.

## **10 Análisis de la endocitosis de CRHR2 $\alpha$ mediante citometría de flujo**

Se cuantificó la internalización del receptor inducida por el ligando mediante la determinación por citometría de flujo de FLAG-CRHR2 $\alpha$  presente a nivel de la membrana plasmática en distintas condiciones. Dado que no se cuenta con anticuerpos robustos para los receptores de CRH, se utilizó la marcación indirecta usando anticuerpos que reconocen la etiqueta FLAG de la construcción y anticuerpos secundarios fluorescentes (dos Santos Claro *et al.*, 2019). Brevemente, las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro. 24 h más tarde, se hambreadon 1 h en OptiMEM previo al pretratamiento con agentes farmacológicos o la estimulación. Una vez finalizado el tiempo de estimulación, las células fueron lavadas con PBS frío y levantadas mecánicamente, favoreciendo el despegado de las células adherentes con PBS-EDTA 1 mM. Después de dos lavados con PBS, se incubaron  $2 \times 10^5$  células por condición analizada durante 1 h a 4°C o en baño de hielo con PBS 10% SFB para reducir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Se cosecharon las células por centrifugación y en el volumen residual se agregaron con 0,2  $\mu$ g de anticuerpo anti-FLAG por 2 h en un baño de agua-hielo en el mismo medio de bloqueo. Se lavaron las células con PBS 1% SFB, en el volumen residual se agregó 1,4  $\mu$ g del anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 647 (Molecular Probes) y se incubó en oscuridad por 1 h en un baño de agua-hielo. Todas las soluciones utilizadas contienen azida sódica 0,01%. En forma paralela se prepararon los correspondientes controles de autofluorescencia, de anticuerpo primario realizando la marcación en la línea parental HT22 y de anticuerpo secundario en muestras donde no se incubó con el anticuerpo primario. Para la adquisición de datos se empleó un equipo FACsCANTO II (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star).

## **11 Análisis de los cambios morfológicos**

Este método fue puesto a punto durante la Tesis de Licenciatura de María Carolina Inda y previamente publicado por nuestro laboratorio (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). Brevemente, las células se sembraron en placas de 12 o 24 pocillos a una confluencia

de 40-50%. 24h más tarde, se lavaron con PBS y se trataron con los distintos agentes farmacológicos y/o se estimularon por el tiempo indicado en OptiMEM manteniendo las células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se fotografiaron las células en campo claro utilizando un microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1 (Zeiss), equipado con una cámara CCD AxioCam HRm3 digital, la cámara de incubación XLmulti S1 (D) y el módulo de temperatura XL S1 (D). La adquisición se controló con el programa Zen Blue 2011 (Zeiss) y se tomaron fotografías con el objetivo de aire 40X. Se tomaron al menos 10 fotografías por cada tratamiento, seleccionando los campos al azar. La cuantificación se realizó mediante el *plugin Simple Neurite Tracer*, que se distribuye como parte del programa Fiji. De cada fotografía, se eligió cuantificar aquellas células que estuvieran poco superpuestas con otras, para poder medir correctamente las trayectorias. Se determinó el largo de la neurita más larga y el diámetro de la célula en píxeles y luego se realizó el cociente. Para cada tratamiento, se midieron en total al menos 100 células de 5 campos distintos.

## **12 Tratamiento estadístico de los datos**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  desvío estándar de la media (SEM por sus siglas en inglés) de al menos tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. El programa GraphPad Prism fue usado para el análisis estadístico de los datos. Pruebas t de *Student* fueron utilizadas para comparar dos grupos experimentales. Para comparaciones múltiples, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores. Se realizaron pruebas *post hoc* de Tukey o Bonferroni para determinar los grupos que presentaban diferencias significativas entre sí. En todos los casos se consideró un valor  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

# RESULTADOS

## Resultados

### 1 Generación de clones estables de expresión para el CRHR2 $\alpha$ en la línea celular hipocampal HT22

Nuestro laboratorio se caracteriza por estudiar el sistema CRH en un entorno celular con relevancia fisiológica para nuestras hipótesis, ya que una de nuestras premisas es que el contexto celular es clave para el estudio y caracterización de la función de los receptores de CRH. Es por esta razón que utilizamos la línea celular neuronal hipocampal HT22 para nuestros experimentos, la cual deriva de la línea inmortalizada de hipocampo de ratón HT-4.

Decidimos comenzar este trabajo investigando la expresión de ambos receptores de CRH antes de realizar la transfección del CRHR2 $\alpha$  en las células HT22. De esta manera podremos asegurar que todos los efectos que observemos corresponden a la acción del CRHR2 $\alpha$  transfectado. Se pusieron a punto dos PCRs a tiempo final utilizando como control positivo de ambos receptores cDNA obtenido de cerebro de ratón adulto. Los *primers* para el CRHR2 se diseñaron para detectar las 2 isoformas existentes en ratones. Como control de la calidad del cDNA se detectó  $\beta$ -actina. No se observó la expresión de ninguno de los dos receptores de CRH en la línea HT22 (Figura 8).

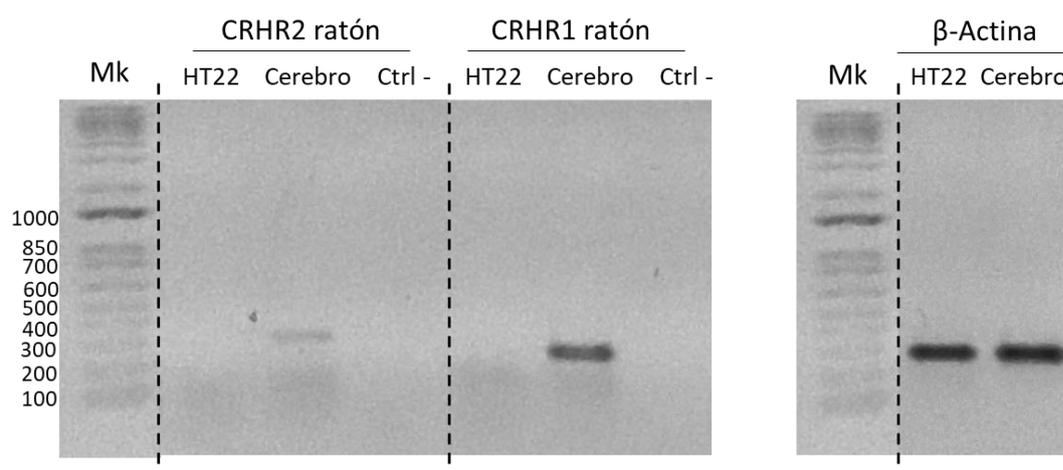


Figura 8: **Detección de los receptores de CRH en la línea hipocampal HT22.** Imagen representativa de la detección de la expresión de los genes de CRHR1 y CRHR2. Mk corresponde al marcador de tamaño para DNA utilizado en pares de bases (pb). La longitud del amplicón correspondiente al CRHR1 es 278 pb, al CRHR2 es 378 pb y la  $\beta$ -actina 290 pb. La imagen corresponde al revelado con bromuro de etidio de un gel 1% de agarosa en buffer TAE 1X.

Una vez corroborada que la expresión endógena de los receptores de CRH es indetectable, decidimos iniciar la transfección utilizando el esquema que se describe a continuación.

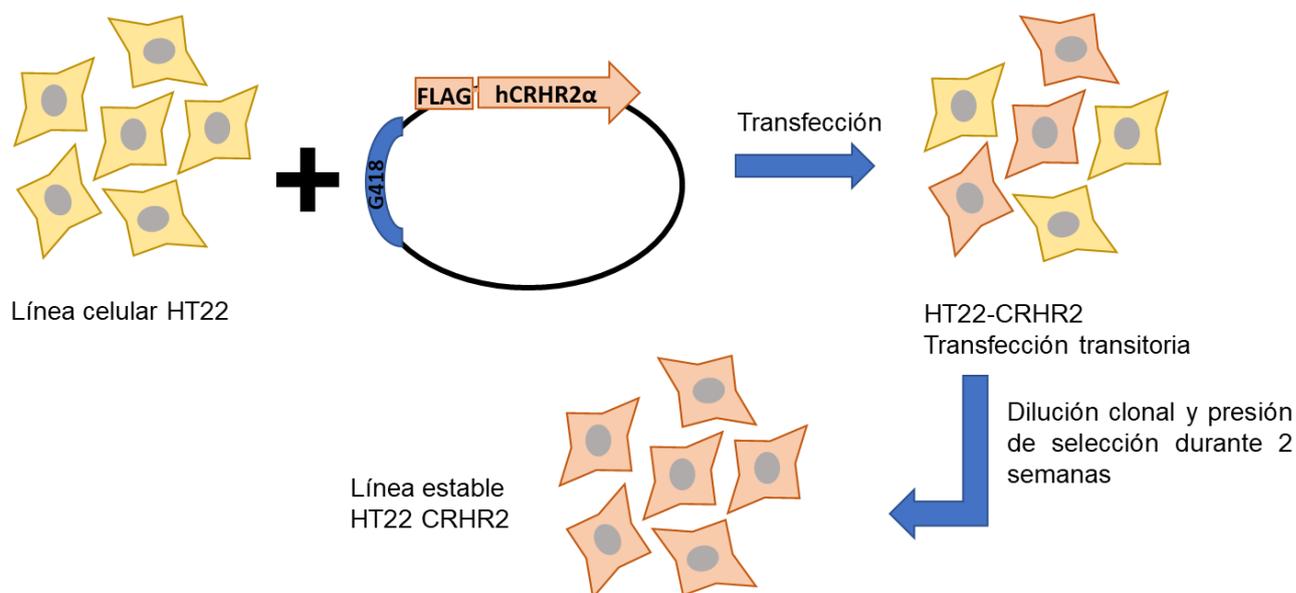


Figura 9: **Esquema de trabajo para la generación de clones estables.** En este caso se esquematiza el procedimiento para la inserción del CRHR2 $\alpha$  en el genoma de la línea parental HT22. G418 corresponde a la resistencia eucariota genética.

Se llevó a cabo un procedimiento similar para generar la línea celular que expresa de manera estable tanto el CRHR2 $\alpha$  como el sensor de FRET EPAC-S<sup>H187</sup> para medir AMPc. Más adelante en esta sección describiremos los resultados obtenidos en la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ -EPAC-S<sup>H187</sup>.

Una vez obtenidos los diferentes clones, se realizó una RT-qPCR para corroborar la expresión (Figura 11), así como también ensayos funcionales como por ejemplo la medición del ERK1/2 fosforilado luego de estimular con UCN1 (Figura 10). Existen algunos trabajos que han observado la fosforilación de este efector mediada por el CRHR2 en otros contextos celulares (Markovic *et al.*, 2008, 2011). De esta manera se continuó el trabajo sólo con aquellos clones que activaron ERK1/2.

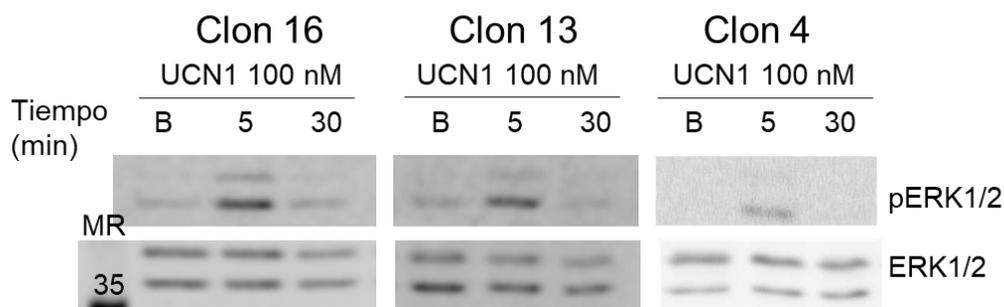


Figura 10: **Selección de clones estables por funcionalidad.** *Western Blot* representativo de los 3 clones seleccionados mostrando la fosforilación de ERK1/2 luego de estimular las células. La movilidad relativa esperada para ERK1/2 es 42/44 KDa.

Por último, analizamos mediante RT-qPCR, los niveles de sobre-expresión en cada uno de los clones seleccionados. Como se puede observar en la figura 11, el Clon 4 fue el que mostró una mayor expresión de mRNA del receptor, mientras que el Clon 13 y el Clon 16 mostraron cantidades similares. En este caso, no contamos con un control endógeno para el CRHR2 $\alpha$  humano, ya que los *primers* que utilizamos para hacer este experimento son de esa especie, es por este motivo que los valores de cuantificación se muestran sin relativizar al basal o situación control.

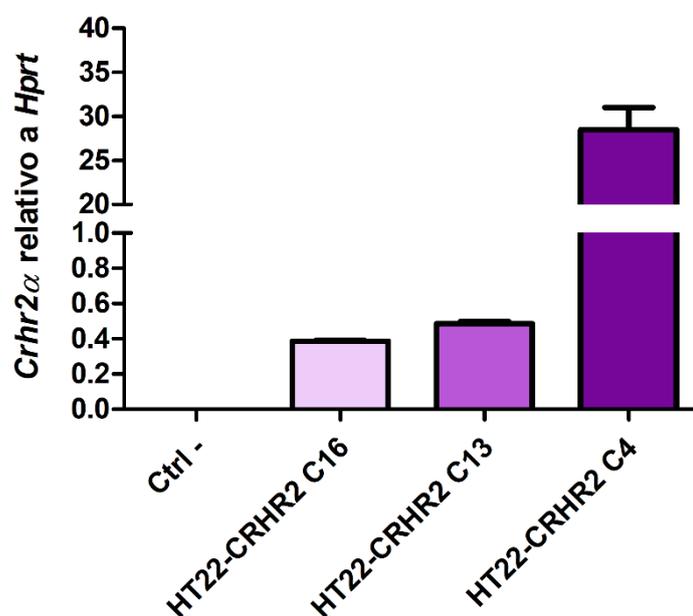


Figura 11: **Niveles de sobre-expresión del CRHR2 $\alpha$  en los diferentes clones.** Los niveles de *hCrhr2 $\alpha$*  se midieron mediante RT-q-PCR y fueron normalizados a *Hprt*.

Por otro lado, profundizando en este tipo de análisis, se midieron los niveles de expresión de ambos receptores de CRH en homogenato de cerebro de ratón (Figura 12A). El CRHR1 se expresó en niveles mayores que el CRHR2, pero ambos receptores fueron detectables en cerebro por RT-qPCR.

Por otro lado, medimos los niveles de expresión de los receptores sobre-expresados en nuestras células HT22-CRHR1 (clon 2) y HT22-CRHR2 $\alpha$  (clon 16) (Figura 12B). Como se comentó previamente, no contamos con un control endógeno de expresión del CRHR2 $\alpha$  ya que la construcción de receptor que utilizamos es humano. Cabe aclarar que a nivel secuencia aminoacídica, el CRHR2 $\alpha$  humano y de ratón son casi idénticos (difieren sólo en pocos aminoácidos en posiciones dentro de los pasos transmembrana del receptor, es decir que no modificarían la función ni comportamiento del receptor). Al comparar las figuras A y B observamos que, tanto en nuestras líneas celulares, como en cerebro, la expresión del CRHR1 es mayor respecto al CRHR2, por lo tanto, podemos suponer que nuestro contexto celular respeta lo que se observa de manera endógena. En este caso se analizó para el Clon 16 para el CRHR2 $\alpha$  ya que es el clon que más se utilizó a lo largo de este trabajo.

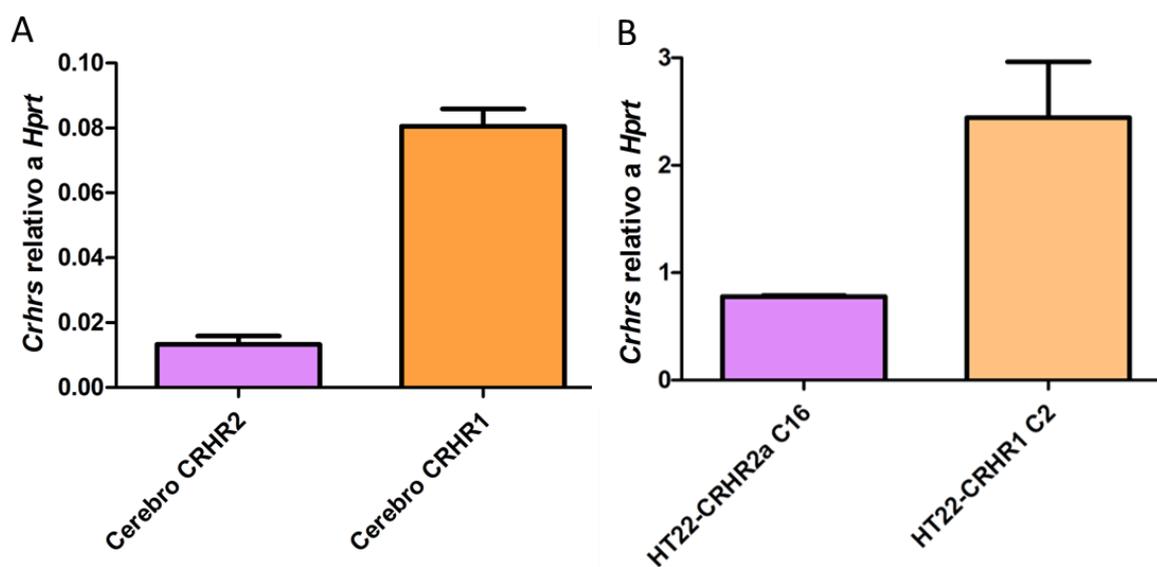


Figura 12: Niveles de expresión endógena en cerebro y en las líneas HT22 en los diferentes clones de los receptores de CRH. Los niveles de *hCrhr2 $\alpha$*  y de *mCrhr11* se midieron mediante RT-q-PCR y fueron normalizados a *Hprt* en los extractos celulares indicados en la figura.

## 2 Tanto las UCNs como CRH activan ERK1/2 a través del CRHR2 $\alpha$ en la línea celular hipocampal HT22-CRHR2 $\alpha$ y en la línea de células $\beta$ pancreáticas MIN6

En la Tesis Doctoral del Dr. Juan Jose Bonfiglio en nuestro laboratorio, se describió el patrón de activación de ERK1/2 mediado por CRHR1 estimulado con CRH, el cual es bifásico, siendo la primera fase rápida y aguda mediada por PKA y B-Raf, mientras que la segunda es más débil y sostenida al menos por 40 minutos (Figura 13), dependiente de la internalización del receptor y de la  $\beta$ -arrestina2 (Bonfiglio *et al.* 2013). Por otro lado, y de la mano de la Dra. Carolina Inda, se demostró que estas dos fases de activación dependen de diferentes fuentes de AMPc, siendo el segundo mensajero que proviene de las tmACs clave para la primera fase. sAC participa en ambas y es la única fuente de AMPc presente en la fase de activación sostenida (Inda *et al.*, 2016).

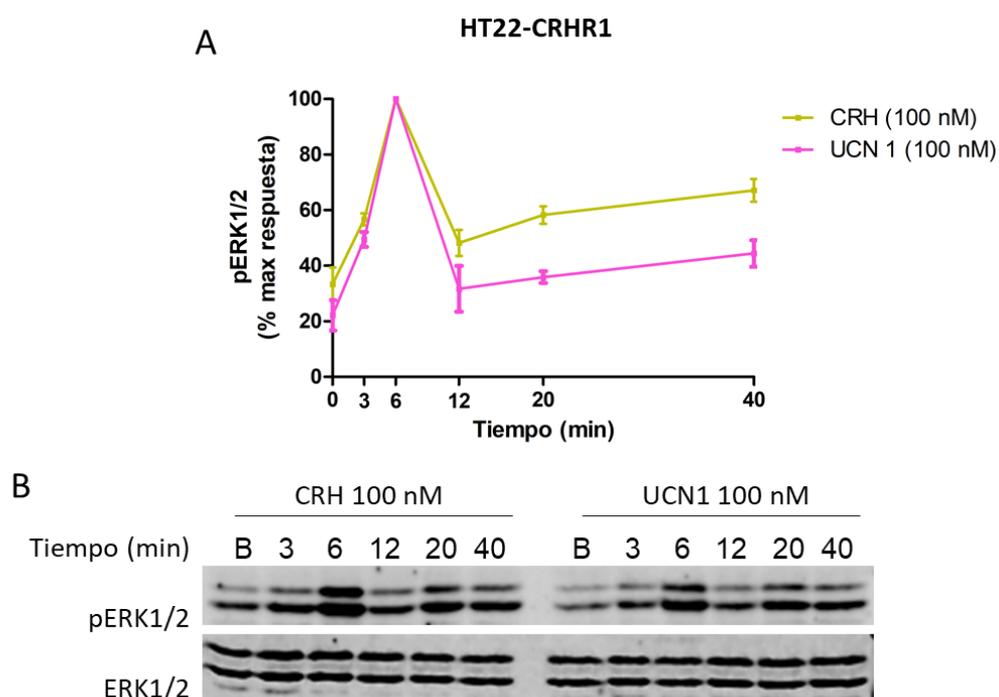


Figura 13: **Perfil de activación de pERK1/2 mediado por el CRHR1 en las células HT22-CRHR1.** Los niveles de pERK1/2 y de ERK1/2 total fueron determinados por *Western Blot* tras ser estimuladas con CRH o UCN1 100nM durante los tiempos indicados. Las señales fueron cuantificadas por densitometría, cada valor de pERK1/2 fue normalizado al de ERK1/2 total. Los resultados están expresados como el porcentaje del máximo de pERK1/2 obtenido a los 6 minutos de estímulo.  $\pm$  EMS de tres experimentos independientes.

## 2.1 ERK1/2 es activado en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ utilizando CRH o las UCNs

Teniendo en cuenta la información previamente mencionada acerca del CRHR1, comenzamos este trabajo caracterizando la activación de ERK1/2 mediada por el CRHR2 $\alpha$ . Para esto, se utilizaron las células HT22-CRHR2 $\alpha$  previamente hambreadas en medio Opti-MEM durante 5-6 horas antes del estímulo. Como se observa en la figura 12, utilizando todos los ligandos del sistema CRH como estímulos observamos una activación de ERK1/2 que muestra una clara primera fase luego de 6 minutos de estímulo, que decayó a los 12 minutos de una manera menos abrupta que la activación de ERK1/2 en las HT22-CRHR1 estimuladas con CRH o UCN1 (Figura 11). Por otro lado, no se observó claramente un nuevo aumento a tiempos largos en comparación con la activación del CRHR1, sino que la fosforilación se mantiene activa a bajos niveles al menos hasta los 40 minutos (Figura 14).

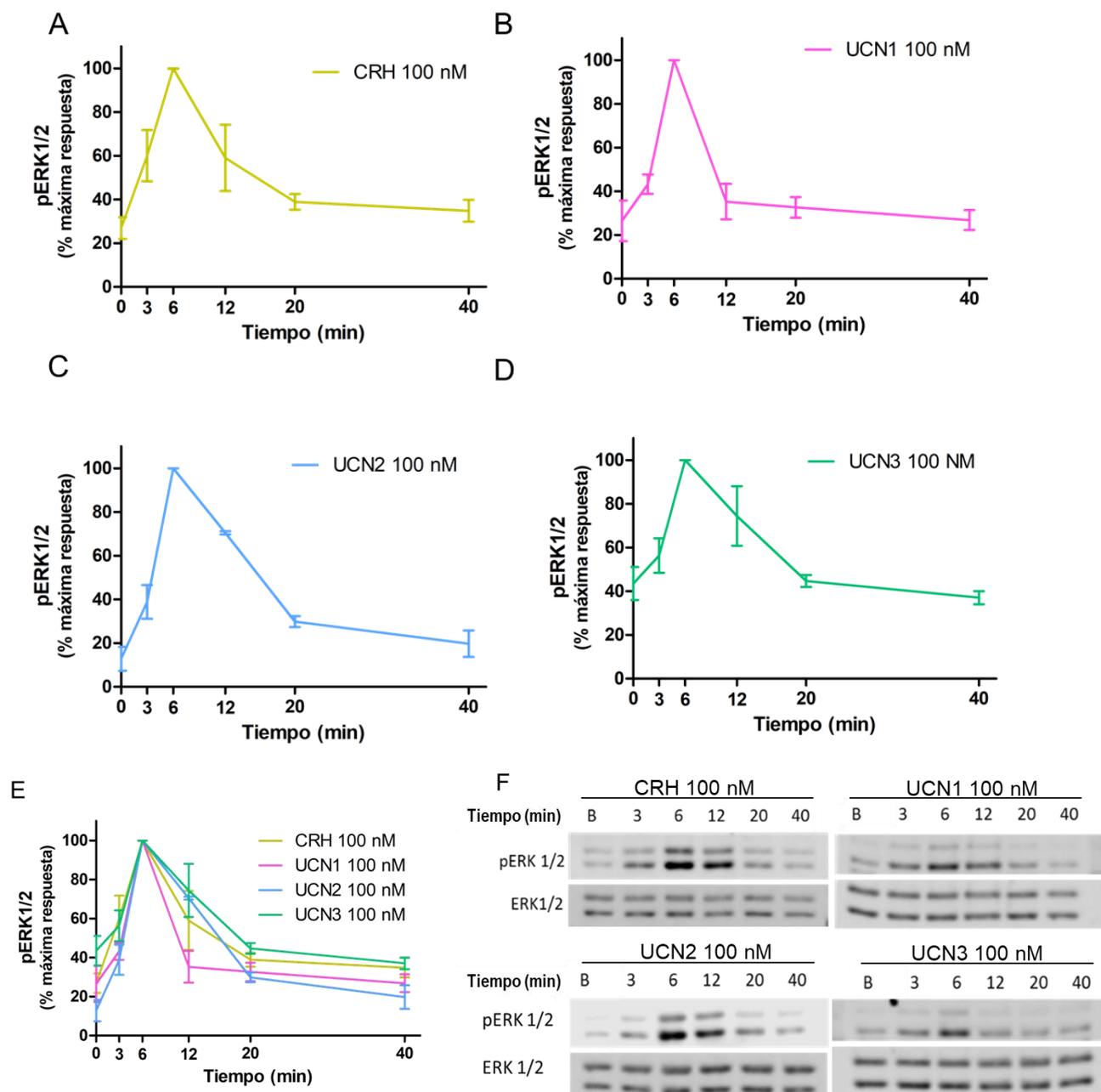


Figura 14: **Perfiles de activación de ERK1/2 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Los niveles de pERK1/2 y de ERK1/2 total fueron determinados por *Western Blot* tras estimular las células con los diferentes ligandos a 100nM por los tiempos indicados (A-E). Las señales fueron cuantificadas por densitometría cada valor de pERK1/2 fue normalizado al de ERK1/2 total. Los resultados están expresados como el porcentaje del máximo de pERK1/2 obtenido a los 6 minutos de estímulo  $\pm$  EMS de tres experimentos independientes. F) Figuras representativas de los *Western Blot* obtenidos para cada estímulo a los diferentes tiempos.

### 2.3 ERK1/2 es activado con un perfil similar al obtenido en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ en las células MIN6 utilizando CRH o las UCNs

Dado que contamos con la línea celular MIN6 que expresa el CRHR2 $\alpha$  y el CRHR1 de manera endógena (Huising *et al.*, 2011), decidimos comparar, primero, si la activación de ERK1/2 existe y segundo, si sucedía con un perfil similar al observado para el CRHR2 $\alpha$ . Detectamos que ERK1/2 se fosforiló en respuesta a los estímulos y con un perfil de activación similar al observado en las HT22-CRHR2 $\alpha$  (Figura 15).

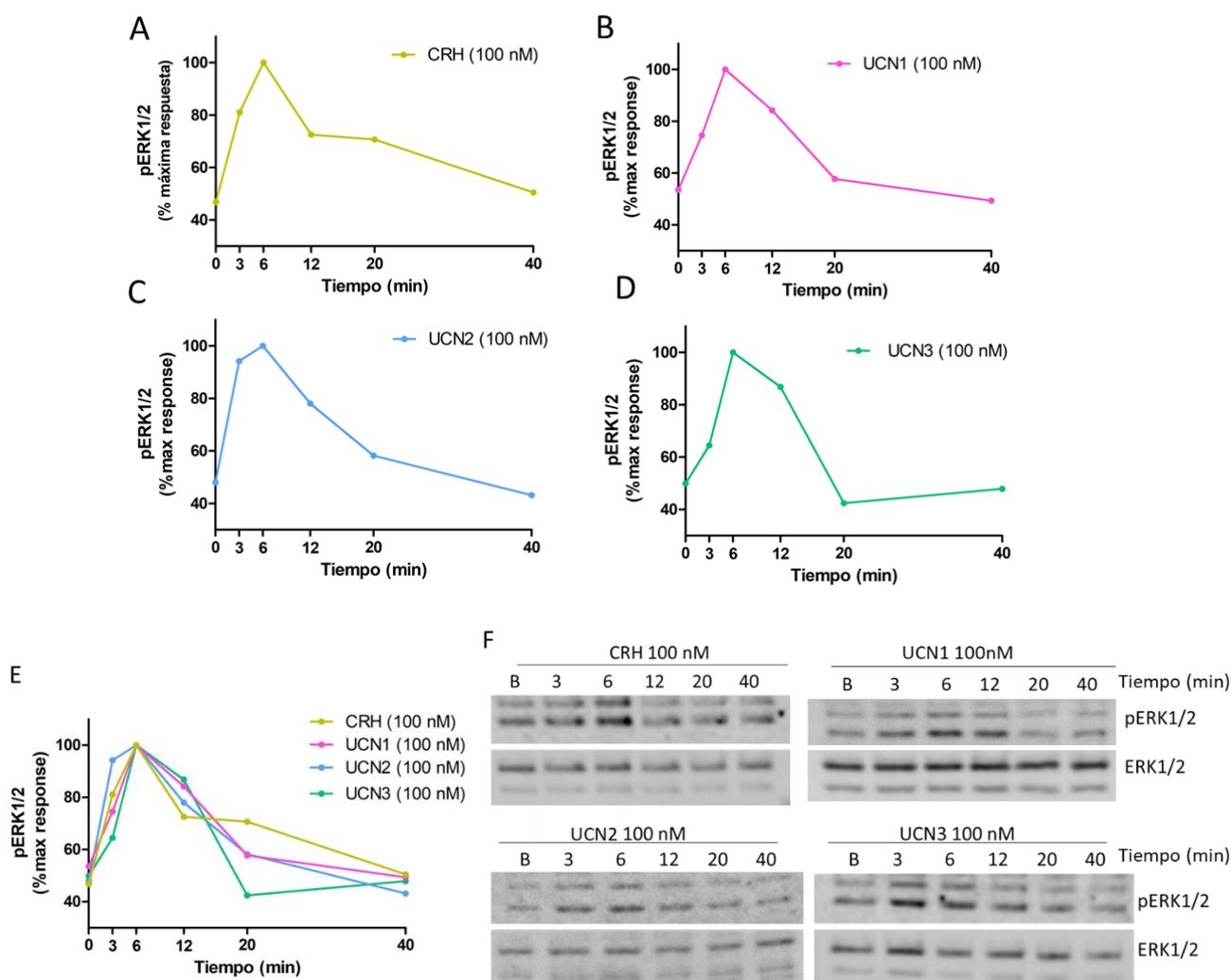


Figura 15: **Perfiles de activación de ERK 1/2 en las células MIN6.** Los niveles de pERK1/2 y de ERK1/2 total fueron determinados por *Western Blot* tras ser estimulas las células con los diferentes ligandos a 100nM durante los tiempos indicados (A-E). Las señales fueron cuantificadas por densitometría, cada valor de pERK1/2 fue normalizado al de ERK1/2 total. Los resultados están expresados como el

porcentaje del máximo de pERK1/2 obtenido a los 6 minutos de estímulo. F) Figuras representativas de los *Western Blot* obtenidos para cada estímulo a los diferentes tiempos.

Teniendo en cuenta que esta línea celular también expresa de manera endógena al CRHR1, la activación que observamos al estimular con UCN2 y UCN3 correspondería a la actividad del CRHR2 $\alpha$ , mientras que con los otros dos estímulos puede corresponder a la activación de ambos receptores.

### **3 Curvas concentración-respuesta y cálculo de EC<sub>50</sub> de los ligandos en las líneas celulares HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$**

Con estos resultados de la activación de ERK1/2, decidimos estimar la afinidad de los estímulos por los receptores de CRH ya que contamos con dos líneas celulares que los expresan de manera estable e independiente y que corresponden al mismo contexto celular. Para realizar las curvas de concentración-respuesta, decidimos medir la activación de ERK1/2 luego de 6 minutos de estimular las células HT22-CRHR1 o HT22-CRHR2 $\alpha$  con los 4 ligandos que corresponden al sistema CRH. Para obtener el EC<sub>50</sub> de pERK1/2 inducido por CRH o las UCNs, los valores se ajustaron a una curva de concentración-respuesta de tres parámetros, mediante el software GraphPad Prism (Figura 16).

Las curvas de concentración respuesta fueron en línea con lo que reúne la bibliografía acerca de las afinidades de estas neurohormonas donde CRH y la UCN1 activaron con afinidades similares al CRH, mientras que la UCN 2 y 3 serían menos afines para el CRHR1 en concentraciones fisiológicas. Por otro lado la UCN1 y la UCN3 fueron las de mayor afinidad para el CRHR2 $\alpha$  (Chen, 2016). Este resultado confirma que nuestro sistema asemeja el comportamiento del receptor previamente reportado en la línea celular de ovario de hámster, CHO (Lewis *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2001). Continuamos entonces caracterizando la acción de los receptores de CRH con nuestras construcciones expresadas en las células HT22 ya que los *ni tags* que poseen tanto FLAG para el CRHR2 $\alpha$  como c-Myc para el CRHR1 en sus aminos terminales, ni la sobre-expresión modifican la afinidad de los ligandos.

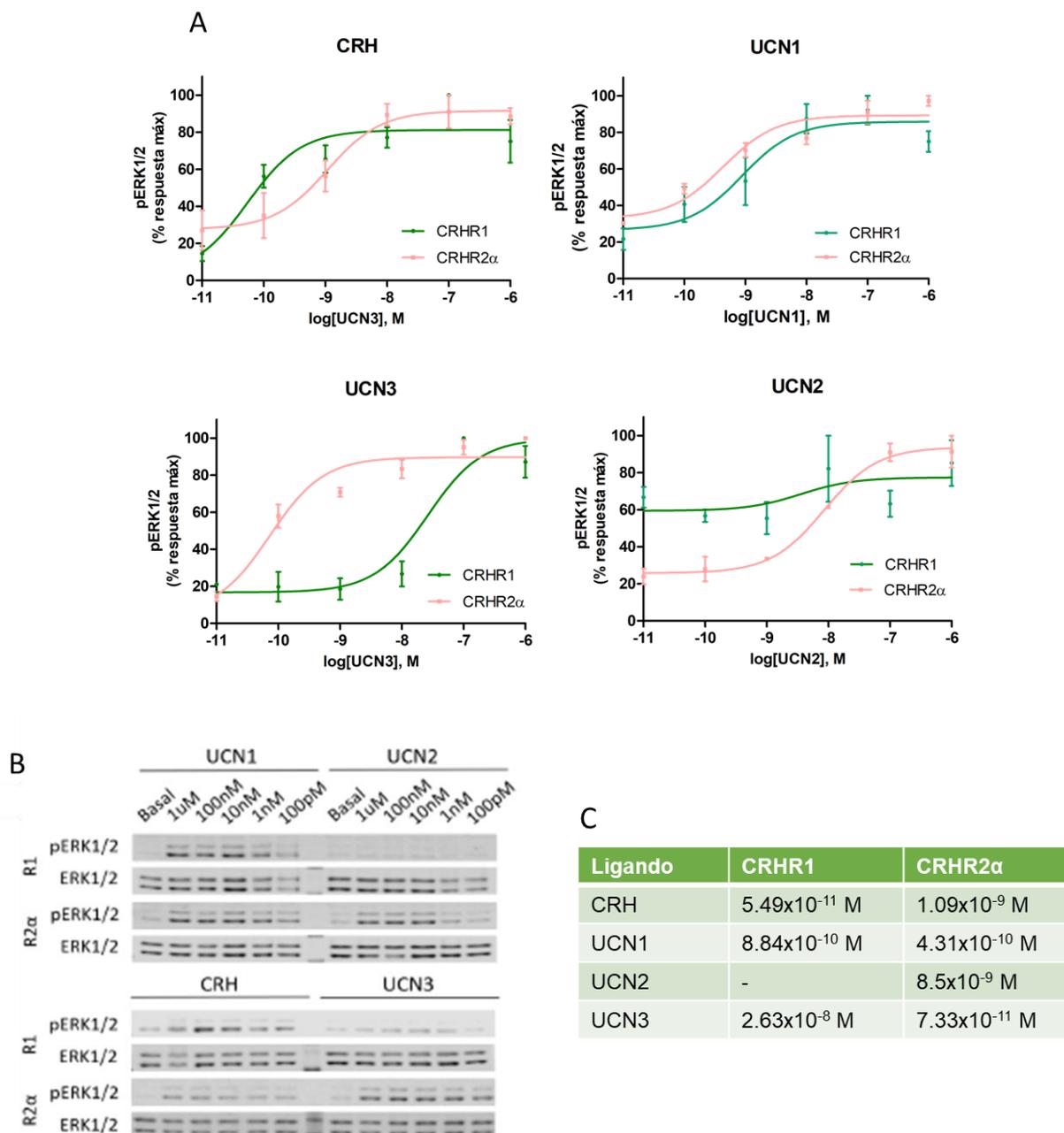


Figura 16: **EC<sub>50</sub>** de pERK1/2 inducido por CRH y UCNs en las células HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2α. A) Curvas de concentración-respuesta de los ligandos mediadas por los receptores de CRH. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de estímulos durante 6 minutos. Los niveles de pERK1/2 y ERK1/2 total fueron determinados por *Western Blot* (B) y cuantificados por densitometría utilizando el software *ImageJ*. Se realizaron 3 experimentos independientes de cada condición y se grafican las medias ± EMS. C) Valores de EC<sub>50</sub> obtenidos para cada estímulo y para ambos receptores de CRH.

#### **4 Participación del AMPc y sus fuentes generadoras en el contexto celular HT22-CRHR2 $\alpha$**

Como se explicó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, los receptores de CRH son GPCRs que señalizan principalmente acoplados a Gs, por lo tanto la participación del AMPc resulta ser de gran importancia para la función de los ligandos que participan en el sistema CRH (Inda, Armando, *et al.*, 2017). Por este motivo decidimos investigar las funciones del segundo mensajero río abajo de la activación del CRHR2 $\alpha$  en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ , así como también en las MIN6 para utilizarlas de manera comparativa como un sistema de expresión endógeno del CRHR2 $\alpha$ .

La primera pregunta que quisimos responder fue si la activación del CRHR2 $\alpha$  desencadena la generación de AMPc en nuestro sistema y la segunda, si el AMPc generado proviene de ambas fuentes: tmACs y sAC como se ha descrito en profundidad para el CRHR1 (Inda *et al.*, 2016). Para responder ambas preguntas decidimos realizar las mediciones de AMPc utilizando un sensor de FRET. En la Tesis Doctoral de la Dra. Carolina Inda se optimizó el uso de sensores de FRET para la medición de AMPc/PKA disparada por CRH en las células HT22-CRHR1. El sensor EPAC-S<sup>H187</sup> resultó ser el más indicado para la medición de AMPc por su mayor brillo y fotoestabilidad respecto a otros sensores como ICUE3 (dos Santos Claro *et al.*, 2019; Inda, 2017).

Nuestra primera aproximación consistió en corroborar la funcionalidad del sensor de nuestro sistema. Se transfectaron de manera transitoria las células HT22-CRHR2 $\alpha$  con el sensor de FRET Epac-S<sup>H187</sup> y se midió la generación del segundo mensajero en tiempo real a nivel célula única y sin agregar inhibidores de fosfodiesterasas (PDEs, de sus siglas en inglés *Phosphodiesterases*). Diferentes concentraciones de UCN1 activaron la respuesta de AMPc con diferentes perfiles e intensidades, pero en todos los casos la respuesta fue rápida. Teniendo en cuenta este resultado, decidimos continuar nuestro estudio utilizando 100 nM de concentración final de estímulo (Figura 17).

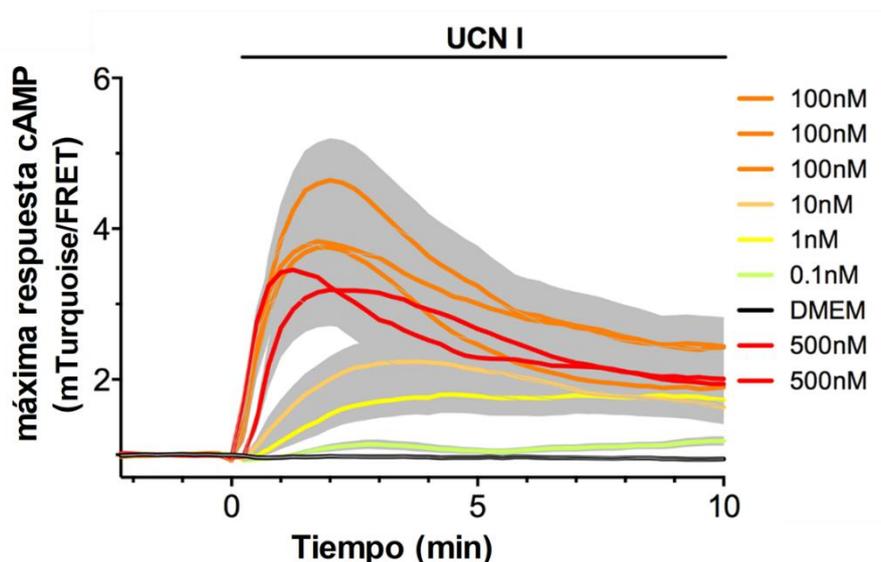


Figura 17: **Respuesta de AMPc frente a diferentes concentraciones de UCN 1 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  transfectadas transitoriamente con el sensor EPAC-S<sup>H187</sup>, se estimularon a tiempo 0 min con las concentraciones indicadas. Datos: Media  $\pm$  EMS, n=20-25 células.

#### 4.1 CRH y las UCNs generan una respuesta de AMPc en la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ , pero no en las MIN6.

Continuamos nuestro análisis acerca de la respuesta de AMPc en nuestro sistema utilizando los ligandos del sistema CRH en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  transfectadas transitoriamente con el sensor de FRET. Como se comentó anteriormente, en este caso mantuvimos la concentración de los estímulos constante, siendo esta 100 nM en todos los casos. Dado que la respuesta observada en la figura 17 es rápida, representamos la activación con los diferentes ligandos luego de 2 minutos de estimulación. Como se puede observar en la figura 18, todos los estímulos activaron una respuesta de AMPc, la UCN1 y CRH lo hicieron con una mayor intensidad, mientras la UCN2 y la UCN3 con una menor, pero en todos los casos la activación fue notoria. Este resultado nos sugiere que la respuesta de AMPc es dependiente del receptor y no del ligando que lo está activando.

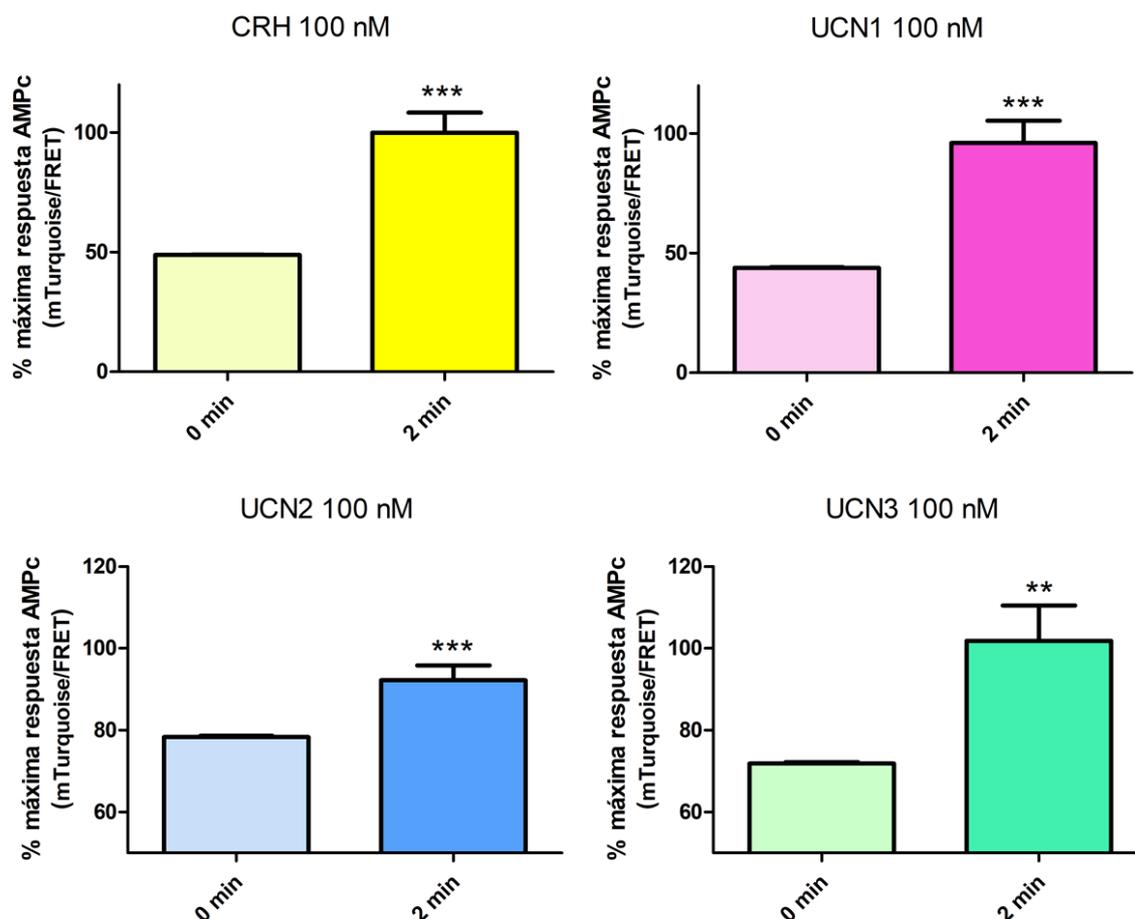


Figura 18: **Respuesta de AMPc medida con el sensor Epac-S<sup>H187</sup> dependiente de CRH y sus péptidos relacionados.** Respuesta de FRET relativa al máximo de la respuesta. Las células HT22-CRHR2 $\alpha$ -Epac-S<sup>H187</sup> fueron estimuladas con los diferentes ligandos a una concentración de 100 nM, se grafican los niveles basales de AMPc a tiempo 0 y luego 2 minutos después del estímulo. Datos: media  $\pm$  EMS, n=18-30 células, \*\* p<0,005, \*\*\* p<0,001, el análisis estadístico se realizó usando el software *GraphPad* (t test) comparando con el tiempo 0.

Dado que se ha reportado previamente que al tratar con forskolina (molécula permeable a la membrana plasmática que activa a las tmACs), las células MIN6 generan un aumento de AMPc (Landa *et al.*, 2005), decidimos investigar si la respuesta del segundo mensajero utilizando los ligandos de sistema CRH era similar a la obtenida en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Se transfectó el sensor de FRET EPAC-S<sup>H187</sup> en las células MIN6 de manera transitoria, se corroboró el incremento de AMPc al tratar con forskolina y luego se estimularon con CRH y con UCN2 y 3. Decidimos no utilizar UCN1 ya que se estarían estimulando ambos receptores y nuestra intención fue favorecer la respuesta diferencial entre los receptores CRHR1 y CRHR2 $\alpha$ .

Ninguno de los ligandos generó un incremento en la generación de AMPc, mientras que con el tratamiento con forskolina se observó un rápido aumento del segundo mensajero (Figura 19). El uso de forskolina nos permitió confirmar que, tanto la maquinaria de las células MIN6 como el sensor de FRET transfectado en las mismas funcionaron correctamente.

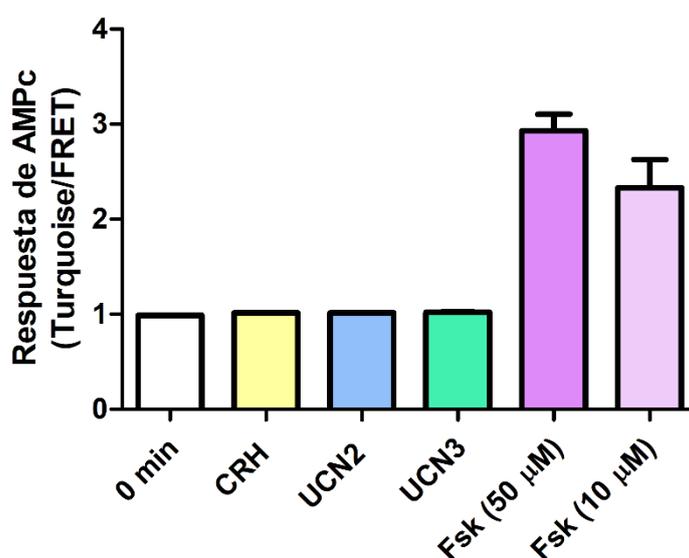


Figura 19: **Respuesta de AMPc medida con el sensor Epac-S<sup>H187</sup> en las células MIN6 transfectadas de manera transitoria.** Las células fueron estimuladas a tiempo 0 con los diferentes estímulos a una concentración 100 nM y con forskolina (Fsk) a las concentraciones indicadas, se grafican los datos basales como tiempo 0 y los cambios de FRET observados luego de 2 minutos. Datos: n=3, media  $\pm$  EMS, n=22-32 células.

Este resultado, confirma nuestra hipótesis acerca de la importancia contexto celular y la dependencia de éste en la activación de diferentes vías de señalización mediada por los receptores de CRH.

#### 4.2 CREB y Akt se activan mediante la estimulación del CRHR2 $\alpha$ tanto en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ como en las MIN6

Nos preguntamos si otros efectores previamente descritos río abajo del AMPc se activarían mediante la estimulación del CRHR2 $\alpha$  en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Se han relacionado efectores río debajo de AMPc como PKA y EPACs con la activación de la vía PI3K/Akt en otros contextos celulares (García-Morales, Luaces-Regueira, & Campos-Toimil 2017; Gündüz *et al.* 2019), es por eso que decidimos comenzar a

investigar la participación de Akt río debajo del CRHR2 $\alpha$ . Por otro lado y como se introdujo anteriormente, CREB es uno de los efectores más comúnmente relacionados con el aumento de los niveles intracelulares de AMPc, y además teniendo en cuenta estudios previos de nuestro laboratorio en las células HT22-CRHR1 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017), consideramos que era un buen candidato para caracterizar como efector de CRHR2 $\alpha$  en nuestro sistema.

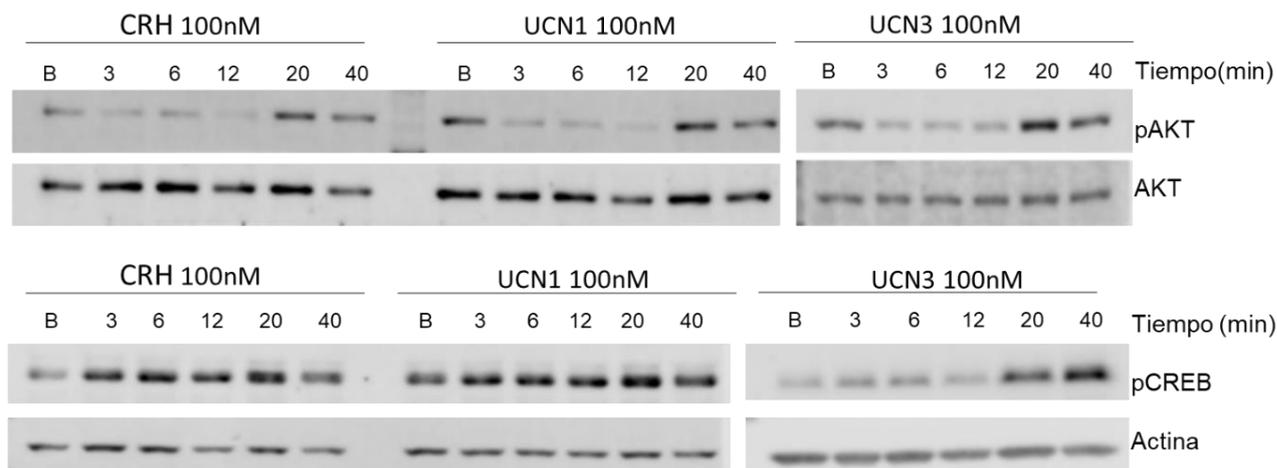


Figura 20: **Perfiles de activación de Akt y CREB en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Los niveles de las proteínas fosforiladas y de las proteínas totales, fueron determinados por *Western Blot* tras ser estimuladas con los diferentes ligandos a 100nM durante los tiempos indicados. Figuras representativas de los *Western Blot* obtenidos para cada estímulo y cada efector a los diferentes tiempos.

Observamos que ambos efectores se activaron luego de estimular con CRH o UCN1 y 3 (Figura 20). Decidimos comparar este resultado con las células MIN6 ya que demostramos previamente que utilizando CRH o UCN2 y 3, esta línea no genera AMPc río abajo del CRHR2 activado (Figura 19), por lo tanto, este resultado nos brindará importante información acerca de la señalización de los receptores de CRH en diferentes contextos celulares. En este caso, decidimos utilizar solo CRH y UCN3 para favorecer la activación de manera diferencial al CRHR1 y al CRHR2 $\alpha$ . Nos sorprendió observar que tanto CREB como Akt también fueron activados en estas células dependientemente de CRH y UCN3 (Figura 21).

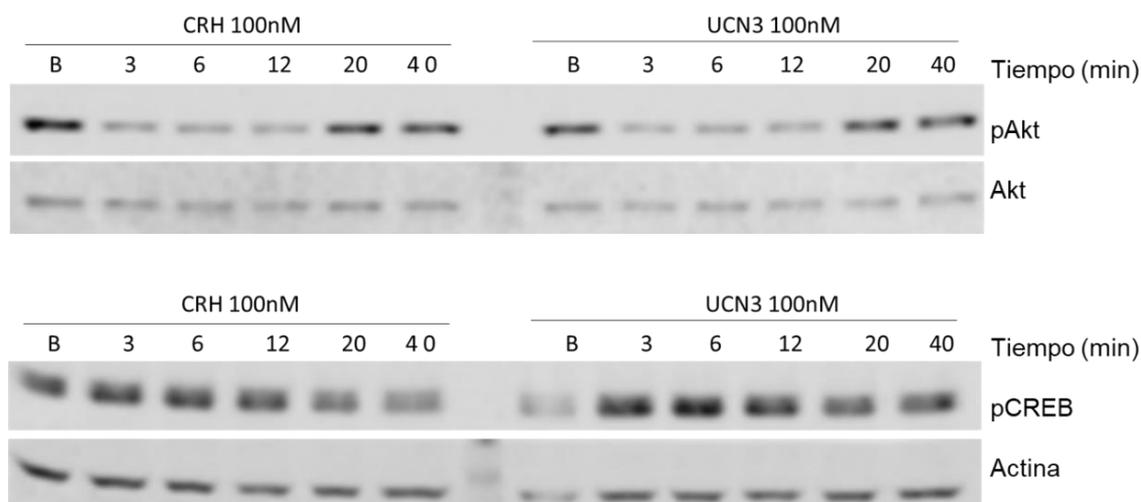


Figura 21: **Perfiles de activación de Akt y CREB en las células MIN6.** Los niveles de las proteínas fosforiladas y de las proteínas totales, fueron determinados por *Western Blot* tras ser estimuladas con los diferentes ligandos a 100nM durante los tiempos indicados. Figuras representativas de los *Western Blot* obtenidos para cada estímulo y cada efector a los diferentes tiempos.

Encontramos similitudes en la activación de Akt donde los niveles basales fueron altos, luego hubo una reducción en la fosforilación, y a tiempos largos, volvió a incrementar. Esto se observa tanto en las células sobre-expresadas como en las células que contienen endógenos los receptores. Podríamos pensar una posible explicación a este comportamiento teniendo en cuenta que existe información previa en otros sistemas celulares que relaciona a la vía PI3K con la endocitosis de otros GPCRs (English, Mahn, & Marchese 2018). Aún no se conoce con seguridad el tránsito del CRHR2 $\alpha$ , ni en qué tipo de estructura membranosa se encuentra dentro de la célula en condiciones basales, más adelante profundizaremos sobre el tránsito del CRHR2 $\alpha$ . Cabe la posibilidad que el receptor se encuentre en algún tipo de endosoma y que presente actividad constitutiva, señalizando vía Akt en condiciones previas a la estimulación, lo cual explicaría los niveles de fosforilación de Akt en condiciones basales.

Respecto a la activación de CREB, en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ , se observó una activación creciente con el tiempo, mientras que, en las MIN6, la activación fue rápida y luego ocurrió una caída de ésta a 20 minutos de la estimulación, decidimos cuantificar esta activación detectada por *Western Blot* para poder comparar con mayor precisión los perfiles de activación (Figura 22). Dado que la activación de

CREB está íntimamente ligada con el AMPc, este resultado podría indicarnos que el CREB fosforilado en las células MIN6 es independiente de AMPc y por eso su perfil de activación difiere respecto del observado en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  (Figura 22). Estudiando la bibliografía acerca de CREB y su activación, encontramos que esta proteína puede ser activada por diferentes vías mediante la fosforilación del dominio KID (Alberini, 2009). Este dominio posee la Ser133, siendo esta la posición más popular respecto a las modificaciones post-traduccionales de esta molécula. Sin embargo, este dominio, cuenta con varios sitios de fosforilación permitiendo la regulación de más de una vía sobre CREB, entre ellas encontramos a las vías Ras/Raf/MAPK/p90RSK, Ca<sup>2+</sup>/CaMK, PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ , y la más conocida, AMPc/PKA. Por otro lado, GMPc también puede activar a CREB mediante la fosforilación de la Ser133. A su vez, la vía de las CaMK puede fosforilar la molécula tanto en la Ser133 como en la Ser142 siendo esta última inhibitoria sobre la acción de CREB (H. Wang *et al.*, 2018). Esta información nos permite pensar, que probablemente este resultado corresponda a una regulación diferencial dependiente del contexto celular. Este punto resulta extremadamente interesante por lo que se lo tiene en cuenta para ser profundizado en un futuro.

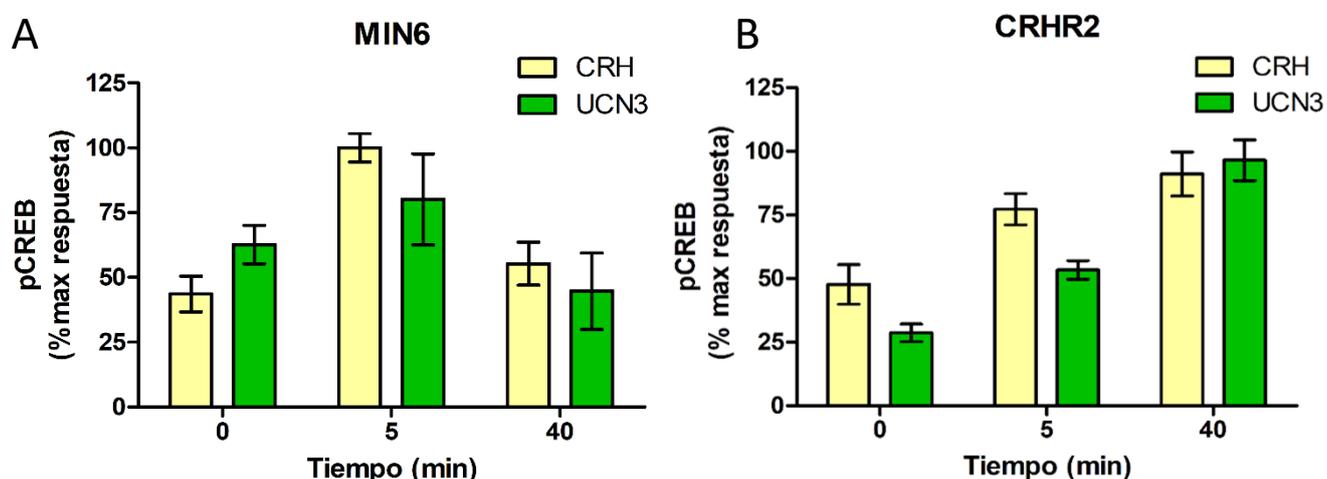


Figura 22: **CREB se activa con diferentes perfiles entre las células MIN 6 y las HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Los niveles de pCREB y de las proteínas totales ( $\beta$ -actina), fueron determinados por *Western Blot* tras ser estimuladas con los diferentes ligandos a 100nM durante los tiempos indicados y cuantificadas por densitometría utilizando el software *ImageJ*. En A se muestra el perfil de activación obtenido en las células MIN6 y en B el obtenido en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Datos: n=3, media  $\pm$  EMS.

#### 4.3 Tanto las tmACs como sAC participarían en la generación de AMPc mediada por CRHR2 $\alpha$ en el contexto celular hipocampal

Antecedentes de nuestro laboratorio han demostrado que tanto en las células HT22-CRHR1 como en cerebro adulto de ratón se ha encontrado a sAC dentro de sus fuentes generadoras de AMPc (Inda, 2017), por lo tanto quisimos investigar acerca del rol de esta y de las AC clásicas en la señalización del CRHR2 $\alpha$ .

Utilizando las células HT22-CRHR2 $\alpha$ -Epac-S<sup>H187</sup> decidimos responder el siguiente interrogante: si ambas fuentes de AMPc participan en la respuesta del segundo mensajero en nuestro sistema. Para esto, se agregó durante el *time course* del experimento de medición de cambios de FRET, inhibidores específicos para cada fuente de AMPc. Se utilizó 2',5'-ddA como inhibidor farmacológico para las tmACs y 2-HE para sAC. Luego del estímulo se agregaron los inhibidores como se explica en Materiales y Métodos. En este caso se utilizaron los clones estables de las células HT22-CRHR2 $\alpha$  que expresan el sensor de FRET y se midió la respuesta de AMPc a tres tiempos diferentes en caso de que el efecto de los inhibidores se manifestara a tiempos largos. Pudimos comprobar que las tmACs participaron en la generación de AMPc ( $p < 0.001$ ) y a su vez, al inhibir a sAC se observó también una disminución del AMPc generado lo que podría indicarnos una participación de ambas fuentes (Figura 23), siendo la sAC de contribución menor al aumento total de AMPc, como se observó para el CRHR1 (Inda *et al.*, 2016). Este resultado nos sugiere que al igual que en el caso del CRHR1, tanto tmACs como sAC participan en la señalización vía CRHR2 $\alpha$ .

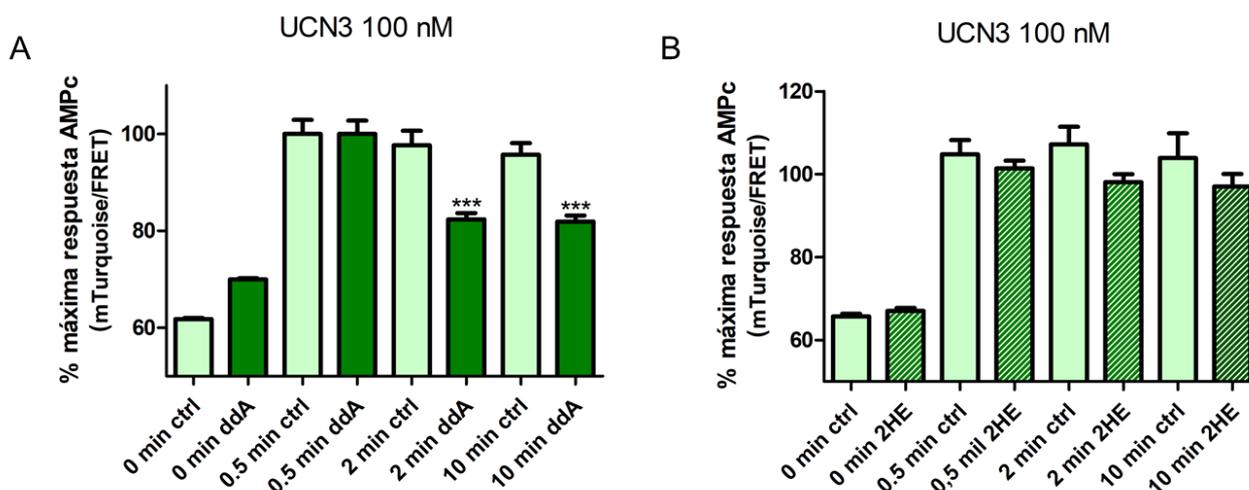


Figura 23: **Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC en la respuesta de AMPc generada por la UCN3.** Respuesta de FRET relativa al máximo de la respuesta. Las células HT22-CRHR2 $\alpha$ -Epac-S<sup>H187</sup> fueron estimuladas con UCN3 100 nM a tiempo 0. El vehículo (ctrl) o los inhibidores específicos de A) tmACs (2',5'-ddA 100  $\mu$ M) o B) sAC (2-HE 30  $\mu$ M) fueron agregados 1,5 min después del estímulo. Datos: n=2, media  $\pm$  EMS, 20-25 células, \*\*\* p<0,001, el análisis estadístico realizado fue ANOVA de una vía usando el software *GraphPad*.

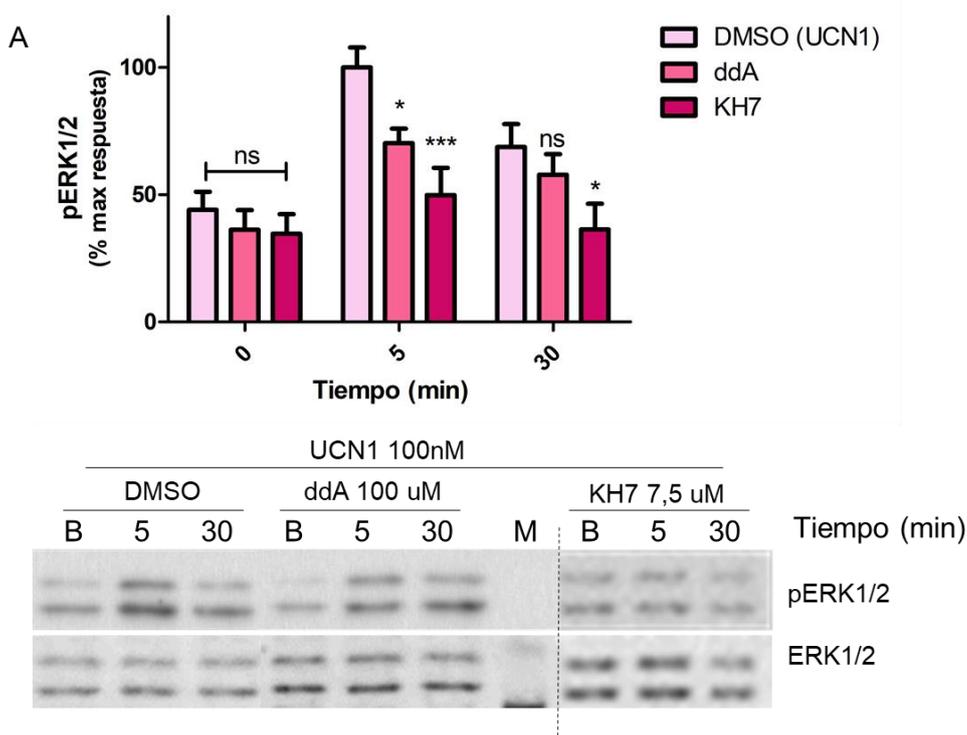
#### 4.4 Ambas fuentes generadoras de AMPc son necesarias para la señalización río abajo del receptor en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

Para profundizar en la activación de ambas fuentes del segundo mensajero, nuestra siguiente pregunta fue cuál era la participación de éstas en la fosforilación de los efectores que estudiamos a lo largo de esta Tesis: ERK1/2, Akt y CREB. La bibliografía sostiene que la activación de CREB se encuentra generalmente río debajo de la vía AMPc/PKA, aunque pueden participar otras vías como se comentó anteriormente. Para el caso de ERK1/2, en el contexto neuronal y células neuroendocrinas también se lo encuentra ligado al AMPc, pero no en otros contextos celulares como fibroblastos (Inda *et al.*, 2016). Por otro lado, en general Akt se encuentra río debajo de la vía PI3K (Hemmings & Restuccia 2012). Hoy en día se sospecha que Akt no sólo se activa por la vía PI3K sino que podría ser fosforilado en otros sitios independientes de la PI3K, lo que complica aún más la regulación de los mecanismos en los que participa (Cole *et al.*, 2019). Nuestra intención, en este caso, fue analizar dos vías diferentes en el mismo sistema y la participación del AMPc en estas vías generado por diferentes fuentes. Con este objetivo, se preincubaron las células HT22-CRHR2 $\alpha$  con los inhibidores 2',5'-ddA para tmACs y KH7 para sAC y luego se midió la fosforilación de los diferentes efectores por *Western Blot*.

##### 4.4.1 sAC es necesaria para la activación de ERK1/2 dependiente de UCN1 y UCN3

En la Tesis Doctoral de la Dra. Carolina Inda, se demostró que ambas fuentes de AMPc participan en activación de ERK1/2 del CRHR1 en las células HT22-CRHR1. Sin embargo, esta participación no es tan sencilla, ya que el AMPc generado por cada una de las fuentes, cumple una función diferente, mientras que el segundo mensajero generado por las tmACs regula sólo la fase temprana de ERK1/2, el AMPc generado por sAC regula ambas fases (Inda *et al.*, 2016) .

Con este antecedente, decidimos analizar si ambas fuentes participan en la señalización de ERK1/2 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  (Figura 12 y 13). Al medir la fosforilación de ERK1/2 luego de los tratamientos y de estimular con UCN1, se observó una reducción a los 5 minutos con ambos inhibidores (tmACs  $p < 0.05$ , sAC  $p < 0.001$ ). Luego de 30 minutos, se observó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 sólo relacionada con sAC ( $p < 0.05$ ), mientras que la inhibición de las tmACs parecería no tener ningún efecto a tiempos largos (Figura 24A). La misma tendencia se observó al estimular las células con UCN3, en este caso no se observaron diferencias significativas (Figura 24B). Creemos que esta diferencia entre estímulos corresponde a la cantidad de repeticiones que se realizaron de cada experimento ya que la utilización de estos inhibidores es perjudicial para las células y varía entre experimentos.



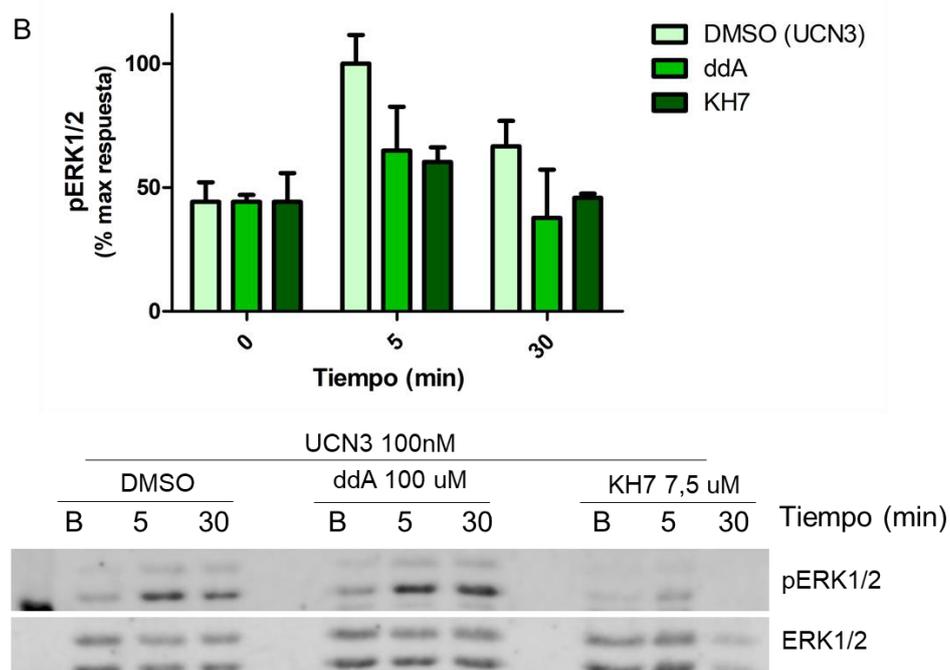


Figura 24: **Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC en la activación de ERK1/2 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron preincubadas con vehículo (DMSO) o con los inhibidores a las concentraciones indicadas durante 15 minutos antes del estímulo con UCN1 (A) o UCN3 (B) 100 nM. Los niveles de pERK y su total se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados. La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el *software ImageJ*. Datos: n=5, media  $\pm$  EMS, para UCN1 n=3 para UCN3, \*\*\*, p < 0,001 \*, p < 0.05; El análisis estadístico se realizó utilizando el *software GraphPad* (ANOVA de dos vías corregido por la prueba *post hoc* de Bonferroni).

#### 4.4.2 sAC es la única fuente de AMPc involucrada en la activación de Akt dependiente de UCN3 y UCN1

Consideramos de gran relevancia estudiar esta vía ya que cada vez se la relaciona con más procesos celulares en el sistema nervioso central. Por otro lado, nuestra intención es caracterizar las vías de señalización de los receptores de CRH y poco se conoce acerca de la vía de la PI3K en el sistema CRH. La información obtenida con estos experimentos nos sirve para ampliar nuestro conocimiento sobre la acción del CRHR2 $\alpha$  en un contexto celular neuronal más allá de vía AMPc/PKA/ERK1/2 que está descrita en mayor detalle para este sistema.

Luego de realizar el mismo proceso descrito en el ítem anterior y estimulando con UCN1, se observó que sólo sAC parece involucrada en la activación de Akt a tiempos largos (p<0.05) mientras que el bloqueo de las tmACs no generó ningún cambio (Figura 25A). Lo mismo se observó al utilizar UCN3 como estímulo (Figura 25B). Este

resultado sugiere que Akt podría generarse desde compartimientos endocíticos ya que su activación sólo dependería de AMPc sAC-dependiente, siendo esta molécula clave en la señalización desde endosomas para el CRHR1 en el mismo contexto celular (Inda *et al.*, 2016).

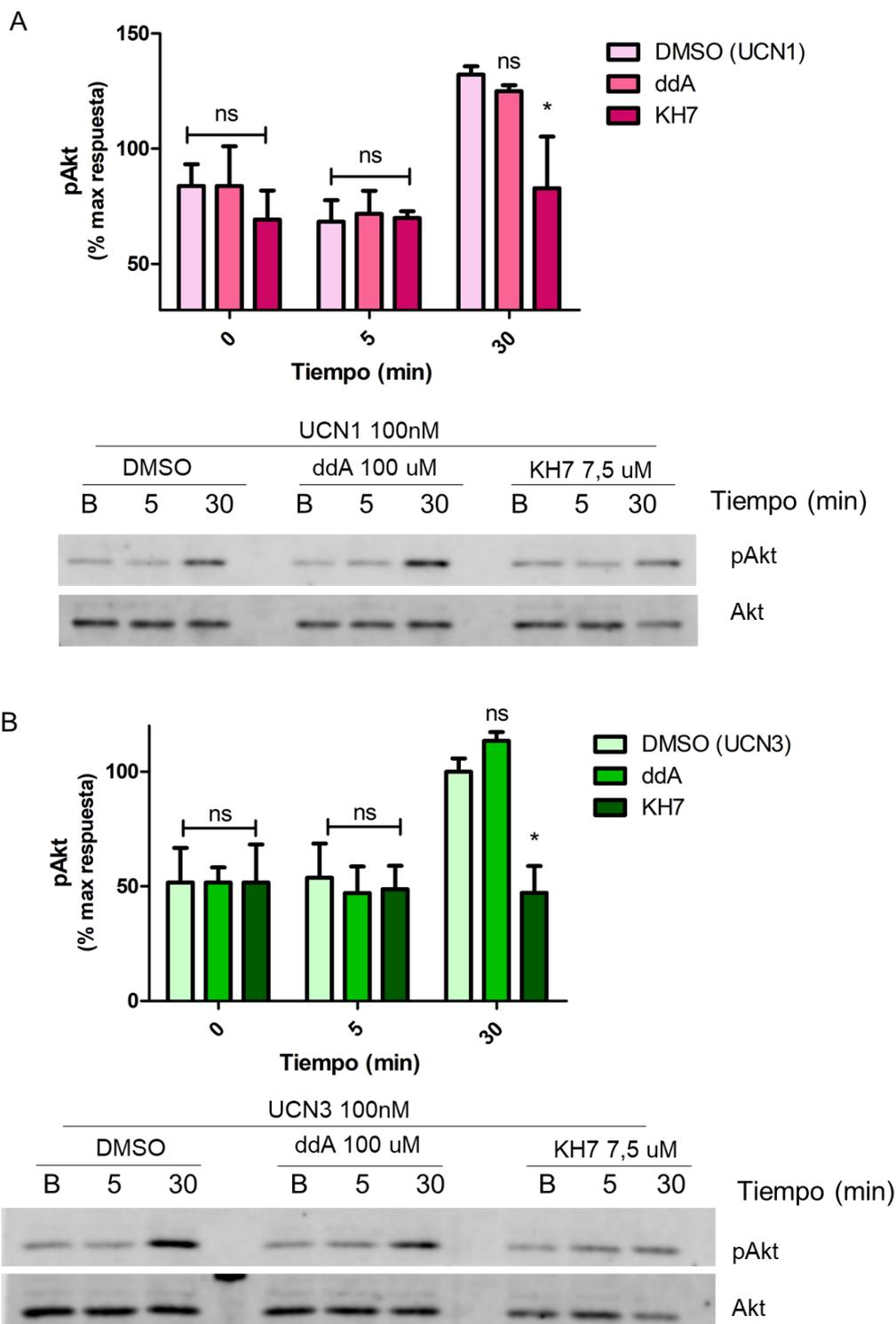


Figura 25: **Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC en la activación de Akt en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron preincubadas con vehículo (DMSO) o con los inhibidores a las concentraciones indicadas durante 15 minutos antes del estímulo con UCN1 (A) o UCN3 (B) 100 nM. Los niveles de pAkt y su total se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados. La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el *software ImageJ*. Datos: n=5, media  $\pm$  EMS, para UCN1, n=3 para UCN3, \*, p < 0.05; El análisis estadístico se realizó utilizando el *software GraphPad* (ANOVA de dos vías corregido por la prueba *post hoc* de Bonferroni).

#### 4.4.3 Tanto tmACs como sAC son necesarias para la fosforilación de CREB dependiente de UCN3

El factor de transcripción CREB, es uno de los principales participantes en la regulación de elementos de transcripción activados río abajo del AMPc. Antecedentes de nuestro laboratorio, han demostrado que en respuesta de CRH y UCN1, la fosforilación de CREB aumenta en función del tiempo y a su vez es concentración dependiente en las células HT22-CRHR1 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). Como se observa en la figura 15, lo mismo sucede en función del tiempo utilizando los diferentes estímulos en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Por otro lado, se ha observado también que ambas fuentes de AMPc participan en la fosforilación de CREB en las células HT22-CRHR1 y que además esta activación depende de PKA pero no de ERK1/2 (Inda, 2017; Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta el rol clave que cumple este efector en la señalización vía AMPc y particularmente ligado al CRHR1, la siguiente pregunta que decidimos responder fue si ambas fuentes de AMPc participan en la activación de CREB. En este caso utilizamos a la UCN3 como estímulo. Como se puede observar, al inhibir ambas fuentes generadoras de AMPc, disminuyó significativamente la activación de CREB a tiempos largos que corresponde al tiempo con mayor cantidad de CREB fosforilado (p>0,001) en nuestro sistema (Figura 26).

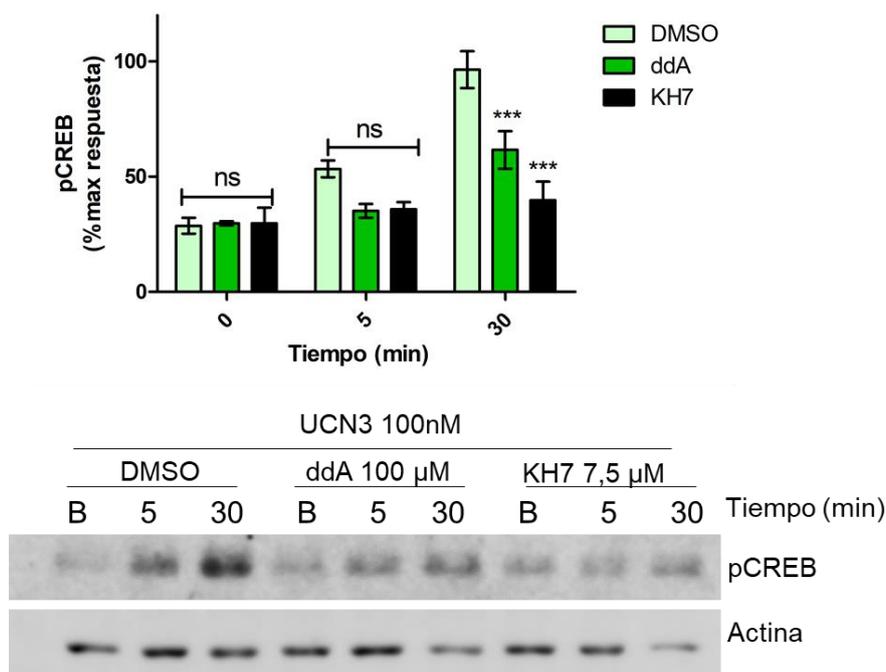


Figura 26: **Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC en la activación de CREB en las células HT22-CRHR2 $\alpha$** . Las células HT22-CRHR2 fueron preincubadas con vehículo (DMSO) o con los inhibidores a las concentraciones indicadas durante 15 minutos antes del estímulo con UCN3 100 nM. Los niveles de pCREB y actina se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados (B). La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el software *ImageJ*, los resultados de ésta se encuentran graficados en la figura A. Datos: n=3, media  $\pm$  EMS; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns: no significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando el software *GraphPad* (ANOVA de dos vías corregido por la prueba post hoc de Bonferroni).

## 5 Participación de PKA en la señalización mediada por el CRHR2 $\alpha$

La siguiente pregunta que quisimos abarcar, corresponde a la participación de PKA en nuestro sistema HT22-CRHR2 $\alpha$ . Como se introdujo previamente, PKA es un efector que puede encontrarse río debajo de la activación de AMPc en diferentes sistemas celulares y tejidos y cuya actividad o función depende de éstos. Para el caso del CRHR1 en el contexto de las HT22, se demostró que en respuesta a CRH, tanto las tmACs como sAC señalizan a través de la PKA (Inda, 2017). Comenzamos a extender este estudio sobre la acción de las UCNs sobre el CRHR2 $\alpha$  y la participación de PKA.

Nuestra primera aproximación fue responder si la PKA se activa en presencia de las UCNs en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  para lo cual transfectamos de manera transitoria las células con el sensor de FRET AKAR4, el cual mide la actividad de la PKA. Observamos que las 3 urocortinas fueron capaces de generar un aumento en la actividad de PKA (Figura 27). Nos resulta de suma importancia continuar el estudio de la actividad de PKA ya que como demuestra la figura, esta actividad es sostenida en el tiempo, lo cual nos estaría indicando la participación de otros mediadores del metabolismo del AMPc en el mantenimiento de esta actividad.

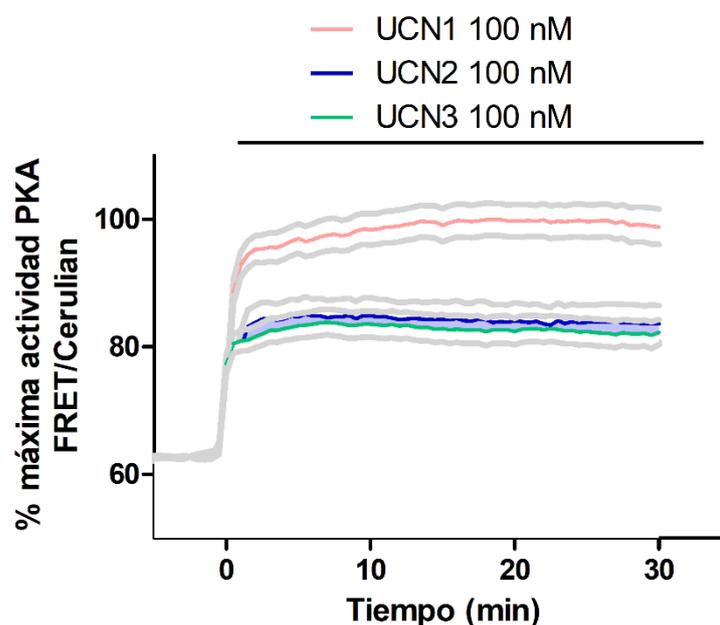


Figura 27: **Respuesta de la actividad de PKA frente a la estimulación con las diferentes UCNs en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron transfectadas transitoriamente con el sensor AKAR4, se estimularon a tiempo 0 min con las tres urocortinas a una concentración 100 nM. Datos: Media  $\pm$  SEM, n=40-50 células.

## 6 Mediadores de AMPc en la activación de ERK1/2 y de Akt

Teniendo en cuenta el resultado anterior, decidimos profundizar en la participación de los mediadores que se encuentran río debajo de la activación de AMPc. Existen antecedentes que demuestran que la activación de ERK1/2 y de Akt dependen de PKA y de EPACs en diferentes contextos celulares (Kawasaki *et al.* 1998; García-Morales, Luaces-Regueira, & Campos-Toimil 2017), es por esto que decidimos que nuestro siguiente interrogante sería acerca de la participación de estos mediadores río debajo de la respuesta de AMPc disparada por la activación del CRHR2 $\alpha$ .

Respecto a la participación de PKA y EPACs en la fosforilación de ERK1/2 dependiente de CRH en las células HT22-CRHR1, nuestro laboratorio demostró que la inhibición de PKA disminuye la primera fase de activación, mientras que los EPACs 1 y 2 inciden en ambas fases de ERK1/2 (Inda *et al.*, 2016). Basándonos en estos antecedentes, avanzamos en averiguar la participación de estos efectores en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  utilizando dos inhibidores farmacológicos, H-89 para PKA y ESI09 para los EPACs 1 y 2.

Luego de preincubar las células con el inhibidor de PKA y estimularlas con UCN1, se observó una disminución en la activación de ERK1/2 a 5 minutos ( $p < 0,05$ ) pero no a tiempos largos. Por otro lado, en el caso de Akt al inhibir PKA se observó un aumento en la fosforilación ( $p < 0,05$ ) 30 minutos luego de agregar el estímulo (Figura 28).

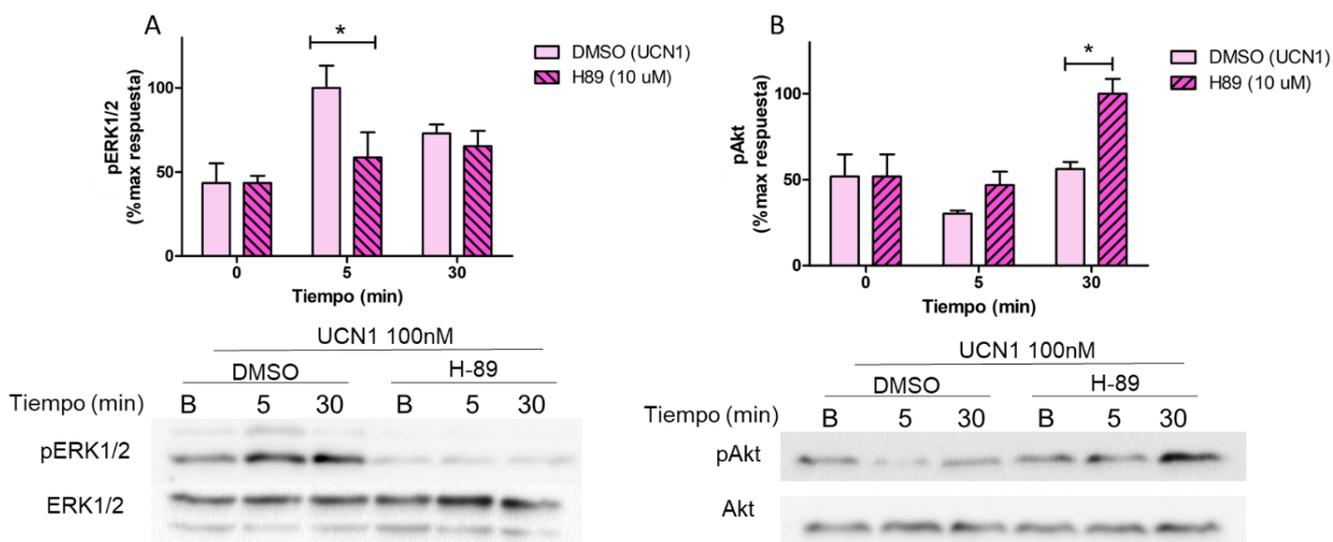


Figura 28: **Efecto de la inhibición de PKA en la fosforilación de ERK1/2 y Akt disparada por la UCN1.** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron preincubadas con vehículo (DMSO) o con el inhibidor H-89 durante 15 minutos antes del estímulo con UCN1. Los niveles de pERK y su total (A) y del Akt y su total (B) se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados. La cuantificación para ambos se realizó por densitometría utilizando el software ImageJ. Datos:  $n=3$ , media  $\pm$  EMS, \*,  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad (ANOVA de dos vías corregido por la prueba post hoc de Bonferroni).

### 6.1 Los EPACs participarían en la fosforilación de ERK1/2 y de Akt generada mediante la UCN3 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .

Luego de preincubar las células 15 minutos con el inhibidor de EPACs 1 y 2, se observó una marcada reducción tanto en la fosforilación de ERK1/2 como en la de Akt luego de la estimulación. La tendencia en la reducción se sostuvo luego de 30 minutos en ambos casos (Figura 29).

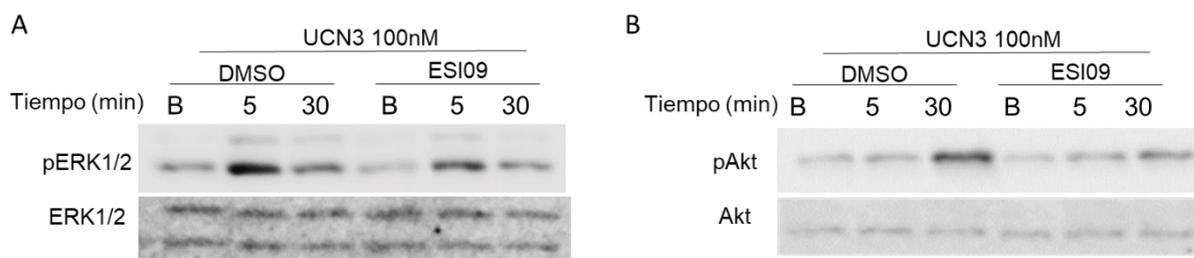


Figura 29: **Efecto de la inhibición de los EPACs sobre la activación de ERK1/2 y Akt.** Las células HT22-CRHR2 fueron preincubadas con vehículo o con los inhibidores durante 15 minutos antes del estímulo con UCN3. Los niveles de las fosfo-proteínas y su totales se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados.

Tanto la PKA como los EPACs estarían implicados en la fosforilación de ERK1/2 en nuestro sistema. En el caso de Akt, los EPACs parecerían cumplir un rol en la activación de Akt ya que al inhibirlos se observa una disminución de la proteína fosforilada (Figura 29), mientras que para el caso de PKA, se observa un aumento (Figura 28), lo que podría indicar un efecto negativo de la PKA sobre Akt. Creemos que el aumento podría corresponder a efectos inespecíficos del inhibidor utilizado y por lo tanto hipotetizamos que la PKA no tiene efecto sobre la activación de Akt. Se continuará con esta hipótesis en la Discusión de esta Tesis.

## **7 Inducción de *c-fos* en líneas celulares y cultivos primarios de neuronas dependiente de CRH y las UCNs**

Como se introdujo en el ítem anterior, CREB es un efector clave en las vías de señalización que dependen de AMPc. Una vez activado, CREB es un factor de transcripción que tiene funciones críticas en el sistema nervioso central (Benito & Barco 2010). Las respuestas a corto y largo plazo dependen exclusivamente de la expresión de nuevos genes y desde hace algunos años, la investigación en este tipo

de regulación se encuentra muy activa. La activación de los programas de transcripción son una parte esencial de la respuesta celular a la estimulación externa, regula múltiples procesos incluyendo el desarrollo de la arquitectura neuronal y el aprendizaje y memoria, y está alterado en muchos desórdenes neuronales (Benito & Barco 2015). Una de las funciones más importantes de CREB como factor de transcripción, es la inducción de la expresión de *c-fos*, teniendo en cuenta que CREB se encuentra dentro de los efectores activados en nuestro sistema por el CRHR2 $\alpha$ , decidimos profundizar en el análisis de la expresión de este gen.

### 7.1 CRH y las UCNs inducen la expresión de *c-fos* de manera diferencial en las células HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$

Nos preguntamos entonces si la respuesta de *c-fos* se encontraba regulada por CRH y las UCNs en nuestro sistema de estudio. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el CRHR1 produce una fuerte inducción de *c-fos* dependiente de CRH en las células HT22-CRHR1 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). Decidimos profundizar en esto realizando la medición de los niveles de *c-fos* tanto en las células HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$  utilizando todos los ligandos del sistema. Se observó que CRH y la UCN1 100nM generaron un aumento en la expresión de *c-fos* medida por RT-q-PCR en las células HT22-CRHR1 luego de 1 hora de estimulación. A su vez, UCN2 y UCN3 a la misma concentración también generaron un aumento en la expresión de *c-fos* la cual no esperábamos por la baja afinidad del CRHR1 a estos ligandos (Figura 30A). En base a este resultado, decidimos repetir el experimento utilizando una concentración menor de estímulo. Al repetir el experimento con una menor concentración de estímulo, observamos una inducción aún más fuerte de *c-fos* generada por CRH y UCN1, mientras que la UCN2 y la 3 generaron un aumento despreciable respecto al control, consistente con la posible pérdida de selectividad generada con concentraciones altas (Figura 30B).

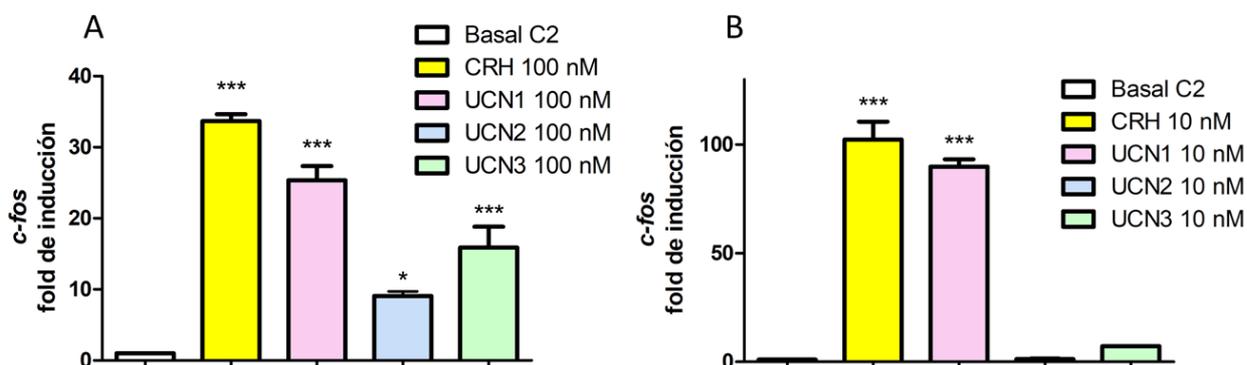


Figura 30: Inducción de *c-fos* en las células HT22-CRHR1 utilizando diferentes ligandos y concentraciones. Los niveles de *c-fos* en las células HT22-CRHR1 se midieron mediante RT-q-PCR y fueron normalizados a *Hprt*, luego de 1 hora de estimulación. En A se muestran los resultados para HT22-CRHR1 utilizando 100 nM y en B 10 nM de concentración de cada estímulo. Datos: media  $\pm$  EMS. \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto al basal utilizando ANOVA de una vía, seguido por el post test Tukey.

Al estimular a las células HT22-CRHR2 $\alpha$  se obtuvo un incremento en la inducción de *c-fos* sólo con UCN1 y UCN3, pero de menor magnitud que el observado en la figura 18 para el CRHR1 (Figura 31A). Se realizó el mismo experimento utilizando las células HT22-CRHR2 $\alpha$  y en las MIN6 (Figura 31B), como se observa en la figura, la inducción fue menor respecto a la observada en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Podemos atribuir esta diferencia a la vía por la cual se activa CREB en cada sistema, ya que en el caso de las MIN6 los niveles de AMPc son indetectables luego de estimular con CRH o las UCNs, sin embargo hay activación de CREB y probablemente éste sea quien activa la inducción de *c-fos*.

Para el caso de las MIN6 se observó un mayor aumento en la inducción de *c-fos* provocada por CRH y por UCN1 respecto a la UCN2 y UCN3 (Figura 31B). Esto puede deberse a que tanto CRH como la UCN1 activan ambos receptores que se encuentran expresados en esta línea celular. Respecto a las otras dos UCNs, se observa una diferencia respecto a la UCN2 y a lo obtenido con las células HT22-CRHR2 $\alpha$  en donde sólo la UCN1 y la UCN3 son capaces de activar la transcripción de *c-fos* (Figura 31A), en las MIN6 la UCN2 sí es capaz de inducir la transcripción de este gen. Nuevamente, atribuimos estas diferencias al contexto celular y a las diferencias vías que probablemente se activen dependiendo del estímulo y que sin duda terminarán regulando procesos diferentes.

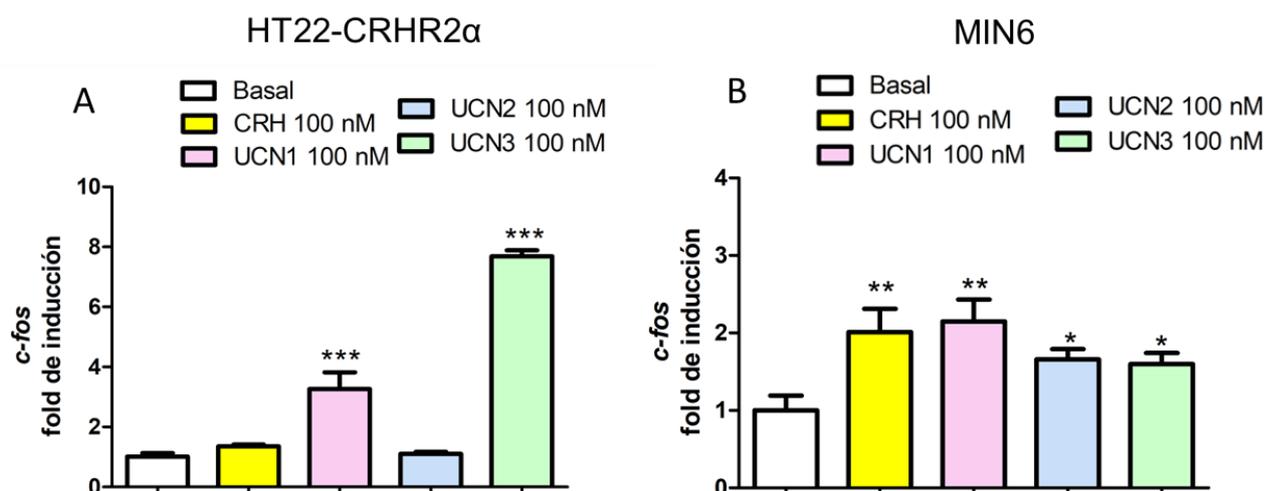


Figura 31: **Inducción de *c-fos* en las células HT22-CRHR2α y MIN6 utilizando diferentes ligandos como estímulo.** Los niveles de *c-fos* se midieron mediante RT-q-PCR y fueron normalizados a *Hprt* luego de 1 hora de estimulación. En la figura A se muestran los datos que corresponden a las células HT22-CRHR2α y en B a las MIN6. Datos: n=3, media ± EMS, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 respecto al basal utilizando ANOVA de una vía, seguido por el post test Tukey.

La activación diferencial dependiente de ligando que observamos tanto en la figura 30 como 31, nos sugiere diferentes mecanismos activados por el mismo receptor según el ligando que esté presente y el tipo celular. Este resultado está en línea con la delicada regulación de la expresión de estos receptores y sus ligandos en el cerebro. En general donde se expresa uno de los ligandos del sistema no se expresan los otros 3, por lo tanto, probablemente en una determinada región del cerebro se activará selectivamente un mecanismo de señalización, esto comprende una regulación extremadamente fina y necesaria para las funciones del cerebro. Por otro lado, estos resultados le otorgan a la UCN2 una menor participación en esta vía y en este contexto celular.

### 7.2 CRH induce la expresión de *c-fos* en cultivos primarios hipocampales, pero no en corticales de embriones de ratón

Decidimos profundizar en la inducción de este gen en un contexto celular que se acerque a la fisiología en donde los receptores de CRH desempeñan su función. Para esto, decidimos utilizar cultivos primarios de neuronas de embriones de ratón, estos experimentos se comenzaron en el Instituto Max Planck de Psiquiatría de Múnich en Alemania y se continuó en el IBioBA.

Por otro lado, se ha demostrado que tanto en corteza como en hipocampo, el CRHR1 se encuentra expresado en neuronas glutamatérgicas, relacionadas con las vías excitatorias, quienes tienen un rol central en la neurotransmisión de glutamato frente al estrés (Damian Refojo *et al.*, 2011). Cabe destacar que resultados previos de nuestro laboratorio, demostraron que en cultivos primarios de neuronas de ratón, CRH activa la respuesta de AMPc de manera similar a las células HT22-CRHR1 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). Esto nos sugiere que la activación de CREB y eventualmente la inducción de *c-fos* se produciría de forma análoga a lo observado en las células HT22-CRHR1 estimuladas con CRH. Este antecedente nos incentivó a efectuar las mediciones de *c-fos* en cultivos primarios.

Se cultivaron neuronas corticales e hipocampales hasta el estadio maduro (entre 18-21 días) de embriones de entre 16.5 y 17.5 días de gestación. Se considera una neurona madura porque el nivel de crecimiento de sus prolongaciones y formación de dendritas en sus sinapsis similares a los de una neurona desarrollada. Para evaluar los efectos de CRH sobre *c-fos* en este tipo de cultivos, decidimos realizar la estimulación en dos condiciones, siendo una basal, es decir, sólo el agregado de medio de cultivo condicionado, y la otra con una incubación previa de las neuronas con 4-aminopiridina y bicuculina (4AP-B). La bicuculina es un inhibidor de los receptores de GABA-A en sinapsis inhibitorias, cuyo bloqueo ha sido ampliamente utilizado para inducir la actividad neuronal por generar trenes de potenciales de acción. El agregado de 4-aminopiridina, un bloqueante de canales de potasio genera que esta inducción sea aún más potente ya que evita la repolarización de las membranas neuronales. Cabe destacar que una porción pequeña dentro de este tipo de cultivos primarios, aproximadamente el 10%, corresponde a neuronas gabaérgicas, mientras el 90% restante corresponden a glutamatérgicas. Esta activación que se genera al agregar 4AP-B simula la actividad neuronal sináptica excitatoria de una manera muy similar a la fisiológica. En la condición sin preincubación, se observó una marcada inducción en la expresión de *c-fos* dependiente de CRH en el hipocampo, pero no en la corteza (Figura 32). Por otro lado, en la condición previamente preincubada con 4AP-B, se observó una expresión mayor de *c-fos* en la condición libre de estímulo, lo que nos indicaría que las neuronas están sinápticamente activas (Figura 32 B y D). Nos sorprendió que al estimular con CRH en las neuronas previamente tratadas con 4AP-B se redujo la expresión del gen

en las neuronas tanto de corteza como de hipocampo. Por lo tanto, CRH tendría un efecto inhibitorio sobre *c-fos* cuando ocurre la sinapsis excitatoria, mientras que, al no inducir un nivel extremo de activación, estimularía la inducción de *c-fos* sólo en el hipocampo, probablemente de una manera intracelular y no por la conexión entre las neuronas vecinas (Figura 32D). Este resultado nos parece sumamente interesante, ya que nos estaría informando acerca de las diferencias entre nuestro sistema y la situación fisiológica, ya que al no preincubar con 4AP-B el comportamiento de las neuronas hipocampales va en línea con lo observado en las HT22-CRHR1 (Figura 30), mientras que en las neuronas que se asemejan a la actividad neuronal excitatoria real, el efecto es contrario.

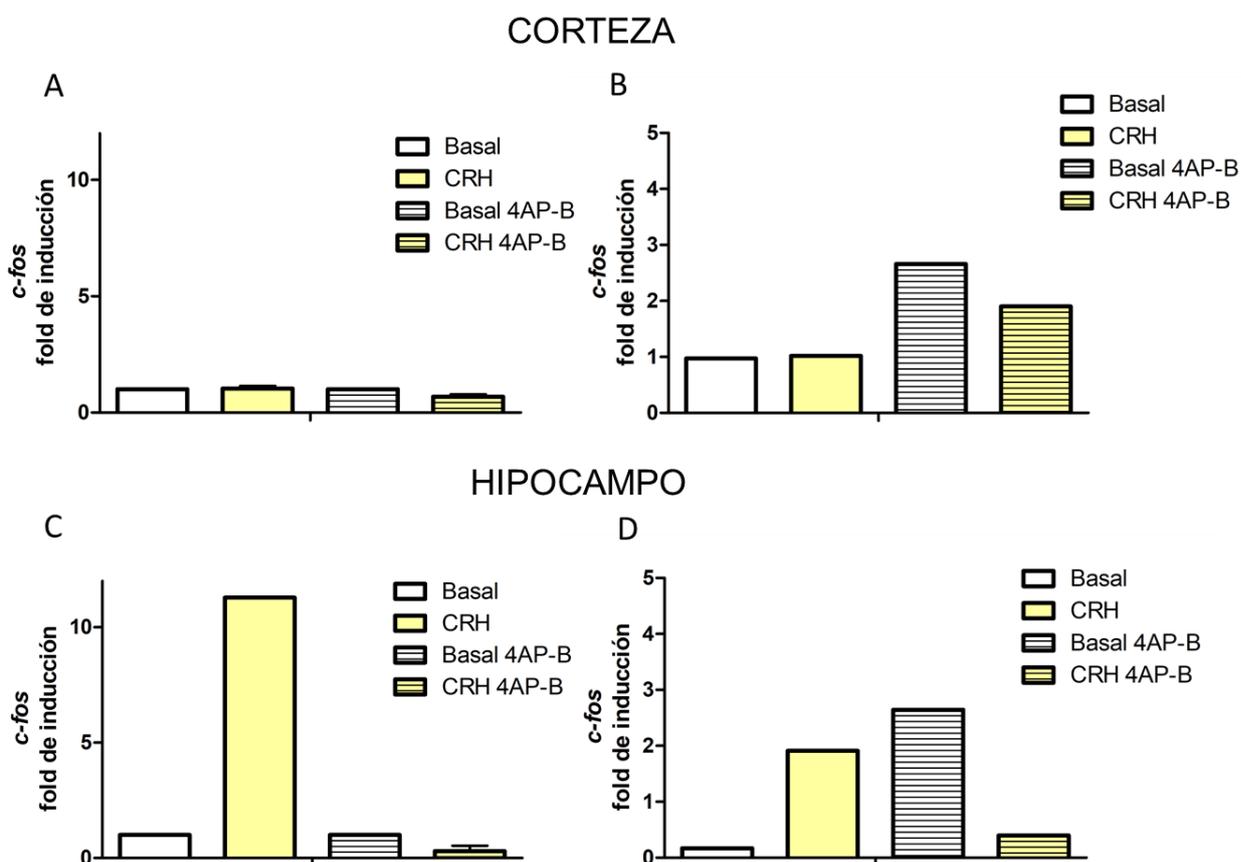


Figura 32: Inducción de la expresión de *c-fos* mediada por los receptores de CRH en cultivo primario de neuronas de embriones de ratón. Los niveles de *c-fos* se midieron mediante RT-q-PCR y fueron normalizados a *Hprt*. En A y B se muestran los resultados para las neuronas de corteza y en C y D para las neuronas hipocampales. A,C corresponden a los niveles de expresión relativizados al basal de cada condición y B,D corresponden a los niveles sin relativizar a sus basales. Las mediciones se

realizaron luego de 1 hora de estimulación con CRH 1  $\mu$ M. En el caso del tratamiento con 4AP-B se colocó 15 minutos antes de la estimulación. Datos: media  $\pm$  EMS, n=2.

### 7.3 La inducción de *c-fos* mediada por los receptores de CRH dependería no sólo de la actividad neuronal sino también del ligando.

Los resultados obtenidos utilizando UCN3 como estímulo, nos indican un comportamiento inverso respecto a las neuronas hipocampales previamente activadas y tratadas con CRH. En las neuronas preincubadas con 4AP-B, se observó una mayor expresión de *c-fos* en comparación con aquellas no tratadas. En ambos casos se estimuló durante 1 hora con UCN3 1  $\mu$ M. En la figura 33 se muestran los resultados de este comportamiento.

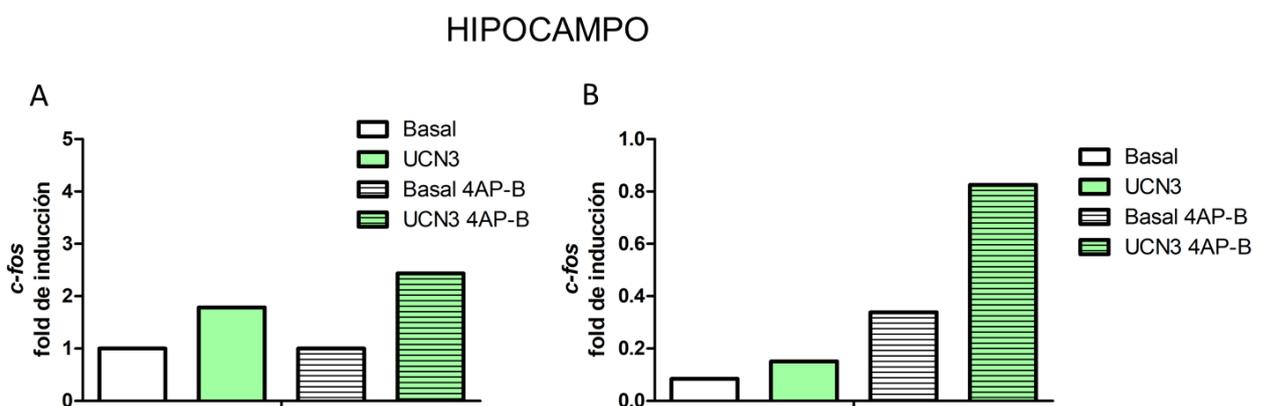


Figura 33: **Inducción de la expresión de *c-fos* estimulada por UCN3 en el hipocampo.** Los niveles de *c-fos* se midieron mediante RT-qPCR y fueron normalizados a *Hprt*. Luego de pretratar 15 minutos con 4AP-B en el caso indicado, se estimuló con UCN3 1  $\mu$ M durante 1 hora. En A se muestran los resultados relativizados a las condiciones basales y en B se muestran sin relativizar.

En las figuras 32 y 33, vemos que las neuronas hipocampales en condiciones basales mostrarían un comportamiento similar frente a la estimulación con CRH o con UCN3, mientras que al estar activadas y por lo tanto representar una situación más fisiológica, el comportamiento parecería ser diferente, teniendo CRH un efecto inhibitorio y la UCN3 promoviendo la inducción de *c-fos*.

## 8 La activación del CRHR2 $\alpha$ induce la diferenciación en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

Hemos investigado previamente, de la mano de la Dra. Carolina Inda, acerca de cambios morfológicos observados en las células HT22-CRHR1, los cuales definimos como el redondeo del soma y la extensión de la longitud de las neuritas. Demostramos que este proceso es inducido por CRH y UCN1 en estas células y que además, depende del AMPc que sólo proviene del pool generado vía sAC (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). En línea con estos resultados, decidimos avanzar sobre los cambios morfológicos y la función del CRHR2 $\alpha$ .

### 8.1 UCN1 y 3 estimulan la diferenciación de la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ mientras que la UCN2 no tiene efecto

Para investigar si existen cambios morfológicos en la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ , utilizamos como estímulo de CRHR2 $\alpha$  las 3 urocortinas. Tanto la UCN1 como la UCN3 indujeron la diferenciación en las células, mientras que la UCN2 no produjo cambio (Figura 34). Este resultado, nos indica que la neuritogénesis depende del ligando que esté activando al CRHR2 $\alpha$ , por lo tanto, este resultado también confirma, que los ligandos podrían activar diferentes vías en nuestro contexto celular.

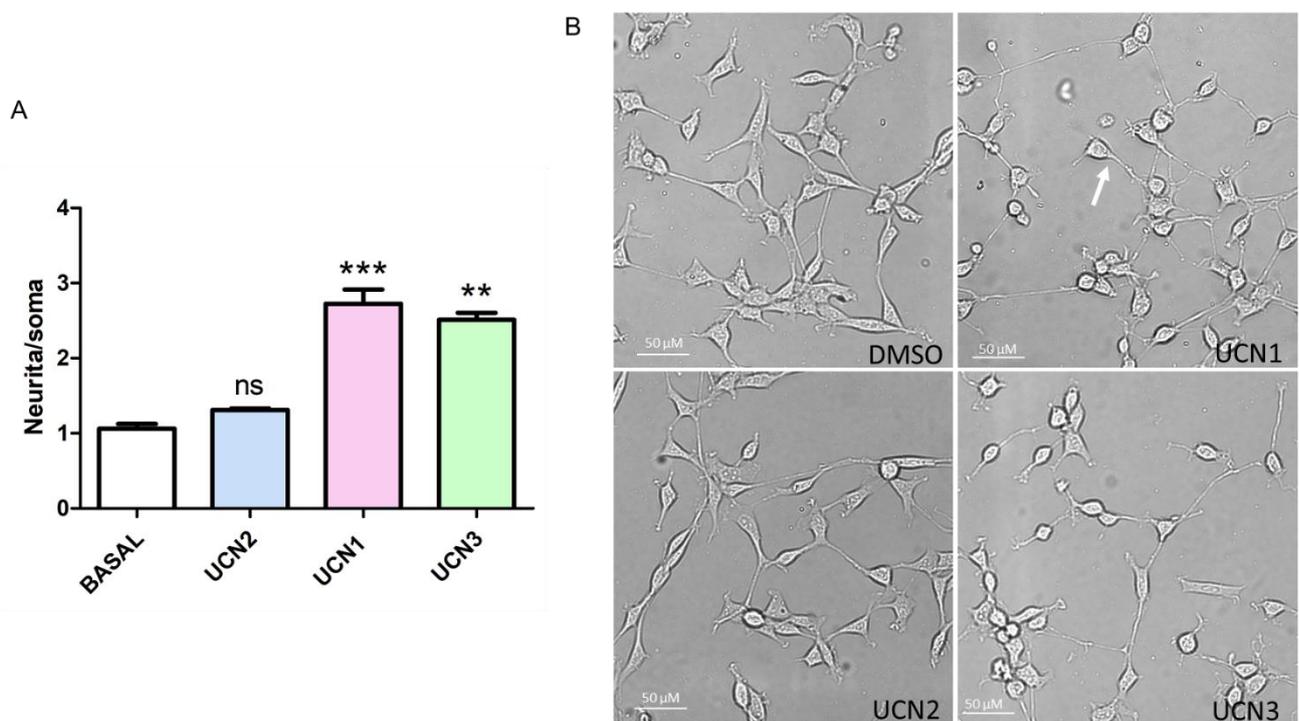


Figura 34: **La activación del CRHR2 $\alpha$  produce cambios morfológicos en las células HT22.** El crecimiento de neuritas en células HT22-CRHR2 fue analizado después de 1 h de estímulo como el cociente entre la neurita más larga y el diámetro del soma en cada célula. Datos: n=3, media  $\pm$  EMS, \*\*\*, p<0,001, \*\*, p<0,01, ns, no significativo, respecto del basal por ANOVA de un factor de medidas repetidas y prueba post hoc de Tukey. A- Cuantificación de la neuritogénesis luego del estímulo con las distintas UCNs o vehículo (DMSO). B- Imágenes representativas de cada condición, la flecha blanca indica una célula donde se observa la elongación de la neurita y el soma redondeado.

## 8.2 Los cambios morfológicos generados por la activación del CRHR2 $\alpha$ dependen del AMPc generado por sAC en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

Una vez corroborada la inducción de cambios morfológicos a través de la estimulación del CRHR2 $\alpha$ , nos preguntamos si estos cambios dependen de AMPc, y si ese AMPc proviene de una o de ambas fuentes generadoras. Para contestar esta pregunta, se preincubaron las células HT22-CRHR2 $\alpha$  con los inhibidores de tmACs (2',5'-ddA) y de sAC (KH7) y luego fueron estimuladas con UCN1 y UCN3 durante 1 hora. Al inhibir el AMPc generado por las tmACs no se observó ningún cambio, mientras que al inhibir sAC se produjo una marcada reducción de la neuritogénesis (Figura 35).

En la figura 35C se muestran imágenes representativas donde se observa claramente cómo los somas de las células se redondean y se extienden las neuritas al utilizar ambos estímulos. La misma morfología se sostiene a pesar de haber preincubado con el inhibidor 2',5'-ddA. En las imágenes control, se muestra como los inhibidores por sí solos no afectan la morfología de las HT22-CRHR2 $\alpha$ . Este resultado deja en evidencia nuevamente, el rol fundamental que tiene el AMPc en los diferentes procesos celulares, pudiendo regular los cambios morfológicos en este contexto mediante la fuente generadora del segundo mensajero. A su vez, el sistema aumenta su complejidad al tener un efecto dependiente del ligando, en este caso, ligado a la neuritogénesis. Se concluye de esta manera, que al igual que para el CRHR1 (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017), la única fuente de AMPc involucrada en la diferenciación de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ , es sAC.

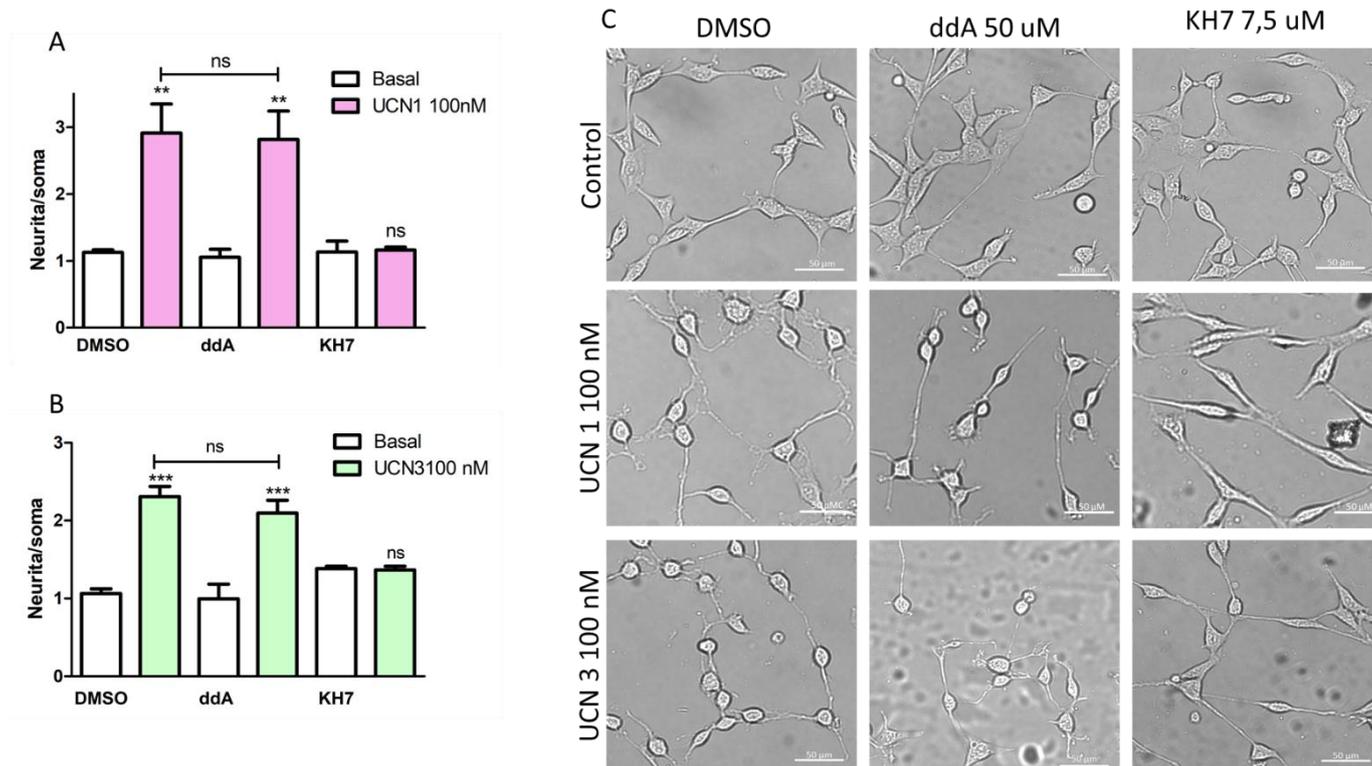


Figura 35: **La diferenciación celular en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  depende del AMPc generado vía sAC.** Las células fueron estimuladas durante 1 h con 100 nM de UCN1 (A) o UCN3 (B), 15 minutos de DMSO como vehículo, 15 minutos de 7.5  $\mu$ M de KH7, inhibidor específico de sAC ó 15 minutos de 100  $\mu$ M de 2',5'-ddA, inhibidor específico de tmACs. A-B Cuantificación de la neuritogénesis bajo el efecto de los inhibidores como se detalla en Materiales y Métodos. C- Imágenes representativas de los cambios morfológicos luego de los tratamientos indicados en la figura. Datos: n=3, media  $\pm$  EMS, \*\*\*,  $p < 0,001$ , \*\*,  $p < 0,01$ , ns, no significativo respecto del basal por ANOVA de un factor de medidas repetidas y prueba post hoc de Tukey.

## 9 Rol de PKA en la señalización y los cambios morfológicos en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

### 9.1 PKA participa en la activación de CREB en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

En base al conocimiento previo acerca de la dependencia de CREB y PKA en otros sistemas, nuestra siguiente pregunta fue acerca del rol de esta quinasa en la fosforilación de CREB en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  estimuladas con UCN 1 y 3. Para realizar este análisis, utilizamos un inhibidor farmacológico para PKA (H-89) y medimos la activación de CREB como en los casos anteriores. Observamos una

disminución en la fosforilación de CREB luego de 30 minutos de estimulación tanto con UCN1 como con UCN3 (Figura 36). Este resultado era el esperado ya que en general CREB suele estar río debajo de la vía AMPc/PKA.

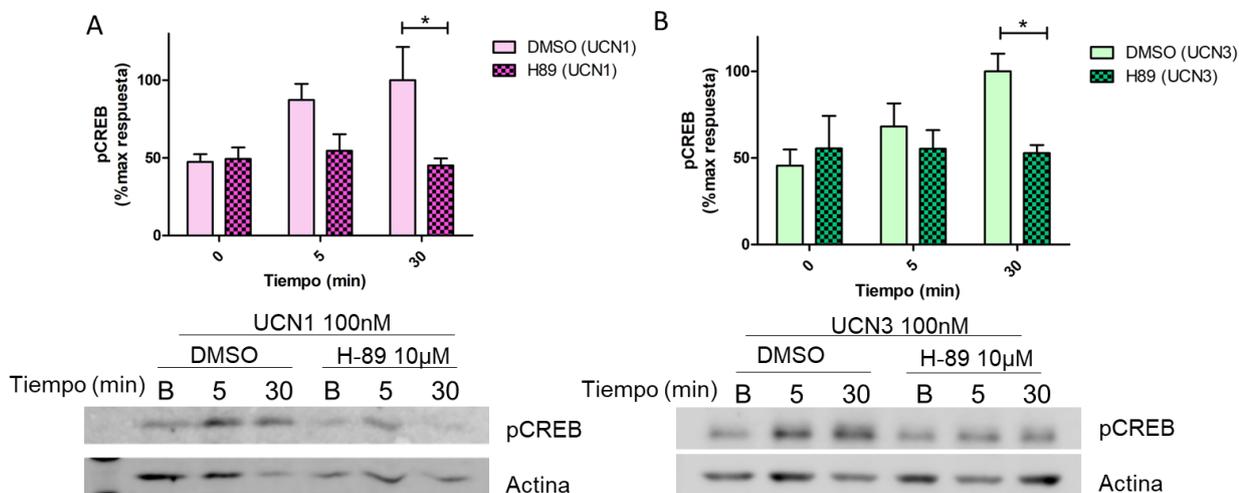


Figura 36: **Efecto de la inhibición de la PKA en la fosforilación de CREB dependiente de UCN1 y UCN3.** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron preincubadas con vehículo DMSO o con el inhibidor H-89 en la concentración indicada (10  $\mu$ M) durante 15 minutos antes del estímulo con UCN1 (A) o UCN3 (B) 100 nM. Los niveles de pCREB y  $\beta$ -actina se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados. En la parte inferior de ambas figuras se agregó una imagen representativa del experimento. La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el *software ImageJ*, los resultados de la misma se encuentran graficados en la parte superior de las figuras. Datos: n=3, media  $\pm$  EMS; \*, p < 0.05. El análisis estadístico se realizó utilizando el *software GraphPad* (ANOVA de dos vías corregido por la prueba post hoc de Bonferroni).

Con relación al resultado anterior y a los mostrados en el punto 6.1, decidimos analizar si efectivamente el *c-fos* inducido por la UCN1 y la UCN3 era dependiente de PKA. En la figura 37 se muestran los resultados obtenidos al pretratar las células con el inhibidor de PKA H-89. Como se puede observar, la inhibición de la actividad de PKA, lleva a la inducción de *c-fos* a niveles basales, evidenciando la relación entre PKA y CREB en este sistema.

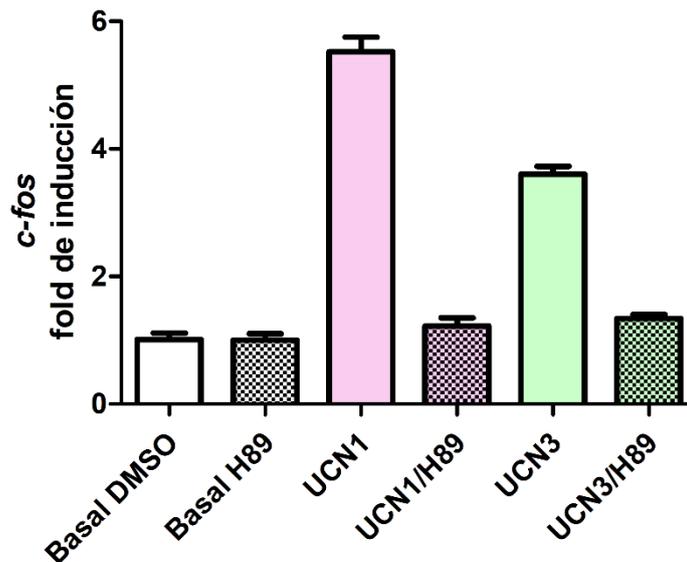


Figura 37: **Efecto de la inhibición de la PKA en la inducción de c-fos mediada por UCN1 y UCN3 en células HT22 CRHR2 $\alpha$ .** Los niveles de *c-fos* se midieron mediante RT-q-PCR y fueron normalizados a *Hprt* luego de preincubar 15 minutos con el inhibidor H-89 o con el vehículo DMSO y de 1 hora de estimulación con los ligandos indicados.

### 9.2 La inhibición de PKA reduce la neuritogénesis en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

Decidimos continuar nuestro estudio de la participación de PKA en nuestro sistema, pero en este caso sobre la diferenciación celular que, como ya vimos con anterioridad, es gatillada por la activación del CRHR2 $\alpha$ . Para ensayar esto, realizamos el mismo experimento de neuritogénesis previamente descrito, utilizando a las UCNs 1 y 3 como estímulos y H89 como inhibidor de la PKA en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Los resultados que se plasman en la figura 38, demuestran que el inhibir la acción de PKA se generó un bloqueo en la diferenciación celular independientemente de la urocortina que se usó como estímulo.

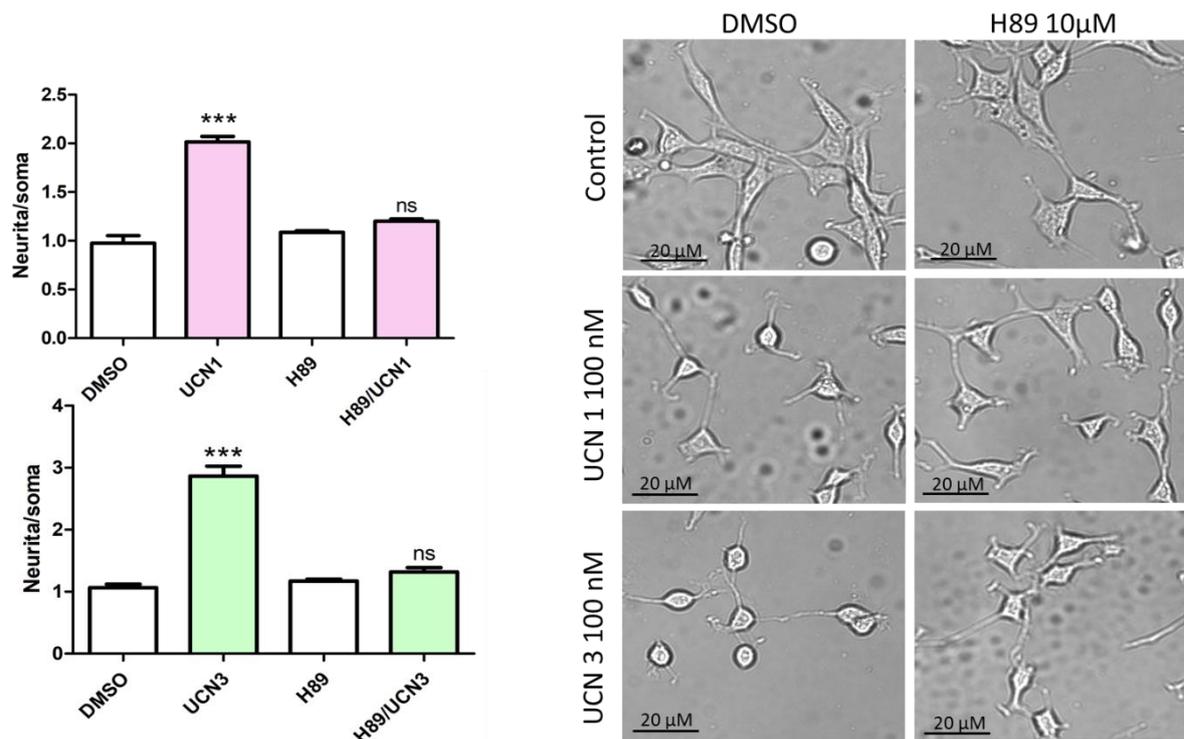


Figura 38: **Efecto de la inhibición de la PKA en la neuritogenesis inducida por la estimulación del CRHR2 $\alpha$ .** Las células fueron estimuladas durante 1 h con 100 nM de UCN1 (A) o UCN3 (B), 15 minutos de DMSO como vehículo, 15 minutos de 10  $\mu$ M de H-89, inhibidor específico de PKA. A-B Cuantificación de la neuritogenesis bajo el efecto del inhibidor. C- Imágenes representativas de los cambios morfológicos luego de los tratamientos indicados en la figura. Datos: n=3, media  $\pm$  EMS, \*\*\*,  $p < 0,001$ , ns, no significativo respecto del basal por ANOVA de un factor de medidas repetidas y prueba post hoc de Tukey.

## 10 Localización del CRHR2 $\alpha$ en la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$

Una de las preguntas que nos hemos realizado durante esta Tesis Doctoral es acerca de la localización celular del CRHR2 $\alpha$  una vez activado. Este es un punto de debate entre los investigadores que estudian los receptores de CRH, por este motivo decidimos investigar si el receptor CRHR2 $\alpha$  en nuestro sistema, cumple con lo que sugieren otros grupos acerca de su localización dentro de la célula, esto es mayor cantidad de receptor en el interior celular que en la membrana plasmática en condiciones basales (Tu *et al.*, 2007, Waselus *et al.*, 2010).

### 10.1 La cantidad de receptor aumenta en la membrana plasmática de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ luego de 6 minutos de estimulación

Para responder esta pregunta realizamos una inmunomarcación del FLAG *tag* que contiene el CRHR2 $\alpha$  expresado en la línea HT22-CRHR2 $\alpha$  previamente fijadas, los resultados se observan en la figura 39. Se observó que, en condiciones basales, el receptor se detectó tanto en el interior de la célula como en membrana plasmática, aunque en ésta con menor señal. Luego de estimular las células HT22-CRHR2 $\alpha$  6 minutos con UCN1 100nM, nos sorprendió observar que la cantidad de receptor en membrana aumentó y luego de 30 minutos de estímulo volvió a las condiciones basales. Previamente se describió que en neuronas del núcleo dorsal del rafe luego de someter a los animales a un estrés agudo, la localización del CRHR2 se encontraba aumentada en la membrana plasmática respecto del interior celular luego de 24 horas del estímulo (Waselus *et al.*, 2010).

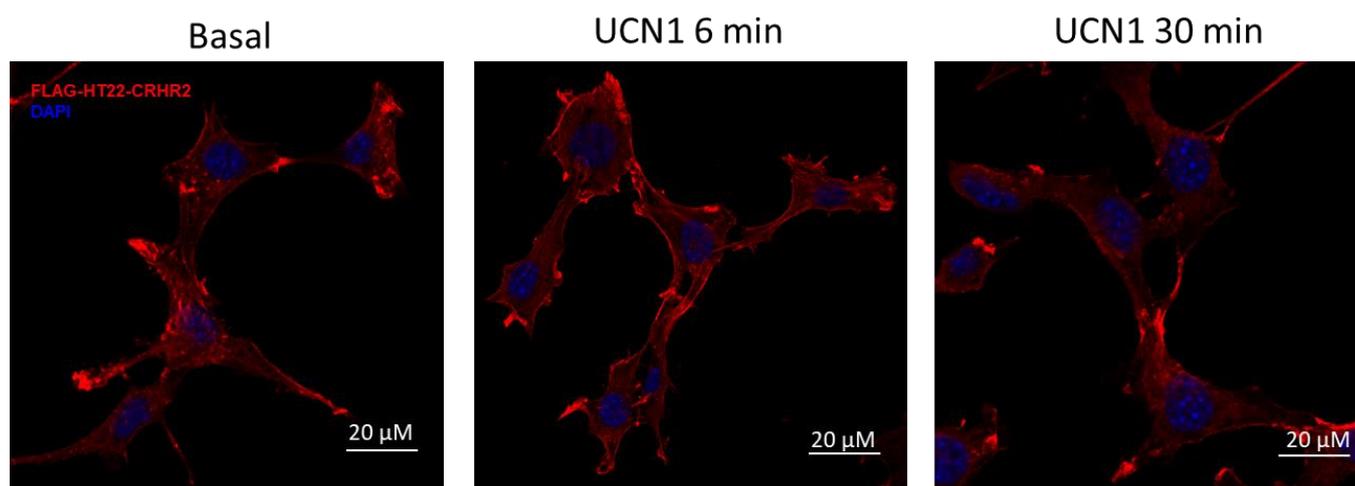


Figura 39: **Detección del CRHR2a por inmunofluorescencia.** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron estimuladas con 100 nM de UCN1 a los tiempos indicados. Se realizó una inmunomarcación indirecta con anticuerpo primario anti-FLAG (1:250, ratón) y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 644 (anti-ratón). Las imágenes fueron obtenidas mediante el uso de microscopía confocal.

Teniendo en cuenta que este tipo de tránsito es poco común para un GPCR, decidimos profundizar acerca de la información que nos brindan las inmumocitoquímicas. Para esto, se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo de una transecta que atraviesa la célula, de esta manera se

puede realizar un gráfico que representa lo que se observa en las imágenes obtenidas. El resultado de esta cuantificación se observa en la figura 40.

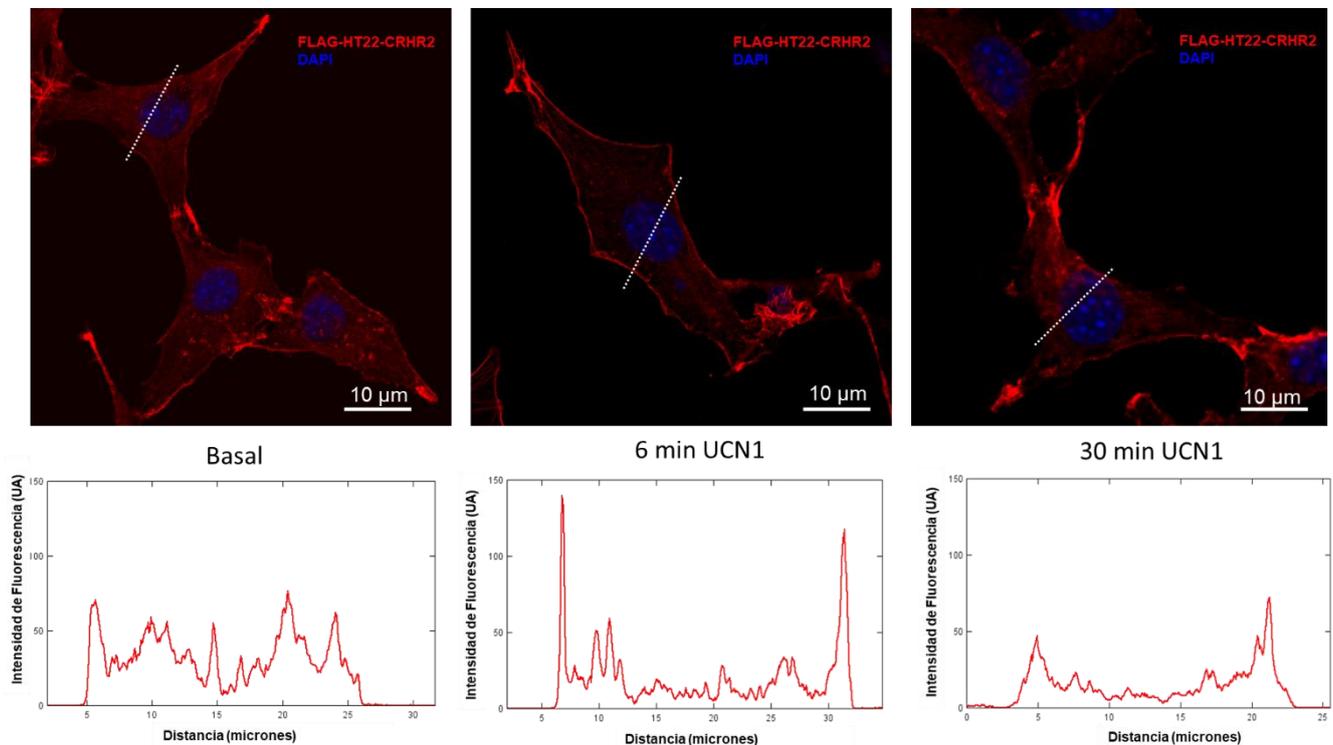


Figura 40: **Localización del CRHR2 $\alpha$  en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  por cuantificación de fluorescencia.** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron estimuladas con 100 nM de UCN1 a los tiempos indicados. Se realizó una inmunomarcación indirecta con anticuerpo primario anti-FLAG (1:250, ratón) y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 644 (anti-ratón). Usando el programa FIJI de ImageJ, se cuantificó la fluorescencia a lo largo de las líneas blancas punteadas que se observan en la figura. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal.

Luego de obtener este resultado cualitativo y cuantitativo respecto al tránsito del receptor por inmunocitoquímica, decidimos corroborarlo con otro tipo de experimento que nos permitiera cuantificar una mayor cantidad de células y nos brindara información poblacional. Para esto realizamos una citometría de flujo fluorescente detectando al receptor por inmunomarcación indirecta como se comentó en la figura 38, pero esta técnica nos permite medirlo célula por célula y con la célula viva. La citometría de flujo nos arrojó un resultado que concuerda con al observado en las inmunofluorescencias, donde a 6 minutos del estímulo con UCN1 la cantidad de

receptor aumentó en la superficie de las células ( $p < 0,05$ ) y luego se redujo a niveles basales (Figura 41).

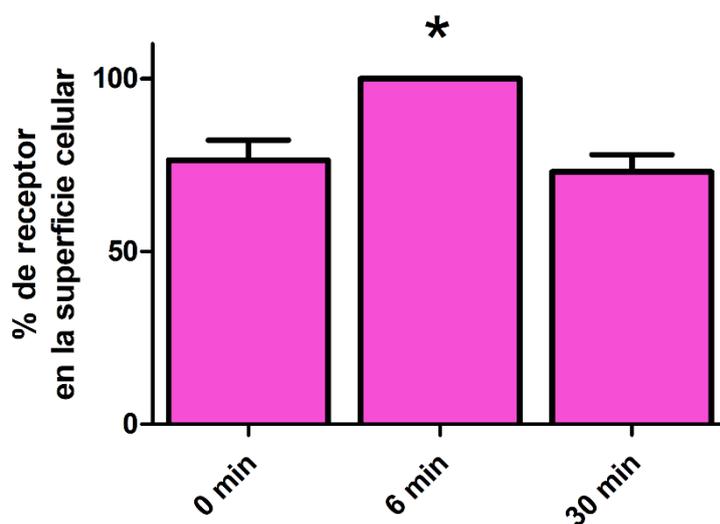


Figura 41: **La cantidad de receptor luego de 6 minutos de ser estimulado aumenta significativamente en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** Las células HT22-CRHR2 $\alpha$  fueron estimuladas con 100 nM de UCN1 a los tiempos indicados. Se levantaron las células utilizando EDTA en PBS y se realizó una inmunomarcación indirecta con anticuerpo primario anti-FLAG (1:250, ratón) y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 644 (anti-ratón). Las células se pasaron un citómetro de flujo, se seleccionó la población de células vivas y se cuantificó la cantidad de fluorescencia a cada tiempo. La fluorescencia medida a 6 minutos fue definida como el 100%. Datos:  $n=3$ , media  $\pm$  EMS, 10.000 células por condición \*,  $p < 0,05$  con respecto a 6 minutos, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey.

## 10.2 El péptido señal no clivable dirige el tránsito del CRHR2 $\alpha$ en el contexto celular de las células HT22

Como se describió a lo largo de esta Tesis, el péptido señal del CRHR2 $\alpha$  es clave para el tránsito de este, por este motivo quisimos examinar si el comportamiento no convencional observado se alteraba al tener un péptido señal clivable. Para realizar este experimento utilizamos una construcción del CRHR2 $\alpha$  de ratón la cual cuenta con el péptido señal del virus de influenza el cual es clivable. Seguido en la construcción se tiene un FLAG tag para poder detectarlo (PS-FLAG-CRHR2 $\alpha$ ). En la figura 42, se muestra el resultado luego de la inmunofluorescencia y la cuantificación de fluorescencia de la transecta como en el caso anterior, realizada en las células

HT22 transfectadas transitoriamente con el plásmido PS-FLAG-CRHR2 $\alpha$ . En la condición basal encontramos mayor cantidad de receptor en la membrana en comparación con las situaciones estimuladas. En este caso a 30 minutos, se observó una acumulación mayor puntillada dentro de la célula, lo que podría estar indicando la presencia del receptor en compartimientos endocíticos. Este comportamiento es el mismo que hemos observado previamente para el CRHR1 en las células HT22-CRHR1, el cual tiene un péptido clivable convencional (Inda *et al.*, 2016). Esto nos habilita a pensar que en condiciones fisiológicas estos receptores tienen un tránsito anterógrado a tiempos cortos, internalizando rápidamente en el caso del CRHR1, y aumentando la cantidad en membrana plasmática para el CRHR2 $\alpha$ . A tiempos largos, ambos receptores serían internalizados.

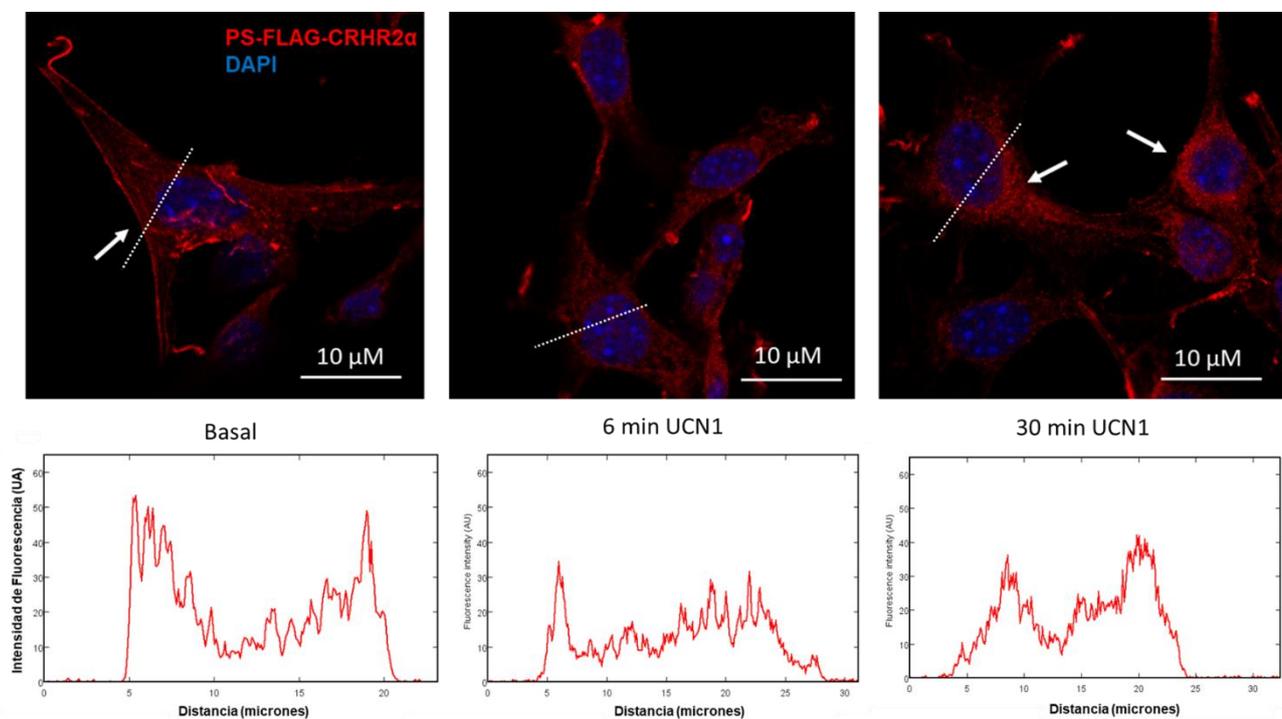


Figura 42: **El pseudopéptido señal determina el tránsito intracelular del CRHR2 $\alpha$  en el contexto de las HT22.** Las células HT22 fueron transfectadas transitoriamente con las construcción del PS-FLAG-CRHR2 $\alpha$  estimuladas con 100 nM de UCN1 a los tiempos indicados. Se realizó una inmunomarcación indirecta con anticuerpo primario anti-FLAG (1:250, ratón) y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 644 (anti-ratón). Usando el programa FIJI de ImageJ, se cuantificó la fluorescencia a lo largo de las líneas blancas punteadas que se observan en la figura. Las imágenes fueron obtenidas mediante el uso de microscopía confocal.

### 10.3 El CRHR2 $\alpha$ en las células HT22 se encuentra en el retículo endoplasmático en condiciones basales

Nos propusimos continuar nuestro estudio para determinar el compartimiento en el que se acumula el CRHR2 $\alpha$  intracelular. Para responder a esta inquietud utilizamos dos plásmidos que transfectamos de manera transitoria en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Estos plásmidos cuentan con proteínas que se expresan exclusivamente en el ER (pECFP-ER) o en el aparato de Golgi (pECFP-Golgi) y que se encuentran fusionadas a una proteína fluorescente. Luego de realizar sobre estas células la inmunomarcación para el CRHR2 $\alpha$  como se comentó previamente, observamos por colocalización de señales que el receptor se encuentra en el ER y no en el aparato de Golgi en condiciones basales (Figura 43). Este resultado nos es sumamente útil para planificar futuros experimentos y continuar el estudio del tránsito intracelular de este GPCR.

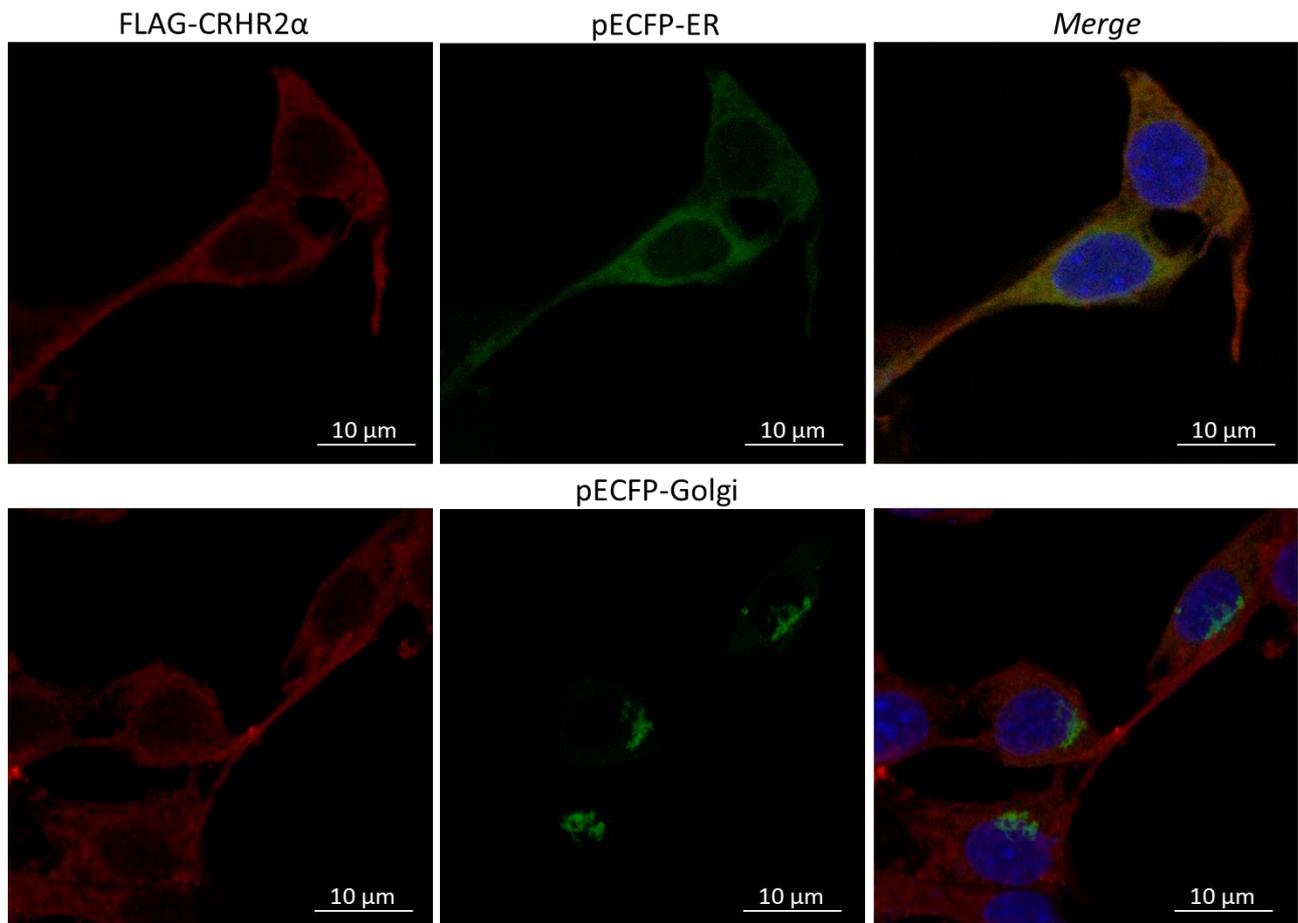


Figura 43: **Inmunodetección del CRHR2a intracelular.** Las células HT22 fueron transfectadas transitoriamente con los vectores ECFP-ER y ECFP-Golgi, los cuales expresan proteínas de cada estructura acopladas a una proteína fluorescente. Se realizó una inmunomarcación indirecta con anticuerpo primario anti-FLAG (1:250, ratón) y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 644 (anti-ratón) en condiciones basales. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal.

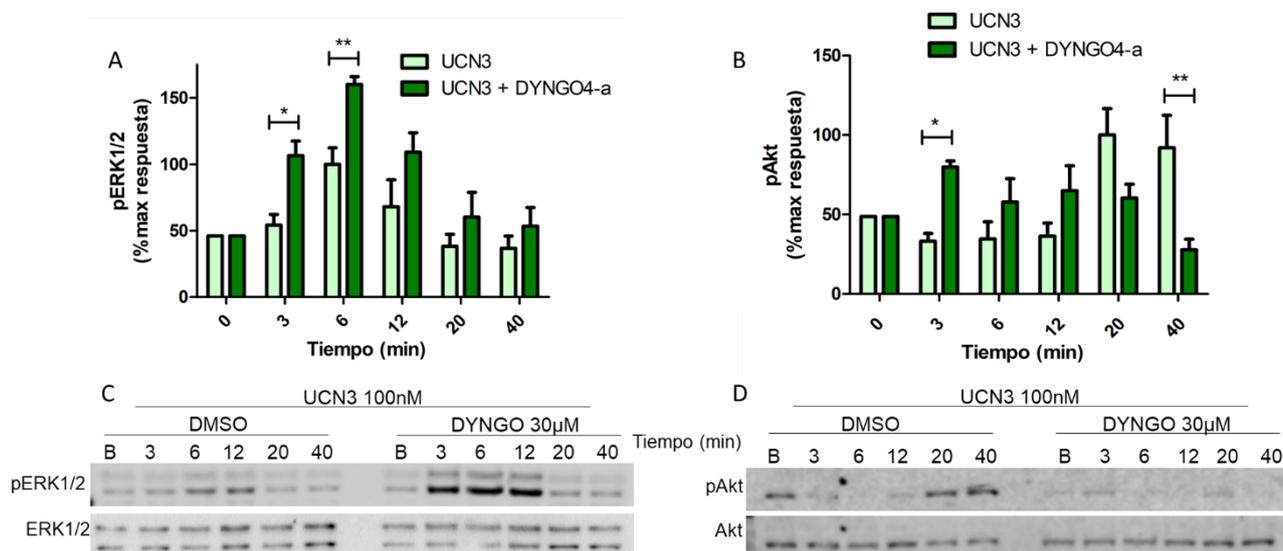
#### 10.4 Efecto de la endocitosis en la señalización del CRHR2 $\alpha$ disparada por la UCN3

Antecedentes de nuestro laboratorio han demostrado que la endocitosis del CRHR1 como de otros GPCRs, se encuentra mediada por clatrina y a su vez, las cascadas de señalización de este proceso están reguladas por las  $\beta$ -arrestinas, particularmente por la  $\beta$ -arrestina2 (Bonfiglio *et al.*, 2013). En línea con esto, nos preguntamos qué sucede con la endocitosis y la posible señalización desde endosomas en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  teniendo en cuenta el tránsito diferencial que posee respecto al CRHR1 en el mismo contexto celular y que éste puede señalizar desde endosomas luego de internalizar (Inda *et al.*, 2016).

##### 10.4.1 El bloqueo de la endocitosis y del reciclado en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ genera efectos opuestos en la activación de los efectores ERK1/2 y Akt.

Para comenzar el estudio, utilizamos dos inhibidores farmacológicos que participan en diferentes vías de la endocitosis o el tránsito intracelular. Uno de ellos es el DYNGO4-a el cual bloquea la endocitosis mediada por clatrina. El segundo es el fármaco Brefeldina A, el cual inhibe el transporte de proteínas del ER hacia el aparato de Golgi. Luego de preincubar las células 15 minutos con DYNGO4-a y 1 hora con Brefeldina A, analizamos la fosforilación de ERK1/2 y de Akt. Los resultados se encuentran en la figura 44 (Para DYNGO4-a) y 45 (Para Brefeldina A). En el caso del DYNGO4-a, se observó un aumento en la fosforilación de ERK1/2 a tiempos cortos luego de la estimulación (3 minutos  $p < 0,05$  y 6 minutos  $p < 0,01$ ). En el resto de los tiempos experimentales también se observó una tendencia al aumento, pero no significativa (Figura 44A). Este resultado podría sugerir que, al inhibir la internalización del receptor, la cantidad que se encuentra en la membrana plasmática en condiciones basales se sostiene, pero además aumentaría debido al incremento del receptor en la superficie celular luego de 6 minutos de estimulación (Figura 41) y continuaría señalizando desde la membrana sin poder internalizar. Contrariamente para la fosforilación de Akt, se produjo una reducción, siendo ésta significativa luego de 40

minutos de estimulación ( $p < 0,01$ ). Este resultado concuerda con las observaciones de otros investigadores acerca de la activación de Akt dependiente de la endocitosis del receptor (English, et al 2018, May *et al.* 2010) (Figura 44B).



**Figura 44: El bloqueo de la endocitosis en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  genera efectos diferentes en la activación de los efectores ERK1/2 y Akt.** Las células HT22-CRHR2 fueron preincubadas con vehículo o con 30  $\mu$ M de DYNGO4-a durante 15 minutos antes del estímulo con UCN3 100 nM. Los niveles de pERK (C), pAkt (D) y sus respectivos totales se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados. La cuantificación para ambos efectores (A, B) se realizó por densitometría utilizando el software ImageJ. Datos:  $n=3$ , media  $\pm$  EMS, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad (ANOVA de dos vías corregido por la prueba post hoc de Bonferroni).

Para el caso de la fosforilación de ERK1/2 con el tratamiento con Brefeldina A, no hubo diferencias significativas respecto al control con etanol, sin embargo, la tendencia es la misma que con DYNGO4-a (figura 45A). Finalmente, para la fosforilación de Akt se observó el mismo comportamiento que al utilizar DYNGO4-a a tiempos largos, una reducción de la activación ( $p < 0,01$ ) (Figura 45B). Existen antecedentes en otros sistemas celulares que han demostrado que al utilizar Dynasore, un análogo del DYNGO4-a y Brefeldina A, se obtienen los mismos resultados a pesar de estar inhibiendo el tránsito de los receptores a diferentes niveles, por lo que algunos autores concluyen que en algunas situaciones la Brefeldina A también inhibiría la endocitosis del receptor (Godbole *et al.*, 2017; Min *et al.*, 2014)

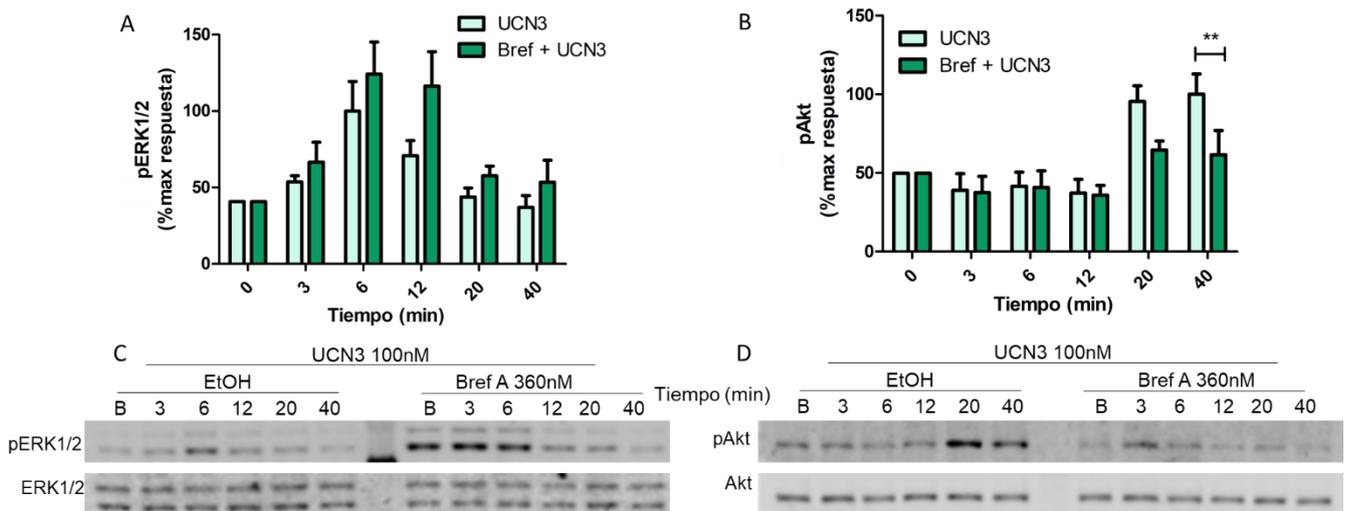


Figura 45: **Bloqueo del transporte entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  en la activación de los efectores ERK1/2 y Akt.** Las células HT22-CRHR2 fueron preincubadas con vehículo o con 360 nM de Brefeldina A (Bref) durante 1 hora antes del estímulo con UCN3 100 nM. Los niveles de pERK (C), pAkt (D) y sus respectivos totales se determinaron por *Western Blot* en los tiempos indicados. La cuantificación para ambos efectores (A, B) se realizó por densitometría utilizando el software ImageJ. Datos: media  $\pm$  EMS, n=3; \*\*, p < 0.01. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad (ANOVA de dos vías corregido por la prueba post hoc de Bonferroni).

# CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

## Conclusiones

Los principales hallazgos de esta Tesis se enumeran a continuación:

- La activación de ERK1/2 en el contexto de la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$  utilizando los 4 ligandos del sistema CRH, tiene un pico máximo rápido a 6 minutos y la activación se mantiene en niveles bajos por al menos 40 minutos.
- La activación de ERK1/2 en el contexto celular de las células MIN6, tiene un perfil similar al descrito para las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .
- Las EC<sub>50</sub> para el CRHR1 y el CRHR2 $\alpha$  en el entorno de las HT22, se asemeja a lo reportado previamente en membranas de otros contextos celulares, por lo tanto, lo convierte en un buen sistema de estudio.
- Las tres urocortinas aumentan los niveles de AMPc, activan la PKA y fosforilan CREB en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .
- CRH y las UCNs no aumentan los niveles de AMPc, pero si fosforilan CREB en las células MIN6.
- La respuesta de AMPc mediada por la UCN3 dependería del AMPc generado por tmACs así como también de la fuente no convencional sAC.
- En las células HT22-CRHR2 $\alpha$  la existencia de dos fuentes de AMPc se evidencia en la activación de ERK1/2 y CREB, mientras que sólo sAC parece intervenir en la fosforilación de Akt.
- La inducción de *c-fos* es dependiente de ligando, PKA/CREB y estructura (hipocampo o corteza) en el sistema CRH.
- Frente a una inducción de la actividad neuronal en neuronas hipocampales, CRH tendría un efecto inhibitorio sobre la inducción de *c-fos* mientras que la UCN3 aumentaría la transcripción de ese gen.
- La activación de CRHR2 $\alpha$ , ya sea mediada por la UCN1 o 3, promueve la diferenciación de la línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ , favoreciendo la elongación de las neuritas. Este proceso depende sólo del AMPc generado por sAC y de PKA/CREB.
- En las células HT22-CRHR2 $\alpha$  luego de estimular con UCN1 se produce un rápido aumento de receptor en la membrana plasmática y a tiempos más largos una disminución por endocitosis.

- El tránsito del receptor CRHR2 $\alpha$  en el contexto de las HT22 es dirigido por el pseudo péptido señal.
- El bloqueo de la endocitosis, así como también el bloqueo del transporte del retículo endoplasmático al Golgi en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  genera un aumento en la activación de ERK1/2 y una disminución en la activación tardía de Akt.

## Discusión

Durante los años de trabajo de la Doctora Carolina Inda en nuestro laboratorio, pudimos demostrar que el CRHR1 en la línea celular hipocampal de ratón HT22 utiliza tanto las tmACs como una fuente no convencional de AMPc, la adenilil ciclase soluble sAC. Profundizando en la señalización temporal y espacial de este segundo mensajero, se demostró que ambas fuentes participan en la señalización sostenida de AMPc y de los mediadores ERK1/2 y CREB. CRHR1 continúa señalizando desde compartimientos endocíticos, generando AMPc a través de la sAC. Por otro lado, se demostró la participación de sAC en la elongación de neuritas en las células HT22. Teniendo en cuenta esta información respecto al CRHR1, decidimos investigar los mecanismos que utiliza el CRHR2 $\alpha$  en el mismo contexto celular.

### Caracterización de las células HT22-CRHR2 $\alpha$ y puesta a punto del sistema en las células HT22

Comenzamos este trabajo generando clones estables en la línea HT22 expresando el CRHR2 $\alpha$ . De esta manera obtuvimos dos líneas celulares que expresan independientemente a los receptores de CRH las cuales nos permiten comparar la actividad de éstos en el mismo contexto celular. Por otro lado, esta línea celular que corresponde a un contexto hipocampal, no expresa niveles detectables de CRHR1 ni de CRHR2 (Figura 8). Teniendo el antecedente de la activación de ERK1/2 mediante el CRHR1 en las células HT22 sobre-expresando el receptor (HT22-CRHR1) y conociendo que el CRHR2 $\alpha$  es capaz de activar la vía de PKA (P. G. Slater, Yarur, & Gysling 2016; Markovic *et al.* 2008), exploramos la funcionalidad de los clones generados midiendo la activación de ERK1/2 como muestra la figura 10. Medimos los niveles de expresión de receptores por RT-qPCR (Figura 11). Cabe aclarar que a lo largo de este trabajo se obtuvieron resultados similares al analizar diferentes clones.

Continuamos nuestro trabajo calculando los EC50 por medio de curvas de concentración-respuesta de los ligandos con ambos receptores de CRH en las células HT22-CRHR1 y HT22-CRHR2 $\alpha$ . Utilizando las líneas celulares anteriormente mencionadas y midiendo la activación de ERK1/2 en su pico máximo de 6 minutos, calculamos las EC50 correspondientes. Los resultados que obtuvimos nos indican que CRH activa con mayor afinidad al CRHR1, mientras que la UCN1 activa a ambos receptores con una afinidad similar. En el caso de la UCN2 y la UCN3 presentaron

alta afinidad para el CRHR2 $\alpha$ , y particularmente la UCN3 en altas concentraciones podría activar al CRHR1. Estos resultados van en línea con la bibliografía lo cual nos indica que nuestros sistemas están funcionando correctamente y se asemejan al comportamiento descrito de los receptores y sus ligandos (Grammatopoulos & Chrousos, 2002, Hauger *et al.* 2006, Gutknecht *et al.* 2008).

Decidimos que la concentración de uso en la mayor parte de los experimentos sería de 100 nM, de esta manera nos aseguramos la activación de los receptores y por otro lado usaríamos una concentración promedio dentro de nuestros resultados de EC50 y de las concentraciones que se suelen usar en bibliografía que oscilan entre 100 nM y 1  $\mu$ M dependiendo el experimento. Una vez puesto a punto nuestro sistema, continuamos con el análisis de la activación de los efectores.

#### Los perfiles de activación de ERK1/2, Akt y CREB no dependen de los ligandos que activan el CRHR2 $\alpha$

Dado que la bibliografía no cuenta con suficiente información acerca de distintos efectos de los ligandos del sistema CRH mediados por el CRHR2 $\alpha$  decidimos estudiar los efectores que se han descrito río debajo de la activación del CRHR1 para poder compararlos en el mismo contexto celular. Por otro lado, CRH y las UCNs tienen un patrón de expresión diferente que se solapa sólo en algunas estructuras (Figura 3), lo que sugiere que probablemente activen diferentes circuitos del cerebro usando a los receptores como mediadores de las respuestas (Henckens *et al.*, 2016). Es por este motivo que nos resulta extremadamente importante estudiar todos los ligandos para identificar posibles diferencias entre ellos que nos permitan comprender mejor cómo funcionan estas redes de comunicación en el cerebro. Por otro lado, esta información abre las puertas para comprender los mecanismos por los que actúa, por ejemplo, la UCN1 que activa a los dos receptores con la misma afinidad, por lo tanto, se propone la existencia de una delicada regulación en este sistema que aún no se conoce.

En este trabajo, describimos la activación de los efectores ERK1/2, Akt y CREB río debajo del CRHR2 $\alpha$  utilizando las 3 UCNs y CRH como agonistas. Antecedentes previos de nuestro laboratorio han demostrado la activación de ERK1/2 y de CREB en el sistema HT22-CRHR1 (Bonfiglio *et al.* 2013; Inda, Bonfiglio, *et al.* 2017). Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral, fue comparar las respuestas entre receptores. Comenzamos describiendo el perfil de activación de ERK1/2 en las

células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Elegimos este efector ya que contamos con una profunda descripción de la activación de la misma quinasa en el contexto de las HT22-CRHR1 mediado por CRH (Bonfiglio *et al.* 2013). Demostramos que en línea HT22-CRHR2 $\alpha$ , ERK1/2 se activa rápidamente con un pico a los 6 minutos de estimulación y luego se produce una disminución de la misma con una pendiente menos pronunciada de la que se ha descrito para el CRHR1, utilizando CRH o cualquiera de las de UCNs. Por otro lado, no se observa claramente una segunda fase de la activación de ERK1/2 como en el caso del CRHR1, sino que para el CRHR2 $\alpha$  observamos que la fosforilación de ERK1/2 no desciende a niveles basales al menos hasta los 40 minutos luego del estímulo, lo que podría definirse como una activación sostenida de ERK1/2 pero con una diferencia respecto al CRHR1 donde la activación baja a niveles basales para subir luego y mantenerse activa al menos por 40 minutos (Figuras 13-14). En el caso del CRHR1 esta segunda fase de activación depende de la internalización del receptor y de la  $\beta$ -arrestina2 (Bonfiglio *et al.* 2013). Al no tener información concluyente acerca de la internalización del CRHR2 $\alpha$  no podemos definir a que se debe esta diferencia, pero sí podemos sugerir que existen diferencias en el tránsito de los receptores, como se discutirá más adelante y que esto puede estar relacionado con la diferencia en los perfiles de activación de ERK1/2.

Por otro lado, se conoce que Akt regula una gran cantidad de procesos celulares como la proliferación, metabolismo y apoptosis entre otros (Testa & Tsichlis 2005; Sugiyama, Fairn, & Antonescu 2019). Se la ha relacionado con la regeneración y la protección sobre la apoptosis neuronal en ratas que han sufrido un infarto cerebral inducido. A su vez, se le ha otorgado a CRH un rol crítico en la diferenciación en células de tipo *stem* neurales en el hipocampo adulto y se lo ha relacionado con la activación de Akt (Koutmani *et al.*, 2019). En este trabajo hemos demostrado que Akt se activa mediante el CRHR2 $\alpha$  utilizando diferentes estímulos a tiempos largos. Destacamos además que los niveles de pAkt en condiciones basales son altos tanto en las células HT22-CRHR2 $\alpha$  como en las MIN6 (Figuras 20-21). Se ha demostrado con el receptor de histamina (H2R), que los niveles altos de Akt en condiciones basales están relacionados con los bajos niveles de ERK1/2 activado en las mismas condiciones. Se propuso que la vía PI3K/Akt/mTor regula la vía Ras/MEK/ERK1/2 y que este *crossstalk* condiciona la capacidad proliferativa de las células (Alonso *et al.*, 2016). Se ha propuesto también, que la vía de Akt puede regular río arriba otras MAPK

como p38 en procesos inflamatorios (Mercau *et al.*, 2014). En línea con estos trabajos y con lo que hemos reportado respecto a pAkt en nuestro sistema, nos preguntamos si existirá un *crosstalk* entre ERK1/2 y Akt ya que cuando uno se fosforila el otro está inactivo, o activo en bajos niveles y esta diferencia se sostiene a diferentes tiempos. Este es un proceso que estamos en vías de responder.

Para el caso de la activación de CREB observamos perfiles similares de activación respecto a ambos receptores en el contexto celular de las HT22. Sin embargo, al estimular los receptores en las células MIN6 la activación es rápida y luego decrece y en el caso de las células HT22 para ambos receptores, esta activación aumenta con el tiempo (Figura 21-22). Este resultado soporta nuestra hipótesis acerca de la importancia de estudiar el sistema CRH en un contexto celular particular. CREB puede ser regulado por la vía convencional, mediante AMPc y PKA la cual proponemos como vía canónica en el caso de los receptores de CRH en el contexto celular hipocámpal, y también puede ser regulado por otras vías como GMPc y PKG así como también por CAMK IV teniendo esta última, además, un rol inhibitorio. Por lo tanto no es sorprendente encontrar diferencias en las activaciones dependiendo del contexto celular (H. Wang *et al.*, 2018). Profundizaremos acerca del rol de CREB en la señalización dirigida por CRHR2 $\alpha$ /UCNs a lo largo de esta discusión.

#### La generación de AMPc mediante el CRHR2 $\alpha$ depende del contexto celular

Los resultados hasta ahora discutidos, sugieren que el AMPc estaría involucrado en la activación de efectores como ERK1/2 y CREB en nuestro sistema celular ya que suele ser la vía canónica de activación de los mismos en células neuronales y endócrinas (Emery *et al.*, 2014; Vaudry *et al.*, 2002). Además teniendo en cuenta que el CRHR2 $\alpha$  es un GPCR acoplado a Gs, la participación del AMPc se encuentra altamente relacionada con efectores río abajo de su activación (Inda, Armando, *et al.*, 2017). En línea con esto, investigamos no solo la participación del AMPc en nuestro sistema sino también en las células MIN6 ya que uno de los puntos claves del estudio de esta tesis, es el contexto celular. Es habitual que los GPCRs se estudien en ambientes que no se corresponden con el entorno en el que se expresan a nivel fisiológico. La expresión artificial en líneas celulares como HEK293T entre otras (Yarur *et al.*, 2020; Blanco *et al.*, 2011) ha sido ampliamente utilizadas para comenzar la descripción de las vías de activación de los receptores de CRH, que luego debieron

ser re-investigados en diferentes contextos ya que las respuestas resultan diferentes (Chen, 2016; Inda *et al.*, 2016). Siguiendo esta línea de pensamiento observamos que en la línea que expresa de manera endógena al CRHR2 $\alpha$  (y al CRHR1), MIN6, no generó un aumento de AMPc luego de estimularlas tanto con CRH como con las UCNs (Figura 19). Por otro lado, en nuestra línea celular HT22-CRHR2 $\alpha$ , sí se observó la generación de AMPc (Figura 18). Estos resultados nos indican que efectivamente en el sistema CRH, también para el CRHR2 $\alpha$  es sumamente importante estudiarlo en un contexto celular lo más similar al fisiológico para poder describir correctamente su función o los mecanismos que se activan. Volviendo al resultado observado con la activación de CREB en el ítem anterior, esta diferencia en la activación de AMPc, puede explicar que tal vez esa activación efectivamente es mediante otra vía diferente a la de AMPc/PKA que relacionamos directamente con los receptores de CRH por la bibliografía. Cabe destacar que nos parece necesario comenzar a aproximar y definir algunos caminos utilizando líneas celulares generales las cuales se transfectan con facilidad y están extremadamente estudiadas, pero los resultados obtenidos deben ser corroborados luego en un sistema que asemeje el entorno real del receptor en estudio, como cultivos primarios neuronales y finalmente animales. En este trabajo comenzamos a estudiar la acción de CRH y las UCNs en cultivos primarios de embriones de ratón, pero debido a diferentes factores independientes al laboratorio no pudimos finalizarlos; es una de las prioridades que tenemos en cuanto se nos permita.

#### Tanto sAC como las tmACs estarían involucradas en la generación de AMPc en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

Dentro de los nuevos paradigmas acerca de la organización celular, la señalización dirigida por microdominios de acción es uno de los más emergentes en el campo. Se ha demostrado que las adenilil ciclasas son fuertes candidatas en dirigir esta respuesta (Cooper & Tabbasum 2014).

Tal como describió la Dra. Carolina Inda en su Tesis Doctoral, sAC está involucrada en los mecanismos de señalización del sistema CRH/CRHR1 y además se expresa a nivel de RNA mensajero tanto en cerebro, corteza e hipocampo, como en las células HT22 (Carolina Inda, 2017). Esto era de esperar dado que se han descripto previamente roles de sAC en el cerebro (Stiles *et al.*, 2014). Se destaca sobre todo

su función en el crecimiento de axones y en la formación del cono de crecimiento en respuesta a netrina-1 en neuronas ganglionares (Wu et al 2006). También en ese tipo de neuronas, sAC favoreció la viabilidad y el crecimiento axonal en respuesta a la actividad eléctrica (Corredor *et al.*, 2012). Además, sAC se expresa también en astrocitos y se ha reportado que participa en el acoplamiento metabólico entre éstos y neuronas (Choi *et al.*, 2012).

Existe evidencia creciente de que el AMPc regula la acción de las neurotrofinas que estimulan cambios morfológicos en neuronas (Huang & Reichardt 2003; Stiles, Kapiloff, & Goldberg 2014). Estas observaciones sugieren que sAC podría ser una fuente atípica de AMPc, o mejor dicho poco descripta, en estas vías de señalización. Más aún, consideramos que es importante profundizar el estudio de sAC en neuronas teniendo en cuenta que en células excitables se observa una correlación entre el influjo de calcio por actividad eléctrica y los niveles de AMPc detectados, y como se comentó en la introducción, el calcio es uno de los principales reguladores de sAC junto con el bicarbonato.

Carolina demostró que el CRHR1 utiliza a sAC como fuente de AMPc además de las tmACs. Profundizando en la fuente no convencional de segundo mensajero, se demostró que no sólo es otra fuente de AMPc sino que además éstas regulan diferentes procesos (Inda *et al.*, 2016; Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). ¿Le da lo mismo a la célula el AMPc que proviene de sAC o de tmACs? ¿Por qué la célula tendría diferentes fuentes de AMPc que generan la misma molécula? Este es un tema que está en debate y gracias a las nuevas tecnologías que permiten una mejor visualización a nivel de célula única y en tiempo real, se puede entender con más detalle este tipo de procesos. Nuestros resultados permiten reafirmar que las adenilil ciclasas generan microdominios de señalización que dirigen la activación de diferentes funciones de las células que dependen también de patrones temporales. Respecto a sAC, ya se han descrito estos microdominios que lo involucran en otros entornos celulares como testículos y riñón (Tresguerres *et al.*, 2011) y que además se ha postulado como un paradigma emergente para otras ciclasas como se comentó al inicio de esta sección (Cooper & Tabbasum 2014), sin embargo nuestro laboratorio fue el primero en reportarlo para el CRHR1 y esta tesis es el primer reporte para la acción de sAC mediada por el CRHR2 $\alpha$ . En este trabajo pudimos demostrar que sAC participaría en el sistema HT22-CRHR2 $\alpha$  utilizando UCN3 como estímulo (Figura 23).

A pesar de que la mayor fuente de AMPc provendría de las tmACs, sAC aportaría una fracción que tiene una función diferente al generado por las tmACs, ampliaremos sobre el rol de sAC relacionado con el CRHR2 $\alpha$  en las siguientes secciones.

#### Diferentes roles de sAC río abajo del CRHR2 $\alpha$ en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

El rol de sAC en los GPCRs aún está siendo estudiado, sin embargo, se conocen algunos antecedentes que nos permiten pensar que probablemente sAC esté involucrada en una gran batería de procesos ya que su expresión es muy ubicua. En línea con la discusión del punto anterior, se describió que en la mucosa del colon, los receptores  $\beta$ 1AR y  $\beta$ 2AR estimulados por epinefrina disparan diferentes funciones para el AMPc si proviene de sAC o de las tmACs, donde el primero participa en la secreción sostenida de K<sup>+</sup>, y el segundo en la secreción transitoria de Cl<sup>-</sup> (Halm, Zhang, & Halm 2010). Otro ejemplo es el de los receptores EP1 y EP4 que son GPCRs que se encuentran en las membranas bronquiales y regulan mediante tmACs el canal de Cl<sup>-</sup> CFTR en la fibrosis quística. En este caso, se describió que existe un mecanismo luego de la generación de tmACs que lleva a la activación de EPACs, éstos median la respuesta de calcio que activa a sAC y finalmente se llega al aumento de la actividad del CFTR a través de la PKA (Ivonne, Salathe, & Conner 2015).

En este trabajo se extiende al CRHR2 $\alpha$  lo que Carolina Inda postuló en su Tesis doctoral donde sAC sería una fuente alternativa generadora de AMPc en la señalización del CRHR1. Carolina demostró la participación de sAC en ambas fases de activación de ERK1/2 luego de estimular el CRHR1 con CRH, mientras que las tmACs participan sólo en la primera fase de ERK1/2 (Inda *et al.*, 2016). Pudimos demostrar que sAC participa en la fosforilación de los tres efectores estudiados, siendo la única fuente de AMPc necesaria para la activación de Akt. Para ERK1/2 y CREB, ambas fuentes de AMPc participarían en la fosforilación de ambos (Figuras 24-26). Particularmente en el caso de ERK1/2, no podemos comparar con exactitud acerca de la regulación de ambas fases como en el caso del CRHR1 ya que, por ejemplo, aún desconocemos qué sucede en el proceso de internalización del CRHR2 $\alpha$  en este contexto celular, sin embargo, podemos profundizar acerca del este efecto de sAC sobre Akt. Se ha demostrado para el receptor de quimioquinas (CXCR4/5) que la inhibición de la endocitosis disminuye la fosforilación de Akt pero no la de ERK1/2, así como también al silenciar la formación de endosomas

tempranos, se atenúa la activación de Akt sin interferir en la vía de ERK1/2 (English, Mahn, & Marchese 2018). Teniendo en cuenta esta información y los resultados previos de nuestro laboratorio en relación con sAC y la endocitosis, nuestra hipótesis es similar para el CRHR2 $\alpha$  donde la manera de compartimentalizar la señal es mediante microdominios de señalización de AMPc donde sAC controlaría la vía PI3K desde endosomas. Esta hipótesis también está sustentada por lo que propone Sugiyama acerca de los nanodominios de membrana donde se forman pequeños *clusters* y allí se agrupan los receptores. En estos pequeños dominios se produce la señalización desde endosomas, una de éstas vías surge de la interacción entre clatrina y Akt, donde clatrina es dependiente de la activación de Akt (Sugiyama, et al 2019). Nuestro laboratorio está sumamente interesado en estos procesos por lo cual se profundizará sobre los mismos en futuras investigaciones.

#### PKA participa en la fosforilación de ERK1/2, Akt y CREB mediada por el CRHR2 $\alpha$

En este trabajo, describimos primero, que las tres UCNs son capaces de generar una rápida activación de la PKA la cual se sostiene al menos por 30 minutos luego de la estimulación (Figura 27). Se cree que un pequeño pulso de AMPc ya sea desde nano o microdominios es suficiente para activar a la PKA. La función prolongada de esta quinasa puede depender de otros factores independientes de la acción del AMPc, como puede ser la actividad de las PDEs que afectan al nucleótido (así como también de fosfatasas que inactivan directamente el sitio catalítico de la PKA (Zaccolo, Zerio, & Lobo 2021).

Estudios previos realizados sobre el receptor de PTH han demostrado lo que Hoffmann propuso en el año 1999, donde existe una regulación entre el AMPc y ERK1/2 mediante la inactivación de las PDEs. Vilardaga y sus colaboradores proponen que la activación prolongada de ERK1/2 mediada por  $\beta$ -arrestina, inhibe la acción de las PDEs generando una respuesta sostenida de AMPc al activar el receptor de PTH en las células HEK293 (Hoffmann *et al.* 1999; Feinstein *et al.* 2011; Vilardaga, Jean-Alphonse, & Gardella 2014), esta respuesta también podría ser la encargada de mantener la PKA activa de manera prolongada como observamos en nuestro sistema.

Además, demostramos que la PKA es un factor fundamental en la activación de ERK1/2 y de Akt en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ , sin embargo, esta función difiere entre

los efectores. Mientras PKA estimula la fosforilación de ERK1/2 y CREB, parecería inhibir la de Akt. Puntualizando en el caso de CREB no sorprende que sea un estimulador de la activación ya que es la vía canónica río debajo de la generación de AMPc mediada por GPCRs. En el caso de ERK1/2, la activación puede ser vía PKA o independiente de la misma, particularmente para el CRHR1 nuestro laboratorio demostró que la segunda fase de activación de ERK1/2 es dependiente de la endocitosis (Bonfiglio *et al.* 2013) y de EPACs (Inda *et al.*, 2016) . En el caso del CRHR2 $\alpha$  observamos que el punto de activación de ERK1/2 de 30 minutos, no se ve afectado al bloquear la actividad de la PKA, por lo tanto, puede que al igual que el CRHR1 existan dos vías de regulación diferentes para la activación de ERK1/2 (Figura 28A). Para el caso de Akt, teniendo en cuenta nuestra hipótesis acerca de la señalización desde los endosomas, podemos suponer que PKA no afectaría la activación, sin embargo, observamos un aumento en la fosforilación del mismo al inhibir esta quinasa (Figura 28B). Es de tener en cuenta que el inhibidor de la actividad de PKA, H-89 puede afectar otras funciones al ser un inhibidor con efectos inespecíficos. Sin embargo, un trabajo de 2010 en neuronas y uno de 2002 en HEK-293T, demostraron también, que el efecto de H-89 elevó los niveles de activación de Akt. Ambos trabajos sugieren que la PKA regula negativamente al Akt que se activa mediante el AMPc generado, vía EPACs, sin embargo los mecanismos involucrados aún se desconocen (May *et al.*, 2010; Mei *et al.*, 2002). Al estudiar la dependencia de la activación de ERK1/2 y de Akt río debajo de los EPACs 1 y 2, otros efectores generales que se activan de manera dependiente al AMPc, observamos la misma tendencia respecto a ERK1/2 pero para el caso de Akt observamos la disminución de la activación (Figura 29). Este resultado va en línea con lo propuesto por May y Mei donde los EPACs son los encargados de activar Akt y la regulación de PKA actúa sobre ese AMPc que activa a los EPACs, sin embargo, para comprender por completo el mecanismo es necesario seguir profundizando en el mismo. Proponemos continuar el estudio acerca del efecto de la PKA sobre Akt utilizando otras herramientas, como por ejemplo herramientas genéticas (siRNAs sobre los EPACs, PKI sobre PKA) u otros inhibidores farmacológicos para corroborar estos resultados.

### CRH y las UCNs inducen la transcripción de *c-fos* tanto en las células HT22 como en cultivo primario neuronal

Una de las preguntas que quisimos abordar más allá de saber si *c-fos* participa en nuestro sistema, es saber si esa participación es ligando dependiente, ya que la regulación por ligando es algo que se conoce en los GPCRs de clase B (Wootten *et al.*, 2017) y poco se sabe acerca de diferencias entre los agonistas del CRHR2 $\alpha$ . Comparamos las respuestas de este gen de expresión inmediata utilizando todos los ligandos del sistema CRH en ambas líneas, las células HT22-CRHR1 y las HT22-CRHR2 $\alpha$ . Para el caso del CRHR1 observamos que, utilizando 10 nM de concentración de ligando, sólo CRH y la UCN1 son capaces de generar un aumento selectivo en la transcripción de *c-fos* (Figura 30B). Este resultado confirma lo que observamos al medir la respuesta de AMPc por FRET en estas células estimuladas con la misma concentración de los ligandos (datos no mostrados). Al medir la respuesta de *c-fos* utilizando los ligandos a concentraciones 100 nM observamos que tanto CRH como todas las UCNs, con diferente intensidad, fueron capaces de aumentar la inducción del gen (Figura 30A). Proponemos que este efecto se debe a la saturación del sistema con el ligando y, además, la respuesta de AMPc para el CRHR1 a concentraciones mayores a 10 nM de CRH tiene forma acampanada, por lo tanto, a mayor concentración, menor respuesta de AMPc, y dado que la inducción de *c-fos* está relacionada con PKA/CREB y en nuestro sistema, ambos están regulados por AMPc, es probable que la disminución en la respuesta de *c-fos* se deba a este efecto. Además, se ha descrito previamente que al utilizar concentraciones altas de CRH y sus péptidos relaciones se producen señales que corresponden al pegado inespecífico de los mismos a los receptores y esto se debe a la gran similitud que hay tanto entre los ligandos como entre los receptores (A. Chen, 2016).

Al ensayar el mismo experimento, pero con el CRHR2 $\alpha$  en las células HT22, observamos que sólo la UCN1 y la 3 fueron capaces de aumentar la transcripción de *c-fos*, mientras que CRH y la UCN2 no lograron reproducir este efecto (Figura 31A). Para el caso de las células MIN6, todos los ligandos son capaces de generar una inducción de *c-fos*, siendo CRH y la UCN1 mejores activadores, efecto que probablemente se deba a que puede mediar sobre ambos receptores de CRH (Figura 31B). Nos resultó sumamente interesante que la UCN2 en este contexto celular fuera capaz de aumentar la inducción de *c-fos* mientras que en las HT22 no tiene esta

capacidad. El rol de la UCN2 en el cerebro está en continuo debate ya que no se sabe bien si de hecho cumple alguna función, este resultado refuerza esta hipótesis donde la UCN2 tendría su efecto principal en células de la periferia, pero no en neuronales (A. Chen *et al.* 2004; Deussing & Chen 2018).

El razonamiento anterior, nos permite sugerir que la regulación respecto a la inducción de *c-fos* va a depender del ligando que esté participando en el proceso y no solamente del receptor *per se*. Consideramos sumamente importante seguir estudiando estas diferencias entre ligandos/receptores ya que por ejemplo en este trabajo observamos que CRH activa sólo *c-fos* mediante el CRHR1, sin embargo, la UCN1 lo hace en ambos receptores. Estas diferencias y similitudes podrían ser clave para entender la orquestación de la respuesta a estrés integral y a las patologías asociadas.

En línea con la conclusión anterior, profundizamos en la inducción de *c-fos* mediada por CRH, pero en este caso en un entorno fisiológico de aún mayor relevancia como son los cultivos primarios de embrión de ratón provenientes de la corteza y del hipocampo. Se ha descrito que el CRHR1 así como también CRH, se encuentran expresados en las dos estructuras previamente mencionadas (Figura 3) (Deussing & Chen 2018). Inesperadamente, observamos que CRH sólo tuvo efecto en los cultivos primarios provenientes del hipocampo. Este resultado nos resulta de suma importancia ya que nos estaría indicando que un mismo estímulo puede gatillar respuestas diferentes en los distintos tipos de neuronas, siendo que en ambos casos el CRHR1 se encuentra expresado de manera endógena (Figura 32A). Por otro lado, se conoce que el hipocampo tiene funciones clave en la formación de memorias y forma parte del sistema límbico, mientras que la corteza está relacionada con lo sensorial y lo motor (Deussing & Chen 2018). Teniendo en cuenta estas funciones de las estructuras del cerebro y las funciones comportamentales que se conocen para CRH, tiene lógica que veamos efecto sobre el hipocampo y no sobre la corteza. Además, los resultados al estimular con UCN3 nos muestran también que hay un aumento de la expresión de *c-fos* en el hipocampo, por lo tanto, podría estar indicando que el CRHR2 $\alpha$  también se encuentra expresado en los cultivos primarios de neuronas de esta estructura y esta información no es trivial, ya que la baja expresión de este receptor complica la definición de su rol (Figura 33A). En este caso, nos queda descartar una activación cruzada del CRHR1 dado que en altas concentraciones puede activarse con la UCN3 (Figura 16). Proponemos el uso de antagonistas

específicos para el bloqueo del CRHR1 y el CRHR2 (por ejemplo, el CP-376395 y Astresina-B respectivamente) y así poder estudiar con precisión la acción de la UCN3 en este tipo de cultivos neuronales.

Por otro lado, estos experimentos fueron realizados en dos condiciones, una basal y otra utilizando 4AP-B. Como se explicó a lo largo de esta Tesis, 4AP-B se utiliza para mantener activas sinápticamente a las neuronas que generan respuestas excitatorias, inhibiendo tanto la repolarización como la activación de neuronas con respuestas inhibitorias que haya en el cultivo, que a pesar de estar en un porcentaje menor que las excitatorias, pueden tener cierta participación. Al comparar estas dos condiciones frente al estímulo con CRH observamos un efecto inhibitorio sobre la activación generalizada por los trenes de potenciales de acción que produce la preincubación con 4AP-B y esto fue observado tanto en neuronas hipocampales como corticales, más allá que en condiciones basales CRH no produzca ningún efecto sobre las neuronas de corteza (Figura 32B,D). Cabe destacar que 4AP-B se utiliza para mimetizar en cultivos primarios de neuronas, la activación real sináptica que encontraríamos en el cerebro. Por lo tanto, estos resultados son sumamente interesantes ya que la diferencia entre las condiciones basales y las tratadas con 4AP-B indicarían que a la neurona no le da lo mismo estar en conexión sináptica con sus vecinas en una situación donde hay trenes de potenciales, frente a una situación sináptica basal respecto al efecto de CRH sobre ellas. Creemos que el aumento en la inducción de *c-fos* tanto en las neuronas hipocampales basales como en las HT22-CRHR1 dependiente de CRH corresponde a una activación intracelular independiente de la conexión intercelular, es por esto que en los dos contextos celulares la respuesta es similar y varía al utilizar 4AP-B donde es dependiente de la conexión inter-célula.

Respecto al caso de la UCN3 en las neuronas hipocampales y el tratamiento con 4AP-B, observamos un efecto mayor en la inducción de *c-fos* y no un efecto inhibitorio como con CRH (Figura 33B). Esta diferencia podría estar indicando que el aumento en la transcripción de *c-fos* no corresponde a un efecto cruzado con el CRHR1 por la alta concentración de UCN3 como se mencionó anteriormente, sino que parecería ser específico para el CRHR2. Llegamos a esa conclusión, ya que, si el efecto de UCN3 fuera sobre el CRHR1, deberíamos observar lo mismo que en la situación estimulada con CRH, y en este caso observamos lo contrario, donde frente a la preincubación con 4AP-B la inducción de *c-fos*, aumenta. De todas maneras, creemos necesario

seguir investigando la acción de la UCN3 sobre estos cultivos y además utilizando inhibidores específicos para el CRHR1.

Estos acercamientos al contexto celular fisiológico real donde se desempeñan los receptores de CRH es clave para poder comenzar a integrar los conocimientos generados en las líneas celulares y finalmente lograr entender cómo funciona el sistema CRH en el cerebro.

La activación del CRHR2 $\alpha$  promueve la diferenciación de las células HT22-CRHR2 $\alpha$  la cual es ligando y fuente de AMPc dependiente.

Como se introdujo al inicio de este trabajo, la proliferación y la diferenciación celular se suelen describir como mecanismos antagónicos por lo tanto se entiende que un mecanismo que genera una diferenciación acarrea el arresto de la proliferación (Vaudry *et al.*, 2002). Además se ha relacionado a CRH con la diferenciación neuronal en células *stem* del hipocampo (Koutmani *et al.*, 2019) Siguiendo esta línea de pensamiento, Juan José Bonfiglio fue quien observó que luego de estimular con CRH las células HT22-CRHR1 generaban un cambio morfológico y comenzó a estudiarlo. Finalmente Carolina Inda demostró que ese cambio morfológico es dependiente de AMPc, pero sólo del que proviene de sAC, así como también dependiente de CREB pero no de ERK1/2 por lo que indicaría que estos efectores están funcionalmente aislados (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). Extendimos este trabajo sobre el CRHR2 $\alpha$  en el mismo contexto celular, donde principalmente observamos que la UCN2 no es capaz de diferenciar las células mientras que la UCN1 y la UCN3 sí son capaces (Figura 34). A su vez, como se discutió en el ítem de inducción de *c-fos*, la UCN2 tampoco es capaz de inducir este IEG, por lo tanto, es la urocortina que tiene más limitaciones a la hora de activar al CRHR2 $\alpha$  en nuestro sistema. Esto nos pareció sumamente relevante ya que en otros trabajos se ha visto que la UCN2 tiene efectos inhibitorios sobre la prolongación de las dendritas en cultivos primarios hipocampales de rata donde se expresan ambos receptores (H. Sheng *et al.*, 2008, 2012). También se ha visto en el mismo tipo de cultivos primarios que la UCN2 tiene un efecto inhibitorio sobre la CRMP de sus siglas en inglés *Collapsin Response Mediator Protein*, la cual se expresa sobre todo en el desarrollo del sistema nervioso y que tiene efecto sobre la diferenciación celular entre otros (Yanming Chen *et al.*, 2012). Toda esta información nos lleva a concluir que en este caso la decisión que tomará la

célula frente al estímulo mediada por el CRHR2 $\alpha$  depende del ligando y no del receptor en sí. Creemos que las diferencias de expresión de UCNs en las estructuras del cerebro, son las que dirigen estos procesos y que por esa razón el contexto celular es prioritario en las vías de señalización que se activan en el sistema CRH.

El rol del AMPc en la diferenciación celular es un campo en constante estudio y que aún no se encuentra del todo caracterizado. A nivel neuronal, se ha descrito al AMPc como regulador de procesos diferenciadores relacionado con la regeneración de los axones en neuronas jóvenes, y tanto esta habilidad como la concentración de AMPc se pierden a medida que la neurona envejece (Cai *et al.*, 2001). Tomando este trabajo como pionero, se ha demostrado que a medida que axones de la retina envejecen, la generación de AMPc disminuye, y que al aumentar el segundo mensajero hay un rejuvenecimiento en los conos de la retina (Shewan *et al.*, 2002). Durante este trabajo logramos demostrar que el AMPc está involucrado en el proceso de diferenciación y que depende de la fuente de donde provenga. Resultados previos de nuestro laboratorio, han demostrado que en células HT22-CRHR1, estimuladas por CRH, este proceso está comandado por PKA y el AMPc proveniente de sAC y que además es independiente de ERK1/2 a pesar de saber que tanto la PKA como el AMPc activan esta quinasa en el mismo contexto celular (Inda, Bonfiglio, *et al.*, 2017). Logramos demostrar que lo mismo sucede para el CRHR2 $\alpha$  respecto a la procedencia del AMPc, sólo el que provenga de sAC será capaz de lograr un efecto diferenciador (Figura 35). Además, demostramos que la PKA y probablemente CREB y *c-fos* son esenciales para este proceso (Figura 36-38). Estos resultados son similares a los obtenidos para el CRHR1, pero a ellos se le adiciona que no cualquier ligando es capaz de activar este proceso y este punto nos resulta interesante y un tema de constante debate.

El objetivo fundamental de nuestro laboratorio es entender cómo funciona el sistema CRH teniendo en cuenta las similitudes tanto de sus receptores como de sus ligandos y por lo tanto la delicada regulación que probablemente exista entre ellos. Una de nuestras hipótesis principales, que demostramos a lo largo de esta Tesis, es que al receptor no le es lo mismo si es activado por un ligando o por otro. Este es uno de los resultados más prometedores que obtuvimos ya que no sólo depende de la fuente de AMPc que esté presente en el sistema, sino que también de la urocortina que está en juego. Como hemos demostrado previamente, tanto CRH como las UCNs son capaces de generar el aumento de AMPc en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ , sin embargo,

la UCN2 no produce aumento de *c-fos*, que en general está ligado al AMPc, ni tampoco desata la diferenciación celular. Estos eventos nos sugieren que la UCN2 en particular se comporta de manera diferente respecto a la UCN1 y la UCN3 en nuestro sistema y particularmente este ligando como se comentó anteriormente, es bastante controversial en el cerebro. La UCN2 es la urocortina más expresada en piel y músculo esquelético, fue hallada en cerebro de rata pero al repetir esos experimentos en cerebro de ratón, no se logró replicar el patrón de expresión (Reyes *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003). Sumado a experimentos con el promotor de la UCN2 y  $\beta$ -galactosidasa en ratones, tampoco se encontró un patrón de expresión claro en el cerebro (Deussing *et al.*, 2010). Varios autores creen que esto se debe a que se encuentra cerca del límite de detección de las técnicas que se utilizaron en esos experimentos (Deussing & Chen 2018), sin embargo, no se tienen certezas acerca de la expresión de la UCN2 en el cerebro murino. Nuestro descubrimiento acerca de la incapacidad de generar la diferenciación celular en las HT22-CRHR2 $\alpha$  confirma la posibilidad de que esta urocortina cumpla funciones diferentes, o tal vez ninguna, que la UCN 1 y la 3 en el cerebro de ratón y que las vías que sí activa, sean intrínsecas del receptor y no dependientes del contexto.

En la figura 46 se resumen en forma esquemática los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral sobre las vías de señalización activadas y la relación con el proceso de diferenciación mediado por el CRHR2 $\alpha$  y las UCNs 1 y 3 en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .

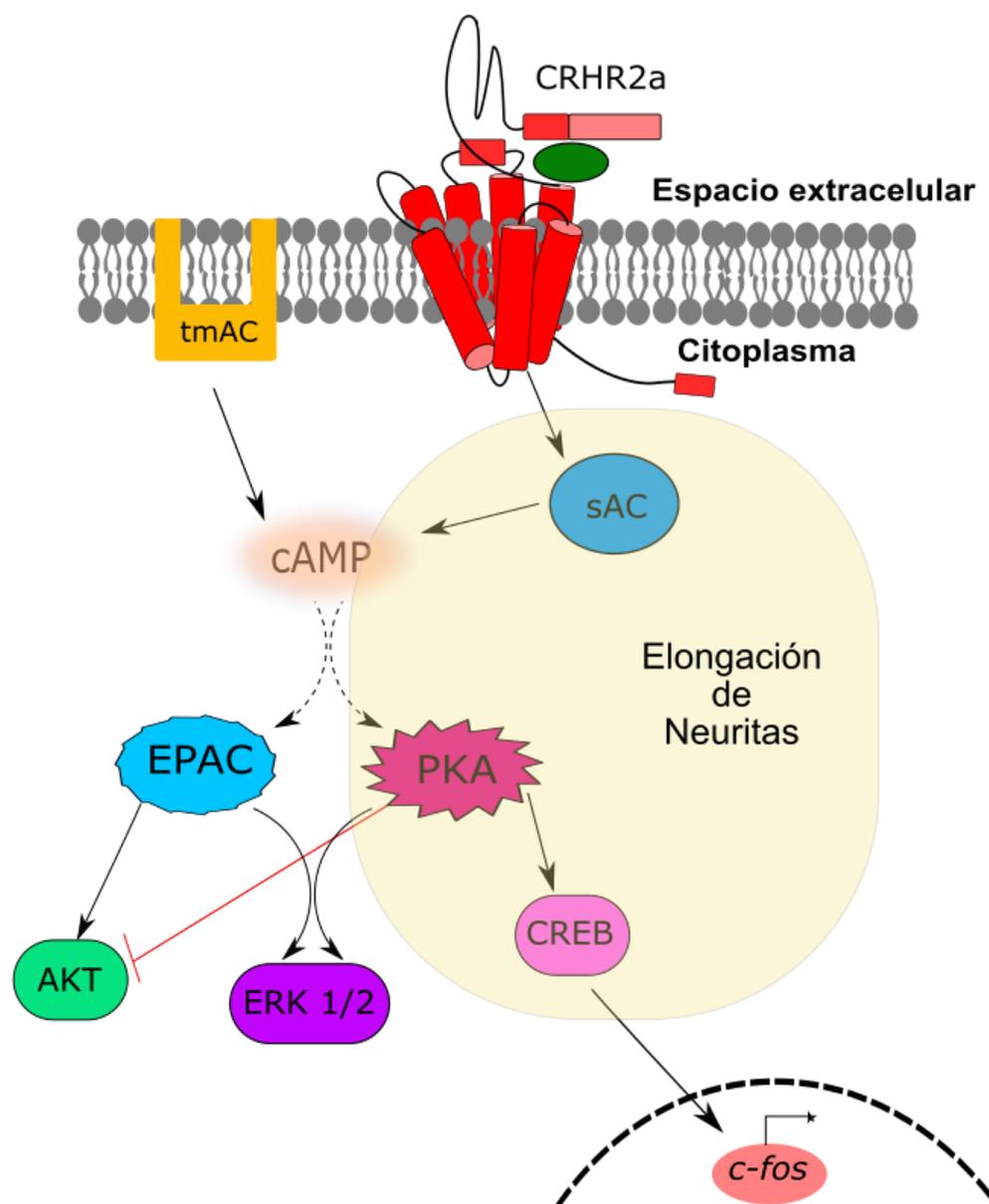


Figura 46: **Modelo propuesto de las vías de señalización y diferenciación celular estudiadas para el CRHR2 $\alpha$  en las células HT22-CRHR2 $\alpha$ .** La estimulación del CRHR2 $\alpha$  con las UCNs genera AMPc a través de tmACs y de sAC, a su vez se activan los EPACs y la PKA, la cual participa en la fosforilación de CREB y de ERK1/2, mientras que tendría un efecto inhibitorio en Akt. Akt estaría activado sólo por el AMPc generado vía sAC. PKA activa a CREB y éste induce la expresión de *c-fos*. A su vez el AMPc generado por sAC, la activación de PKA y la fosforilación de CREB, inducen la elongación de las neuritas en estas células.

### El CRHR2 $\alpha$ presenta un tránsito no convencional en las células HT22-CRHR2 $\alpha$

En 1992 Von Zastrow y Kobilka describieron por primera vez la endocitosis de los GPCRs dirigida por ligando, donde en condiciones basales el receptor se encuentra en la membrana plasmática. La activación del receptor por el ligando conduce a su internalización, lo que significaba el fin de la señalización mediada por ese receptor (Von Zastrow & Kobilka 1992). Hoy en día se conocen vías alternativas a la canónica descrita en 1992, donde los receptores pueden señalizar desde compartimentos endocíticos luego de haber internalizado (Vilardaga, Jean-Alphonse, & Gardella 2014). Como ya se ha mencionado nuestro laboratorio ha demostrado que el CRHR1 en el contexto de las células HT22 internaliza rápidamente en presencia de CRH y permanece en compartimentos intracelulares al menos por 40 minutos, por otro lado puede señalizar desde endosomas y que esta señalización depende de sAC y no de las tmACs (Inda *et al.*, 2016). Nos preguntamos si el CRHR2 $\alpha$  en el mismo contexto celular seguía un tránsito similar al CRHR1. Los anticuerpos para los receptores de CRH no son herramientas confiables ni en especificidad ni sensibilidad (Damian Refojo *et al.*, 2011), por lo tanto el seguimiento del receptor se realizó mediante el FLAG-*tag* que contiene en su amino terminal. Por medio de citometría de flujo e inmunofluorescencias, demostramos que el CRHR2 $\alpha$  presenta un tránsito particular y diferente al reportado para el CRHR1. Encontramos que en condiciones basales, el receptor se encuentra tanto en la membrana como dentro de la célula, este comportamiento fue previamente descrito en células HEK293 (Schulz *et al.*, 2010). Luego de la estimulación con UCN1 observamos un rápido aumento del receptor en la membrana que luego de 30 minutos de estímulo decreció a condiciones basales, este resultado es la primera vez que se reporta para este receptor en un entorno neuronal (Figuras 39-41). Resultados preliminares con UCN3 muestran resultados similares a los obtenidos con UCN1 (datos no mostrados).

Como se ha analizado a lo largo de esta Tesis Doctoral, el pseudo péptido señal que contiene este receptor, le otorga características distintivas como la imposibilidad de oligomerizar, pero este péptido no impide la posibilidad de dimerizar con otros receptores como puede ser el receptor de dopamina (Fuenzalida *et al.*, 2014; Teichmann *et al.*, 2012; Yarur *et al.*, 2020). Pudimos corroborar la importancia de este péptido, ya que al utilizar un plásmido con el CRHR2 $\alpha$  con el péptido señal del virus de la influenza el cual es clivable (PS-FLAG-CRHR2), observamos un tránsito similar

al de CRHR1 lo que nos indica que el pseudo péptido señal dirige este tránsito (Figura 42). Nos preguntamos entonces ¿Cuál es la función de este tránsito particular del CRHR2 $\alpha$  y que a los 5 minutos de estimulación es completamente inverso al observado para el CRHR1? Nuestra hipótesis radica en la regulación de la señalización de estos receptores en aquellas estructuras del cerebro en la que se expresen ambos. Es decir, la actividad canónica de cada receptor se verá modificada en presencia del otro. Yarur y sus colaboradores, han demostrado que el CRHR2 $\alpha$  cambia tanto su localización como su señalización cuando heteromeriza con el receptor de dopamina de tipo 1 (Yarur *et al.*, 2020). Si algún proceso similar sucede con el CRHR1 y el CRHR2 podría indicar un *crosstalk* entre ellos y explicar tal vez las diferencias en el tránsito y la expresión de los ligandos en áreas particulares del cerebro. Aún no se conoce si los receptores de CRH tienen la capacidad de heteromerizar entre sí en un contexto neuronal, pero sería extremadamente interesante y revelador continuar este estudio en esta línea de pensamiento.

El control del destino del CRHR2 $\alpha$  en este contexto celular, la resensibilización y el tiempo de vida media son aspectos temporales importantes y que deben ser objeto de próximos estudios. La información con la que se cuenta acerca de la desensibilización del CRHR2 $\alpha$  es escueta. Hauger y sus colaboradores demostraron que este receptor en la línea celular de retinoblastoma Y79 y en HEK293T, está regulado por un mecanismo de desensibilización rápido y fuerte generado por la preincubación con UCN2 y UCN3, pero no por CRH. Además se produce el reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas hacia la membrana luego de la estimulación y la fosforilación del receptor (Gutknecht *et al.*, 2008; Hauger *et al.*, 2013). Para el caso del CRHR1, se conoce que la desensibilización depende del tipo celular, diferentes estudios en células corticotrofas, de neuroblastoma ó retinoblastoma y en HEK293, han demostrado distintos tiempos para la resensibilización del receptor (Inda, Armando, *et al.*, 2017).

El último aspecto que abordamos durante esta Tesis Doctoral y el cual consideramos que debe seguir siendo explorado es la endocitosis del CRHR2 $\alpha$ . En nuestro caso, observamos como la internalización del receptor puede modificar la señalización que caracterizamos a lo largo de este trabajo. Contamos con información previa del CRHR1 el cual es capaz de seguir señalizando luego de ser endocitado por acción de CRH (Inda *et al.*, 2016). Al haber descripto las diferencias en el tránsito entre estos

receptores la siguiente pregunta que nos interrogó fue el rol de la endocitosis del CRHR2 $\alpha$  respecto a la activación de efectores. Continuamos utilizando las células HT22-CRHR2 $\alpha$ . Demostramos que al bloquear la endocitosis con DYNGO4-a, la curva de fosforilación de ERK1/2 aumenta en su totalidad, siendo significativo este aumento a tiempos cortos. En el caso del CRHR1, al bloquear la endocitosis, sólo se observa un aumento a tiempos largos en la fosforilación de ERK1/2 (Inda *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta la diferencia en el tránsito, relacionamos este aumento de ERK1/2 con la cantidad de receptores que aumenta luego de 5 minutos de estimulación (Figura 41). Con el tratamiento con DYNGO4-a, logramos que el receptor que está en la membrana no pueda internalizar ya que este fármaco inhibe la formación de hoyos de clatrina, siendo este el método convencional por el cual los GPCRs internalizan. Sin embargo, este bloqueo, no impediría la llegada de los receptores a la membrana luego de la estimulación, entonces, este aumento en la activación de ERK1/2 puede deberse al aumento de receptores en la membrana, que una vez que llegan no pueden volver a internalizar y quedan señalizando desde allí (Figura 44A). Cuando analizamos el perfil de Akt al bloquear la endocitosis, encontramos un comportamiento inverso, donde la activación del efector baja de manera significativa a tiempos largos, y de hecho también observamos que la cantidad de pAkt en condiciones basales que describimos en este trabajo, también disminuye (Figura 44B). Para realizar las cuantificaciones, en general normalizamos la activación a niveles basales para poder compararlas sin el sesgo de la activación intrínseca del efector, el cual va a variar levemente por el hecho de trabajar con células en cultivo. En este caso al normalizar al basal, en la cuantificación no se observa la diferencia en los basales, pero en la imagen demostrativa del *Western Blot*, se observa claramente esta diferencia (Figura 44B).

El efecto diferente de la endocitosis entre los receptores nos sugiere que tal vez exista un *crosstalk* entre ellos, ya que no sólo la activación es inversa (cuando uno aumenta el otro disminuye), sino que también tienen un comportamiento opuesto frente al bloqueo de la endocitosis. Creemos que en el caso de Akt, la activación baja debido a que probablemente, está involucrado en la formación del endosoma o tal vez señalice desde éste como se ha demostrado para el receptor de quimiocina (English, Mahn, & Marchese 2018).

Para el caso de la Brefeldina A, no tenemos datos acerca de su efecto sobre el CRHR1, y los obtenidos para el CRHR2 $\alpha$  van en línea con lo observado para DYNKO4-a (Figura 45). Le Min y sus colaboradores, demostraron para el receptor de kisspeptina que la respuesta a su ligando respecto al Ca<sup>+2</sup> es bifásica, siendo la segunda fase disminuida al utilizar tanto Dynasore, análogo de DYNKO4-a o Brefeldina A. Por otro lado, utilizando células tiroideas y TSH, Godbole demostró que tanto Dynasore como Brefeldina A inhiben la respuesta de AMPc y de PKA citoplasmática, cuando prueban la respuesta con sensores para la membrana plasmática no observan efectos de los inhibidores. Este bloqueo en la vía de PKA termina afectando la fosforilación de CREB y por lo tanto la transcripción de ciertos genes (Godbole *et al.*, 2017; Min *et al.*, 2014). Estos trabajos son ejemplos en donde el bloqueo de la endocitosis y del reciclado del receptor dan resultados similares como en nuestro caso.

Finalmente en el año 2010, May demostró que para el receptor de PACAP en células de glía, bloquear la endocitosis ya sea vía dominante negativo de dinamina o vía Dynasore, generó un decrecimiento en la fosforilación de Akt, mientras que al usar Brefeldina A no observaron efecto sobre la activación de este efector, por lo que relacionan a Akt con la formación de endosomas y no con el tráfico que deriva de los nuevos compartimientos de (May *et al.*, 2010). En nuestro caso, la Brefeldina A disminuye la activación de Akt al igual que el bloqueo de la endocitosis (Figura 45), lo que podría indicar una relación entre Akt y el reciclado del CRHR2 $\alpha$ . Consideramos interesante continuar explorando estos procesos con el uso de otras herramientas que no sólo sean farmacológicas, como dominantes negativos y SiRNAs de las moléculas que participan en el tráfico como dinamina, Vps35 (retrómero), etc.

## **Perspectivas**

Nuestro laboratorio apunta a describir vías de señalización y características espaciales y temporales de la activación de los CRHRs, siendo estas dependientes del contexto celular. Durante este trabajo de Tesis Doctoral hemos descrito parte de las vías activadas por el CRHR2 $\alpha$  mediadas por las UCNs en el contexto de la línea celular hipocampal HT22. Una de las preguntas que consideramos más importantes a contestar es acerca del *crosstalk* entre los receptores. Se ha descrito que el CRHR2 $\alpha$  sólo puede heteromerizar con el receptor de dopamina de tipo 1 (Fuenzalida

*et al.*, 2014; Yarur *et al.*, 2020), pero no existen datos que hayan estudiado la heteromerización entre en CRHR1 y el CRHR2 $\alpha$ , así como también con otros receptores GPCRs. Este tipo de análisis podría brindar información de importancia biológica para comprender el porqué del tránsito particular que presenta el CRHR2 $\alpha$  en el contexto celular de las células HT22. Durante esta Tesis Doctoral, se realizó el clonado del receptor CRHR2 $\alpha$  en un plásmido de expresión junto con una presión de selección compatible para ser expresada en la línea celular HT22-CRHR1. De esta manera podríamos contar con ambos receptores expresándose en las mismas células con contexto hipocampal y que además cuentan con *tags* diferentes lo que nos permitirá seguir ambos receptores de manera diferencial, así como también activarlos selectivamente utilizando los resultados de concentración-respuesta que obtuvimos en a lo largo de este trabajo. Estos experimentos quizás nos permitirán obtener respuestas acerca de la heteromerización, y *crosstalk* entre ambos receptores.

En línea con el razonamiento anterior resultará interesante continuar el estudio de la señalización desde endosomas de este receptor. Sabemos que el CRHR1 señala desde endosomas mediante sAC, sin embargo, para el CRHR2 $\alpha$  aun no contamos con esta información, aunque hemos demostrado su requerimiento para la activación de efectores tardíos. Una de las diferencias entre los receptores aparece en el perfil de la activación de ERK1/2 gatillada por el CRHR1 activado por CRH. Para el caso del CRHR2 $\alpha$  en el mismo contexto celular, no observamos una diferencia tan marcada a los 12 minutos luego de la estimulación donde para el caso del CRHR1 los niveles de pERK1/2 son cercanos a los basales y luego se activan de manera sostenida por tiempos largos. Sabemos que para el CRHR1 esta segunda fase sostenida depende de la endocitosis del receptor y de la señalización desde endosomas, por lo tanto, el perfil agudo predominante para el CRHR2 podría ser una diferencia importante entre ellos. A su vez, sería interesante saber si la endocitosis significa la finalización de las vías activadas, y en el caso que el CRHR2 $\alpha$  siga señalizando desde endosomas, entender cuál es el proceso que termina la señal si no lo es la internalización del receptor. Cabe señalar que los estudios en referencia al CRHR1 están todavía en desarrollo en nuestro grupo.

Por otro lado, como se ha desarrollado en la introducción de esta tesis, existe un componente de la familia CRH llamado CRH *binding protein* (CRH-BP) que se ha considerado un "*decoy*" o "*scavenger*" del sistema. Un trabajo relativamente reciente

reporta que esta proteína podría funcionar como *scaffold* del CRHR2 $\alpha$  para llevarlo hacia la membrana plasmática (Slater *et al.* 2016). En línea con este trabajo, consideramos importante estudiar la expresión de la CRH-BP en nuestro sistema celular y modular su expresión para poder comprender el mecanismo detrás del tránsito celular observado. A su vez, consideramos clave también, estudiar el dominio carboxilo terminal del CRHR2 $\alpha$ , ya que como también se ha mencionado anteriormente, es una de las diferencias estructurales con el CRHR1, donde éste tiene un dominio PDZ (Clase I) mientras que el CRHR2 $\alpha$ , no lo contiene. El dominio PDZ, participa en diferentes interacciones entre el GPCR y otras proteínas. Para el CRHR1, se conoce que el dominio PDZ participa en el *crosstalk* con otros receptores como por ejemplo el receptor de serotonina (5HT2A), así como también regula la interacción de proteínas de tipo MAGUKs (de sus siglas en inglés *Membrane-associated guanylate kinase*) las cuales se conoce, que regulan el tránsito del CRHR1 (Inda, Armando, *et al.* 2017; Slater, Yarur, *et al.* 2016). Por lo tanto, esta diferencia entre los receptores de CRH es clave ya que el dominio PDZ puede tener un rol importante en la respuesta biológica, es por este motivo que consideramos relevante el estudio del dominio carboxilo terminal del CRHR2 $\alpha$ .

Destacamos a lo largo de este trabajo la importancia del contexto celular. No se dispone de líneas celulares que expresen el CRHR2 $\alpha$  de manera endógena y en ausencia del CRHR1 lo que ha complejizado el estudio en sistema de líneas establecidas. Consideramos de gran valor biológico continuar estas investigaciones en modelos celulares de cultivo primario neuronal o tejidos ya que se pueden encontrar diferencias con líneas y células periféricas como hemos registrado a lo largo de esta Tesis.

Finalmente creemos que el desarrollo de nuevas herramientas para poder seguir a los receptores de CRH será esencial para avanzar con el estudio de este sistema, Consideramos que el uso y la ampliación de herramientas que permitan la visualización *in vivo* tanto el células como el tejido serán las más adecuadas ya que son técnicas mucho menos invasivas en comparación con las bioquímicas y esa característica permitirá utilizarlas *in vivo*. En el anexo de esta Tesis Doctoral se detalla el desarrollo de una herramienta para seguir al CRHR1, la cual es una nanomolécula que permite la realización de microscopía de superresolución y demás tiene actividad

antagonista sobre el receptor. Resultará interesante extender este trabajo para el seguimiento del CRHR2 $\alpha$ .

# ANEXO

## Anexo

Debido a la falta de herramientas tecnológicas y de anticuerpos específicos que permitieran el seguimiento de los receptores de CRH (Damian Refojo *et al.*, 2011), se estableció una colaboración con el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION-CONICET). En el contexto de la Tesis Doctoral del Dr. Alan Marcelo Szalai, y junto a su director Pedro Aramendia, se llevó a cabo un trabajo de investigación para generar estas nuevas herramientas. A continuación, se resumirá el trabajo realizado el cual generó una pequeña molécula con capacidad antagonista sobre el CRHR1. Nos centraremos en los experimentos realizados durante mi Tesis Doctoral. Los detalles de las técnicas, nanoscopías, características espectroscópicas y ruta de síntesis del ABP-09 se encuentran en parte de la Tesis Doctoral del Dr. Szalai y en la publicación obtenida en colaboración en la que comparto la primera autoría y mi directora comparte la autoría de correspondencia debido a nuestra participación material e intelectual en el trabajo (Szalai, 2018; Szalai *et al.*, 2018).

Hoy en día la microscopía de súper-resolución se encuentra en tendencia respecto al estudio de procesos biológicos, ya que puede ser poco invasiva y permite observar a nivel de molécula única en tejidos y células vivas y en tiempo real. Este tipo de microscopía ha permitido la descripción de estructuras como los microtúbulos mediante la marcación de la proteína vimentina y proteínas estructurales de la membrana plasmática como caveolina y conexina-43 (Hein *et al.*, 2010). Por otro lado, permitió la descripción de otros procesos como el movimiento de vesículas sinápticas (V. Westphal *et al.*, 2008), y diversas aplicaciones en el campo de la microbiología, neurobiología y biología molecular (Coltharp & Xiao, 2012; Sigrist & Sabatini, 2012; Han *et al.*, 2013)

Debido al interés farmacológico que posee el CRHR1, se han diseñado una gran cantidad de antagonistas en la búsqueda de drogas con fines terapéuticos (Grammatopoulos & Chrousos 2002; Fleck *et al.* 2012). Asimismo, en 2013 se cristalizó el receptor lo cual posibilitó y abrió las puertas al diseño de nuevas moléculas específicas *in silico* ya que su cristalización se realizó unida a un antagonista comercial lo que permitió entender la unión del receptor a una molécula con esas características (Hollenstein *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta este contexto, se decidió diseñar y sintetizar una sonda fluorescente que permitiera realizar microscopía de súper-resolución y a su vez que tuviera capacidad antagonista sobre el CRHR1.

El diseño y los experimentos de *docking* fueron realizados por el Dr. Claudio Cavassotto en el IBioBA y la síntesis fue llevada a cabo por el Dr. Alan Szalai en el CIBION. Brevemente, se utilizó la estructura cristalizada del CRHR1 junto con el antagonista comercial CP-376395 (TOCRIS *bioscience*) como esqueleto para realizar los experimentos de *docking* y se seleccionó un candidato que cumpliera con los requerimientos necesarios para sintetizar la molécula. La intención de generar esta nueva herramienta fue que la molécula tuviera capacidad fluorescente, que fuera pequeña y a su vez que esta fluorescencia fuera estable, es decir su emisión perdurara el mayor tiempo posible. Es por este motivo que se decidió utilizar la estructura de los aza-BODIPY la cual cumple con estos requisitos, y además posee coeficientes de absorción molar y rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados (Ulrich, Ziessel, & Harriman 2008; Loudet & Burgess 2007). Por otro lado, los aza-BODIPY son versátiles al momento de realizar sustituciones químicas y brindarles nuevas características a las moléculas.

Los aza-BODIPY se relacionan con otros fluoróforos conocidos como BODIPY los cuales difieren en su ruta sintética, pero tienen propiedades espectroscópicas similares. Los BODIPY fueron previamente utilizados en microscopías y nanoscopías de STED y STORM para observar a nivel de molécula única (Ali *et al.*, 2017; Deniz *et al.*, 2010; King *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015), pero éste es el primer trabajo que utiliza los aza-BODIPY en nanoscopía STORM para la detección de un receptor de superficie.

Teniendo en cuenta la información anterior, el Dr. Cavassotto utilizando el programa *Internal Coordinates Mechanics (ICM)*, generó una serie de aza-BODIPYs con afinidad por el sitio de unión alostérico del CRHR1 que tuvieran capacidad antagonista, además de conservar su característica fluorescente. Se seleccionó el ABP-09 ya que su interacción con el receptor fue similar a la que se observa con el antagonista comercial de referencia CP-376395 y además su ruta de síntesis era posible. Los detalles de la síntesis se encuentran en la Tesis Doctoral del Dr. Szalai (Szalai, 2018).

Una vez sintetizada la molécula y caracterizada a nivel espectroscópico por el Dr. Szalai, decidimos probar su funcionamiento en las células HT22-CRHR1. Comenzamos caracterizando las propiedades fluorescentes de la molécula ABP-09 dentro de las células utilizando dos concentraciones diferentes. Dado que el ABP-09 es lipofílico y atraviesa membranas celulares, consideramos necesario evaluar el tiempo necesario para que la concentración dentro de la célula se estabilizara y que pudiéramos observar en mayor medida, las moléculas de ABP-09 unidas específicamente al CRHR1. Utilizando un microscopio de fluorescencia de campo amplio con cámara de incubación, se realizó un *time course* para observar el comportamiento de la fluorescencia por 24 horas. El resultado se muestra en la figura 47.

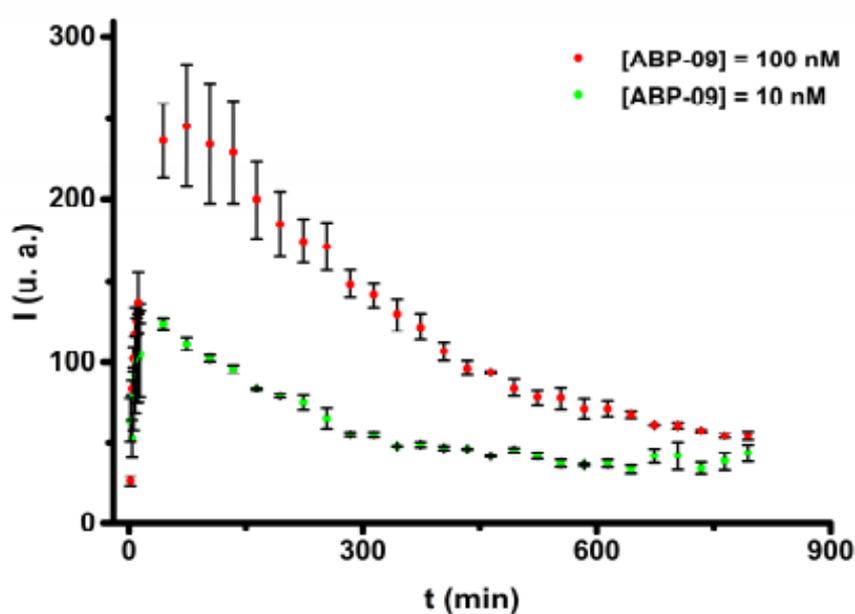
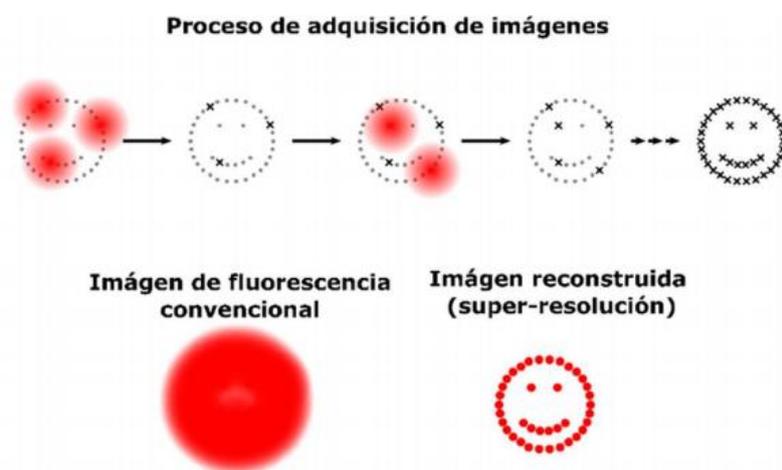


Figura 47: **Variación de la fluorescencia del ABP-09 en función del tiempo para células HT22-CRHR1.** Las células fueron preincubadas con las concentraciones señaladas durante 24 hs, se muestran las primeras 13. Se realizaron 3 experimentos independientes de cada condición y se grafican las medias  $\pm$  EMS.

Se determinó que la preincubación indicada para asegurarnos que la fluorescencia fuera estable era de 20 horas y además, en la condición de menor concentración ensayada, se logró una correcta visualización de la fluorescencia.

La siguiente pregunta que se decidió abordar fue si ABP-09 era capaz de unirse al receptor, y además si sus características ópticas nos permitirían realizar microscopía de super resolución. Para responder esta pregunta, se eligió la nanoscopía de STORM, el microscopio utilizado fue previamente diseñado y armado por el Dr. Barabás en el CIBION (Barabás, 2017). Esta nanoscopía se basa en utilizar la capacidad de “*blinking*” de algunas moléculas fluorescentes mediante la excitación en su longitud de onda. Se adquieren una serie de fotos que luego se suman y se obtiene una imagen que contiene todas las anteriores, en la figura 48 se esquematiza este fenómeno. La capacidad de las moléculas de prenderse y apagarse, permite que en



cada imagen secuencial que se obtiene, no se repitan las mismas moléculas y mejora la resolución de la imagen reconstruida.

Figura 48: **Representación de la adquisición de imágenes en STORM.** Se presenta el encendido secuencial de pocas moléculas en cada cuadro. La triple flecha indica decenas de miles de reiteraciones. Finalmente se presenta la imagen de fluorescencia convencional junto a la de súper-resolución. Figura adaptada de la Tesis del Dr. Szalai (2018).

Luego de preincubar las células por 20 horas con una concentración 10 nM de ABP-09, se realizó una inmunomarcación indirecta con Alexa 647 sobre el *cMyc tag* del CRHR1, se fijaron las células, y se observaron en el microscopio utilizando la técnica de STORM. En la figura 49 se muestran ejemplos de los resultados obtenidos.

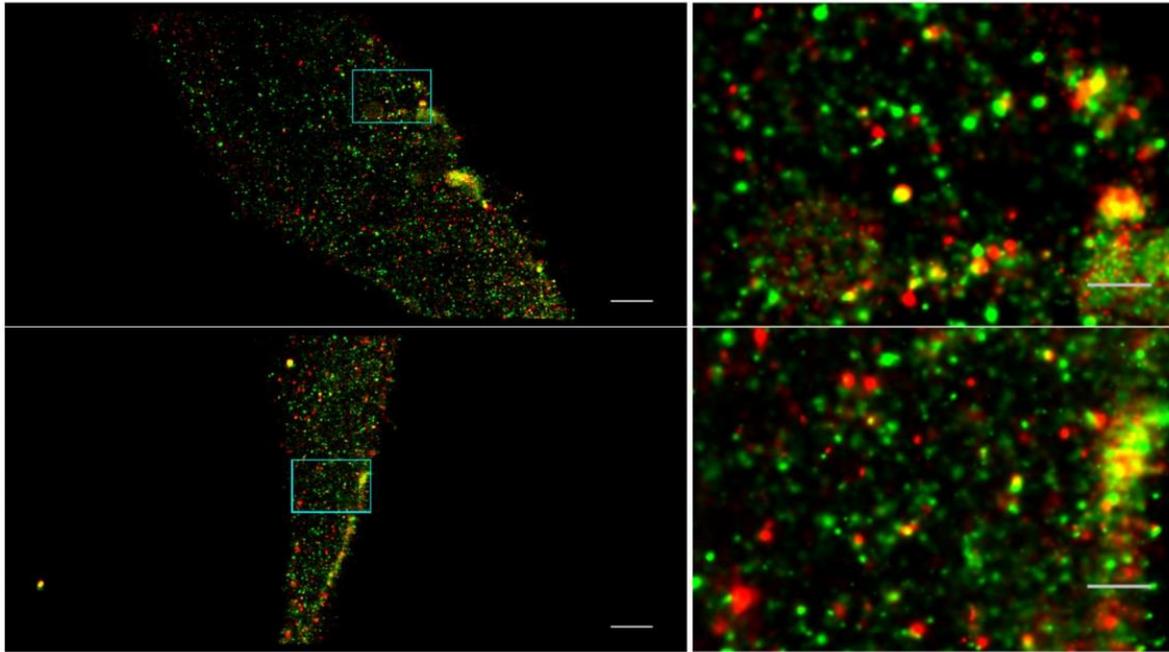


Figura 49: **Imágenes de STORM de la colocalización del ABP-09 con el CRHR1 en las células HT22-CRHR1.** El canal verde corresponde al ABP-09, mientras que el rojo al CRHR1 previamente marcado con AlexaFluor 647. En las imágenes de la izquierda se muestra una célula individual por imagen y la barra representa 2  $\mu\text{m}$ . En las de la derecha se muestra un acercamiento en las zonas correspondientes a los recuadros color celeste de las imágenes de la izquierda. Barra de tamaño: 500 nm.

El análisis cualitativo de las imágenes obtenidas nos indica que el ABP-09 colocaliza con el CRHR1. El análisis cuantitativo de esta colocalización se realizó utilizando el programa *ThunderSTORM*. Este análisis se basa en calcular la precisión de localización por separado de ambos canales, el del ABP-09 (láser de excitación en 532 nm) y el del AlexaFluor647 (láser de excitación a 642 nm) y luego determinar si estas localizaciones coinciden. En la figura 50 se muestra el histograma obtenido donde se corrobora que el ABP-09 y el CRHR1 se encuentran mayormente colocalizados.

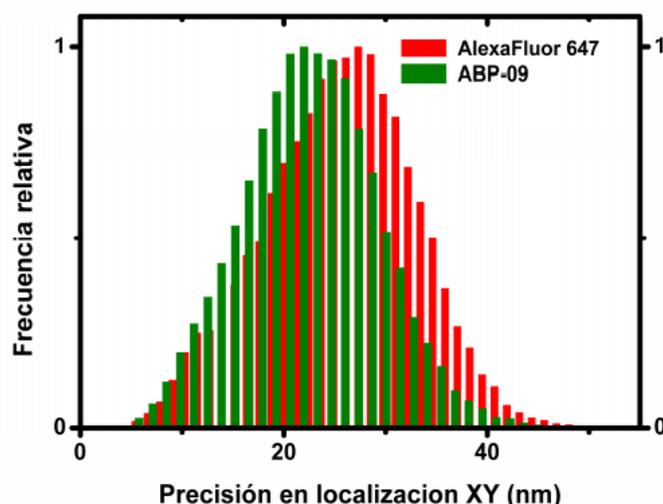


Figura 50: **Histograma de la precisión de localización para el ABP-09 y el CRHR1 en las células HT22-CRHR1.** Los valores de media y desvío estándar son 23 nm y 7 nm para el ABP-09, y 26 nm y 7 nm para CRHR1. El número de localizaciones que corresponden a una molécula tenidas en cuenta son 71324 (ABP-09) y 64284 (CRHR1).

Una vez confirmada la interacción entre ABP-09 y el CRHR1, decidimos estudiar si la molécula funcionaba como un antagonista de este receptor. Para demostrarlo, se decidió investigar la activación de diferentes efectores conocidos río debajo de la activación del CRHR1: AMPc, ERK1/2 y Akt. El primero se evaluó por medio de la técnica de FRET y tanto ERK1/2 como Akt, mediante *Western Blot*, siguiendo los mismos pasos que se han descrito previamente a lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral. En todos los casos, se comparó la acción del ABP-09 con el efecto del CP-376395, el antagonista comercial que se utilizó como ejemplo para la síntesis de esta nueva molécula.

Para el análisis de la generación de AMPc, se utilizaron las células HT22-CRHR1-Epac-S<sup>H187</sup>, las cuales expresan el sensor de AMPc de FRET de manera estable. Primero, luego de la preincubación de 20 horas con el ABP-09, se realizó el análisis de los espectros de emisión del sensor de FRET y del ABP-09 y se corroboró que era posible separarlos y cuantificar las variaciones del sensor sin que la emisión del ABP-09 interfiriera. Seguido, se estimuló con CRH 100 nM en el *time course* y se cuantificó la generación de AMPc. Cabe destacar que para el caso del CP-376395, también se realizó una preincubación de 20 horas para que la comparación fuera más acertada. Los resultados se resumen en la figura 51.

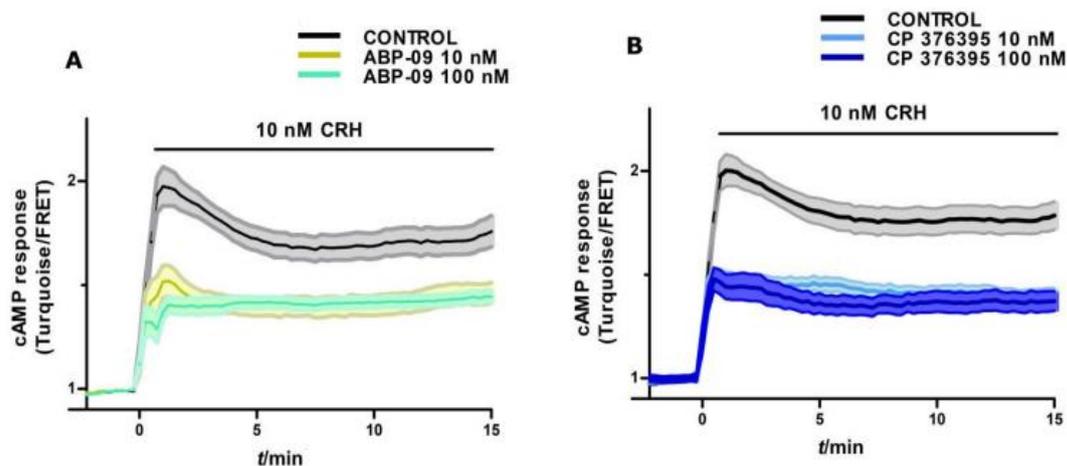


Figura 51: **Respuesta de AMPc luego del tratamiento con ABP-09 y CP-376395 en las células HT22-CRHR1-Epac-S<sup>H187</sup> estimuladas con CRH.** Las células se preincubaron durante 20 hs con ABP-09 (A) o CP-376395 (B) a las concentraciones indicadas. En el tiempo 0 se agregó el estímulo y se midió la generación de AMPc durante al menos 15 minutos. Datos: Media ± EMS, n=14-25 células.

Tanto el ABP-09 como el CP-346395 generaron una disminución aproximada del 50% de AMPc en células pretratadas con ABP-09. Este resultado nos indica que efectivamente nuestra molécula tiene actividad antagonista sobre el CRHR1. Finalmente, resultados similares se obtuvieron mediante la medición de la activación de ERK y Akt.

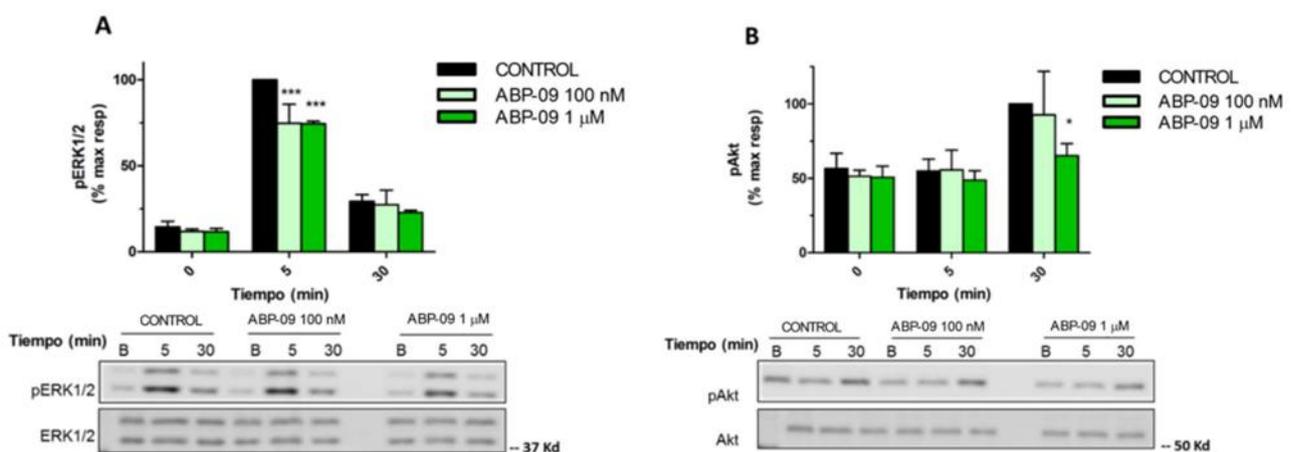


Figura 52: **Efecto de ABP-09 en la activación de ERK1/2 y de Akt en las células HT22-CRHR1 estimuladas con CRH.** Los niveles de las proteínas fosforiladas y de las proteínas totales, fueron determinados por *Western Blot* tras ser estimuladas con CRH 100 nM. En A se muestra el efecto sobre la activación de ERK1/2 y en B de Akt, luego de preincubar las células 20 horas con las concentraciones

indicadas de ABP-09. Datos: Media  $\pm$  EMS, n=3, \* p<0.05, \*\*\* p<0.001. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad (ANOVA de dos vías corregido por la prueba post hoc de Bonferroni).

En la figura 52 se observa que ABP-09 produce una disminución significativa en la activación de ambos efectores, lo que demuestra la función antagonista del ABP-09 sobre el CRHR1.

Este trabajo realizado en colaboración aporta una herramienta que podría ser extremadamente útil para el estudio del CRHR1, además la metodología empleada puede ser aplicada a cualquier otro GPCR que se haya cristalizado. La descripción realizada en la Tesis Doctoral del Dr. Szalai explica con detalles cómo analizar y seleccionar una sonda para realizar nanoscopía y consideramos este trabajo sumamente relevante ya que permite la visualización de la células en el orden molecular, esto es una ventaja a la marcación con anticuerpos ya que éstos suelen ser grandes y la amplificación que se produce durante la detección dificulta la observación a nivel de molécula única.

Este trabajo multidisciplinario fue comentado en Noticias del CONICET:

<https://www.conicet.gov.ar/dos-institutos-del-polo-cientifico-desarrollaron-una-nueva-molecula-de-interes-biomedico/>

# BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía

- Ahmed, N. N., Franke, T. F., Bellacosa, A., Datta, K., Gonzalez-Portal, M. E., Taguchi, T., Testa, J. R., & Tschlis, P. N. (1993). The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. *Oncogene*, 8(7), 1957–1963. <http://europepmc.org/abstract/MED/8510938>
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89(1), 121–145. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>
- Ali, F., Sreedharan, S., Ashoka, A. H., Saeed, H. K., Smythe, C. G. W., Thomas, J. A., & Das, A. (2017). A Super-Resolution Probe to Monitor HNO Levels in the Endoplasmic Reticulum of Cells. *Analytical Chemistry*, 89(22), 12087–12093. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02567>
- Allen, M. D., & Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), 716–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.136>
- Alon, T., Zhou, L., Pérez, C. A., Garfield, A. S., Friedman, J. M., & Heisler, L. K. (2009). Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the corticotropin-releasing hormone promoter. *Endocrinology*, 150(12), 5626–5632. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0881>
- Alonso, N., Diaz Nebreda, A., Monczor, F., Gutkind, J. S., Davio, C., Fernandez, N., & Shayo, C. (2016). PI3K pathway is involved in ERK signaling cascade activation by histamine H2R agonist in HEK293T cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(9), 1998–2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.016>
- Andrzej S., Blazej Z., Michal Z., Radomir ., Sobia K, J. W. & Desmond. J. T. (2007). Corticotropin releasing hormone and the skin. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11(1), 2230–2248. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Arbiser, J. L., Karalis, K., Viswanathan, A., Koike, C., Anand-apte, B., Flynn, E., Zetter, B., & Majzoub, J. A. (1999). *Corticotropin-releasing hormone stimulates angiogenesis and epithelial tumor growth in the skin*. 838–842.
- Bahrami, S., & Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in Biological Regulation*, 62(7491), 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.05.001>
- Barabás, F. (2017). Tesis Doctoral: *Nanoscopía de fluorescencia por localización estocástica de moléculas individuales Nanoscopía de fluorescencia por localización*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6197\\_Barabas](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6197_Barabas)
- Bellacosa, A., Kumar, C. C., Cristofano, A. Di, & Testa, J. R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*, 94(1 SUPPL.), 29–86. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(05\)94002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(05)94002-5)
- Benito, E., & Barco, A. (2010). CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in Neurosciences*, 33(5), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.001>
- Benito, E., & Barco, A. (2015). The Neuronal Activity-Driven Transcriptome. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 1071–1088. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8772-z>
- Bimboim, H. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1007/BF00429704>

- Bittencourt, J. C., & Sawchenko, P. E. (2000). Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: An analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *Journal of Neuroscience*, 20(3), 1142–1156. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-03-01142.2000>
- Blanco, E. H., Zúñiga, J. P., Andrés, M. E., Alvarez, A. R., & Gysling, K. (2011). Corticotropin-releasing factor binding protein enters the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells and cortical neurons. *Neuropeptides*, 45(4), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.05.002>
- Bonfiglio, J J, Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E., & Silberstein, S. (2011). The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology*, 94(1), 12–20. <https://doi.org/10.1159/000328226>
- Bonfiglio, J J, Inda, C., Senin, S., Maccarrone, G., Refojo, D., Giacomini, D., Turck, C. W., Holsboer, F., Arzt, E., & Silberstein, S. (2013). B-Raf and CRHR1 internalization mediate biphasic ERK1/2 activation by CRH in hippocampal HT22 Cells. *Mol Endocrinol*, 27(3), 491–510. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1359>
- Bonfiglio, Juan José. (2008). Tesis de Licenciatura: *Mecanismos moleculares de la hormona CRH a través de su receptor CRHR1*, Universidad de Buenos Aires
- Braun, T., & Dods, R. F. (1975). Development of a Mn<sup>2+</sup> sensitive, “soluble” adenylate cyclase in rat testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(3), 1097–1101. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.3.1097>
- Buck, J., Sinclair, M. L., Schapal, L., Cann, M. J., & Levin, L. R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 79–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.79>
- Buckinx, R., Adriaensen, D., Van Nassauw, L., & Timmermans, J. P. (2011). Corticotrophin-releasing factor, related peptides, and receptors in the normal and inflamed gastrointestinal tract. *Frontiers in Neuroscience*, 5(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00054>
- Butcher, R. W., & Sutherland, E. W. (1962). *Adenosine 3,5-Phosphate in Biological Materials*. 237(4), 1244–1251.
- Buxton, I. L. O., & Brunton, L. L. (1983). Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 258(17), 10233–10239.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., & Filbin, M. T. (2001). Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4731–4739. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-13-04731.2001>
- Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Gagliani, M. C., De Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., & Lohse, M. J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biology*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000172>
- Chalovich, J. M., & Eisenberg, E. (2005). NIH Public Access. *Biophysical Chemistry*, 257(5), 2432–2437. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>.Two-stage
- Chang, C. L., & Hsu, S. Y. T. (2004). Ancient evolution of stress-regulating peptides in vertebrates. *Peptides*, 25(10 SPEC. ISS.), 1681–1688. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.05.022>
- Chen, A. (2016). *Genetic Dissection of the Neuroendocrine and Behavioral Responses to Stressful Challenges* (Issue 617, pp. 69–79). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41603-8>
- Chen, A., Blount, A., Vaughan, J., Brar, B., & Vale, W. (2004). Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin

- and skeletal muscle tissues: Localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology*, 145(5), 2445–2457. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1570>
- Chen, A., Perrin, M., Brar, B., Li, C., Jamieson, P., DiGrucchio, M., Lewis, K., & Vale, W. (2005). Mouse Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 2 $\alpha$  Gene: Isolation, Distribution, Pharmacological Characterization and Regulation by Stress and Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology*, 19(2), 441–458. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0300>
- Chen, A., Vaughan, J., & Vale, W. W. (2003). Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: A putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Molecular Endocrinology*, 17(8), 1622–1639. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0054>
- Chen, Yanming, Sheng, H., Xu, Y., Zhang, Y., & Ni, X. (2012). Activation of CRHR2 exerts an inhibitory effect on the expression of collapsin response mediator protein 3 in hippocampal neurons. *Neuropeptides*, 46(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.12.004>
- Chen, Yanqiu, Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., & Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 289(5479), 625–628. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.625>
- Chen, Yuncai, Andres, A. L., Frotscher, M., & Baram, T. Z. (2012). Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: The CRH system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6(APRIL 2012), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00013>
- Choi, H. B., Gordon, G. R. J., Zhou, N., Tai, C., Rungta, R. L., Milner, T. A., Ryu, J. K., Mclarnon, J. G., Tresguerres, M., Levin, L. R., Buck, J., & Macvicar, B. A. (2012). Metabolic Communication between Astrocytes and Neurons via Bicarbonate-Responsive Soluble Adenylyl Cyclase. *Neuron*, 75(6), 1094–1104. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.032>. Metabolic
- Chong, Z.Z, Li, F., & Maiese, K. (2005). Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol*, 20(1), 299–315. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Cole, P. A., Chu, N., Salguero, A. L., & Bae, H. (2019). AKTivation mechanisms. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.004>
- Coltharp, C., & Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1808–1818. <https://doi.org/10.1111/cmi.12024>
- Cooper, D. M. F., & Tabbasum, V. G. (2014). Adenylate cyclase-centred microdomains. *Biochemical Journal*, 462(2), 199–213. <https://doi.org/10.1042/BJ20140560>
- Corredor, R. G., Trakhtenberg, E. F., Pita-Thomas, W., Jin, X., Hu, Y., & Goldberg, J. L. (2012). Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. *Journal of Neuroscience*, 32(22), 7734–7744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5288-11.2012>
- Coste, S. C., Kesterson, R. a, Heldwein, K. a, Stevens, S. L., Heard, a D., Hollis, J. H., Murray, S. E., Hill, J. K., Pantely, G. a, Hohimer, a R., Hatton, D. C., Phillips, T. J., Finn, D. a, Low, M. J., Rittenberg, M. B., Stenzel, P., & Stenzel-Poore, M. P. (2000). Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genetics*, 24(4), 403–409. <https://doi.org/10.1038/74255>
- Cummings, S., Elde, R., Ells, J., & Lindall, A. (1983). Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: An immunohistochemical study. *Journal of*

- Neuroscience*, 3(7), 1355–1368. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.03-07-01355.1983>
- Dautzenberg, F. M., & Hauger, R. L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: Yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(2), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)01946-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)01946-6)
- Deniz, E., Ray, S., Tomasulo, M., Impellizzeri, S., Sortino, S., & Raymo, F. M. (2010). Photoswitchable fluorescent dyads incorporating bodipy and [1,3]oxazine components. *Journal of Physical Chemistry A*, 114(43), 11567–11575. <https://doi.org/10.1021/jp107116d>
- Deussing, J. M., Breu, J., Kühne, C., Kallnik, M., Bunck, M., Glasl, L., Yen, Y. C., Schmidt, M. V., Zurmühlen, R., Vogl, A. M., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hölter, S. M., Wotjak, C. T., Landgraf, R., De Angelis, M. H., Holsboer, F., & Wurst, W. (2010). Urocortin 3 modulates social discrimination abilities via corticotropin-releasing hormone receptor type 2. *Journal of Neuroscience*, 30(27), 9103–9116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1049-10.2010>
- Deussing, J. M., & Chen, A. (2018). The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. *Physiological Reviews*, 98(4), 2225–2286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2017>
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007).  $\beta$ -Arrestins and Cell Signaling. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 483–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
- dos Santos Claro, P. A., Inda, C., Armando, N. G., Piazza, V. G., Attorresi, A., & Silberstein, S. (2019). Assessing real-time signaling and agonist-induced CRHR1 internalization by optical methods. *Methods in Cell Biology*, 149, 239–257. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.08.009>
- Douglas, H., & Robert, W. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Draws, J. (2000). Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287(5460), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1960>
- Dubé, C., Brunson, K., Nehlig, A., & Baram, T. Z. (2000). Activation of specific neuronal circuits by corticotropin releasing hormone as indicated by c-fos expression and glucose metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(10), 1414–1424. <https://doi.org/10.1097/00004647-200010000-00003>
- Dunn, H. A., Walther, C., Godin, C. M., Hall, R. A., & Ferguson, S. S. G. (2013). Role of SAP97 protein in the regulation of corticotropin-releasing factor receptor 1 endocytosis and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15023–15034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473660>
- Eichel, K., & von Zastrow, M. (2018). Subcellular Organization of GPCR Signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.009>
- Emery, A. C., Eiden, M. V., Mustafa, T., & Eiden, L. E. (2014). Activation in Neuronal and Endocrine Cells. *Science Signal*, 6(281). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003993>.Rapgef2
- English, E. J., Mahn, S. A., & Marchese, A. (2018). Endocytosis is required for CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4)-mediated Akt activation and antiapoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 293(29), 11470–11480. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001872>
- Evans, R. T., & Seasholtz, A. F. (2009). Soluble corticotropin-releasing hormone receptor 2a splice variant is

- efficiently translated but not trafficked for secretion. *Endocrinology*, 150(9), 4191–4202. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0285>
- Facci, L., Stevens, D. A., Pangallo, M., Franceschini, D., Skaper, S. D., & Strijbos, P. J. L. M. (2003). Corticotropin-releasing factor (CRF) and related peptides confer neuroprotection via type 1 CRF receptors. *Neuropharmacology*, 45(5), 623–636. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00211-9](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00211-9)
- Feinstein, T. N., Wehbi, V. L., Ardura, J. A., Wheeler, D. S., Ferrandon, S., Gardella, T. J., & Vilardaga, J. P. (2011). Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nature Chemical Biology*, 7(5), 278–284. <https://doi.org/10.1038/nchembio.545>
- Feinstein, T. N., Yui, N., Webber, M. J., Wehbi, V. L., Stevenson, H. P., King, J. D., Hallows, K. R., Brown, D., Bouley, R., & Vilardaga, J. P. (2013). Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 27849–27860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445098>
- Ferrandon, S., Feinstein, T. N., Castro, M., Wang, B., Potts, J. T., Gardella, T. J., & Vilardaga, J. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nature Chemical Biology*, 5(10), 734–742. <https://doi.org/10.1038/nchembio.206>
- Fleck, B. A., Hoare, S. R. J., Pick, R. R., Bradbury, M. J., & Grigoriadis, D. E. (2012). Binding kinetics redefine the antagonist pharmacology of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(2), 518–531. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.188714>
- Fuenzalida, J., Galaz, P., Araya, K. A., Slater, P. G., Blanco, E. H., Campusano, J. M., Ciruela, F., & Gysling, K. (2014). Dopamine D1 and corticotrophin-releasing hormone type-2a receptors assemble into functionally interacting complexes in living cells. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5650–5664. <https://doi.org/10.1111/bph.12868>
- García-Morales, V., Luaces-Regueira, M., & Campos-Toimil, M. (2017). The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 145, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.004>
- Godbole, A., Lyga, S., Lohse, M. J., & Calebiro, D. (2017). Internalized TSH receptors en route to the TGN induce local Gs-protein signaling and gene transcription. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00357-2>
- Gourcerol, G., Wu, S. V., Yuan, P., Pham, H., Miampamba, M., Larauche, M., Sanders, P., Amano, T., Mulak, A., Im, E., Pothoulakis, C., Rivier, J., Tach, Y., & Million, M. (2011). Activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 mediates the colonic motor coping response to acute stress in rodents. *Gastroenterology*, 140(5), 1586–1596. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.039>
- Grace, C. R. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., DiGrucchio, M. R., Cantle, J. P., Rivier, J. E., Vale, W. W., & Riek, R. (2007). Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 4858–4863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700682104>
- Grammatopoulos, D. K., & Chrousos, G. P. (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(10), 436–444. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00670-7](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00670-7)
- Grammatopoulos, D. K., Randeva, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A., & Hillhouse, E. W. (2001). Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: Evidence for receptor coupling to multiple G-

- proteins. *Journal of Neurochemistry*, 76(2), 509–519. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00067.x>
- Grammatopoulos, D. K., Randeve, H. S., Levine, M. A., Katsanou, E. S., & Hillhouse, E. W. (2000). Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: An effect mediated via R1 $\alpha$  and R2 $\beta$  CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Molecular Endocrinology*, 14(12), 2076–2091. <https://doi.org/10.1210/me.14.12.2076>
- Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., & Navarra, P. (2007). Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.006>
- Greenberg, M. E., Greene, L. A., & Ziff, E. B. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 260(26), 14101–14110.
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., & Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234(4772), 80–83. <https://doi.org/10.1126/science.3749894>
- Grewal, S. S., Fass, D. M., Yao, H., Ellig, C. L., Goodman, R. H., & Stork, P. J. S. (2000). Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap-1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34433–34441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004728200>
- Grewal, S. S., York, R. D., & Stork, P. J. S. (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(5), 544–553. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)00010-0)
- Grün, D., Lyubimova, A., Kester, L., Wiebrands, K., Basak, O., Sasaki, N., Clevers, H., & Van Oudenaarden, A. (2015). Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature*, 525(7568), 251–255. <https://doi.org/10.1038/nature14966>
- Gündüz, D., Troidl, C., Tanislav, C., Rohrbach, S., Hamm, C., & Aslam, M. (2019). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK Signalling in cAMP/Epac-Mediated Endothelial Barrier Stabilisation. *Frontiers in Physiology*, 10(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01387>
- Gutknecht, E., Hauger, R. L., Van Der Linden, I., Vauquelin, G., & Dautzenberg, F. M. (2008). Expression, binding, and signaling properties of CRF2(a) receptors endogenously expressed in human retinoblastoma Y79 cells: Passage-dependent regulation of functional receptors. *Journal of Neurochemistry*, 104(4), 926–936. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05052.x>
- Halm, S. T., Zhang, J., & Halm, D. R. (2010).  $\beta$ -Adrenergic activation of electrogenic K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> secretion in guinea pig distal colonic epithelium proceeds via separate cAMP signaling pathways. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(1). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00035.2010>
- Han, R., Li, Z., Fan, Y., & Jiang, Y. (2013). Recent Advances in Super-Resolution Fluorescence Imaging and Its Applications in Biology. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(12), 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.11.003>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Harada, S., Imaki, T., Naruse, M., Chikada, N., Nakajima, K., & Demura, H. (1999). Urocortin mRNA is expressed in the enteric nervous system of the rat. *Neuroscience Letters*, 267(2), 125–128.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00349-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00349-3)

- Hauger, R. L., Olivares-Reyes, J. A., Braun, S., Hernandez-Aranda, J., Hudson, C. C., Gutknecht, E., Dautzenberg, F. M., & Oakley, R. H. (2013). Desensitization of human CRF2(a) receptor signaling governed by agonist potency and beta-arrestin2 recruitment. *Regulatory Peptides*, 186, 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.06.009>
- Hauger, R. L., Risbrough, V., Brauns, O., & Dautzenberg, F. M. (2006). Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 5(4), 453–479. <https://doi.org/10.2174/187152706777950684>
- Heijne, G. von. (1992). Membrane Protein Structure Predictionm Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule. *Methods in Molecular Biology*, 453, 33–85. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6_2)
- Hein, B., Willig, K. I., Wurm, C. A., Westphal, V., Jakobs, S., & Hell, S. W. (2010). Stimulated emission depletion nanoscopy of living cells using SNAP-tag fusion proteins. *Biophysical Journal*, 98(1), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.053>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). The PI3k-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), 3–5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026609>
- Henckens, M., Printz, Y., Shamgar, U., Dine, J., Lebow, M., Drori, Y., Kuehne, C., Kolarz, A., Eder, M., Deussing, J., Justice, N., Yizhar, O., & Chen, A. (2016). CRF receptor type 2 neurons in the posterior bed nucleus of the stria terminalis critically contribute to stress recovery. *Molecular Psychiatry Advance Online Publication*, doi(10), 1–10. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.133>
- Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: Implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 27(3), 260–286. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0034>
- Hoffmann, R., Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., Yarwood, S. J., & Houslay, M. D. (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at ser579. *EMBO Journal*, 18(4), 893–903. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.893>
- Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K. Y., Doré, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., & Marshall, F. H. (2013). Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature*, 499(7459), 438–443. <https://doi.org/10.1038/nature12357>
- Holsboer, F., & Ising, M. (2010). Stress Hormone Regulation: Biological Role and Translation into Therapy. *Annual Review of Psychology*, 61(1), 81–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100321>
- Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). Opinion: The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 727–730.
- Hsu, S. Y., & Hsueh, A. J. W. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nature Medicine*, 7(5), 605–611. <https://doi.org/10.1038/87936>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Huising, M. O., Pilbrow, A. P., Matsumoto, M., Der Meulen, T. Van, Park, H., Vaughan, J. M., Lee, S., & Vale, W. W. (2011). Glucocorticoids differentially regulate the expression of CRFR1 and CRFR2α in MIN6 insulinoma cells and rodent islets. *Endocrinology*, 152(1), 138–150. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0791>

- Inda, C. (2017). Tesis Doctoral: *Caracterización de distintas fuentes de cAMP en la señalización del GPCR* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en la señalización del GPCR CRHR1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.
- Inda, C., Armando, N. G., dos Santos Claro, P. A., & Silberstein, S. (2017). Endocrinology and the brain: Corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocrine Connections*, 6(6), R99–R120. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0111>
- Inda, C., Bonfiglio, J. J., dos Santos Claro, P. A., Senin, S. A., Armando, N. G., Deussing, J. M., & Silberstein, S. (2017). cAMP-dependent cell differentiation triggered by activated CRHR1 in hippocampal neuronal cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02021-7>
- Inda, C., dos Santos Claro, P. A., Bonfiglio, J. J., Senin, S. A., Maccarrone, G., Turck, C. W., & Silberstein, S. (2016). Different cAMP sources are critically involved in G protein-coupled receptor CRHR1 signaling. *Journal of Cell Biology*, 214(2), 181–195. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512075>
- Irannejad, R., Tomshine, J. C., Tomshine, J. R., Chevalier, M., Mahoney, J. P., Steyaert, J., Rasmussen, S. G. F., Sunahara, R. K., El-samad, H., Huang, B., & Zastrow, M. (2013). Conformational biosensors reveal adrenoceptor signalling from endosomes. *Nature*, 495(7442), 534–538. <https://doi.org/10.1038/nature12000>.Conformational
- Irannejad, R., & Von Zastrow, M. (2014). GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 27(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.10.003>
- Itoi, K., Talukder, A. H., Fuse, T., Kaneko, T., Ozawa, R., Sato, T., Sugaya, T., Uchida, K., Yamazaki, M., Abe, M., Natsume, R., & Sakimura, K. (2014). Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins in the mouse brain and characterization of labeled neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 155(10), 4054–4060. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1182>
- Ivonne, P., Salathe, M., & Conner, G. E. (2015). Hydrogen peroxide stimulation of CFTR reveals an Epac-mediated, soluble AC-dependent cAMP amplification pathway common to GPCR signalling. *British Journal of Pharmacology*, 172(1), 173–184. <https://doi.org/10.1111/bph.12934>
- Jaiswal, B. S., & Conti, M. (2001). Identification and Functional Analysis of Splice Variants of the Germ Cell Soluble Adenylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31698–31708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011698200>
- Jin, L., Chen, J., Li, L., Li, C., Chen, C., & Li, S. (2014). CRH suppressed TGFβ1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition via induction of E-cadherin in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 26(4), 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.017>
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J., & Steegborn, C. (2006). Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *Journal of Molecular Biology*, 362(4), 623–639. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.045>
- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., & Graybiel, A. M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, 282(5397), 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2275>
- King, J. T., Yu, C., Wilson, W. L., & Granick, S. (2014). Super-resolution study of polymer mobility fluctuations near c\*. *ACS Nano*, 8(9), 8802–8809. <https://doi.org/10.1021/nn502856t>
- Kishimoto, T., Pearse, R. V., Lin, C. R., & Rosenfeld, M. G. (1995). A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 92(4), 1108–1112. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1108>
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., Van Batenburg, A., Groenewald, D., & Jalink, K. (2015). Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS ONE*, 10(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122513>
- Kleinboelting, S., Diaz, A., Moniot, S., Van Den Heuvel, J., Weyand, M., Levin, L. R., Buck, J., & Steegborn, C. (2014). Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10), 3727–3732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322778111>
- Kono, J., Konno, K., Talukder, A. H., Fuse, T., Abe, M., Uchida, K., Horio, S., Sakimura, K., Watanabe, M., & Itoi, K. (2017). Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Structure and Function*, 222(4), 1705–1732. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1303-0>
- Kostich, W. A., Chen, A., Sperle, K., & Largent, B. L. (2014). *Molecular Identification and Analysis of a Novel Human Corticotropin-Releasing Factor ( CRF ) Receptor : The CRF 2  $\beta$  Receptor*. October, 1077–1085.
- Kotowski, S. J., Woodward, H., Seif, T., Bonci, A., & Von Zastrow, M. (2011). Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron*, 71(2), 278–290. <https://doi.org/doi:10.1016/j.neuron.2011.05.036>
- Koutmani, Y., Gampierakis, I. A., Polissidis, A., Ximerakis, M., Koutsoudaki, P. N., Polyzos, A., Agrogiannis, G., Karaliota, S., Thomaidou, D., Rubin, L. L., Politis, P. K., & Karalis, K. P. (2019). CRH Promotes the Neurogenic Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Reports*, 29(4), 932-945.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.037>
- Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A. C., Hochbaum, D., Paez Pereda, M., Coso, O., Stalla, G., Holsboer Florian & Arzt, E. (2002). Activation and Induction of NUR77 / NURR1 in Corticotrophs by CRH / cAMP : Involvement of Calcium, Protein Kinase A, and MAPK Pathways. *Molecular Endocrinology*, 16(June), 1638–1651.
- Kozicz, T., Arimura, A., Maderdrut, J. L., & Lázár, G. (2002). Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the frog *Rana esculenta*. *Journal of Comparative Neurology*, 453(2), 185–198. <https://doi.org/10.1002/cne.10403>
- Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning and Memory*, 14(11), 758–770. <https://doi.org/10.1101/lm.698107>
- Kumari, P., Ghosh, E., & Shukla, A. K. (2015). Emerging Approaches to GPCR Ligand Screening for Drug Discovery. *Trends in Molecular Medicine*, 21(11), 687–701. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.09.002>
- Kuna, R. S., Girada, S. B., Asalla, S., Vallentyne, J., Maddika, S., Patterson, J. T., Smiley, D. L., DiMarchi, R. D., & Mitra, P. (2013). Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated endosomal cAMP generation promotes glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 305(2). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00551.2012>
- Landa, L. E., Harbeck, M., Kaihara, K., Chepurny, O., Kitiphongspattana, K., Graf, O., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Holz, G. G., & Roe, M. W. (2005). Interplay of Ca<sup>2+</sup> and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6  $\beta$ -cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31294–31302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505657200>
- Lawrence, M. C., Jivan, A., Shao, C., Duan, L., Goad, D., Zaganjor, E., Osborne, J., McGlynn, K., Stippec, S., Earnest, S., Chen, W., & Cobb, M. H. (2008). The roles of MAPKs in disease. *Cell Research*, 18(4), 436–442. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.37>

- Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T. M., Gulyas, J., Fischer, W., Bilezikjian, L., Rivier, J., Sawchenko, P. E., & Vale, W. W. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(13), 7570–7575. <https://doi.org/10.1073/pnas.121165198>
- Li, C., Chen, P., Vaughan, J., Blount, A., Chen, A., Jamieson, P. M., Rivier, J., Smith, M. S., & Vale, W. (2003). Urocortin III is expressed in pancreatic  $\beta$ -cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology*, *144*(7), 3216–3224. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0087>
- Li, J., Qi, D., Cheng, H., Hu, X., Miller, E. J., Wu, X., Russell, K. S., Mikush, N., Zhang, J., Xiao, L., Sherwin, R. S., & Young, L. H. (2013). Urocortin 2 autocrine/paracrine and pharmacologic effects to activate AMP-activated protein kinase in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(40), 16133–16138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312775110>
- Litvin, T. N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., & Levin, L. R. (2003). Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase: Synergism between calcium and bicarbonate. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(18), 15922–15926. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212475200>
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, *35*(4), 605–623. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Loudet, A., & Burgess, K. (2007). BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chemical Reviews*, *107*(11), 4891–4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>
- Lovejoy, D. A., Chang, B. S. W., Lovejoy, N. R., & del Castillo, J. (2014). Molecular evolution of GPCRs: CRH/CRH receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*, *52*(3). <https://doi.org/10.1530/JME-13-0238>
- Lovenberg, T. W., Chalmers, D. T., Liu, C., & De Souza, E. B. (1995). CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*, *136*(9), 4139–4142. <https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7544278>
- Magalhaes, A. C., Holmes, K. D., Dale, L. B., Comps-Agrar, L., Lee, D., Yadav, P. N., Drysdale, L., Poulter, M. O., Roth, B. L., Pin, J.-P., Anisma, H., & Ferguson, S. S. G. (2010). CRF Receptor1 regulates anxiety behaviour via sensitization of 5-HT2 receptor signaling. *Nature Neuroscience*, *13*(5), 622–629. <https://doi.org/10.1038/nn.2529.CRF>
- Majzoub, J. A., & Karalis, K. P. (1999). Placental corticotropin-releasing hormone: Function and regulation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *180*(1 III), 242–246. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70708-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70708-8)
- Maras, P. M., & Baram, T. Z. (2012). Sculpting the Hippocampus from within: Stress, spines and CRH. *Trends Neurosci.*, *35*(5), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.005.Sculpting>
- Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., & Grammatopoulos, D. K. (2008). Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *22*(3), 689–706. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0136>
- Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., & Grammatopoulos, D. K. (2011). Molecular determinants and feedback circuits regulating type 2 CRH receptor signal integration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1813*(5), 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.02.005>
- May, V., Lutz, E., MacKenzie, C., Schutz, K. C., Dozark, K., & Braas, K. M. (2010). Pituitary adenylyl cyclase-

- activating polypeptide (PACAP)/PAC 1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$  and vesicle endocytosis for neuronal survival. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9749–9761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043117>
- Mei, F. C., Qiao, J., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., Quilliam, L. A., & Cheng, X. (2002). Differential signaling of cyclic AMP. Opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11497–11504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110856200>
- Melzig, M. F. (1994). Corticotropin Releasing Factor Inhibits Proliferation of AtT-20. *In vitro Cell Dev Biol Anim.*, 3A(11), 741–743. <http://www.jstor.org/stable/4294321>
- Mercau, M. E., Astort, F., Giordanino, E. F., Martinez Calejman, C., Sanchez, R., Calderari, L., Repetto, E. M., Coso, O. A., & Cymering, C. B. (2014). Involvement of PI3K/Akt and p38 MAPK in the induction of COX-2 expression by bacterial lipopolysaccharide in murine adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 384(1–2), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.007>
- Merchenthaler, I., Vigh, S., Petrusz, P., & Schally, A. V. (1982). *Immunocytochemical Localization of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) in the Rat Brain*. 396, 385–396.
- Merriam, L. A., Baran, C. N., Girard, B. M., Hardwick, J. C., May, V., & Parsons, R. L. (2013). Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *Journal of Neuroscience*, 33(10), 4614–4622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4999-12.2013>
- Min, L., Soltis, K., Reis, A. C. S., Xu, S., Kuohung, W., Jain, M., Carroll, R. S., & Kaiser, U. B. (2014). Dynamic kisspeptin receptor trafficking modulates kisspeptin-mediated calcium signaling. *Molecular Endocrinology*, 28(1), 16–27. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1165>
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(JAN2016), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(18), 6682–6686. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.18.6682>
- Montminy, Marc R., & Bilezikjian, L. M. (1988). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, 328(6126), 175–178. <https://doi.org/10.1038/328175a0>
- Moore, C. A. C., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., & Seuwen, K. (2009). Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 428–434. <https://doi.org/10.1038/nchembio.173>
- Muramatsu, Y., Fukushima, K., Iino, K., Totsune, K., Takahashi, K., Suzuki, T., Hirasawa, G., Takeyama, J., Ito, M., Nose, M., Tashiro, A., Hongo, M., Oki, Y., Nagura, H., & Sasano, H. (2000). Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides*, 21(12), 1799–1809. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00335-1)
- On, J. S. W., Arokiaraj, A. W. R., & Chow, B. K. C. (2019). Molecular evolution of CRH and CRHR subfamily before the evolutionary origin of vertebrate. *Peptides*, 120(August 2018), 170087.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.014>

- Ozaita, A., Puighermanal, E., & Maldonado, R. (2007). Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *Journal of Neurochemistry*, *102*(4), 1105–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04642.x>
- Pal, K., Swaminathan, K., Xu, H. E., & Pioszak, A. A. (2010). Structural basis for hormone recognition by the human CRFR2?? G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(51), 40351–40361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186072>
- Parra-Mercado, G. K., Fuentes-Gonzalez, A. M., Hernandez-Aranda, J., Diaz-Coranguez, M., Dautzenberg, F. M., Catt, K. J., Hauger, R. L., & Olivares-Reyes, J. A. (2019). CRF1 Receptor Signaling via the ERK1/2-MAP and Akt Kinase Cascades: Roles of Src, EGF Receptor, and PI3-Kinase Mechanisms. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(December), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00869>
- Parrish Waters, R., Rivalan, M., Bangasser, D. A., Deussing, J. M., Ising, M., Wood, S. K., Holsboer, F., & Summers, C. H. (2015). Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, *58*, 63–78. <https://doi.org/doi:10.1016/j.neubiorev.2015.07.011>
- Patterson, S. L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K. C., Scanlin, H., Drake, C., & Kandel, E. R. (2001). Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*, *32*(1), 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00443-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00443-3)
- Pavlos, N. J., & Friedman, P. A. (2016). GPCR signaling and trafficking: the long and short of it. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *xx*, Ahead of print. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.10.007>
- Pioszak, A. A., Parker, N. R., Suino-Powell, K., & Xu, H. E. (2008). Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(47), 32900–32912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805749200>
- Pozzoli, G., De Simone, M. L., Cantalupo, E., Cenciarelli, C., Lisi, L., Boninsegna, A., Dello Russo, C., Sgambato, A., & Navarra, P. (2015). The activation of type 1 corticotropin releasing factor receptor (CRF-R1) inhibits proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells *in vitro* via p27<sup>Kip1</sup> protein up-regulation and c-Myc mRNA down-regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *412*, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.004>
- Rall, T., Sutherland, E. W., & Berthet, J. (1956). The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rasmussen, S. G. F., Devree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T. A., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skinotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., & Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the  $\beta$  2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, *477*(7366), 549–557. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
- Refojo, D., Echenique, C., Müller, M. B., Reul, J. M. H. M., Deussing, J. M., Wurst, W., Sillaber, I., Paez-Pereda, M., Holsboer, F., & Arzt, E. (2005). Corticotropin-releasing hormone activates ERK1/2 MAPK in specific brain areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(17), 6183–6188. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502070102>
- Refojo, D., Schweizer, M., Kuehne, C., Ehrenberg, S., Thoeringer, C., Vogl, A. M., Dedic, N., Schumacher, M., Von Wolff, G., Avrabos, C., Touma, C., Engblom, D., Schütz, G., Nave, K. A., Eder, M., Wotjak, C. T., Sillaber, I., Holsboer, F., Wurst, W., & Deussing, J. M. (2011). Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate

- anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. *Science*, 333(6051), 1903–1907. <https://doi.org/10.1126/science.1202107>
- Regev, L., & Baram, T. Z. (2014). Corticotropin Releasing Factor in Neuroplasticity. *Front. Neuroendocrinol.*, 35(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.001>.Corticotropin
- Reyes, T. M., Lewis, K., Perrin, M. H., Kunitake, K. S., Vaughan, J., Arias, C. A., Hogenesch, J. B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W. W., & Sawchenko, P. E. (2001). Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2843–2848. <https://doi.org/10.1073/pnas.051626398>
- Roisen, F. I., Murphy, R. A., Pichichero, M. E., & Braden, W. G. (1972). Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science*, 175(4017), 73–74. <https://doi.org/10.1126/science.175.4017.73>
- Romero, G., von Zastrow, M., & Friedman, P. A. (2011). Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling and function of GPCRs: Means, motif and opportunity. *Advances in Pharmacology*, 62, 279–314. <https://doi.org/doi:10.1016/B978-0-12-385952-5.00003-8>
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Rutz, C., Renner, A., Alken, M., Schulz, K., Beyermann, M., Wiesner, B., Rosenthal, W., & Schülein, R. (2006). The corticotropin-releasing factor receptor type 2a contains an N-terminal pseudo signal peptide. *J Biol Chem*, 281(34), 24910–24921. <https://doi.org/M601554200> [pii]n10.1074/jbc.M601554200
- Sakanaka, M., Shibasaki, T., & Lederis, K. (1987). Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. *Journal of Comparative Neurology*, 260(2), 256–298. <https://doi.org/10.1002/cne.902600209>
- Schiöth, H. B., & Lagerström, M. C. (2008). Structural diversity of g protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(4), 339–357. <https://doi.org/10.1038/nrd2518>
- Schulz, K., Rutz, C., Westendorf, C., Ridelis, I., Vogelbein, S., Furkert, J., Schmidt, A., Wiesner, B., & Schülein, R. (2010). The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 32878–32887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129627>
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*.
- Sheng, H., Xu, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Xu, X., He, C., & Ni, X. (2012). CRH-R1 and CRH-R2 differentially modulate dendritic outgrowth of hippocampal neurons. *Endocrine*, 41(3), 458–464. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9603-5>
- Sheng, H., Zhang, Y., Sun, J., Gao, L., Ma, B., Lu, J., & Ni, X. (2008). Corticotropin-releasing hormone (CRH) depresses N-methyl-D-aspartate receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons via CRH receptor type 1. *Endocrinology*, 149(3), 1389–1398. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1378>
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
- Shewan, D., Dwivedy, A., Anderson, R., & Holt, C. E. (2002). Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nature Neuroscience*, 5(10), 955–962. <https://doi.org/10.1038/nn919>

- Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G., & di Fiore, P. P. (2012). Endocytosis and signaling: Cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological Reviews*, 92(1), 273–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2011>
- Sigrist, S. J., & Sabatini, B. L. (2012). Optical super-resolution microscopy in neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.014>
- Slater, P. G., Yarur, H. E., & Gysling, K. (2016). Corticotropin-releasing factor receptors and their interacting proteins: functional consequences. *Molecular Pharmacology*, November, 1–30. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104927>
- Slater, P. G., Cerda, C. A., Pereira, L. A., Andrés, M. E., & Gysling, K. (2016). CRF binding protein facilitates the presence of CRF type 2 $\alpha$  receptor on the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(15), 4075–4080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523745113>
- Slater, P. G., Yarur, H. E., & Gysling, K. (2016). *Corticotropin-Releasing Factor Receptors and Their Interacting Proteins : Functional Consequences*. November, 627–632.
- Slessareva, J. E., Routt, S. M., Temple, B., Bankaitis, V. A., & Dohlman, H. G. (2006). Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Vps34 by a G Protein  $\alpha$  Subunit at the Endosome. *Cell*, 126(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.045>
- Smith, M. A., Kim, S. Y., Van Oers, H. J. J., & Levine, S. (1997). Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*, 138(11), 4622–4628. <https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5529>
- Spieß, J., Rivier, J., Rivier, C., & Vale, W. (1981). Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(10), 6517–6521. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6517>
- Steegborn, C., Litvin, T. N., Levin, L. R., Buck, J., & Wu, H. (2005). Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(1), 32–37. <https://doi.org/10.1038/nsmb880>
- Stiles, T. L., Kapiloff, M. S., & Goldberg, J. L. (2014). The role of soluble adenylyl cyclase in neurite outgrowth. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2561–2568. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.012>
- Stork, P. J. S., & Schmitt, J. M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 12(6), 258–266. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02294-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02294-8)
- Stuhr, L. E. B., Wei, E. T., & Reed, R. K. (2014). Corticotropin-releasing factor reduces tumor volume, halts further growth, and enhances the effect of chemotherapy in 4T1 mammary carcinoma in mice. *Tumor Biology*, 35(2), 1365–1370. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1186-0>
- Sugiyama, M. G., Fairn, G. D., & Antonescu, C. N. (2019). Akt-ing up just about everywhere: Compartment-specific Akt activation and function in receptor tyrosine kinase signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(APR), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00070>
- Sutherland, E. W., & Rall, T. (1958). Fractionation and characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide formed by tissue particles. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sutherland, E. W., Rall, T., & Menon, T. (1962). Adenyl Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(4),

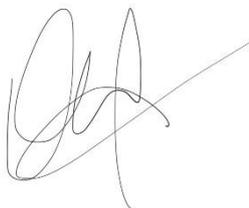
1220–1227.

- Szalai, A. M. (2018). Tesis Doctoral *Sondas fluorescentes para marcación y localización de proteínas en microscopías de súper resolución*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6391\\_Szalai](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6391_Szalai)
- Szalai, A. M., Armando, N. G., Barabas, F. M., Stefani, F. D., Giordano, L., Bari, S. E., Cavasotto, C. N., Silberstein, S., & Aramendía, P. F. (2018). A fluorescence nanoscopy marker for corticotropin-releasing hormone type 1 receptor: Computer design, synthesis, signaling effects, super-resolved fluorescence imaging, and: In situ affinity constant in cells. In *Physical Chemistry Chemical Physics* (Vol. 20, Issue 46, pp. 29212–29220). <https://doi.org/10.1039/c8cp06196c>
- Tanaka, Y., Makino, S., Noguchi, T., Tamura, K., Kaneda, T., & Hashimoto, K. (2003). Effect of stress and adrenalectomy on urocortin II mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, *78*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1159/000071700>
- Tartaglia, M., & Gelb, B. (2010). *Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms*. 99–121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05790.x>. Disorders
- Teichmann, A., Rutz, C., Kreuchwig, A., Krause, G., Wiesner, B., & Schüle, R. (2012). The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2A prevents receptor oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(32), 27265–27274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360594>
- Teli, T., Markovic, D., Levine, M. A., Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. K. (2005). *Regulation of Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Type 1 Signaling: Structural Determinants for G Protein-Coupled Receptor*. *19*(2), 474–490. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0275>
- Testa, J. R., & Tschlis, P. N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*, *24*(50), 7391–7393. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209100>
- Tomita, H., Ziegler, M. E., Kim, H. B., Evans, S. J., Choudary, P. V., Li, J. Z., Meng, F., Dai, M., Myers, R. M., Neal, C. R., Speed, T. P., Barchas, J. D., Schatzberg, A. F., Watson, S. J., Akil, H., Jones, E. G., Bunney, W. E., & Vawter, M. P. (2013). G protein-linked signaling pathways in bipolar and major depressive disorders. *Frontiers in Genetics*, *4*(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00297>
- Tresguerres, M., Levin, L. R., & Buck, J. (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney International*, *79*(12), 1277–1288. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.95>
- Tsvetanova, N. G., & von Zastrow, M. (2014). Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. *Nature Chemical Biology*, *10*(12), 1061–1065. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1665>
- Ulrich, G., Ziesel, R., & Harriman, A. (2008). The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angewandte Chemie - International Edition*, *47*(7), 1184–1201. <https://doi.org/10.1002/anie.200702070>
- Valdenaire, O., Giller, T., Brey, V., Gottowik, J., & Kilpatrick, G. (1997). A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1352*(2), 129–132. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00047-X)
- Van Kolen, K., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E., & Peeters, P. J. (2010). Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology*, *58*(1), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.022>
- Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P., & Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation:

- Making the right connections. *Science*, 296(5573), 1648–1649. <https://doi.org/10.1126/science.1071552>
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A.V., Lovejoy, D., & Rivier, C. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*, 378, 703–706.
- Vilardaga, J. P., Jean-Alphonse, F. G., & Gardella, T. J. (2014). Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nature Chemical Biology*, 10(9), 700–706. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1611>
- Vogt Weisenhorn, D. M., Roback, L. J., Kwon, J. H., & Wainer, B. H. (2001). Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage. *Experimental Neurology*, 169(1), 44–55. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7651>
- Von Zastrow, M., & Kobilka, B. K. (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta$ 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3530–3538.
- Wang, H., Xu, J., Lazarovici, P., Quirion, R., & Zheng, W. (2018). cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00255>
- Wang, Y., Chen, Z., Zhuang, Q., Zhang, X., Wang, Y., Chen, Z., Zhuang, Q., Zhang, X., Li, H., & Wang, J. (2017). Role of Corticotropin-Releasing Factor in Cerebellar Motor Control and Ataxia Report Role of Corticotropin-Releasing Factor in Cerebellar Motor Control and Ataxia. *Current Biology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.035>
- Waselus, M., Nazzaro, C., Valentino, R. J., Dantzer, R., Connor, J. C. O., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2010). *NIH Public Access*. 66(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2009.02.014>. Stress-induced
- Weinberg, Z. Y., & Puthenveedu, M. A. (2019). Regulation of G protein-coupled receptor signaling by plasma membrane organization and endocytosis. *Traffic*, 20(2), 121–129. <https://doi.org/10.1111/tra.12628>
- Westphal, N. J., & Seasholtz, A. F. (2006). CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11(November), 1878–1891. <https://doi.org/10.2741/1931>
- Westphal, V., Rizzoli, S. O., Lauterbach, M. A., Kamin, D., Jahn, R., & Hell, S. W. (2008). Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 320(5873), 246–249. <https://doi.org/10.1126/science.1154228>
- Willoughby, D., & Cooper, D. M. F. (2007). Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews*, 87(3), 965–1010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>
- Wooten, D., Miller, L. J., Koole, C., Christopoulos, A., & Sexton, P. M. (2017). Allostery and Biased Agonism at Class B G Protein-Coupled Receptors. *Chemical Reviews*, [acs.chemrev.6b00049](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00049). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00049>
- Wu, Y. K., Zippin, J.H., Huron, D.R., Kamenetsky, M., Hengst, U., Buck, J., Levin, L.R., & Jaffrey, S.R. (2006). Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1257–1264. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Yang, S., Liu, W., Wen, J., Zhu, M., & Xu, S. (2013). Corticotropin releasing hormone is correlated with tumorigenesis of gastric cancer. *Cancer Investigation*, 31(3), 167–171.

<https://doi.org/10.3109/07357907.2013.771269>

- Yarur, H. E., González, M. P., Verbel-Vergara, D., Andrés, M. E., & Gysling, K. (2020). Cross-talk between dopamine D1 and corticotropin releasing factor type 2 receptors leads to occlusion of their ERK1/2 signaling. *Journal of Neurochemistry*, July 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jnc.15016>
- Zaccolo, M., Zerio, A., & Lobo, M. J. (2021). Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. *Pharmacological Reviews*, 73(1), 278–309. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000086>
- Zanassi, P., Paolillo, M., Feliciello, A., Avvedimento, E. V., Gallo, V., & Schinelli, S. (2001). cAMP-dependent Protein Kinase Induces cAMP-response Element-binding Protein Phosphorylation via an Intracellular Calcium Release/ERK-dependent Pathway in Striatal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11487–11495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007631200>
- Zhang, Y., Swaminathan, S., Tang, S., Garcia-Amorós, J., Boulina, M., Captain, B., Baker, J. D., & Raymo, F. M. (2015). Photoactivatable BODIPYs Designed to Monitor the Dynamics of Supramolecular Nanocarriers. *Journal of the American Chemical Society*, 137(14), 4709–4719. <https://doi.org/10.1021/ja5125308>
- Zhou, J., Du, T., Li, B., Rong, Y., Verkhatsky, A., & Peng, L. (2015). Crosstalk between MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways during brain ischemia/reperfusion. *ASN Neuro*, 7(5). <https://doi.org/10.1177/1759091415602463>



Natalia Giannina Armando

Autora



Susana Silberstein

Directora