



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Determinantes estructurales del receptor tipo 1 para el factor liberador  
de corticotropinas en la activación de las MAP Cinzas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MÓNICA DÍAZ CORÁNGUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

TUTOR: DR. JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*En esta tesis no hay dos años de trabajo, sino veintitrés años de mi vida. Por lo tanto, se la dedico a las personas que amo en el mundo, porque siempre las llevo en mi corazón.*

*A mis padres:*

*Ma. de los Angeles Coránquez Jácome  
y José de Jesús Díaz Ruíz*

*Quienes han puesto todo su esfuerzo en darme una educación integral. Gracias papis por todo el cariño que me brindan siempre porque es el mejor impulso que puedo tener para seguir adelante.*

*A mis hermanos:*

*Ma. de los Angeles Díaz Coránquez  
y José Díaz Coránquez*

*Porque de ellos también he aprendido cómo ser mejor persona.  
Gracias por caminar siempre de la mano conmigo.*

*A mi amigo y compañero de toda la vida:*

*P. Damián López Alvarado*

*Porque siempre ha estado a mi lado apoyándome en todo.  
Gracias por crecer conmigo, especialmente por todos los días  
de logros, de risas y de llantos que compartimos.*



---

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis fue realizada bajo la tutoría del **Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes**, a quien agradezco la oportunidad de trabajar por primera vez para contribuir al desarrollo de la ciencia en México.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el **CONACYT: 38495-Q** y se realizó en el **Laboratorio 17 del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN**, con el apoyo técnico de: **Judith Hernández Aranda y Patricia**

Mis mayores agradecimientos a mis sinodales, que conforman uno de los mejores grupos de "Transducción de Señales" en México:

**Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Dra. Claudia González Espinosa, Dra. Guadalupe Reyes Cruz y Dra. Marina Macías Silva.**

Primordialmente, a mi tutor: **Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes.**

Mil gracias por la confianza, el apoyo y la formación que me otorgó en todo este tiempo. Siempre llevaré a la práctica todas las cosas que he aprendido con usted.

Agradezco también a la máxima casa de estudios:

**Universidad Nacional Autónoma de México**

Específicamente a la: **Facultad de Ciencias**

Porque me albergó durante todo el tiempo de mi formación como Bióloga. Haré todo lo que esté en mis manos para poner su nombre en alto.

De manera especial, agradezco:

### **A todos mis maestros**

De la Preparatoria 6 y de la Facultad de Ciencias.

Porque siempre confiaron en mí para poner su conocimiento en mis manos. Muchas gracias por enriquecer mi pequeña cabeza.

### **A todos mis amigos.**

Que siempre han estado conmigo a pesar de todo. Con los que estudiaba, y con los que me divertía. Gracias por los momentos tan gratos de compañía en los que muchos solían compartir mis desvelos.

---

---

*Cinco minutos bastan para soñar toda  
una vida, así de relativo es el tiempo.*

*Mario Benedetti*

---

---

# INDICE

	Página
<b>I. Resumen</b> .....	1
<b>II. Introducción</b> .....	2
2.1 Respuesta fisiológica ante estrés .....	2
2.2 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal .....	3
2.3 El Factor Liberador de Corticotropinas o CRF .....	4
2.4 Receptores para CRF: CRF <sub>1</sub> y CRF <sub>2</sub> .....	6
2.5 Estructura del receptor CRF <sub>1</sub> .....	9
2.6 Vías de Señalización activadas por el receptor CRF <sub>1</sub> .....	11
a) Acoplamiento de Gs/AC/PKA .....	12
b) Acoplamiento de Gq/PLC/PKC .....	13
2.7 Mecanismo de Desensibilización e Internalización del Receptor ..	13
2.8 $\beta$ -Arrestinas .....	15
2.9 Transactivación de Receptores con actividad de cinasa de tirosina	20
<b>III. Antecedentes</b> .....	25
<b>IV. Hipótesis</b> .....	30
<b>V. Objetivos</b> .....	31
<b>VI. Materiales y Métodos</b> .....	32
6.1 Cultivo celular .....	32
6.2 Transfección .....	32
6.3 Cotransfección .....	34
a) $\beta$ -arrestina 1 y 2	
b) GRKs 3 y 5	
c) DN-Dyn-I	
6.4 Ensayo con Inhibidores de Internalización .....	35
6.5 Detección de proteínas por Western Blot .....	35
• fosfo-ERK 1/2.	
• ERK 2 total.	
• $\beta$ -Arrestina2	
• FLAG	
• GRKs 3 y 5	
• Dyn-I	

---

---

6.6 Análisis de Resultados .....	36
<b>VII. Resultados</b> .....	37
a) La tercera asa intracelular (IC3) y la cola carboxílica del receptor CRF <sub>1</sub> son sitios importantes para regular la activación de las ERK1/2 inducida por CRF. ....	37
b) La sobre-expresión de la $\beta$ -arrestina2, pero no la $\beta$ -arrestina1, aumenta la fosforilación de las ERK1/2 .....	45
c) La activación de las ERK 1/2 inducida por CRF es independiente de la sobre-expresión de GRKs 3 y 5 del receptor CRF <sub>1</sub> .....	48
d) La activación de las ERK1/2 mediada por CRF es dependiente de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> .....	50
<b>VIII. Discusión</b> .....	59
<b>IX. Conclusiones</b> .....	67
<b>X. Bibliografía</b> .....	68

---

---

# FIGURAS

	Página
1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal . . . . .	4
2. Representación esquemática del prototipo de la familia B de los GPCRs. . . . .	7
3. Tipos 1 y 2 del receptor para CRF . . . . .	8
4. Isoformas generadas por “splicing alternativo” en el receptor CRF <sub>1</sub> . . . . .	10
5. Estructura del receptor CRF <sub>1</sub> en humanos . . . . .	11
6. Vías de señalización del receptor CRF <sub>1</sub> mediadas por las proteínas Gs y Gq . . . . .	12
7. Mecanismos de regulación del receptor CRF <sub>1</sub> . . . . .	14
8. Esquema representativo de la estructura de las β-arrestinas 1 y 2. . . . .	16
9. Papel de las β-arrestinas en la desensibilización, secuestro y tráfico intracelular de los GPCRs de clase A y B. . . . .	17
10. Modificaciones estructurales que sufren las β-arrestinas al interactuar con un GPCR activado por su ligando y fosforilado por GRKs. . . . .	19
11. Cascadas de MAPK en mamíferos. . . . .	21
12. Cascada de señalización de las Mapas (Mitogen Activated Protein Kinases). . . . .	21
13. Transactivación del receptor de EGF a partir de un GPCR. . . . .	23
14. Papel de la metaloproteasa (MMP) en la transactivación del EGF. . . . .	24
15. Representación esquemática del modelo propuesto en células COS-7, en donde el agonista CRF al unirse al receptor CRF <sub>1</sub> activa la cascada de señalización de las ERK 1/2. . . . .	27
16. Participación del complejo βγ en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por el receptor de CRF y EGF. . . . .	28
17. Células COS-7. . . . .	32
18. Región intracelular del receptor CRF <sub>1</sub> . . . . .	34
19. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF <sub>1</sub> WT y receptores CRF <sub>1</sub> Δ412. . . . .	39
• Estructura de la cola carboxílica del receptor	
• Curso temporal con los receptores: CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> Δ412	
20. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF <sub>1</sub> WT y receptores CRF <sub>1</sub> Δ412. . . . .	40
• Ensayo dosis-dependiente con los receptores: CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> Δ412	
21. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF <sub>1</sub> WT y receptores CRF <sub>1</sub> Δ386. . . . .	41
• Estructura de la cola carboxílica del receptor	
• Curso temporal con los receptores: CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> Δ386	

---

---

22. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF <sub>1</sub> WT y receptores CRF <sub>1</sub> Δ386. ....	42
• Ensayo dosis-dependiente con los receptores: CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> Δ386	
23. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> IC3-WT. ....	43
• Estructura de la tercer asa intracelular	
• Curso temporal con los receptores: CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> IC3-WT	
24. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> IC3-Δ386. ....	44
• Curso temporal con los receptores: CRF <sub>1</sub> WT y CRF <sub>1</sub> IC3-Δ386	
25. Papel de la sobre-expresión de la β-arrestina1 en la activación de ERK 1/2 mediada por CRF. ....	46
• Sobre-expresión de las β-arrestinas 1 y 2	
• Curso temporal con CRF <sub>1</sub> WT + β-arrestina1	
26. Papel de la sobre-expresión de la β-arrestina2 en la activación de ERK 1/2 mediada por CRF. ....	47
• Curso temporal con CRF <sub>1</sub> WT + β-arrestina2	
27. Papel de la sobre-expresión de GRKs 3 y 5 en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF. ....	49
28. Papel de la internalización del receptor EGF mediada por clatrin en la activación de ERK 1/2 por EGF. ....	51
29. Papel de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> WT mediada por clatrin en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF. ....	52
• Efecto de la Sacarosa en curso temporal de 30 min.	
30. Papel de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> WT mediada por clatrin en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF. ....	53
• Efecto de la Sacarosa en curso temporal de 120 min.	
31. Papel de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> WT mediada por clatrin en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF. ....	55
• Efecto de Sacarosa y PAO	
32. Papel de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> en la activación de ERK 1/2 mediada por CRF. ....	56
• Sobre-expresión de la DN-Dyn-I	
• Efecto mediado por CRF	
33. Papel de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> en la activación de ERK 1/2 mediada por UCN-I. ....	57
• Efecto mediado por UCN-I	
34. Papel de la internalización del receptor CRF <sub>1</sub> WT mediada por caveolas en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF. ....	58
35. Modelo de activación de la vía de las ERK 1/2 a través de CRF: Mecanismo mediado por β-arrestina2. ....	66

---

---

## TABLAS

	Página
1. <i>Efectos del CRF en el Sistema Nervioso Central y en algunos sistemas fisiológicos: actividad normal y desórdenes causados por hipersecreción .</i>	6
2. <i>Proteínas de unión a <math>\beta</math>-arrestinas 1 y 2, y sus efectos ocasionados por la formación del complejo. ....</i>	18
3. <i>Lista de anticuerpos primarios y secundarios . ....</i>	36

---

---

## ABREVIATURAS

$\alpha_2$ AR	Receptor $\alpha_2$ Adrenérgico
AC	Adenil Ciclasa
AT <sub>1A</sub>	Receptor tipo 1A para Angiotensina II
CRF	Factor Liberador de Corticotropinas (del inglés <i>Corticotropin Releasing Factor</i> )
CRF <sub>1</sub> $\Delta$ 386	Receptor tipo 1 para el factor liberador de corticotropinas deletado en la Ser386
CRF <sub>1</sub> $\Delta$ 412	Receptor tipo 1 para el factor liberador de corticotropinas deletado en la Ser412
CRF <sub>1</sub> IC3- $\Delta$ 386	Receptor tipo 1 para el factor liberador de corticotropinas deletado en la Ser386 y con mutagénesis puntual en IC3
CRF <sub>1</sub> IC3-WT	Receptor tipo 1 para el factor liberador de corticotropinas con mutagénesis puntual en IC3
CRF <sub>1</sub> WT	Receptor tipo 1 para el factor liberador de corticotropinas
CRF <sub>2</sub>	Receptor tipo 2 para el factor liberador de corticotropinas
C-terminal	Extremo Carboxilo-terminal
DN-Dyn-I	Dominante Negativa de Dinamina-I
Dyn	Dinamina-I
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i> )
ERK 1/2	Cinasas Reguladoras de Señales Extracelulares 1 y 2 (del inglés <i>Extracellular Signal Regulated Kinases 1 y 2</i> )
GPCR	Receptor Acoplado a Proteínas G (del inglés <i>G Protein-Coupled Receptor</i> )
GRK	Cinasas de Receptores Acoplados a Proteínas G (del inglés <i>G Protein-Coupled Receptor Kinases</i> )
HPA	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal (del inglés <i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis</i> )
IC3	Tercer asa intracelular (del inglés <i>Third Intra-Cellular Loop</i> )
MAPK	Cinasa de Proteínas Activadas por Mitógenos (del inglés <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )

---

---

<b>PAO</b>	Oxofenilarsina (del inglés <i>Oxophenylarsine</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa
<b>PKA</b>	Proteína Cinasa A (del inglés <i>Protein Kinase A</i> )
<b>PKC</b>	Proteína Cinasa C (del inglés <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PTHr</b>	Receptor para la Hormona Paratiroidea (del inglés <i>Parathyroid Hormone Receptor</i> )
<b>RTK</b>	Receptores con actividad de cinasa de tirosina (del inglés <i>Tyrosin Kinases Receptors</i> )
<b>UCN I, II y III</b>	Urocortina I, II y III
<b><math>\beta_2</math>AR</b>	Receptor $\beta_2$ adrenérgico
<b><math>\beta</math>arr1</b>	$\beta$ -arrestina1
<b><math>\beta</math>arr2</b>	$\beta$ -arrestina2

**Palabras clave:** estrés, CRF, receptor CRF<sub>1</sub>, sitios de regulación,  $\beta$ -arrestinas, GRKs, internalización, transactivación, receptor para EGF, ERK 1/2.

---

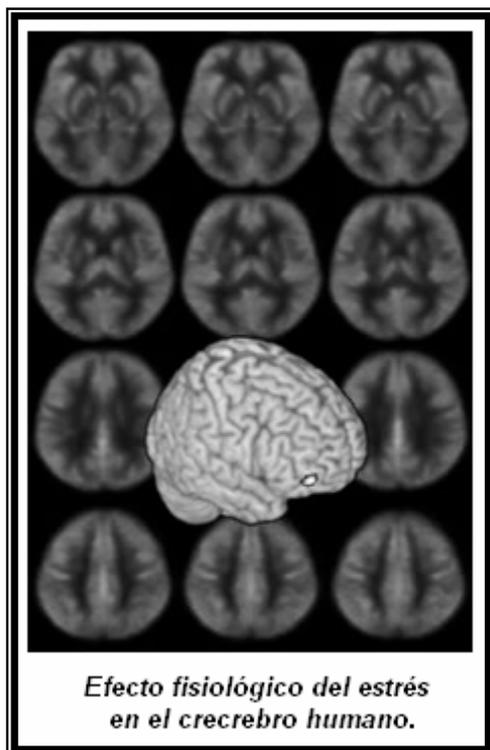
---

## I. RESUMEN

El receptor CRF<sub>1</sub> pertenece a la superfamilia de los GPCRs. Su activación normal se lleva a cabo en cerebro, glándulas suprarrenales, gónadas, tracto digestivo, placenta y tejidos donde se presenta inflamación. Sin embargo, cuando este receptor se encuentra sobre-expresado en órganos como el corazón y el cerebro, puede causar desórdenes como hipertensión y ansiedad. Recientemente se encontró que estos receptores tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular mediante la activación de la vía de las MAPKs. Algunos estudios sugieren que las  $\beta$ -arrestinas, proteínas de regulación de los GPCRs, pueden también funcionar como proteínas transductoras alternativas de la señalización de estos receptores, al formar complejos con otras proteínas como Src, Raf, MEK. Además, dado que la  $\beta$ -arr promueve la internalización del receptor, fosforilado por GRKs, la internalización y estas cinasas podrían tener un papel importante en la activación de vías proliferativas. Se ha demostrado también que el receptor CRF<sub>1</sub> puede activar la vía de MAPKs, en especial a las ERK1/2, por lo que el presente trabajo tiene como objetivos: estudiar el papel de los determinantes estructurales del receptor CRF<sub>1</sub>, estudiar la posible participación de proteínas de regulación como las  $\beta$ -arrestinas y las GRKs 3 y 5, y determinar el papel de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> en la activación ERK1/2 mediada por CRF. Para ello, células COS-7 se transfectaron con los receptores: CRF<sub>1</sub> WT, dos receptores deletados en el extremo C-terminal: CRF<sub>1</sub>- $\Delta$ 386 y CRF<sub>1</sub>- $\Delta$ 412, y dos con mutagénesis puntual en residuos de Ser/Thr de IC3: CRF<sub>1</sub> IC3-WT y CRF<sub>1</sub> IC3- $\Delta$ 386. Se encontró que la ausencia de estos residuos de manera independiente, no modifica la activación de las ERK 1/2; en cambio, cuando se eliminan en la mutante IC3- $\Delta$ 386, la fosforilación de estas cinasas se modifica de manera significativa. Como estos dominios son importantes para la interacción con las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2, células COS-7 fueron cotransfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> WT e individualmente con las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 y se encontró que la sobre-expresión de la  $\beta$ -arr2 aumenta de manera significativa la activación de las ERK 1/2. Además se evaluó el papel de la sobre-expresión de las GRKs 3 y 5 en la activación de las ERK 1/2 y de manera interesante observamos que esta condición no modifica de manera significativa la activación de las ERK 1/2. Esto sugiere que estas isoformas de GRK no se encuentran involucradas en la activación de las ERK 1/2. Finalmente se determinó si la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> es requerida para la activación de las ERK1/2, empleando para ello varios inhibidores de la internalización: sacarosa y oxofenilarsina (vesículas recubiertas de clatrina), la  $\beta$ -ciclodextrina (formación de caveolas) y la sobre-expresión de una dominante negativa de Dyn-I. En todos los casos, se observó una disminución de la activación de las ERK1/2 inducida por CRF, lo cual nos sugiere que el receptor CRF<sub>1</sub> requiere ser internalizado para llevar a la activación de las ERK1/2.

---

## II. INTRODUCCIÓN



### 2.1 Respuesta Fisiológica ante el Estrés.

Mantener un estado homeostático es esencial para la vida; sin embargo, las condiciones ambientales tienden a modificar ese equilibrio. Hans Selye en 1946 observó que determinados estímulos ambientales provocaban una respuesta de adaptación similar en las personas. Quienes no lograban adaptarse, desarrollaban “enfermedades de adaptación” (Goldstein y Kopin 2007).

En base a esto, Selye introduce el concepto de *estrés* como el síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes nocivos del ambiente, ya sean de naturaleza física o química.

No obstante, este concepto se ha modificado debido a que las demandas ambientales que percibimos actualmente son diferentes.

Al día de hoy, el estrés se considera como una discrepancia entre la percepción de un estímulo y los mecanismos que pueden dar respuesta a las demandas ambientales (Goldstein y Kopin 2007).

Ante la presencia constante de factores estresantes, los organismos desencadenan una serie de reacciones fisiológicas con las cuales trata de recuperar el estado homeostático inicial. Estas respuestas adaptativas afectan tanto al comportamiento de los organismos, como a las funciones viscerales de los sistemas: nervioso autónomo, endocrino e inmune. (Taché y Bonaz 2007, Tsigos y Chrousos 2002, Charmandari *et al.* 2005).

Dentro de las respuestas reguladas por el sistema endocrino, se encuentra la secreción de diversas hormonas que se producen en el cerebro, principalmente en el hipotálamo. Cuando estas secreciones son transportadas a través de la sangre, excitan, inhiben o regulan la actividad de algunos órganos, o bien, tienen un efecto sobre el mismo sistema nervioso o en los tejidos de la periferia.

El eje que participa mayoritariamente en las respuestas ante estrés es el eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal (Tsigos y Chrousos 2002, Arborelius *et al.* 1999, Chrousos y Gold 1992).

---

## 2.2 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal.

El cerebro, mediante sus receptores sensitivos percibe cuando el organismo se encuentra ante una condición de estrés, y como consecuencia de ello, manda señales químicas desde el hipocampo para que se pueda activar al eje Hipotálamo-Pituitaria-Suprarrenal o HPA (del inglés *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*).

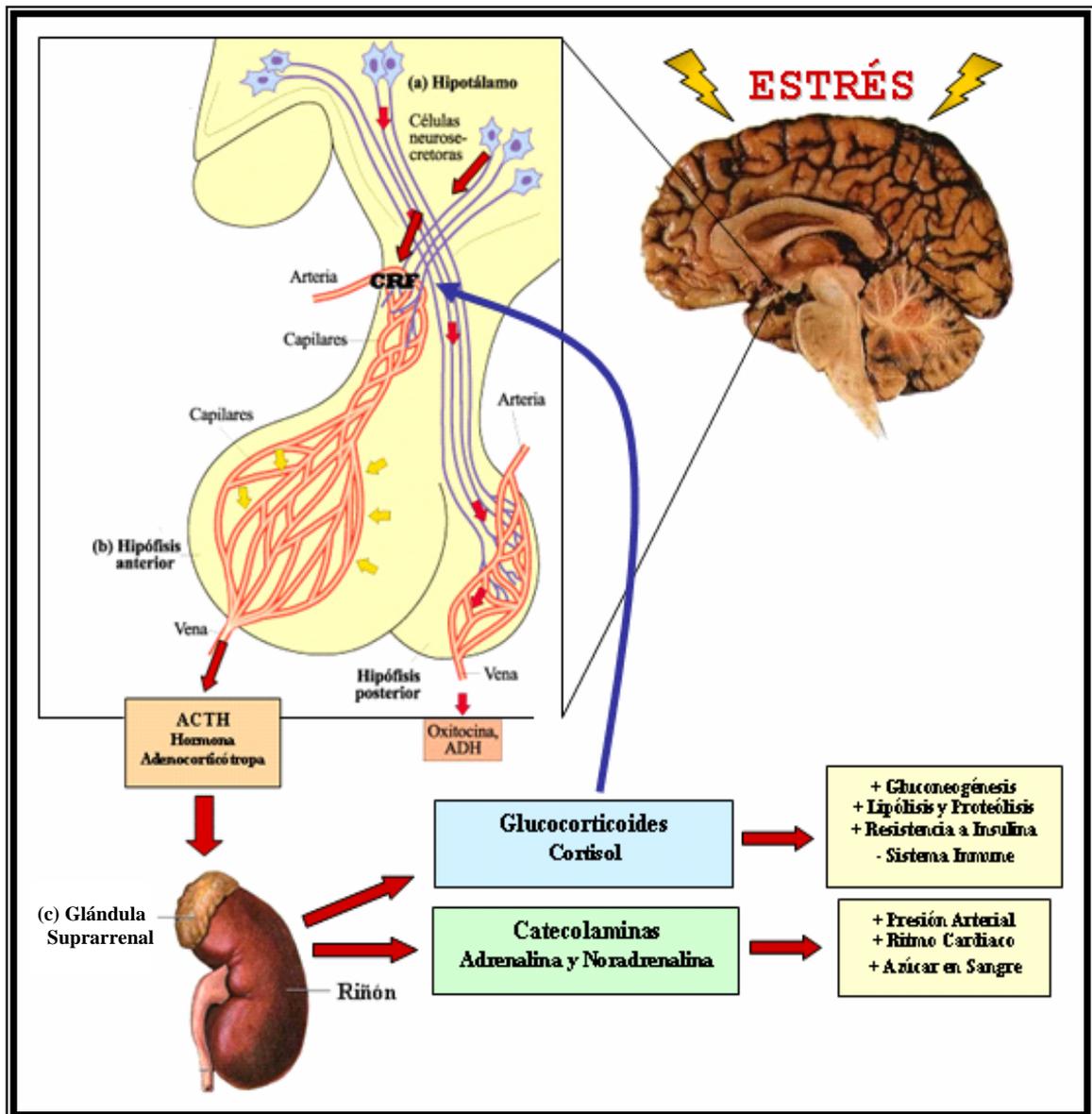
De esta manera, el hipotálamo es estimulado para secretar hormonas relacionadas con las respuestas ante el estrés, como el factor liberador de corticotropinas (Tsigos y Chrousos 2002, Raux-Demay y Girard 1985). Estas hormonas viajan hasta la parte anterior de la pituitaria, donde se produce la liberación de pro-opiomelanocortina y sus péptidos derivados como la hormona adenocorticotropa y la  $\beta$ -endorfina (Slominski *et al.* 2006, Charmandari *et al.* 2005, Arborelius *et al.* 1999).

Cuando estas secreciones llegan hasta las glándulas suprarrenales por vía sanguínea, liberan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) involucradas en el incremento de la presión arterial, el ritmo cardiaco, y el nivel de glucosa en la sangre; y glucocorticoides, que participan ya sea en el incremento de la gluconeogénesis, lipólisis, proteólisis y la resistencia a la insulina, o disminuyen la acción del sistema inmune (Charmandari *et al.* 2005, Tsigos y Chrousos 2002, Arborelius *et al.* 1999) (Figura 1).

El cortisol es uno de los principales glucocorticoides en primates (y corticosterona en roedores), cuya concentración aumenta en la sangre por acción del eje HPA. Funciona como una forma de retroalimentación negativa del sistema, ya que suprime la actividad del eje HPA a nivel de la parte anterior de la pituitaria, del núcleo paraventricular del hipotálamo o del hipocampo (Charmandari *et al.* 2005, Tsigos y Chrousos 2002, Arborelius *et al.* 1999) (Figura 1). Esta regulación incluso parece ser necesaria para la actividad normal del mismo eje (Arborelius *et al.* 1999, Jacobson y Sapolsky 1991).

Mediante la activación del eje HPA, el organismo es capaz de modular las interacciones del medio interno con el externo (homeostasis), con lo cual aumenta sus posibilidades de supervivencia (Tsigos y Chrousos 2002, Chrousos y Gold 1992). Sin embargo, ante la presencia de múltiples factores estresantes, las respuestas fisiológicas del organismo son insuficientes. Como consecuencia de ello, se generan desórdenes psiquiátricos como estrés crónico, depresión, anorexia nervosa, malnutrición, obesidad compulsiva, pánico, alcoholismo crónico, etc. Pero que pueden desencadenar en daños graves e irreparables a nivel de órganos fundamentales como el riñón, o enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (Taché y Bonaz 2007, Charmandari *et al.* 2005).

La hormona que inicia la reacción endócrina a través del eje HPA es el Factor Liberador de Corticotropinas (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Tsigos y Chrousos 2002, Chrousos y Gold 1992).



**Figura 1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA).** Se trata de una respuesta neuroendócrina del cerebro ante la presencia de factores estresantes. Se muestran las tres glándulas participantes, así como las hormonas que se secretan principalmente en cada una de ellas: (a) Hipotálamo → CRF, (b) Parte anterior de la Pituitaria o Hipófisis → ACTH, y (c) Glándula Adrenal → Glucocorticoides y Catecolaminas. La hipersecreción de las hormonas del eje HPA se asocia a enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, así como desórdenes relacionados con la actividad metabólica del organismo; pero también se le ha visto relacionado con problemas conductuales y emocionales.

### 2.3 Factor Liberador de Corticotropinas o CRF

El Factor Liberador de Corticotropinas, o también conocido como CRF/CRH por sus siglas en inglés *Corticotropin Releasing Factor/Hormone*, se trata de un péptido sintetizado a partir de su precursor: pro-CRF, de 91 aminoácidos, que al ser procesado forma una cadena de 41 aminoácidos.

---

Este factor fue descrito y caracterizado por primera vez en el hipotálamo de ovino (Spiess *et al.* 1981, Vale *et al.* 1981) y posteriormente en rata (Rivier *et al.* 1983) y humano (Shibahara *et al.* 1983); se trata de un modulador del eje HPA y del sistema nervioso central (Hilhouse y Grammatopoulos 2006, Perrin y Vale 1999, Tsigos y 2002, Raux-Demay y Girard 1985, Vale *et al.* 1981). Es una hormona que al secretarse por neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, se transporta hasta la parte anterior de la pituitaria (o hipófisis) para generar una respuesta neuroendócrina de adaptación ante el estrés (Charmandari *et al.* 2005, Tsigos y Chrousos 2002).

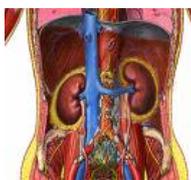
Su actividad se lleva a cabo principalmente en la región cortical y límbica del Sistema Nervioso Central como un neurotransmisor, participando en respuestas autónomas, inmunes, de comportamiento, emocionales y cognitivas (Oakley *et al.* 2007, Hauger *et al.* 2006). Además participa en la regulación de funciones específicas que coordinan la homeostasis de diversos sistemas fisiológicos (Orozco-Cabal *et al.* 2006, Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Slominski 2006, Linton *et al.* 2001, Slominski *et al.* 2001, Perrin y Vale 1999, Tsigos y Chrousos 2002, Chrousos y Gold 1992).

Por otro lado, también se sabe que puede tener un papel importante en el balance energético, metabolismo, sistema inmune, e incluso en otras funciones relacionadas con la reproducción (Tabla 1) (Teli *et al.* 2005, Tsigos y Chrousos 2002, Linton *et al.* 2001, Grammatopoulos y Hillhouse 1999, Chrousos y Gold 1992).

Varios estudios han revelado que, cuando esta hormona es hipersecretada, puede generar desórdenes depresivos, ansiedad y estrés (Oakley *et al.* 2007, Taché y Bonaz 2007, Hilhouse y Grammatopoulos 2006, Hauger *et al.* 2006) que ocasionan problemas ya sea a nivel de órganos vitales como la insuficiencia renal, la neurodegeneración y cambios cardiovasculares; o a nivel conductual como anorexia nervosa, estados de fatiga, pánico y desorden del sueño (Kehne 2007, Hilhouse y Grammatopoulos 2006, Uehara *et al.* 1998, Calabrese *et al.* 1987) (Tabla 1). El estrés conduce a la hipersecreción de esta hormona en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Romeo *et al.* 2007, Taché y Bonaz 2007, Hilhouse y Grammatopoulos 2006). Por esta razón, el CRF se considera como uno de los principales reguladores de las respuestas fisiológicas ante el estrés, mediadas por el eje HPA, y consecuentemente, su regulación podría ser un blanco para el tratamiento de los padecimientos generados por estrés (Kehne 2007).

El CRF presenta varios análogos estructurales cuya secuencia de aminoácidos tiene una homología de aproximadamente del 45% con la del CRF. Estos péptidos fueron clonados de tejidos de rata y de humano (Donaldson *et al.* 1996, Vaughan *et al.* 1995) y existen tres tipos: la urocortina I (UCN-I) y las urocortinas II y III (UCN-II y UCN-III, respectivamente, también llamadas estrescopinas) (Taché y Bonaz 2007, Hilhouse y Grammatopoulos 2006, Hauger *et al.* 2006, Dautzenberg y Hauger 2002).

La expresión de estos péptidos análogos tanto en el cerebro como en los tejidos de la periferia es diferencial, sin embargo, su actividad se asemeja a la del CRF, pues pueden activar de manera específica a los receptores para el CRF: CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub> (Taché y Bonaz 2007).

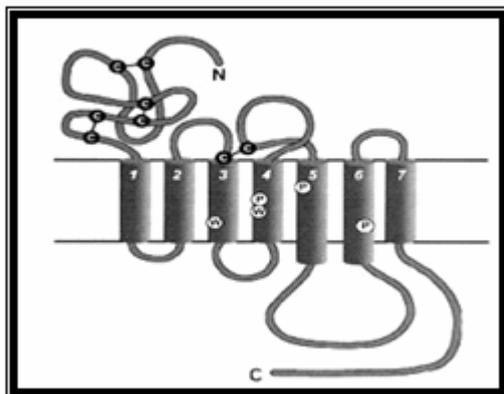
		ACTIVIDAD NORMAL	DESORDENES
<p><b>Sistema Nervioso Central</b></p> <p>Región cortical y límbica</p> 	Neurotransmisor	Respuesta autónoma Respuesta inmune Comportamiento Respuestas emocionales Respuestas cognitivas	Depresión Ansiedad Estrés Desórdenes conductuales Anorexia nervosa Fatiga Pánico Desorden del sueño
<p><b>Sistemas fisiológicos</b></p> 	Acción hormonal	Regulador de homeostasis Balance energético Metabolismo Sistema inmune Implantación del óvulo fecundado	Daños en órganos vitales Insuficiencia renal Neurodegeneración Cambios cardiovasculares

**Tabla 1. Efectos del CRF en el Sistema Nervioso Central y en algunos sistemas fisiológicos: actividad normal y desórdenes causados por su hipersecreción.**

## 2.4 Receptores para CRF: CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub>

Los receptores para el CRF pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales, también llamados receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G Protein-Coupled Receptors*). A la fecha se han caracterizado dos tipos de receptores: el CRF<sub>1</sub> y el CRF<sub>2</sub>, que varían tanto en su distribución en los tejidos, como en su afinidad por los ligandos (Taché y Bonaz 2007, Hauger *et al.* 2006, Hillhouse y Grammatoupoulos 2006, Perrin y Vale 1999, Chalmers *et al.* 1995), lo cual es importante para la regulación de respuestas endócrinas y conductuales (Charmandari *et al.* 2005).

La similitud entre ellos es del 70% y están codificados por genes distintos. Sin embargo, ambos pertenecen al grupo B de los GPCRs (Taché y Bonaz 2007, Hillhouse y Grammatoupoulos 2006, Perrin y Vale 1999) (Figura 2).



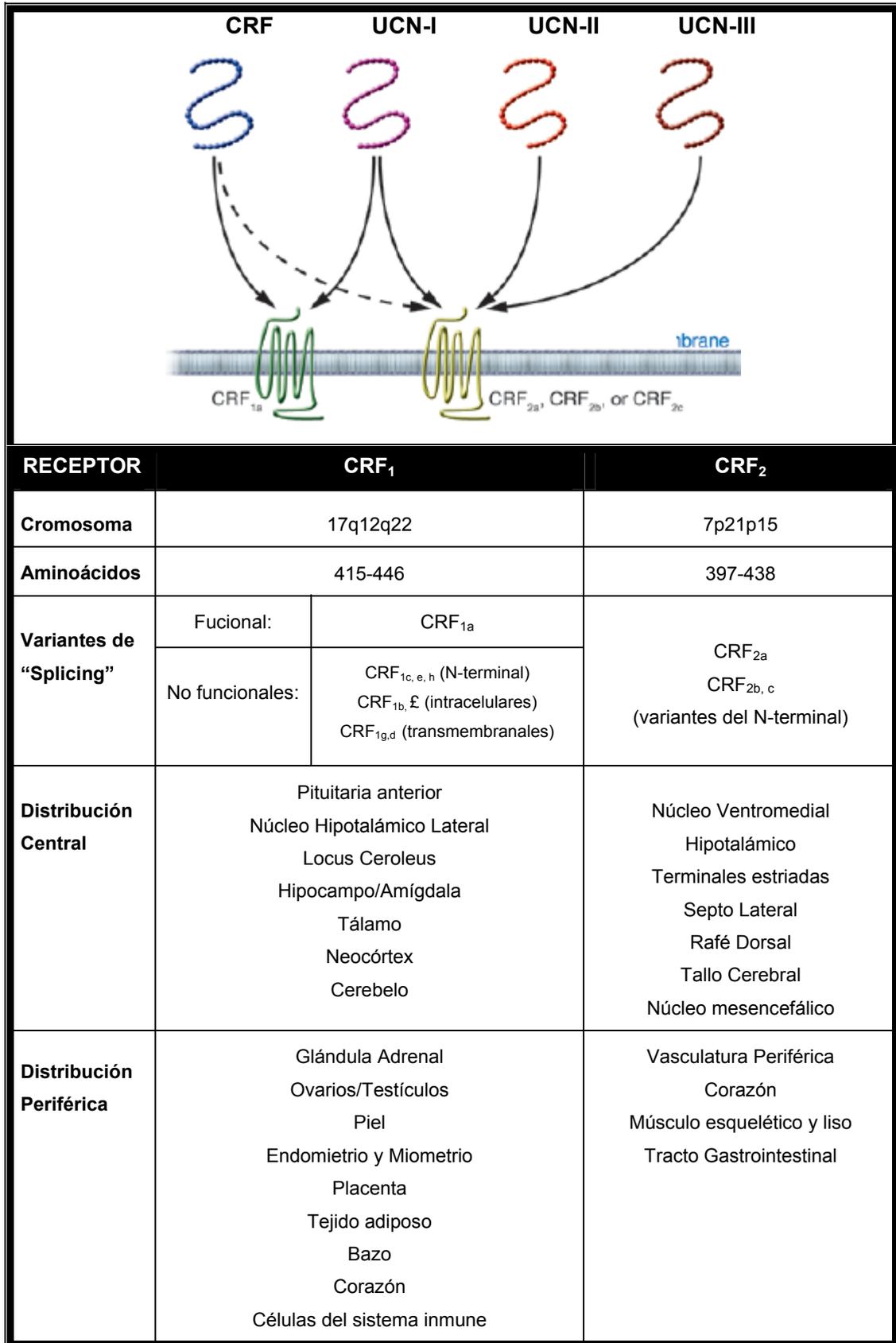
**Figura 2. Representación esquemática del prototipo de la familia B de los GPCRs.** Dentro de esta familia se encuentran los receptores relacionados con el receptor de glucagón. La familia está compuesta por aproximadamente 20 miembros diferentes que se caracterizan por su largo extremo N-terminal donde pueden ser reconocidas hormonas como calcitocina, glucagon y CRF. (Modificado de Kalakowski 1994; Kalakowski et al. 1994).

El receptor CRF<sub>2</sub>, codificado en el cromosoma 7p21p15 (Meyer *et al.* 1997) y compuesto por 397-438 aminoácidos, es el receptor del cual se conoce menos. Presenta tres isoformas generadas por *splicing* alternativo: CRF<sub>2α</sub>, β y γ. Se expresa en el núcleo hipotalámico ventromedial, en la amígdala, el tallo cerebral, las glándulas suprarrenales, ovarios, testículos, endometrio, miometrio, en la vascularización periférica, placenta, tejido adiposo, corazón, piel, en músculo cardíaco y esquelético, así como en el tracto gastrointestinal (Slominski *et al.* 2006, Charmandari *et al.* 2005, Dautzenberg y Hauger 2002) (Figura 3). Aunque se sabe que tiene mejor afinidad por UCN-II y UCN-III, recientemente se ha visto que también puede ser activado por el CRF y UCN-I (Tache y Bonaz 2007, Chen *et al.* 2005).

El receptor CRF<sub>1</sub>, por su parte, se codifica en el cromosoma 17q12q22 (Vamvakopoulos & Sioutopoulou, 1994) y está compuesto por 415 aminoácidos. Puede expresarse en la parte anterior de la pituitaria, en el núcleo hipotalámico lateral, hipocampo, tálamo, corteza, cerebelo, glándulas suprarrenales, músculo esquelético, músculo liso, corazón y piel (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Slominski *et al.* 2006, Charmandari *et al.* 2005) (Figura 3). Este receptor, a diferencia del receptor CRF<sub>2</sub>, solamente puede activarse por la unión del CRF y la UCN-I.

Al parecer, el CRF tiene una afinidad 10 a 40 veces mayor por el receptor CRF<sub>1</sub> que por el receptor CRF<sub>2</sub>, mientras que las urocortinas presentan mejor afinidad por el receptor CRF<sub>2</sub> (Tache y Bonaz 2007, Chen *et al.* 2005, Vaughan *et al.* 1995).

En sus mecanismos de transducción, ambos receptores activan la cascada de señalización mediada por la proteína G<sub>s</sub>, que activa a la Adenil Ciclasa (AC) y consecuentemente a la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés *Protein Kinase A*) (Arborelius *et al.* 1999, Grigoriadis *et al.* 1996, Chalmers *et al.* 1995). Sin embargo, se ha visto que presentan una influencia dependiente del tejido para su señalización (Taché y Bonaz 2007, Hillhouse y Grammatopoulos 2006), que asimismo, se encuentra relacionada con los efectos fisiológicos que ejerce cada uno de los receptores.



**Figura 3. Tipos 1 y 2 del receptor para CRF.** Se muestra la afinidad diferencial por los ligandos: CRF y sus análogos (UCN-I, II y II), así como las características principales de cada uno de estos receptores en humanos (Modificado de Taché y Bonaz 2007; Taché y Bonaz 2007).

---

Mientras que el receptor CRF<sub>1</sub> se encuentra relacionado con la respuesta ante estrés a través de su participación en el eje HPA, el receptor CRF<sub>2</sub> parece tener efectos antagónicos, pues su actividad disminuye el comportamiento de ansiedad y estrés (Coste *et al.* 2000, Kishimoto *et al.* 2000, Hauger *et al.* 2006).

Además de esto, la sobre-expresión del receptor CRF<sub>1</sub> se asocia con enfermedades endocrinas, psiquiátricas, neurológicas e inflamatorias (Hauger *et al.* 2006, Hillhouse y Grammatopoulos 2006) y dichos efectos pueden ser aumentados por la hipersecreción de su ligando, el CRF (Arborelius *et al.* 1999). El receptor CRF<sub>2</sub>, por su variabilidad y expresión, se vincula más con efectos que disminuyen las respuestas activadas por el receptor CRF<sub>1</sub>. Por esta razón, en este trabajo nos enfocaremos al estudio del receptor CRF<sub>1</sub>.

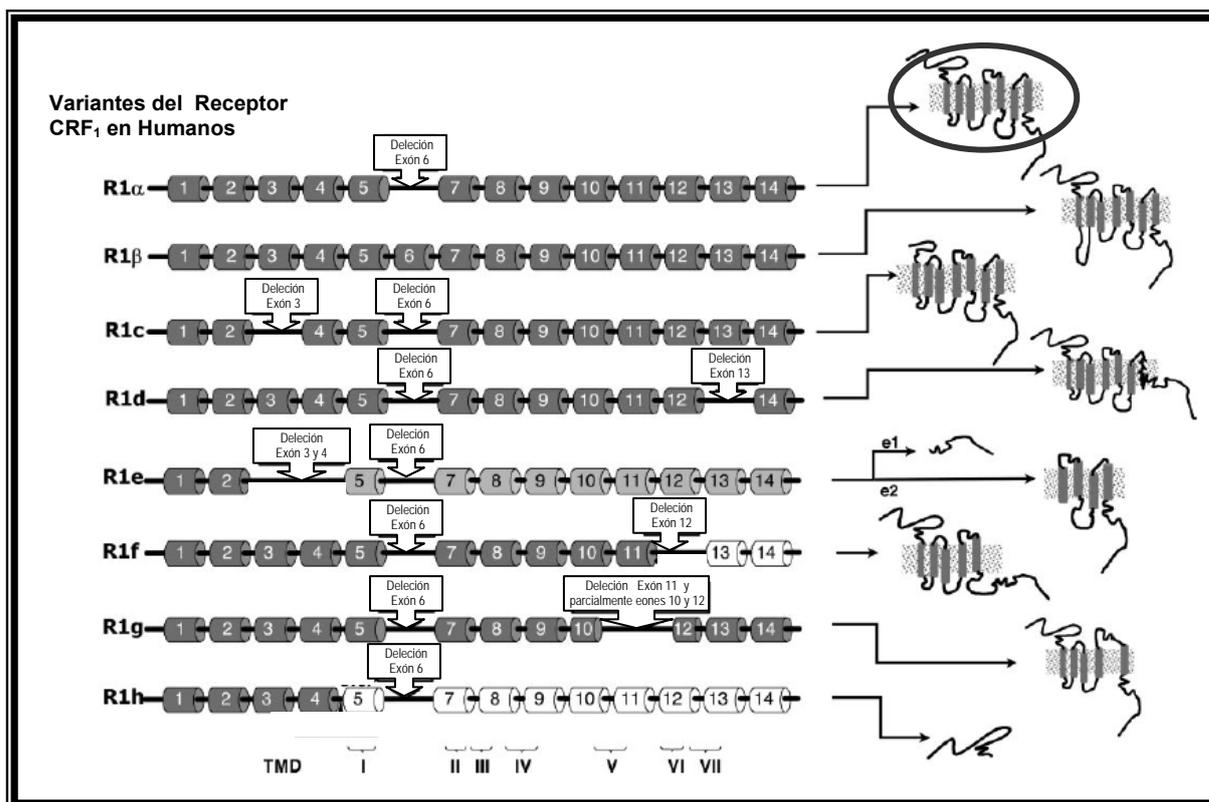
## 2.5 Estructura del receptor CRF<sub>1</sub>

El receptor CRF<sub>1</sub> de mamíferos está compuesto por 415 aminoácidos. El gen de este receptor ha sido clonado en humanos, rata, ratón, tupaya, hamster, borrego, ovino, bovino, pollo y en mono rhesus (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Oshida *et al.* 2004, Pisarchik y Slominski 2002, Perrin y Vale 1999, Palchadhuri *et al.* 1998, Myers *et al.* 1998, Yu *et al.* 1996, Vita *et al.* 1993, Chen *et al.* 1993).

Tiene ocho isoformas generadas por *splicing* alternativo (Figura 4) de las cuales, solamente el receptor CRF<sub>1α</sub> es funcional. El resto de las isoformas generadas carecen de exones que al parecer son relevantes para que el receptor pueda adquirir una conformación activa, y una a su ligando, o bien, para interaccionar con otras proteínas. La razón por la cuál estas isoformas se han conservado, aun se desconoce. (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Slominski *et al.* 2006, Nabhan *et al.* 1995).

En su parte extracelular, el receptor CRF<sub>1</sub> posee varias características importantes: un extremo N-terminal largo característico de los GPCRs clase B; sitios de glicosilación que se encuentran involucrados con su expresión y localización en la membrana plasmática, y múltiples residuos de cisteínas formando puentes disulfuro en sus asas extracelulares (Hillhouse y Grammatopoulos 2006).

Aunque estos motivos también participan en la unión del ligando al receptor, recientemente se encontraron tres regiones que al parecer mejoran la afinidad por el CRF al receptor: la primera de ellas, y probablemente la más relevante, está conformada por la tercer asa extracelular en conjunto con el quinto dominio transmembranal, y las otras dos se encuentran en la segunda asa extracelular, en los aminoácidos 175-178 y en la Histidina 189 del receptor CRF<sub>1</sub> (Liaw en 1997).



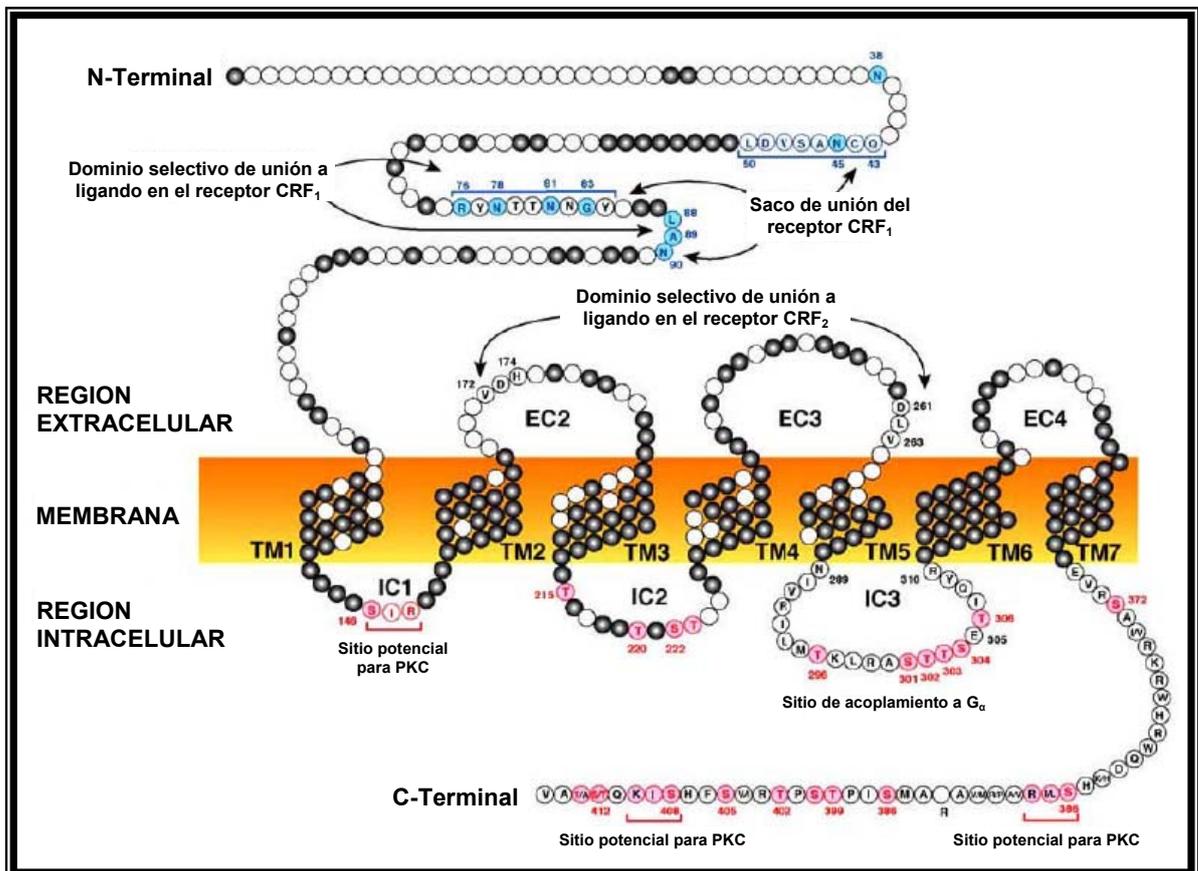
**Figura 4. Isoformas generadas por “splicing alternativo” en el receptor CRF<sub>1</sub>.** A partir del gen que codifica para el CRF<sub>1</sub>R se pueden generar ocho variantes exónicas y estructurales, de las cuales, el CRF<sub>1α</sub>R (señalada en círculo) es la isoforma funcional y por tanto, la que se utilizará en este trabajo. (Modificado de Hillhouse y Grammatopoulos 2006; Hillhouse y Grammatopoulos 2006).

Como parte de la familia de los GPCRs, el receptor CRF<sub>1</sub> se acopla a las proteínas G heterotriméricas G<sub>s</sub> y G<sub>q</sub> (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Hauger *et al.* 2006, Slominski *et al.* 2006). Los sitios de unión del receptor CRF<sub>1</sub> a estas proteínas, se encuentran principalmente en la tercer asa intracelular (IC3, del inglés *third Intra-Cellular loop*) (Figura 5). Es en este mismo sitio, además de algunos otros localizados en la cola carboxílica (C-terminal), donde el receptor puede ser fosforilado por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs, por sus siglas en inglés *G-protein coupled receptor kinases*) en residuos de serina/treonina para llevar a cabo su regulación, principalmente por internalización (Hauger *et al.* 2006, Teli *et al.* 2005).

De manera interesante, estos sitios son semejantes en los dos tipos de receptores para CRF (CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub>), lo cual podría ser evidencia de que los mecanismos de regulación han sido conservados (Hillhouse y Grammatopoulos 2006).

También existen otros sitios potenciales de fosforilación por la proteína cinasa C (PKC por sus siglas en inglés *Protein Kinase C*), los cuales se hallan en la primera y segunda asas intracelulares, y en los últimos residuos de la cola carboxílica del receptor (Oakley *et al.* 2007, Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Teli *et al.* 2005) (Figura 5). Estas regiones, también podrían ser fosforiladas por PKA, sin embargo, esto todavía no se ha estudiado detenidamente (Teli *et al.* 2005).

En otros GPCRs, los sitios de fosforilación de la segunda asa intracelular participan en la unión de proteínas reguladoras como la  $\beta$ -arrestina, que modula la internalización. El papel que tienen estos sitios de fosforilación en la actividad del receptor  $CRF_1$  aún se desconoce, sin embargo, es muy probable que también se encuentren asociados con la regulación del receptor. (Oakley *et al.* 2007, Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Teli *et al.* 2005, Hauger *et al.* 2003).



**Figura 5. Estructura del receptor  $CRF_1$  en humanos.** Se indican los residuos de aminoácidos importantes para la regulación de la actividad del receptor. En la parte extracelular se señalan los sitios de unión a su ligando, mientras que en la parte intracelular se muestran los residuos de serina y treonina (círculos rojos) potenciales para la fosforilación del receptor. (Modificado de Hauger *et al.* 2006; Hauger *et al.* 2006).

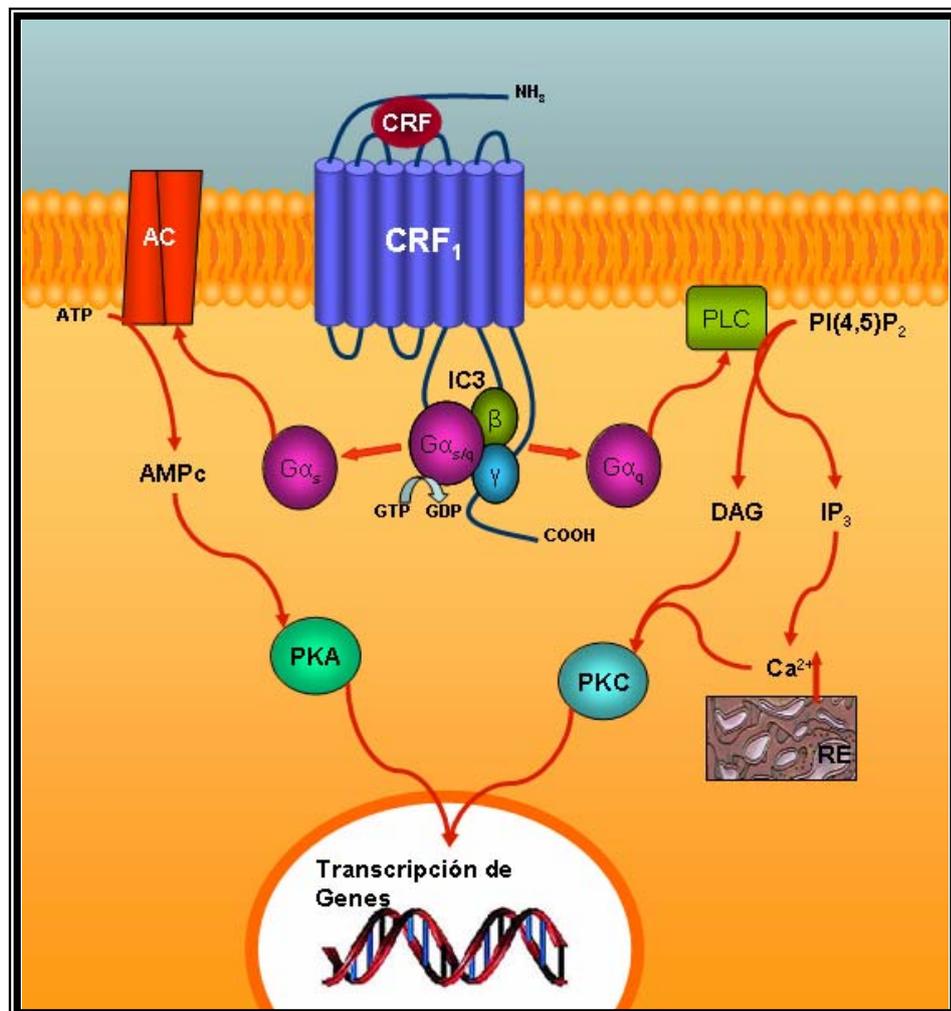
## 2.6 Vías de Señalización activadas por el receptor $CRF_1$

La señalización comienza con la unión del ligando al receptor. Una vez que el receptor se encuentra activado, éste presenta cambios conformacionales que, además de aumentar su afinidad por el ligando, le permiten el acoplamiento de las proteínas G heterotriméricas, de las cuales se encuentra bien caracterizada la unión de  $G_{\alpha q}$  y  $G_{\alpha s}$  al receptor  $CRF_1$  (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Hauger *et al.* 2006, Slominski *et al.* 2006). Dicha interacción promueve el recambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, ocasionando que se disocie esta subunidad del complejo  $\beta\gamma$ .

De esta manera, la subunidad  $G_\alpha$  puede activar a otras proteínas involucradas en el incremento de segundos mensajeros capaces de estimular la actividad de proteínas efectoras que terminan la señalización con la transcripción de genes en el núcleo celular.

### a) Acoplamiento del receptor $CRF_1$ a la vía de $G_{\alpha s}/AC/PKA$

Algunos estudios demuestran que el acoplamiento de  $G_{\alpha s}/AC/PKA$  es la vía preferencial de los receptores para CRF (Hillhouse y Grammatopoulos 2006), pues al parecer, cuando la proteína  $G_{\alpha s}$  se une al receptor, la afinidad por el ligando se incrementa hasta 1300 veces (Hauger *et al.* 2006). Mediante esta vía, la proteína  $G_{\alpha s}$  estimula la actividad de la Adenil Ciclasa la cual a su vez incrementa la producción del segundo mensajero denominado AMP-cíclico. Éste, al activar a la PKA, desencadena la amplificación de la señal activando factores transcripcionales como CREB, AP-1 y  $NF\kappa b$  (Slominski *et al.* 2006, Dautzenberg *et al.* 2002) (Figura 6).



**Figura 6. Vías de Señalización del receptor  $CRF_1$  mediadas por las proteínas  $G_s$  y  $G_q$ .** El recambio de  $GDP$  por  $GTP$  en la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G$  permite la disociación del complejo heterotrimérico. Mediante la proteína  $G_s$  se activa la vía de  $AC/PKA$ , mientras que la proteína  $G_q$  activa la vía de  $PLC/PKC$ . Las proteínas efectoras:  $PKC$  y  $PKA$  terminan con la señalización al activar factores de transcripción de genes en el núcleo.

---

## **b) Acoplamiento del receptor CRF<sub>1</sub> a la vía de G<sub>αq</sub>/PLC/PKC**

El receptor CRF<sub>1</sub> también puede acoplarse a la proteína G<sub>αq</sub>. Por este mecanismo se activa la fosfolipasa C o PLC (por sus siglas en inglés *Phospho Lipase C*), que al hidrolizar fosfolípidos de membrana (Fosfatidil inositol 4, 5 bisfosfato ó PIP<sub>2</sub>), forma dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5 tris-fosfato (IP<sub>3</sub>). Éste último interacciona con receptores que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico, liberando Ca<sup>2+</sup> al medio intracelular. El Ca<sup>2+</sup>, junto con el DAG, activan a la PKC, que es un amplificador de la señal celular involucrado en la transcripción de genes (Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Hauger *et al.* 2006, Slominski *et al.* 2006, Teli *et al.* 2005) (Figura 6).

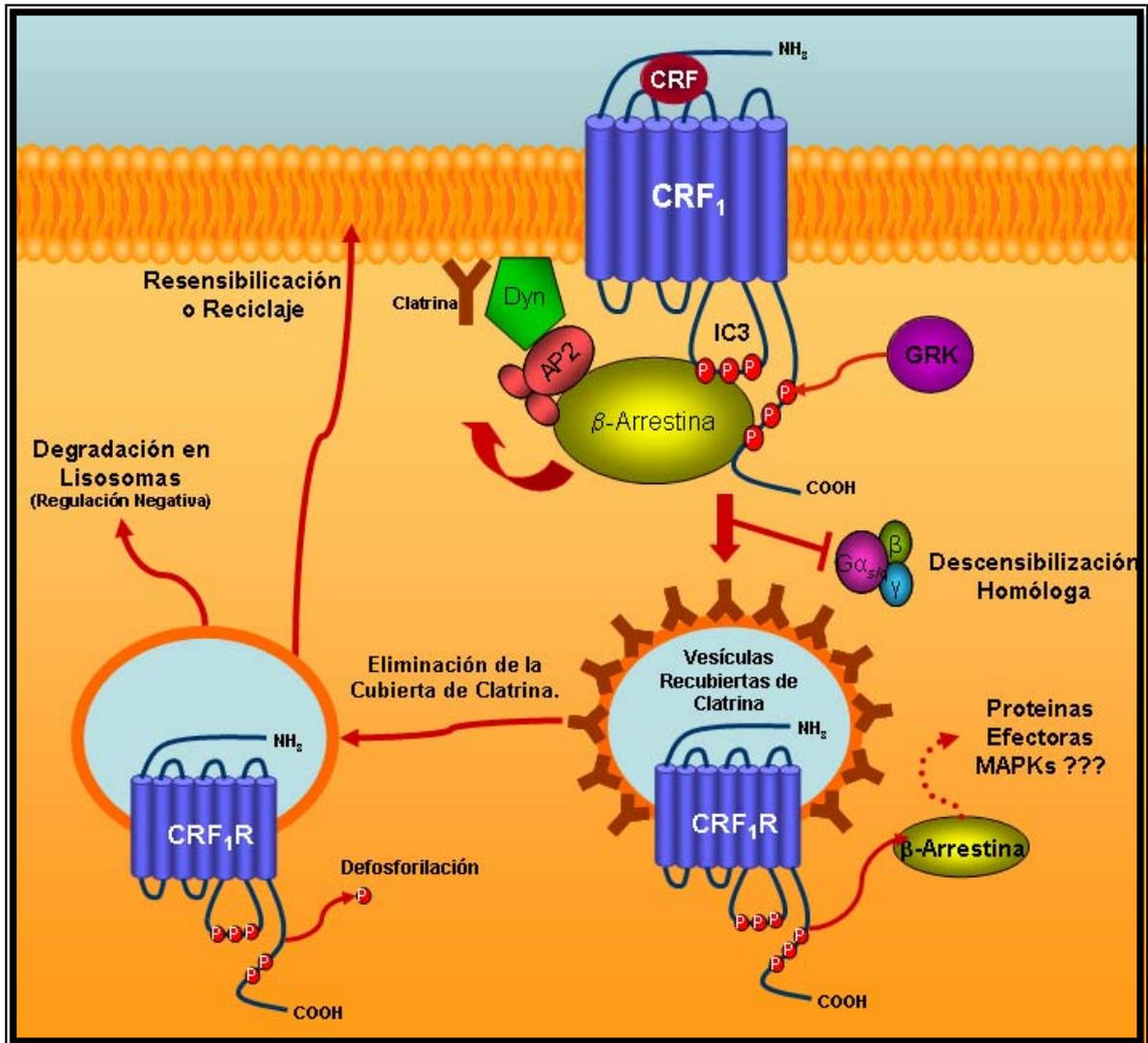
## **2.7 Mecanismos de Desensibilización e Internalización del Receptor.**

Muchos estudios han demostrado que la señalización de los GPCRs mediada por la unión del ligando es rápidamente atenuada por un mecanismo denominado “desensibilización” (Oakley *et al.* 2007, Lefkowitz 2007, Luttrell 2006). Ante un estímulo continuo ocasionado por la presencia de una alta cantidad del ligando, los GPCRs presentan un mecanismo para disminuir su capacidad de ser estimulados nuevamente. Cuando la concentración de ligando disminuye, los receptores vuelven a su estado habitual, permitiendo la “resensibilización”. Estos cambios surgen como un mecanismo de regulación que previenen la actividad constitutiva de los receptores.

Existen dos vías distintas de desensibilización: la desensibilización homóloga y la desensibilización heteróloga. Si la regulación del receptor se inicia por acción de su ligando, se habla de un mecanismo de desensibilización homóloga, mientras que si este mecanismo se lleva a cabo en ausencia de su ligando, entonces se trata de desensibilización heteróloga. Ambos tipos de regulación requieren de la fosforilación del receptor (Lefkowitz 2007, Luttrell 2006).

En el caso de la desensibilización homóloga, la unión del ligando provoca que las cinasas de receptores asociados a proteínas G se transloquen en la membrana plasmática, donde pueden fosforilar al receptor, principalmente en residuos de serina/treonina que se encuentran en la tercer asa intracelular y en el extremo carboxilo terminal (Oakley *et al.* 2007, De Wire *et al.* 2007, Hupfeld y Olefsky 2007, Reiter y Lefkowitz 2006, Luttrell 2006, Teli *et al.* 2005, Shenoy y Lefkowitz 2005, Krasel *et al.* 2004) (Figura 7).

Dicha fosforilación, al parecer genera un cambio conformacional en el receptor que promueve el reclutamiento de las proteínas denominadas arrestinas (Figura 7 y 8), mismas que al competir por el sitio de unión a las proteínas G, terminan con la señalización mediada por el agonista (Oakley *et al.* 2007, Lefkowitz *et al.* 2006, Shenoy y Lefkowitz 2005, Krasel *et al.* 2004, Reiter y Lefkowitz 2006, Ferguson 2001).



**Figura 7. Mecanismos de regulación del receptor CRF<sub>1</sub>.** Las proteínas GRKs fosforilan al receptor activado por su ligando, con lo cual se promueve la traslocación de la  $\beta$ -arrestina a la membrana plasmática. La  $\beta$ -arrestina recluta a otras proteínas involucradas en la formación de vesículas de clatrina como a la dinamina y la AP2; para que el receptor sea internalizado. Durante este proceso, la unión de la  $\beta$ -arrestina al receptor impide el acoplamiento de las proteínas G (Desensibilización Homóloga); la  $\beta$ -arrestina se desprende, llevando a una posible activación de vías de señalización alternativas; y finalmente, a través de la defosforilación del receptor cuando se encuentra en los endosomas, éste se degrada en lisosomas (Regulación Negativa) o se recicla hacia la membrana plasmática (Resensibilización).

---

Las arrestinas funcionan además como proteínas adaptadoras para formar la maquinaria endocítica compuesta por la proteína adaptadora AP2, la guanosín-trifosfatasa pequeña ARF6 y su factor de recambio de nucleótidos de guanina ARNO, las proteínas de fusión sensibles a N-etilmaleimida y la clatrina (Shenoy y Lefkowitz 2005). Este complejo proteico localizado alrededor del receptor, forma las vesículas recubiertas de clatrina, mientras que una proteína G monomérica que se encuentra en el citosol y que se conoce como dinamina, se ensambla en el cuello de la vesícula para extrangular a la vesícula y separarla de la membrana plasmática y que de esta manera pueda llevarse a cabo la endocitosis del receptor.

La consecuente desfosforilación del receptor en los endosomas ayudará a que las proteínas del complejo en la vesícula se despolimericen, dejando a la vesícula libre para que se recicle y se fusione nuevamente con la membrana plasmática y que así, el receptor pueda seguirse activando por su agonista (resensibilización o reciclaje); o bien, para que éste sea degradado al fusionarse la vesícula endocítica con la membrana de los lisosomas y que van a digerir su contenido (regulación negativa) (Figura 7) (Oakley *et al.* 2007, Shenoy y Lefkowitz 2005, Krasel *et al.* 2004, Reiter y Lefkowitz 2006, Ferguson 2001).

Cuando se descubrió la  $\beta$ -arrestina, ésta fue identificada como una proteína que inducía la internalización de los GPCRs, bloqueando su señalización. Sin embargo, más tarde se encontró que la  $\beta$ -arrestina también podía unirse a proteínas de regulación y cinasas implicadas en diferentes vías de señalización (Lefkowitz 2007, Luttrell 2006, Shenoy y Lefkowitz 2005, Pierce y Lefkowitz 2001). Estudios recientes con los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos ( $\beta_2$ AR) y con el receptor tipo 1A para angiotensina II ( $AT_{1A}$ ) demuestran que, si bien la interacción de  $\beta$ -arrestina con el receptor inhibe las vías de señalización mediadas por proteínas G, esta condición también puede activar vías alternas. Este mecanismo de señalización se caracteriza por la formación de complejos proteicos con los GPCRs. De esta manera, la nueva maquinaria formada es capaz de activar a otras proteínas efectoras entre las cuales se ha visto involucrada a la cinasa Src (c-Src) (Figura 7) (Oakley *et al.* 2007, De Wire *et al.* 2007, Kohout y Lefkowitz 2006, Shenoy y Lefkowitz 2005, Lefkowitz *et al.* 2004, Ferguson 2001).

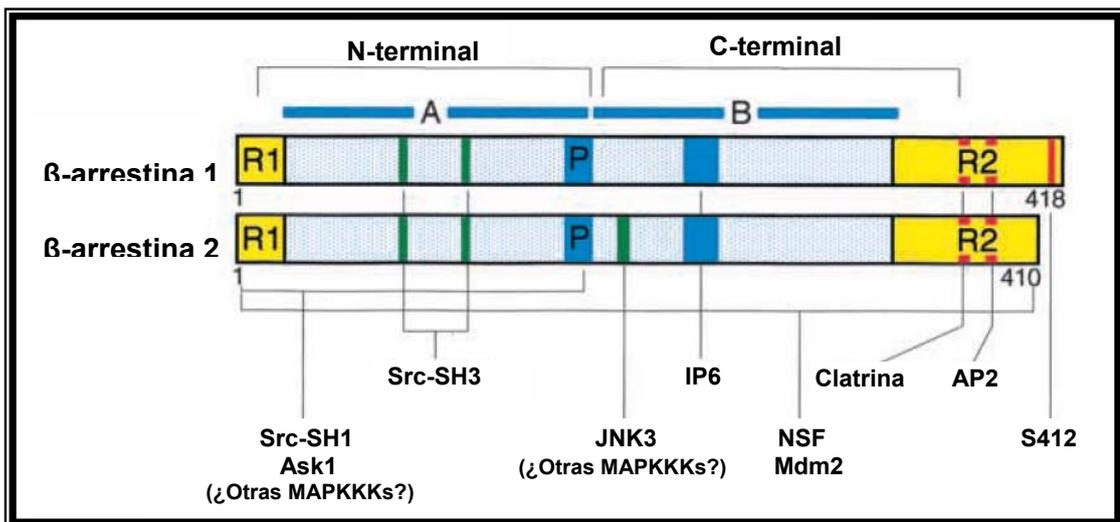
## **2.8 $\beta$ -Arrestinas.**

Las arrestinas son proteínas que se descubrieron a finales de los años 80's como proteínas involucradas en la desensibilización de los GPCRs. La primera fue encontrada estudiando al receptor para rodopsina, y ésta fue llamada "arrestina visual" o arrestina-1. Estudios moleculares posteriores revelaron la presencia de dos isoformas que son afines por el receptor  $\beta_2$ AR, y a estas les llamaron:  $\beta$ -arrestina 1 y 2 (o arrestinas 2 y 3, respectivamente).

Mientras que la arrestina-1, es exclusiva de los receptores para rodopsina, las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 pueden interaccionar con otros GPCRs para inducir su internalización (De Wire *et al.* 2007). El porcentaje de identidad entre las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 es del 78%, pues varían en tan solo ocho aminoácidos de la cola carboxílica y poseen dominios muy semejantes de unión a otras proteínas. En el extremo amino se encuentran dos sitios de unión a cinasas como c-Src (SH1 y SH3), mientras que los sitios de unión a proteínas involucradas en la internalización del receptor (AP2 y clatrin) se encuentran en la cola carboxílica (Figura 8).

Las  $\beta$ -arrestinas regulan la actividad de la mayoría de los GPCRs, sin embargo, la afinidad de las isoformas de  $\beta$ -arrestina por los distintos receptores varía. Al parecer, la  $\beta$ -arrestina2 se encuentra más relacionada con la regulación del  $\beta_2$ AR, en cambio, la actividad del receptor  $AT_{1A}R$  puede ser regulada por ambas isoformas (De Wire *et al.* 2007, Holmes *et al.* 2006, Reiter y Lefkowitz 2006).

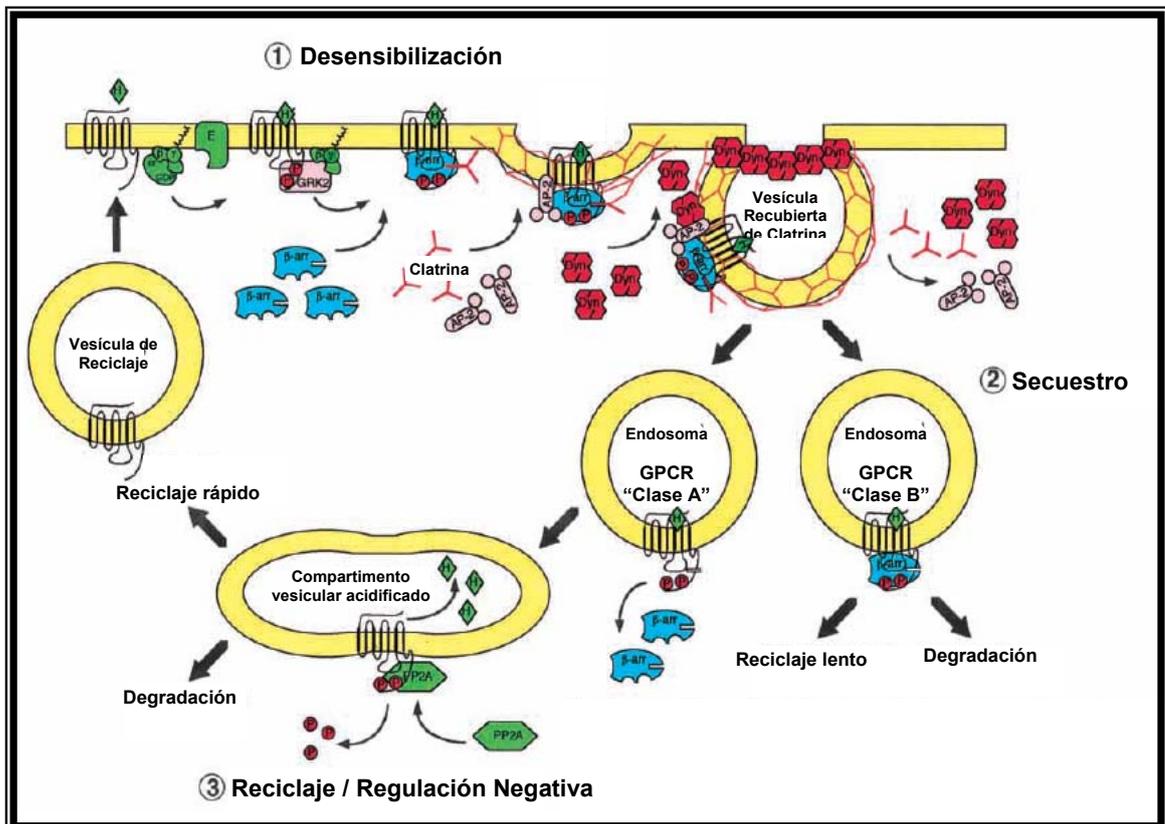
Las  $\beta$ -arrestinas también tienen un papel importante en la regulación del receptor  $CRF_1$ . Después de la activación del receptor, tanto la  $\beta$ -arrestina1 como la  $\beta$ -arrestina2 se reclutan en la membrana plasmática y se unen en los sitios fosforilados por GRKs (principalmente GRK 3 y GRK 6) o por PKC. De esta manera, el receptor queda desensibilizado en aproximadamente el 60% de su señalización (Oakley *et al.* 2007, Holmes *et al.* 2006, Perry *et al.* 2005, Rasmussen *et al.* 2004, Hillhouse y Grammatopoulos 2006).



**Figura 8. Esquema representativo de la estructura de las  $\beta$ -Arrestinas 1 y 2.** Se señalan los extremos amino y carboxilo terminal, los sitios de unión para las proteínas involucradas en la formación de la maquinaria endocítica (Clatrin y AP2), así como las regiones sugeridas para el pegado de proteínas de señalización (Src, JNK3, etc.) (Modificado de Lefkowitz y Luttrell 2002; Luttrell y Lefkowitz 2002).

A pesar de que ambas isoformas participan en la regulación del receptor CRF<sub>1</sub>, parece ser que la  $\beta$ -arrestina2 se encuentra más involucrada en los mecanismos de activación de vías independientes de proteínas G al unirse en sitios específicos de la tercer asa intracelular y de la cola carboxílica del receptor (Oakey *et al.* 2007).

Los sitios de fosforilación en los GPCRs son importantes para su interacción con las  $\beta$ -arrestinas, pues ayudan a que los receptores sufran cambios conformacionales que les permiten mejorar su afinidad con otras proteínas que podrían estar participando en vías de señalización independientes de proteínas G (Perry *et al.* 2005). Puesto que la afinidad de las  $\beta$ -arrestinas con los distintos GPCRs es diferencial, estos receptores se clasifican en dos clases: A y B. Los receptores que pertenecen a la clase A son menos afines por la  $\beta$ -arrestina; cuando la vesícula de clatrina se internaliza, no va acompañada de  $\beta$ -arrestina, haciendo que el receptor se recicle rápidamente. En cambio, en los receptores del tipo B, la  $\beta$ -arrestina permanece unida al receptor, se internaliza con éste y por tanto, tarda más tiempo en volver a la membrana plasmática (Figura 9).



**Figura 9. Papel de las  $\beta$ -arrestinas en la desensibilización, secuestro y tráfico intracelular de los GPCRs de clase A y B.** El receptor activado por su agonista (H) se fosforila por GRKs, promoviendo el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina. Estas últimas compiten por el sitio de unión a proteínas G e impiden que se activen otras proteínas efectoras (E). Las  $\beta$ -arrestinas además, se unen a las proteínas que forman las vesículas de clatrina, mientras que la dinamina inicia el proceso de estrangulación al cerrar las vesículas formadas. Los GPCRs se clasifican en: 'Clase B', si la  $\beta$ -arrestina forma un complejo estable con el receptor (reciclaje lento); y los de la 'Clase A', si la  $\beta$ -arrestina se disocia rápidamente, por la consecuente desfosforilación (reciclaje rápido) (Modificado de Lefkowitz y Luttrell 2002; Luttrell y Lefkowitz 2002).

Además de esto, los receptores que pertenecen a la clase B, poseen un motivo de serina/treonina en la cola carboxílica que ayuda al acoplamiento de  $\beta$ -arrestina con el receptor. Este motivo no se encuentra en los receptores de clase A, y de manera interesante, estos receptores reclutan preferencialmente a la  $\beta$ -arrestina2, mientras que en los de clase B, pueden unirse a cualquiera de estas isoformas (Reiter y Lefkowitz 2006, Oakey *et al.* 2000).

El receptor CRF<sub>1</sub> y los receptores  $\beta_2$  y  $\alpha_{1b}$  adrenérgicos pertenecen al tipo A, mientras que el receptor AT<sub>1A</sub> y el receptor tipo 2 para vasopresina (V<sub>2</sub>) pertenecen al tipo B (Oakey *et al.* 2007, De Wire *et al.* 2007, Holmes *et al.* 2006, Rasmussen *et al.* 2004).

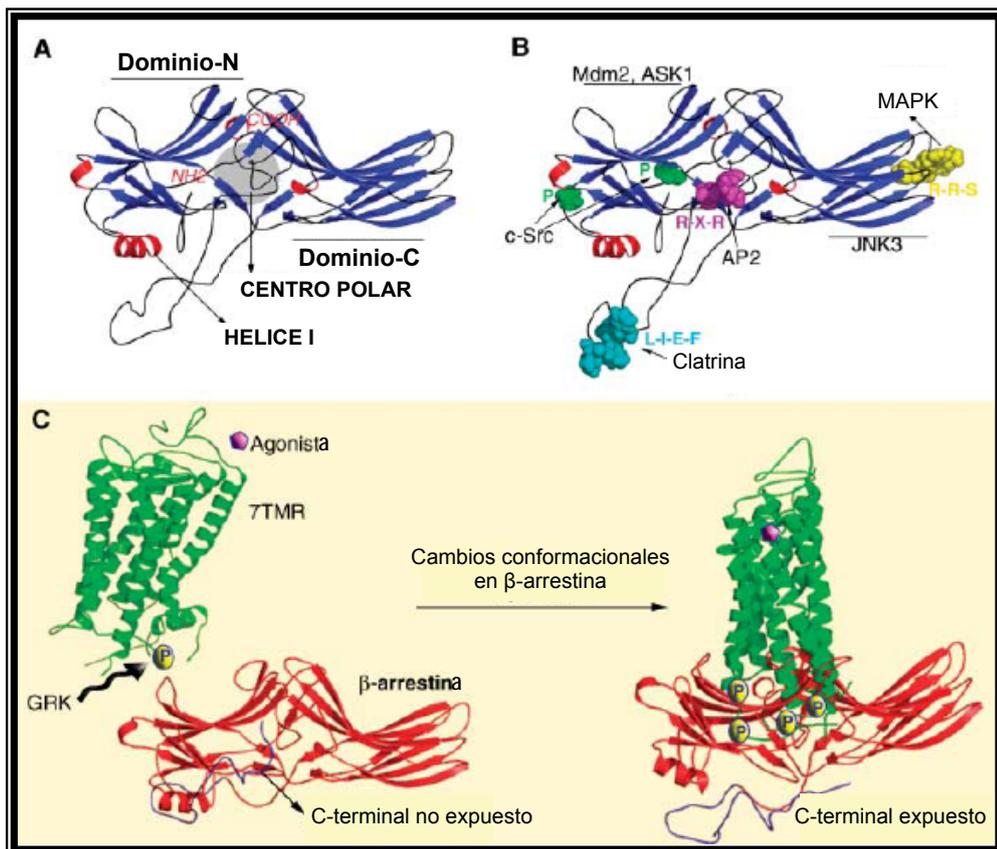
Estudios moleculares que han demostrado la presencia de sitios en las  $\beta$ -arrestinas, para su unión con proteínas efectoras (Tabla 2 y Figura 10), sugieren que éstas son capaces de activar vías de señalización a través de los GPCRs.

Proteína de unión	Isoforma de $\beta$ -arr	Consecuencia funcional
Clatrina	$\beta$ -arr 1, 2	<b>Proteínas de tráfico</b> Endocitosis
AP2	$\beta$ -arr 1, 2	Endocitosis
NSF	$\beta$ -arr 1	Endocitosis y reciclaje.
ARF6	$\beta$ -arr 2 >>> 1	<b>G pequeñas/GEFs</b> Endocitosis
ARNO	$\beta$ -arr 2	Endocitosis
Ral-GDS	$\beta$ -arr 1, 2	Cambios en el citoesqueleto mediados por Ral
RhoA	B-arr 1	Formación de fibras de estrés dependientes de Ang II
<b>Componentes de la cascada de MAPK</b>		<b>Proteínas de señalización</b>
ASK1	$\beta$ -arr 1, 2	Activación de JNK3 y p38
c-Raf-1	$\beta$ -arr 1, 2	Activación de ERK
JNK3	$\beta$ -arr 2 >>> 1	Estabilización de pJNK en endosomas
ERK2	$\beta$ -arr 1, 2	Estabilización de ERK en endosomas
<b>Torosinas-cinasas</b>		
c-Src	$\beta$ -arr 1, 2	Endocitosis, activación de ERK
Yes	$\beta$ -arr 1	Activación de G <sub>oq</sub> y transporte de GLUT4
Hck	$\beta$ -arr 1	Exocitosis de gránulos en neutrófilos
Fgr	$\beta$ -arr 1	Exocitosis de gránulos en neutrófilos

**Tabla 2. Proteínas de unión a  $\beta$ -arrestinas 1 y 2, y sus efectos ocasionados por la formación del complejo.** Algunas proteínas de la cascada de MAPK pueden interactuar con las isoformas 1 y 2 de  $\beta$ -arrestina, ocasionando la fosforilación de sustratos que promueven mecanismos como proliferación y diferenciación celular. Así mismo, a través de algunas cinasas, principalmente las que pertenecen a la familia de Src que pueden activar a las ERK para generar estos mismos efectos celulares. (Modificado de Shenoy y Lefkowitz 2005; Shenoy y Lefkowitz 2005).

Así mismo, se ha visto que algunos de estos receptores, como el receptor  $\beta_2$ AR, el receptor  $AT_{1A}$ , el receptor para la hormona paratiroidea (PTHr), e incluso el receptor  $CRF_1$ , son capaces de activar cascadas de señalización alternas, como es el caso de la vía de las MAPKs (De Wire *et al.* 2007, Lefkowitz *et al.* 2006, Rey *et al.* 2006, Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Brar *et al.* 2004, Waters *et al.* 2004, Tohgo *et al.* 2003, Tohgo *et al.* 2002, Miller y Lefkowitz 2001, Rossant *et al.* 1999).

Se ha sugerido que este mecanismo puede ser a causa de la interacción directa de la arrestina con algunas de las MAPKs (De Wire *et al.* 2007, Shenoy y Lefkowitz 2005) (Tabla 2), sin embargo, no en todos los casos se conoce si la  $\beta$ -arrestina se encuentra involucrada en dicha activación, y de ser así, de qué manera lo hace. Lo que sí es evidente, es que se requiere de la unión del agonista al receptor (Figura 10), y en ocasiones, de su fosforilación e internalización (Oakey *et al.* 2007, Lefkowitz 2007, De Wire *et al.* 2007, Hupfeld y Olefsky 2007, Krasel *et al.* 2004).



**Figura 10. Modificaciones estructurales que sufren las  $\beta$ -arrestinas al interactuar con un GPCR activado por su ligando y fosforilado por GRKs.** A) Conformación tridimensional de la  $\beta$ -arrestina. B) Sitios de unión a proteínas efectoras. C) Fosforilación del GPCR y su unión con  $\beta$ -arrestina. Esta interacción provoca cambios conformacionales en la  $\beta$ -arrestina, de manera que los dominios de unión a proteínas efectoras quedan expuestos. Por ello, la  $\beta$ -arrestina se considera una proteína adaptadora con potencial de desencadenar señalización alterna mediante su unión con los GPCRs. (Modificado de Lefkowitz 2003; Lefkowitz *et al.* 2003).

---

Otro mecanismo que se encuentra mejor caracterizado, es el denominado “transactivación”. Se trata de un proceso en el que los GPCRs desencadenan una señalización que activa a los receptores con actividad de cinasa de tirosina, y en el cuál podrían estar participando cinasas como la Src e incluso la  $\beta$ -arrestina (De Wire *et al.* 2007, Natarajan y Berk 2006, Jafri *et al.* 2006, Shenoy y Lefkowitz 2005, Slomiany y Slomiany 2004, Waters *et al.* 2004, Luttrell y Luttrell 2003, Tohgo *et al.* 2003, Tohgo *et al.* 2002, Miller y Lefkowitz 2001).

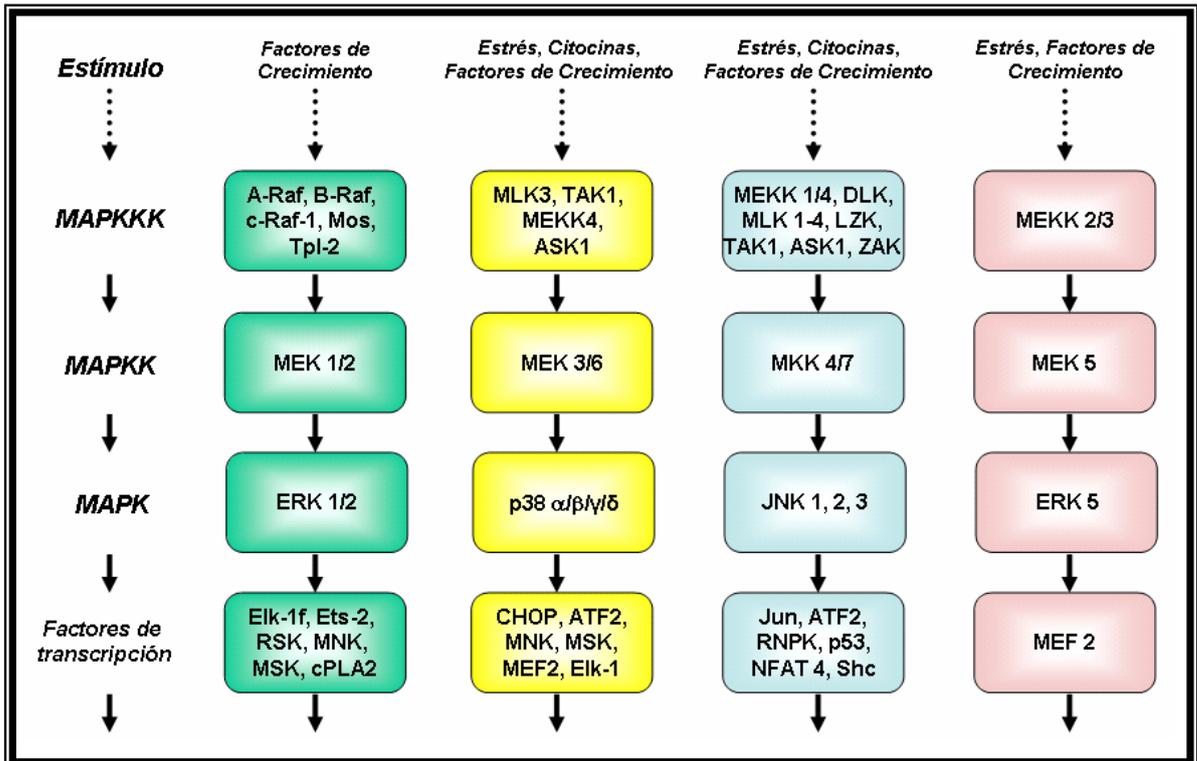
## **2.9 Transactivación de Receptores con actividad de cinasa de tirosina.**

Los receptores con actividad de cinasa de tirosina o RTKs (por sus siglas en inglés *Tyrosin Kinases Receptors*) son un tipo de receptores que, como su nombre lo indica, tienen actividad intrínseca de cinasa de tirosina, pues poseen en su parte intracelular una región catalítica que permite la autofosforilación del receptor y de otros sustratos proteicos. En presencia del agonista, los dominios con actividad de cinasa fosforilan a los residuos de tirosina del receptor (fosfotirosina), los cuales al ser fosforilados, promueven la formación y reclutamiento de un complejo proteico (Shc-Grb2-SOS) importante para iniciar la señalización del receptor en la que se activan proteínas que son fosforiladas en secuencia lineal.

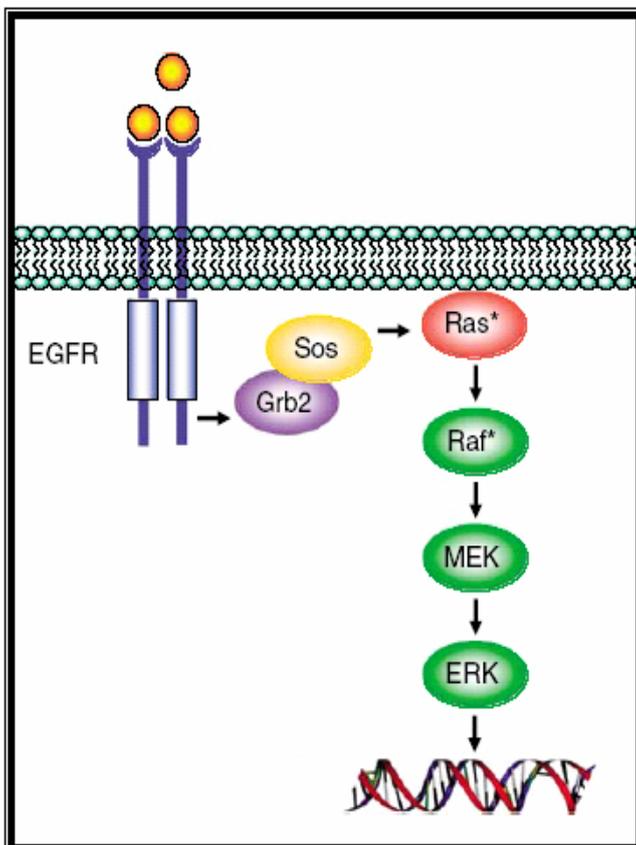
Estos receptores pueden ser activados por estrés o por la acción de citocinas, sin embargo, los ligandos más frecuentes para RTKs son factores de crecimiento (Figura 11) como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermal Growth Factor*), el factor derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *Platelet Derivated Growth Factor*), la interleucina 1 (IL-1, del inglés *Interleucin-1*), etc. El ligando, al unirse al receptor, favorece la dimerización para que se lleve a cabo la transfosforilación.

Posteriormente, dependiendo del estímulo inicial, se activa una de las cuatro vías de las MAPKs. Las cinasas de dicha cascada se fosforilan en secuencia lineal, para finalmente activar diversos factores transcripcionales involucrados con proliferación, diferenciación y apoptosis (figura 11).

Una de las vías de señalización que se activan por la unión del agonista a su receptor (el receptor para EGF, por ejemplo), es la cascada de MAPKs (Figura 12). El complejo Shc-Grb2-SOS activa a la proteína Ras, misma que recluta a la proteína Raf, la primer cinasa Ser/Thr de la cascada de señalización, que fosforila a MEK para que esta a su vez pueda activar a las ERK 1 y 2. Cuando estas últimas se activan, se translocan al núcleo en donde regulan la actividad de diversos factores de transcripción como Jun, Fos y Myc (Leroy *et al.* 2007, Roberts y Dell 2007, Dhillon *et al.* 2007, Pearson *et al.* 2001, Chang y Karin 2001).



**Figura 11. Cascadas de MAPK en mamíferos.** Existen cuatro principales cascadas. Mientras que la vía de ERK se activa comúnmente por factores de crecimiento, las vías de JNK, p38 y ERK5 se activan por estrés ambiental, incluyendo shock osmótico y radiación ionizante. Muchos de los sustratos de MAPKs corresponden a factores de transcripción nucleares (Modificado de Roberts y Dell 2007; Roberts y Dell 2007).



**Figura 12. Cascada de Señalización de las MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases)** La señalización comienza con la unión del ligando, que corresponde a un factor de crecimiento (EGF), esto induce a la dimerización de los receptores para EGF. Una vez que el receptor se encuentra activado por su ligando, los residuos catalíticos del receptor se encargan de fosforilar a los residuos de tiorina, promoviendo el reclutamiento de proteínas efectoras que son activadas en secuencia lineal. La respuesta termina con la transcripción de genes en el núcleo que se encuentran involucrados con procesos de diferenciación y proliferación celular, principalmente (Modificado de Roberts y Dell 2007; Roberts y Dell 2007).

---

Dentro de la familia de las MAPKs, las ERKs, son las proteínas a las cuales se le ha atribuido la capacidad de inducir crecimiento y diferenciación celular (Sugden y Clerk 1997, Cowley *et al.* 1994). Pero no solamente estos procesos han sido identificados, sino también proliferación, supervivencia, desarrollo y transformación, así como control del ciclo celular (De Wire *et al.* 2007, Pearson *et al.* 2001, Chang y Karin 2001).

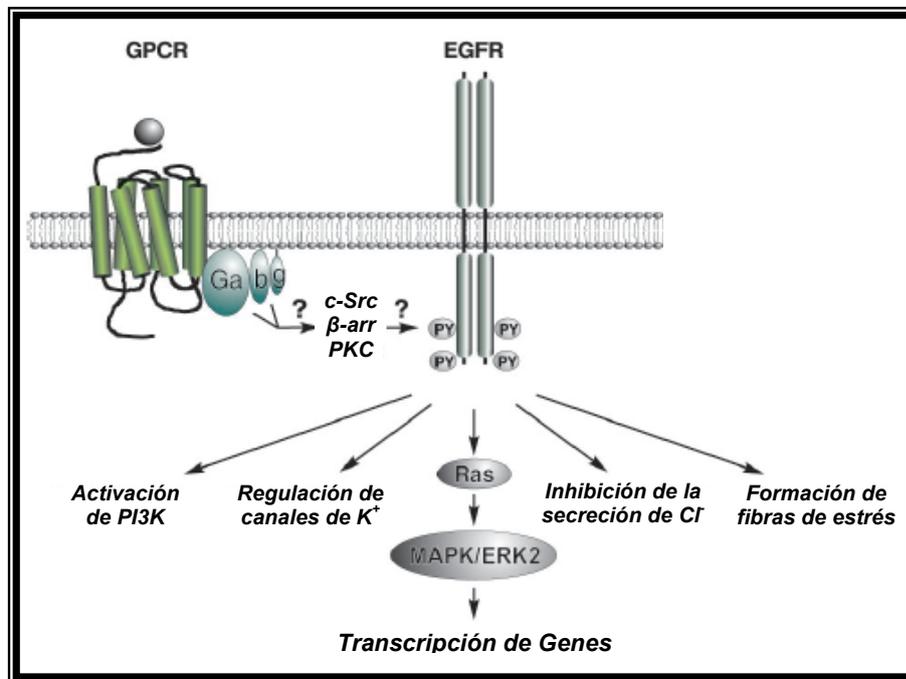
Ya se había visto que los agonistas de muchos GPCRs como el ácido lisofosfatídico, la trombina, la endotelina-1, el carbacol o bombesina, regulan procesos como el crecimiento, diferenciación y transcripción genética mediante la vía de señalización de Ras-MAPK (Dhanasekaran *et al.* 1998). También la mutación de estos receptores se encuentra asociada a la transformación de varios tipos celulares (Xu *et al.* 1994, Allen *et al.* 1991), y a la aparición de otras formas tumorales (Lyons *et al.* 1990, Parma *et al.* 1993). A nivel molecular, se sabe que la cascada de MAPKs puede ser activada no solamente a través del ligando de los RTKs, sino que también por medio de la activación de los GPCRs. A este mecanismo, de activación de los RTKs se le denomina “transactivación” (Pyne *et al.* 2004, Daub *et al.* 1996).

En distintos GPCRs y tipos celulares puede ocurrir este proceso (Natarajan y Berk 2006, Ferry *et al.* 2005, Piiper y Zeuzem 2004, Schafer *et al.* 2004, Fergusson 2003, Saito y Berk 2001, Liebmann y Bohmer 2000, Daub *et al.* 1996); los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos (Karkoulas *et al.* 2005, Askari *et al.* 2005, Cussac *et al.* 2002, Maudsley *et al.* 2000, Zhong y Minnerman 1999), el receptor  $AT_{1A}$  (Olivares-Reyes *et al.* 2005, Lefkowitz *et al.* 2004, Thogo *et al.* 2002) y el receptor para la hormona paratiroidea (PTHrP) (Sneddon y Friedman 2007, Gesty-Palmer *et al.* 2006, Rey *et al.* 2006, Lederer *et al.* 2000), son los que más se han estudiado en la transactivación del receptor para el EGF. Se han propuesto varios mecanismos para la transactivación de RTKs, pero en general, es aceptado que la activación de la vía de MAPKs es dependiente del tipo celular (Prenzel *et al.* 2000). Uno de ellos es en el que se involucra la activación de proteínas efectoras intracelulares incluyendo a la proteína PYK2 (tirosina-cinasa citoplásmica) (Dikic *et al.* 1996) y varios miembros de la familia de Src (Figura 13) (Prenzel *et al.* 2000, Cao *et al.* 2000, Dikic *et al.* 1996, Luttrell *et al.* 1997, Luttrell *et al.* 1996).

Se ha visto que la cinasa Src se recluta en la membrana plasmática como consecuencia de la activación de algunos GPCRs y al parecer posee sitios de unión a estos receptores (Cao *et al.* 2000). También se ha propuesto que puede ser activada por las subunidades  $\beta\gamma$  de algunas proteínas G (Luttrell *et al.* 1997), o bien, por su interacción con las  $\beta$ -arrestinas (De Wire *et al.* 2007, Millar *et al.* 2000), y que dicha activación puede conducir a la señalización de la vía de MAPKs, principalmente de las ERK 1/2, mediante la fosforilación directa del receptor para EGF en los residuos catalíticos (Luttrell *et al.* 1997) o mediante la participación de PI3K (De Wire *et al.* 2007, Punn *et al.* 2006).

Existen otras evidencias de que las  $\beta$ -arrestinas pueden tener un papel importante en la amplificación de la señal mediada por GPCRs de una manera independiente a la activación de proteínas G (Figura 13) (Snedon y Friedman 2007, Lefkowitz 2007, Shenoy y Lefkowitz 2005, Millar *et al.* 2000, Luttrell *et al.* 1996). Existen algunos GPCRs de Clase B (cuya interacción con la  $\beta$ -arrestina es estable) en los cuales, la transactivación es dependiente de la internalización del receptor, y por tanto, de la formación de complejos proteicos receptor/ $\beta$ -arrestina con proteínas como Raf, MEK y ERK (Lefkowitz 2007, Shenoy y Lefkowitz 2005).

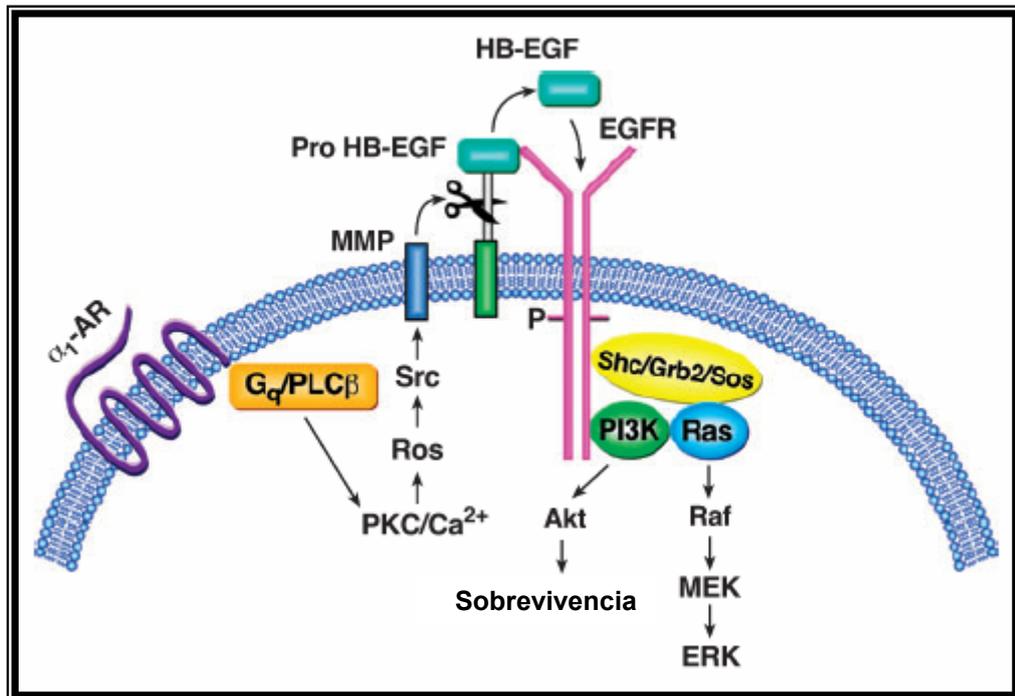
En este caso, la activación dura el tiempo que ERK fosforilado se encuentre asociado a las vesículas citosólicas, generando mecanismos como migración celular y quimiotaxis. Pero en el caso de los receptores que tienen una interacción débil con la arrestina (Clase A) no se encuentra claro si se requiere de internalización y cuál es el mecanismo que activa la vía de MAPKs.



**Figura 13. Transactivación del receptor de EGF a partir de un GPCR.** Varios componentes de la cascada de señalización de algunos GPCRs, como la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G, las cinasas de la familia de Src, las  $\beta$ -arrestinas, la PKC, entre otros, podrían estar participando en la transactivación del receptor para EGF, para llevar a la activación de la vía de MAPKs y regular otros mecanismos celulares. Sin embargo, el mecanismo exacto aun se desconoce (Modificado de Prenzel *et al.* 2000; Prenzel *et al.* 2000).

También se ha descrito otro mecanismo en el que la PKC puede activar a la metaloproteasa (MMP) vía Ros y Src. La metaloproteasa actúa sobre el complejo EGF-heparina (HB-EGF), presente en la membrana celular y como consecuencia de esto, se induce el desprendimiento del EGF al medio extracelular. El EGF liberado, puede activar a su receptor EGFR, llevando así a la señalización de la vía de MAPKs ((Shah *et al.* 2006, Penzel *et al.* 2000) (Figura 14).

Los últimos estudios con el receptor CRF<sub>1</sub>, demuestran que en presencia de su ligando (CRF), este receptor es capaz de activar la vía de MAPKs, específicamente a las ERK 1/2. Los mecanismos aún no se conocen bien, sin embargo, diversos autores han sugerido que puede ser a través de la participación de la PKC o la PKA (Pedersen *et al.* 2002), aunque otros estudios revelan que no se requiere de PKA para llevar a cabo dicha transactivación (Rossant *et al.* 1999).



**Figura 14. Papel de la metaloproteasa (MMP) en la transactivación del EGF.** La unión de algunos GPCRs (como el receptor  $\alpha_1$ AR) con su ligando activan proteínas intracelulares (PKC/Ros/Src) que tienen un efecto sobre la metaloproteasa. Esta última, al actuar sobre el complejo HB-EGF, induce a la liberación de EGF, el cual puede activar la vía de MAPKs mediante su interacción con el receptor EGFR (modificado de Shah *et al.* 2006; Shah *et al.* 2006).

---

### III. ANTECEDENTES

El CRF es un factor sumamente importante en la regulación de las respuestas fisiológicas ante estrés que se activan por el eje HPA. Sus efectos negativos causados por la hipersecreción de esta hormona han llevado a la búsqueda de sus efectos moleculares en el ser humano. Evidencias recientes sugieren que la actividad del CRF también puede estar asociada a la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Graziani *et al.* 2007, Slominsky *et al.* 2006, Smith y Vale 2006, Zbytek y Slominsky 2005, Zbytek *et al.* 2005, Wang *et al.* 2003), y que este mecanismo ocurre mediante la activación de vías proliferativas como la cascada de MAPKs (Kageyama 2007, Hillhouse y Grammatopoulos 2006, Wang *et al.* 2003, Cibelli *et al.* 2001).

Existe evidencia de que a través del estímulo de varios GPCRs es posible activar algunas cinasas de la cascada de MAPKs, como Raf, MEK y ERK, y que este mecanismo aparentemente es dependiente de la transactivación del EGFR, ya sea mediante la participación de la metaloproteasa, las cinasas de la familia de Src, la subunidad  $G\beta\gamma$ , las  $\beta$ -arrestinas, o posiblemente mediante la participación de PKA o PKC (Leroy *et al.* 2007, Faure *et al.* 1994, Hawes *et al.* 1995).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se comenzaron a estudiar las vías de señalización activadas por el receptor  $CRF_1$  a través de CRF en células COS-7 transfectadas con el receptor. De manera muy interesante encontramos que, al igual que ocurre con otros GPCRs, el receptor  $CRF_1$  puede activar la vía de las MAPKs, específicamente de las ERK 1/2. Este dato nos llevó a buscar el mecanismo por el cuál se activa esta vía alterna.

El grupo de Prenzel *et al.* en el 1999, propuso que varios GPCRs pueden llevar a cabo el proceso de transactivación del receptor para EGF. Este mecanismo propuesto es dependiente de la liberación de EGF del factor HB-EGF activado por una proteína transmembranal llamada metaloproteasa, que a su vez, se activa por PKA y PKC (Prenzel *et al.* 1999). Con el receptor  $CRF_1$ , nosotros encontramos que este mecanismo no se encuentra involucrado, en cambio, sí observamos la participación de otros factores intracelulares que se ilustran en la figura 15 y que a continuación se describen (Fuentes-González 2007).

Lo primero que hicimos fue probar el inhibidor del receptor para EGF (AG1478) para determinar la manera en que esta condición modifica la fosforilación de las ERK 1/2. Con este experimento, nosotros encontramos que el CRF requiere de la transactivación del receptor de EGF para activar la vía de las ERK 1/2. Como control, también verificamos la actividad de la PI3K detectando la fosforilación de su sustrato (Akt), tanto en condiciones normales, como en presencia del inhibidor del receptor para EGF.

---

Asombrosamente, observamos que la fosforilación de Akt no se modifica con el inhibidor, lo cual indica que la activación de PI3K puede llevarse a cabo de manera independiente de la transactivación del receptor para EGF. Este resultado nos llevó a preguntarnos si PI3K está involucrada en la activación de las ERK 1/2 a través del CRF, por lo tanto, se utilizó wortmanina (inhibidor de PI3K). Este tratamiento nos dio evidencia de que PI3K sí se encuentra involucrada, pero de manera independiente de la transactivación del receptor para EGF (Figura 15). El grupo de Grammatopoulos *et al.*, recientemente confirmaron la participación de PI3K en la activación de las ERK 1/2 a través de el estímulo con CRF (Grammatopoulos *et al.* 2006).

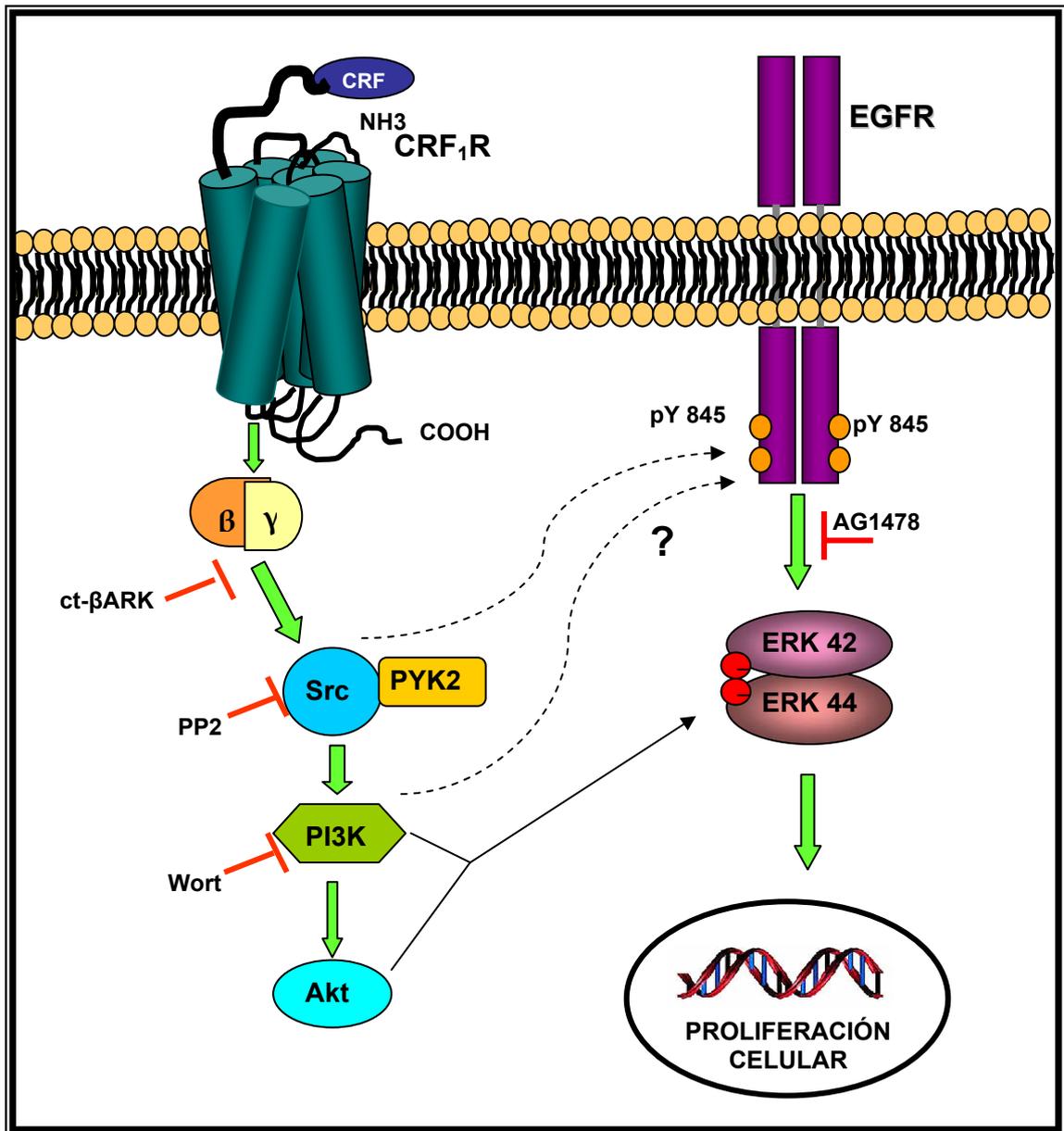
Posteriormente, dada la importancia de las cinasas de la familia de Src en la activación de vías proliferativas, se utilizó el inhibidor de c-Src (PP2). Dichos resultados revelaron que esta proteína tiene un papel importante en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF. Además, para discernir la ubicación de esta cinasa con respecto a PI3K en la vía de señalización que nos encontrábamos describiendo, también probamos la fosforilación de Akt. Con el tratamiento de PP2, la activación de esta proteína disminuyó significativamente, indicando que la cinasa Src se encuentra río arriba de PI3K.

Además, en presencia de PP2, la fosforilación de la MAPKs se abatió por completo, sugiriendo que la activación de las ERK 1/2 a través de CRF es un mecanismo totalmente dependiente de la activación de c-Src.

Como ya se había visto la participación de las subunidad  $G\beta\gamma$  en la transactivación del EGFR a través del  $\beta_2AR$  (Lefkowitz *et al.* 2000) y  $\alpha_2AR$  (Luttrell *et al.* 1997), también se pensó en la posibilidad de que ocurriera un mecanismo similar. Por lo tanto, se transfectó ct-BARK, un fragmento de la proteína GRK 2 que secuestra al complejo  $G\beta\gamma$  impidiendo que active a otras proteínas efectoras. Se encontró que este complejo participa en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF. Entonces determinamos la fosforilación de c-Src y de Akt en presencia de ct-BARK y observamos una disminución significativa en ambos casos. Esto indica, que el estímulo con CRF libera al complejo complejo  $G\beta\gamma$ , que activa a c-Src y, consecuentemente a PI3K para llevar a cabo la fosforilación de las ERK 1/2 (Figura 15).

Los últimos datos obtenidos con el uso de la toxina pertussis, revelan la participación de la proteína  $G_{\alpha i}$  en el mecanismo hasta ahora descrito (datos no publicados Olivares-Reyes y Fuentes-González 2007).

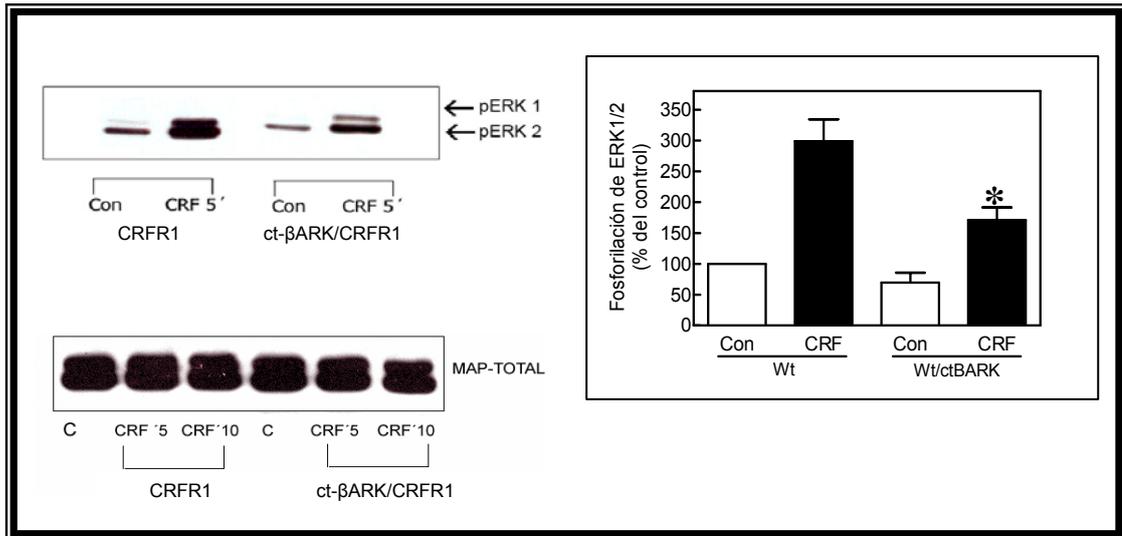
Es importante mencionar que el uso de ct-BARK disminuye la fosforilación de las MAPKs solamente en un 50% (Figura 16), lo cual sugiere que puede haber un factor más involucrado en la activación de las ERK 1/2 a través del estímulo con CRF que posiblemente también se encuentre activando a la cinasa Src (Fuentes-González 2007).



**Figura 15. Representación esquemática del modelo propuesto en células COS-7, en donde el agonista CRF al unirse al receptor CRF<sub>1</sub> activa la cascada de señalización de las ERK1/2. El receptor CRF<sub>1</sub> a través del complejo βγ activa a la proteína cinasa Src, la cual parece estar involucrada en la activación de la vía PI3K / Akt, cinasas que participan en la activación de las ERK1/2. Por otro lado, Src puede también activar a la proteína PYK2 y al receptor para EGF en sus residuos de fosfo-tirosina 845 (pY 845). Este último activa la cascada de señalización de las MAPK específicamente a las ERK1/2, llevando a proliferación celular (Fuentes-González 2007).**

Los estudios realizados con otros GPCRs (β<sub>2</sub>AR, AT<sub>1A</sub> y PTHR) demuestran que un posible mecanismo de transactivación del receptor de EGF, en el que participan las proteínas β-arrestinas, principalmente de la β-arrestina2.

En el caso del receptor β<sub>2</sub>AR, que también pertenece a la clase A de GPCRs, de acuerdo a su interacción parcial con la β-arrestina, se ha encontrado que la transactivación del receptor de EGF es un mecanismo dependiente de la unión de β-arrestina al receptor, así como de su internalización (Lefkowitz *et al.* 2006).



**Figura 16. Participación del complejo  $\beta\gamma$  en la fosforilación de ERK1/2 mediada por el receptor de CRF Y EGF.** La presencia de ct-BARK disminuye el efecto de CRF sobre la fosforilación de las ERK 1/2 en aproximadamente el 50% de su señalización. (Modificado de Fuentes-González 2007; Fuentes-González 2007).

También el grupo de Limbird recientemente demostró que a través de la activación del receptor  $\alpha_2AR$  pueden fosforilarse las ERK mediante un mecanismo dependiente y otro independiente de la activación de Src, donde se requiere de la participación de las proteínas G. Además, encontraron que en este proceso, la  $\beta$ -arrestina tiene un papel esencial en el reclutamiento de Src y, consecuentemente, en la activación de las ERK (Wang *et al.* 2006).

De la misma manera, en el receptor para la hormona paratiroidea (PTHr) aparentemente existe un mecanismo de transactivación del EGFR en el que, al ser activado el receptor, se recluta la  $\beta$ -arrestina2 a la membrana plasmática, misma que activa a c-Src. Esta última, por algún mecanismo, posiblemente su traslado en la membrana plasmática, puede activar al EGFR.

En estos trabajos, como en algunos otros referentes a GPCRs de la clase B, se requiere tanto de la internalización del receptor, como de la formación de complejos proteicos con la maquinaria endocítica. Al parecer, el reclutamiento de proteínas (quinasas principalmente) son un factor que promueve la activación de vías de señalización alternas (De Wire *et al.* 2007).

Un mecanismo similar podría estar ocurriendo en el caso del receptor CRF<sub>1</sub>, ya que las proteínas  $\beta$ -arrestinas probablemente participen en la activación de c-Src, de manera independiente a la que lo hace el complejo G $\beta\gamma$ . Sin embargo, los estudios con respecto al receptor CRF<sub>1</sub> y  $\beta$ -arrestina en la activación de vías proliferativas han sido muy pocos.

---

Además de esto, los sitios intracelulares de los GPCRs, en los que puede haber interacción con  $\beta$ -arrestinas, han sido un foco importante para conocer los papeles multifactoriales que tienen estas proteínas en la regulación de la señalización de estos receptores. Pues estos sitios de fosforilación por GRKs regulan la translocación y unión de la  $\beta$ -arrestina 2 en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) de varios GPCRs (Oakley *et al.* 2007, Braun *et al.* 2003, Fergusson 2001, Holliday *et al.* 2005, Kohout y Lefkowitz 2003).

Los estudios han demostrado que los residuos de serina/treonina en la cola carboxílica funcionan como sitios de anclaje a  $\beta$ -arrestinas, puesto que su eliminación en algunos GPCRs que pertenecen a la clase B, disminuyen la estabilidad del complejo receptor/ $\beta$ -arrestina, cambiando de la clase B a la A (Oakley *et al.* 2007, Oakley *et al.* 1999, Oakley *et al.* 2001).

Recientemente Oakley *et al.*, crearon mutantes del receptor CRF<sub>1</sub> que carecen de los sitios probables de fosforilación localizados en la cola carboxílica y en la tercera asa intracelular (IC3) del receptor (Oakley *et al.* 2007). Con estos receptores se evaluó la importancia de estos motivos de fosforilación por GRKs, en el reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas. Ellos encontraron que la fosforilación del receptor inducida por su agonista ocurre tanto en IC3, como en la cola carboxílica, al parecer de manera jerárquica, pues se requiere de la cola carboxílica para que el motivo STTSET en IC3 pueda fosforilarse.

Interesantemente, el reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina2 coincide con este patrón de fosforilación; en cambio, la internalización no se ve afectada en ninguno de los casos. De esta manera, ellos concluyen que la cola carboxílica del receptor posee sitios importantes tanto para su fosforilación, como para el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina2 y, consecuentemente, para regular la actividad del receptor.

Los estudios con respecto al mecanismo de transactivación del receptor para EGF a través del CRF han sido pocos. Si bien ya se conoce que uno de los mecanismos involucra a G $\beta$  $\gamma$ /Src/PI3K, aún no se sabe si las proteínas involucradas en la regulación negativa del receptor CRF<sub>1</sub> ( $\beta$ -arrestinas y GRKs) pueden tener también un papel importante en dicho mecanismo. Para evaluar esta posible vía alterna de transactivación del EGFR mediada por CRF, en este trabajo se estudiarán los determinantes estructurales del receptor que pertenecen a los sitios de regulación del receptor mediante la fosforilación de sitios específicos, así como por unión de las  $\beta$ -arrestinas.

---

## IV. HIPÓTESIS

Considerando que:

1. La cola carboxílica y la tercer asa intracelular del receptor CRF<sub>1</sub> poseen sitios importantes (Ser/Thr) para la regulación del receptor a través de su fosforilación y de la unión de las proteínas  $\beta$ -arrestinas, y que
2. las  $\beta$ -arrestinas pueden funcionar como proteínas transductoras alternativas de la señalización de los GPCRs al formar complejos proteicos con otras proteínas como Src, Raf, MEK, llevando a la activación de las MAPKs,

entonces, estos sitios de regulación pueden tener un papel importante en la activación de la vía de MAPKs, específicamente de las ERK 1/2 mediada por CRF.

---

## V. OBJETIVOS

Nuestro objetivo principal es estudiar el papel que tienen la cola carboxílica y la tercer asa intracelular del receptor CRF<sub>1</sub> en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF. Para ello se pretenden alcanzar los siguientes cuatro objetivos particulares:

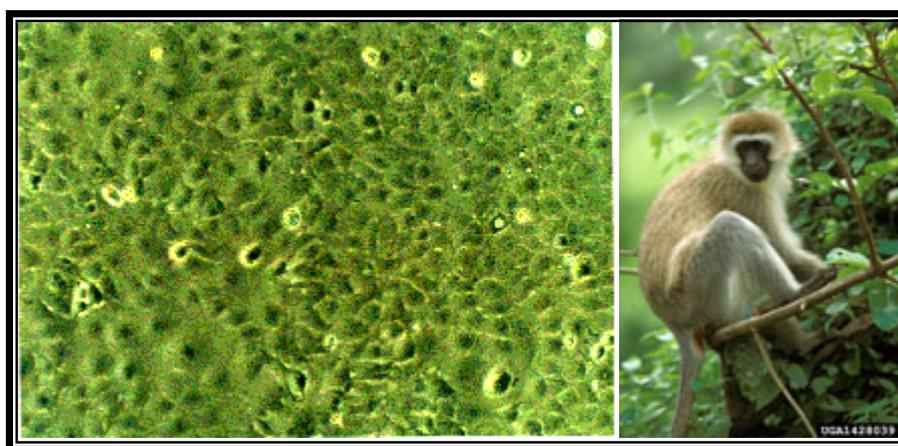
1. Determinar el papel de la cola carboxílica y la tercer asa intracelular del receptor CRF<sub>1</sub> en la activación de las ERK1/2, mediante el uso de receptores mutados en estos sitios (descritos en materiales y métodos).
2. Analizar si se modifica la activación de las ERK 1/2 mediada por el receptor CRF<sub>1</sub> WT con la sobre-expresión de las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2 a diferentes tiempos.
3. Estudiar el efecto de la sobre-expresión de las GRKs 3 y 5 en la activación de las ERK 1/2 mediada por el receptor CRF<sub>1</sub> WT.
4. Determinar si la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> WT es requerida o no para la activación de ERK 1/2.

---

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cultivo celular.

Se utilizó como modelo celular a la línea COS-7 obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC: Manassas, VA), para todos los experimentos. Estas células, provenientes de riñón de simio verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Figura 17), fueron cultivadas en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y 10% (v/v) de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum HyClon*), en una incubación de 37 °C y con 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 17. Células COS-7** Del lado izquierdo se puede apreciar la morfología estrellada de estas células de riñón, y del lado derecho, la especie de simio al que pertenecen (*Cercopithecus aethiops*).

Para las transfecciones y cotransfecciones, las células fueron cultivadas en cajas de 10 cm de diámetro con una confluencia del 70%, y después de 24 horas se resembraron en cajas de 6 y 12 pozos (según el requerimiento de los experimentos), con una confluencia del 70-85% para el día del experimento.

Los experimentos fueron realizados 48 horas post-transfección, y después de haber incubado a las células por 6 horas con DMEM sin suero.

### 6.2 Transfección.

La transfección se realizó por medio de una técnica de liposomas catiónicos en la cual se mezclan vesículas lipídicas con el plásmido que contiene a la región codificante para la proteína requerida. De esta manera, los plásmidos quedan atrapados en las vesículas, y éstas últimas, por su hidrofobicidad, permiten la introducción del plásmido al medio intracelular.

---

Esto se llevó a cabo en DMEM sin suero, 5  $\mu$ l/ml de LipofectAMINE 2000 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y los plásmidos\*, cuyas especificaciones se encuentran más adelante:

1. CRF<sub>1</sub> WT (1  $\mu$ g/ml)
2. CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 412 (1  $\mu$ g/ml)
3. CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 386 (1  $\mu$ g/ml)
4. CRF<sub>1</sub> IC3-WT (1  $\mu$ g/ml)
5. CRF<sub>1</sub> IC3- $\Delta$ 386 (1  $\mu$ g/ml)

El tiempo de transfección fue de 6 horas, siguiendo las especificaciones del fabricante, y en las condiciones en las que se encontraba descrito anteriormente (Oakley *et al.* 2007).

El receptor CRF<sub>1</sub> de humano (plásmido 1) fue previamente amplificado de una librería de cDNA de células Y79 de retinoblastoma por PCR, y subclonado en pcDNA3.1 (Invitrogen: Carlsbad, CA) utilizando los sitios *KpnI* y *XbaI* (Oakley *et al.* 2007). El epítotope de hemaglutinina (HA) de influenza: YPYDVPDYA, fue insertado entre los residuos Cys30 y Glu31, que es una región del extremo amino terminal, usando mutagénesis dirigida (Quick Change™ kit, Stratagene: La Jolla, CA) (Oakley *et al.* 2007). La actividad de estos receptores fue confirmada por los experimentos previamente reportados de señalización de AMPc en células HEK293 (Oakley *et al.* 2007).

Se generaron varias formas truncadas del receptor WT (plásmido 1) (Figura 18):

El CRF<sub>1</sub> WT fue truncado en las siguientes posiciones:

- 1) Ser412, que remueve los últimos 4 aminoácidos (STAV) de la cola carboxílica (CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 412)
- 2) Ser386, que remueve los últimos 30 aminoácidos (SIRARVARAMSIPTSPT RVSFHSIKQSTAV) de la cola carboxílica (CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 386)

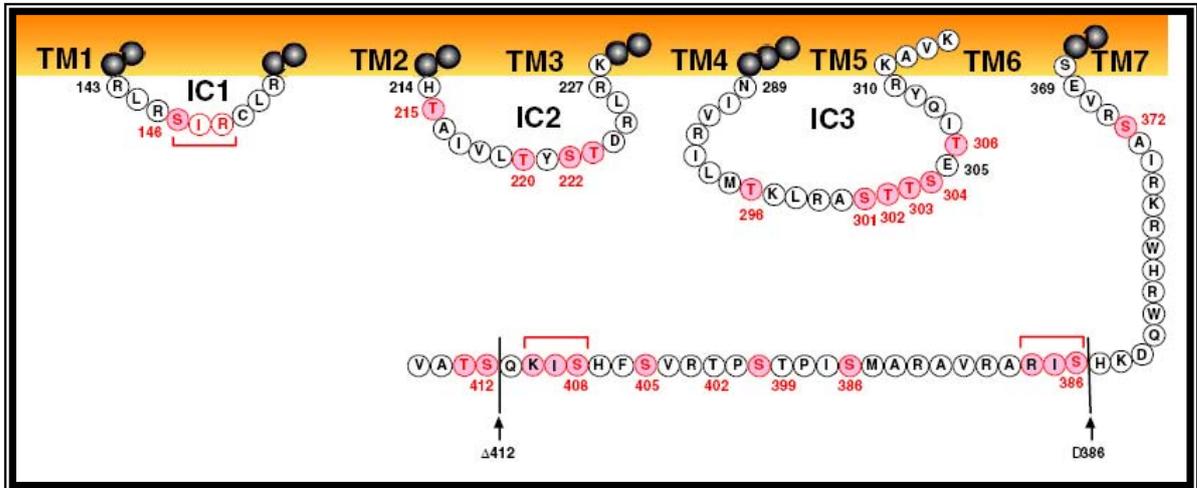
Y se realizó mutagénesis dirigida en sitios específicos de fosforilación por GRKs y PKC, de la tercer asa intracelular del receptor (IC3). Esto fue tanto para el CRF<sub>1</sub> WT, como para el CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 386:

- 3) Los residuos de serina/treonina contenidos en la tercera asa intracelular o IC3 (Ser<sup>301</sup>Thr<sup>302</sup>Thr<sup>303</sup>Ser<sup>304</sup>Glu<sup>305</sup>Thr<sup>306</sup>), fueron intercambiados por alanina, generando los receptores: IC3-5ST/A (CRF<sub>1</sub> IC3-WT) y  $\Delta$ 386-IC35ST/A (CRF<sub>1</sub> IC3- $\Delta$ 386).

---

\* Todos los plásmidos fueron obtenidos en el laboratorio de Richard Hauger en California y fueron las mismas construcciones utilizadas por Oakey *et al.* 2007 (Oakley *et al.* 2007).

Las secuencias creadas de DNA complementario (cDNA), fueron confirmadas por secuenciación (Oakley *et al.* 2007).



**Figura 18. Región intracelular del receptor CRF<sub>1</sub>.** Se señalan en círculos rojos los sitios potenciales de fosforilación del receptor, y así mismo se indican las posiciones en las que éste fue truncado para la realización de los experimentos. (Oakley *et al.* 2007).

## 6.3 Cotransfección

### a) $\beta$ -Arrestina2 y $\beta$ -Arrestina1

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de las  $\beta$ -arrestinas, y puesto que la expresión endógena de estas proteínas en el modelo celular es baja (Tohgo *et al.* 2003, Luttrell 2002) se llevó a cabo su cotransfección. Ésta fue realizada bajo las mismas condiciones que la transfección, utilizando el receptor CRF<sub>1</sub> WT (0.5  $\mu$ g/ml) y añadiendo el plásmido con  $\beta$ -arrestina 2 (1  $\mu$ g/ml) e independientemente con FLAG- $\beta$ -Arrestina 1 (1  $\mu$ g/ml).

### b) GRKs 3 y 5

Las proteínas GRKs se encargan de fosforilar residuos intracelulares del receptor con la finalidad de regular su actividad. Para evaluar el efecto de la fosforilación por GRK3 y 5, se cotransfectaron utilizando el plásmido del receptor CRF<sub>1</sub> WT (0.75  $\mu$ g/ml) e individualmente los plásmidos con GRK3 y GRK5 (0.5  $\mu$ g/ml).

### c) Dominante Negativa de Dinamina I (DN-Dyn-I)

Puesto que la dinamina es una proteína que participa en la formación de vesículas de clatrina y de caveolinas, se cotransfectó una dominante negativa de esta proteína para evaluar el papel de la internalización en la activación de las ERK 1/2. Las condiciones fueron las mismas utilizando el plásmido del receptor CRF<sub>1</sub> WT (0.75  $\mu$ g/ml) y añadiendo el plásmido con DN-Dyn-I (0.5  $\mu$ g/ml).

---

## 6.4 Ensayos con inhibidores de internalización.

Para analizar el papel de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> en la activación de las ERK 1/2, las células transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> (1 µg/ml) fueron preincubadas con medio sin suero que contenía, de manera independiente, a los siguientes inhibidores:

Nombre del Inhibidor	Concentración	Tiempo de estímulo
Sacarosa	0.45 M	10 min.
β-Ciclodextrina	10 mM	30 min.
Oxofenilarsina (PAO)	2.5 µM	10 min.

Y posteriormente, sin retirar el medio con el inhibidor, se estimuló con CRF 100 nM a distintos tiempos.

## 6.5 Detección de proteínas por Western Blot

Después de la realización de cada experimento, se removió el medio y las células fueron lavadas en dos ocasiones con PBS frío (Buffer de fosfatos casero que contiene: NaCl 137mM, KCL 2.1mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>O 10mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>O 2mM, con un pH de 7.4) Este último también fue retirado por completo y a cada pozo se le añadieron 100 µl de Laemli 1X (SDS-protein gel loading solution 2X Quality Biological, INC + β-mercaptoetanol + agua). Cada muestra obtenida se sonicó en pulsos de 40Khz por 10 segundos (Sonios Vibra cell TM, Ultrasonic Processor).

Posteriormente se calentaron a 99°C durante 5 minutos (Termomixer Comfort Eppendorf) y finalmente se centrifugaron 5 minutos a 14.5 rpm (MiniSpinPLUS eppendorf). Después se tomó una alícuota de cada muestra (15 µl del sobrenadante en pozos pequeños y 20 µl en pozos grandes, correspondiente a ≈ 50 µg de proteína) y ésta fue cargada en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Éstos se corrieron en electroforesis a 80V durante 20 minutos y posteriormente a 120V por aproximadamente 70 minutos.

Las proteínas contenidas en los geles, al término de la electroforesis, se transfirieron a membranas PVDF en cámara de transferencia semiseca (Biorad) a 15 V y durante 90 minutos, para posteriormente llevar a cabo la detección de proteínas con anticuerpos específicos.

Todos los blots se se bloquearon por 1 hora con buffer TBS-Tween (TBS-T Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0.1%, pH 7.5) y leche al 5%, para posteriormente incubarlos con los anticuerpos primarios (tabla 3) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T 0.1%, antes de colocar el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 3) conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Proteína:	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
<b>Fosfo-ERK 1/2</b>	$\alpha$ -p-ERK 42/44 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology)	1:4000	$\alpha$ -mouse (ZYMED)	1:5000
<b>ERK2 TOTAL</b>	$\alpha$ -ERK2 (Santa Cruz Biotechnology)	1:2000 ***	$\alpha$ -rabbit (ZYMED)	1:4000 ***
<b><math>\beta</math>-arrestina 2</b>	$\alpha$ - $\beta$ -arrestina 2 (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000	$\alpha$ -mouse (ZYMED)	1:3000 ***
<b>FLAG</b>	$\alpha$ -OctA-Probe (Santa Cruz Biotechnology)	1:000	$\alpha$ -goat (KPL)	1:3000
<b>GRK3</b>	$\alpha$ -GRK3 (Santa Cruz Biotechnology)	1:000	$\alpha$ -rabbit (ZYMED)	1:3000
<b>GRK5</b>	$\alpha$ -GRK5 (Santa Cruz Biotechnology)	1:000	$\alpha$ -rabbit (ZYMED)	1:3000
<b>Dinamina I</b>	$\alpha$ -Dyn-I (Santa Cruz Biotechnology)	1:000	$\alpha$ -goat (KPL)	1:3000

**Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios y secundarios.** Todos los anticuerpos fueron diluidos en buffer TBS-T 0.1% y leche al 5%, excepto los marcados con \*\*\*, que fueron incubados en el mismo buffer pero sin leche.

Después se les añadió un kit de inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence reagent*, Amershan Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante, por 3 minutos y fueron reveladas en cuarto oscuro con los reactivos Kodak, para finalmente detectar la intensidad de cada banda obtenida en las placas, por medio del densitómetro GS-800 (Bio-Rad laboratorios). La cuantificación de estos datos se llevó a cabo en el programa Quantity One® Versión 4.6.3.

## 6.6 Análisis de Resultados

Con una  $n = 3$  ó  $4$ , los experimentos fueron evaluados en porcentajes y posteriormente analizados en el programa PRISM™, versión 4.0 (GraphPad Software: San Diego, CA) para ser graficados. En este mismo programa se realizó la prueba estadística de ANOVA de una y dos vías, tomando como diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ . En los casos en los que esta prueba fue significativa, se hizo un análisis post-hoc usando la prueba de comparación múltiple Bonferroni para determinar las diferencias individuales entre grupos.

---

## VII. RESULTADOS

### ***a) La tercer asa intracelular (IC3) y la cola carboxílica del receptor CRF<sub>1</sub> son sitios importantes para regular la activación de las ERK1/2 inducida por CRF.***

En la región intracelular del receptor CRF<sub>1</sub>, existen varios sitios potenciales de fosforilación (figura 18), que se encuentran principalmente en la tercer asa intracelular y en la cola carboxílica. Estos residuos son importantes para la regulación de la actividad normal del receptor (Oakley *et al.* 2007). Para determinar el papel de estos sitios en la activación de las ERK 1/2 a través de CRF, se utilizaron las mismas formas truncadas del receptor que en el reporte de Oakley *et al.* (2007): el receptor deletado en la Ser412 ( $\Delta$ 412), que remueve los últimos cuatro aminoácidos de la cola carboxílica (STAV); el receptor deletado en la Ser386 ( $\Delta$ 386), a la cuál le faltan los últimos 30 aminoácidos de la cola carboxílica (SIRARVARAMSIPTSPTRVSFHSIKQSTAV), y la mutante IC3-5ST/A, que elimina un cluster de residuos de serinas y treoninas por residuos de alanina, en cercana proximidad a un residuo ácido (STTSET). Tanto la cola carboxílica como la tercera asa intracelular contienen sitios potenciales de fosforilación por GRKs y cinasas dependientes de segundos mensajeros (Oakley *et al.*, 2007; Oakley *et al.*, 2001). Además, la cola carboxílica contiene el motivo TSPT, el cual puede servir como sitio de unión a  $\beta$ -arrestinas (Oakley *et al.*, 2001).

Células COS-7 fueron transfectadas de manera independiente con las formas truncadas del receptor CRF<sub>1</sub>:  $\Delta$ 412 (figura 19a) y  $\Delta$ 386 (figura 21a). Después de 48 horas se estimuló con CRF 100 nM a distintos tiempos y así mismo, se realizaron ensayos dosis dependientes con cada una de las truncantes del receptor (rango 0.1 nM-1 $\mu$ M).

Los resultados obtenidos muestran que, en presencia del receptor normal (CRF<sub>1</sub> WT), el CRF (100 nM) induce una activación rápida de las ERK 1/2, observando una fosforilación desde los 2 minutos y llegando al punto máximo entre los 5 y 10 minutos de estímulo, para posteriormente disminuir gradualmente aunque nunca retornando al nivel de fosforilación basal (figuras 19b y 21b). También, la activación de estas cinasas fue dependiente de la dosis del agonista. Sin embargo, no se observa una clara activación de las ERK 1/2 sino hasta el estímulo de CRF en concentración 100 nM (Figura 20), misma que aumenta y llega cerca del efecto máximo a una concentración de CRF 1  $\mu$ M, sin llegar a una saturación.

En comparación con el efecto dado por la activación del receptor CRF<sub>1</sub> WT, el estímulo con CRF 100 nM con los receptores CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 412 y CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 386 no modifica de manera significativa la activación de ERK 1/2, ni temporalmente (figuras 19 y 21 b), ni de manera dependiente de la dosis del agonista (figuras 20 y 22).

---

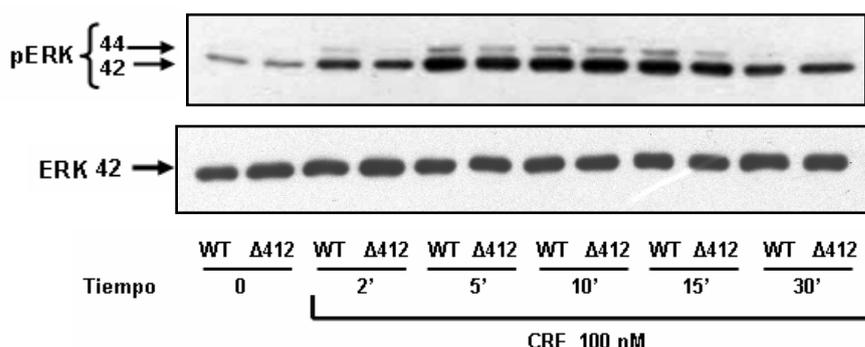
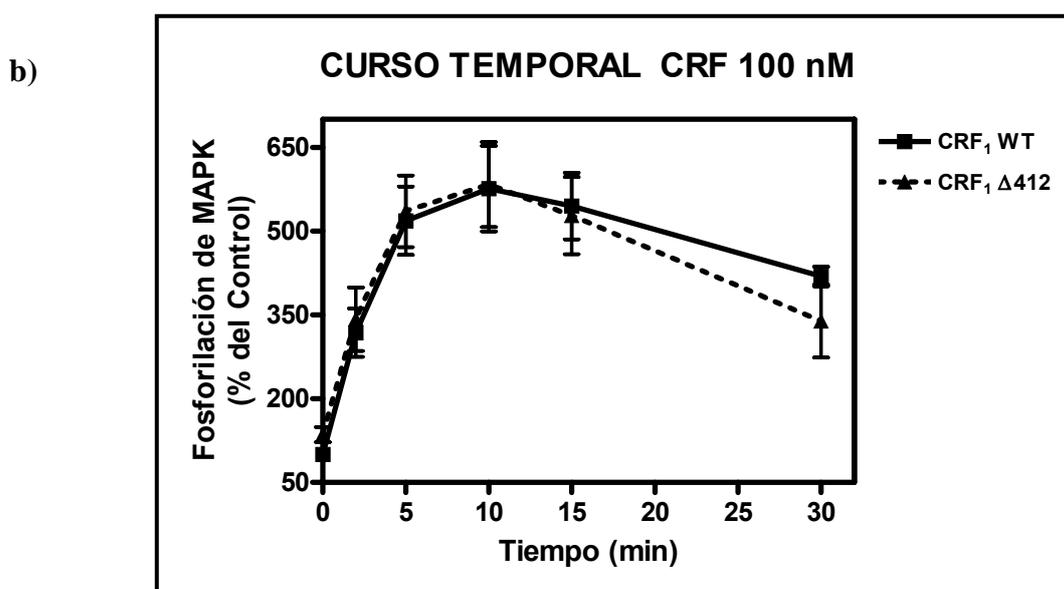
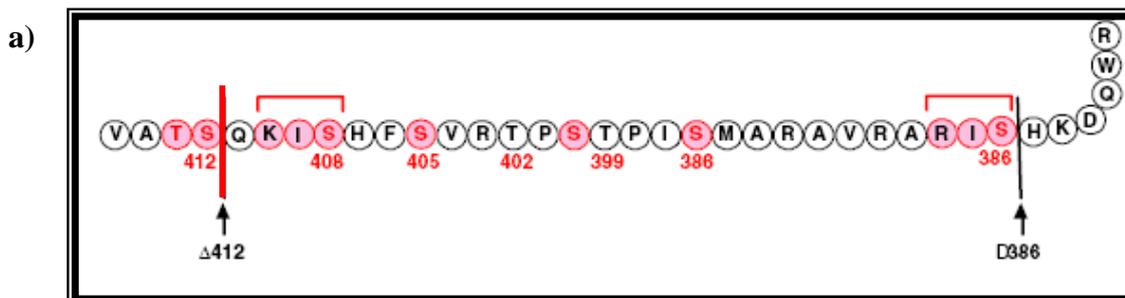
Esto sugiere que la eliminación de la cola carboxílica del receptor por sí misma no tiene un papel importante en la activación de estas cinasas.

También se determinó el papel de los sitios de fosforilación en IC3 (figura 23a) y para ello se utilizó el receptor CRF<sub>1</sub> IC3-WT y un receptor con las mismas mutaciones en IC3, pero además, truncado en Ser386 (CRF<sub>1</sub> IC3-Δ386) (Oakley *et al.* 2007). Este último receptor elimina todos los posibles sitios de fosforilación localizados en la tercera asa y la cola carboxílica. Ambos receptores fueron transfectados independientemente en el mismo modelo celular, y después de 48 horas se realizaron ensayos con estímulos de CRF 100 nM a distintos tiempos.

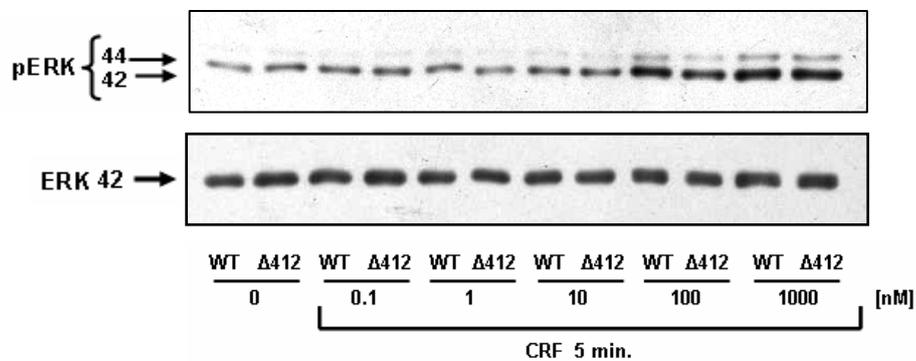
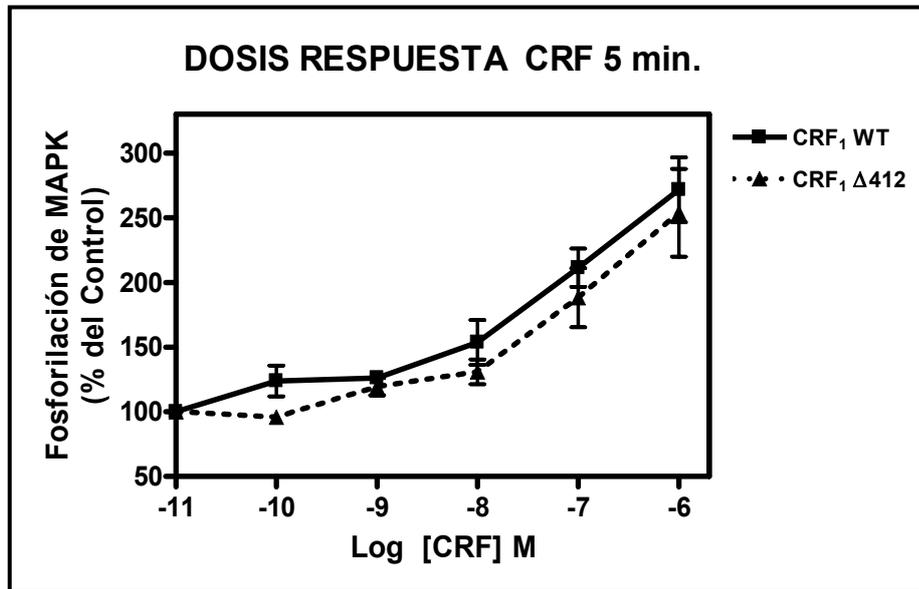
Los resultados obtenidos demuestran que la mutación en los sitios STTSET en el receptor CRF<sub>1</sub> IC3-WT no participan en la activación de las ERK 1/2, puesto que su eliminación no afecta de manera significativa la activación de estas cinasas (figura 23b). Sin embargo, cuando se eliminan estos sitios y la cola carboxílica del receptor en la mutante IC3-Δ386, la activación de las ERK 1/2 disminuye de manera significativa desde los 5 y hasta los 30 minutos de estímulo con CRF 100 nM, pero conservando la misma cinética de activación (figura 24).

Los datos anteriores indican que tanto la cola carboxílica como la tercera asa intracelular del receptor CRF<sub>1</sub> son importantes para la activación de la vía de MAPKs, pero que se requiere de ambos dominios para que se lleve a cabo la regulación de la actividad de estas cinasas.

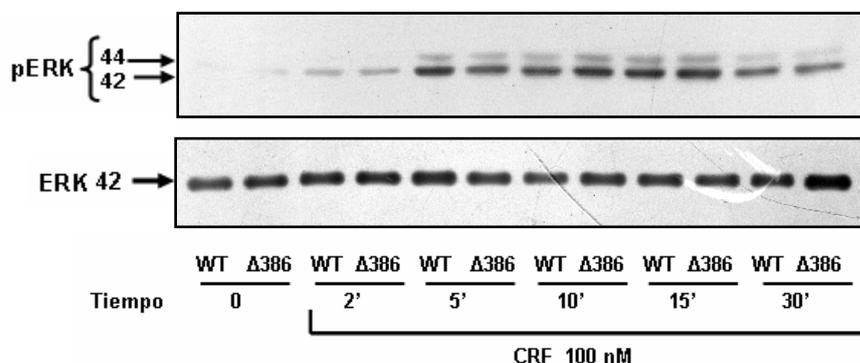
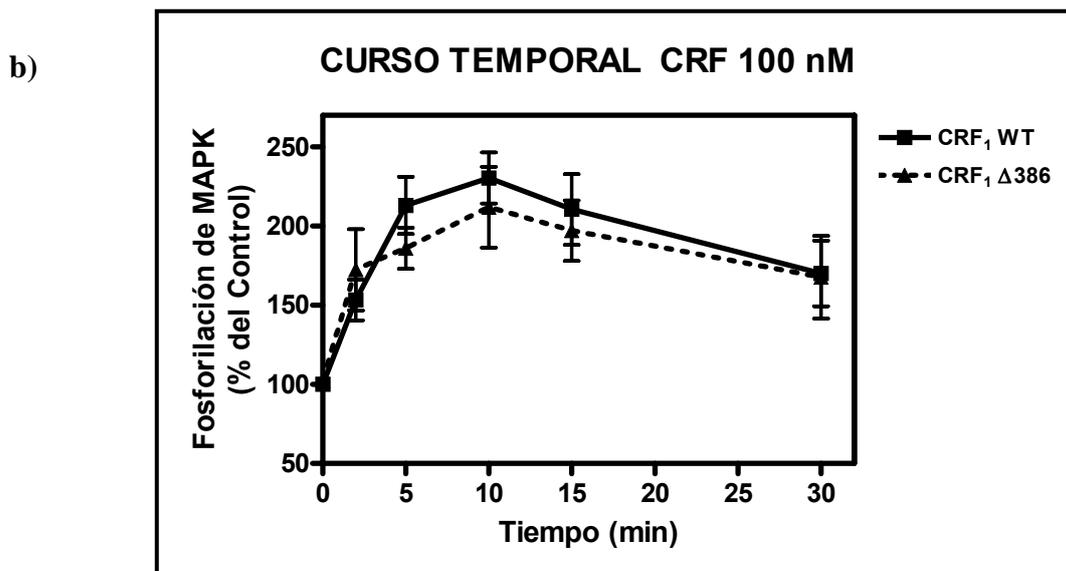
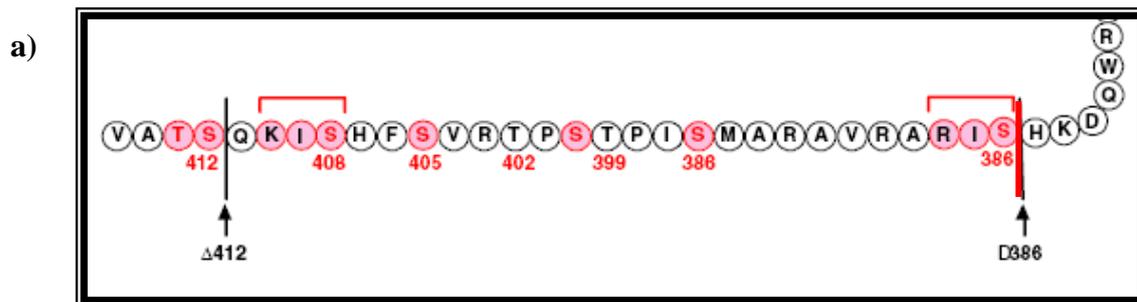
Se demostró recientemente, en células HEK293 y COS-7, la expresión de las formas truncadas del receptor CRF<sub>1</sub> que se utilizaron en este trabajo, pero además, que son mutantes funcionales que continúan activando la vía de G<sub>αs</sub> (Oakley *et al.* 2007). También se controló que el número de células transfectadas, así como la concentración de los plásmidos, fueran iguales en todos los experimentos con la finalidad de evitar diferencias en el nivel de expresión de los receptores normales y truncados.



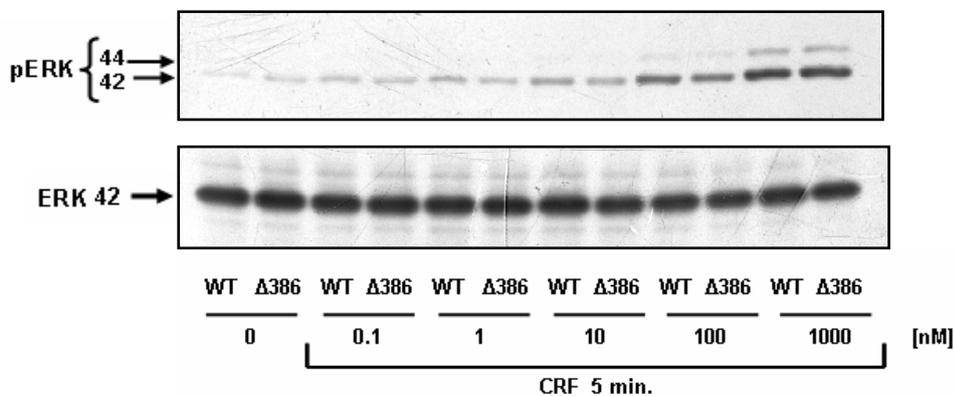
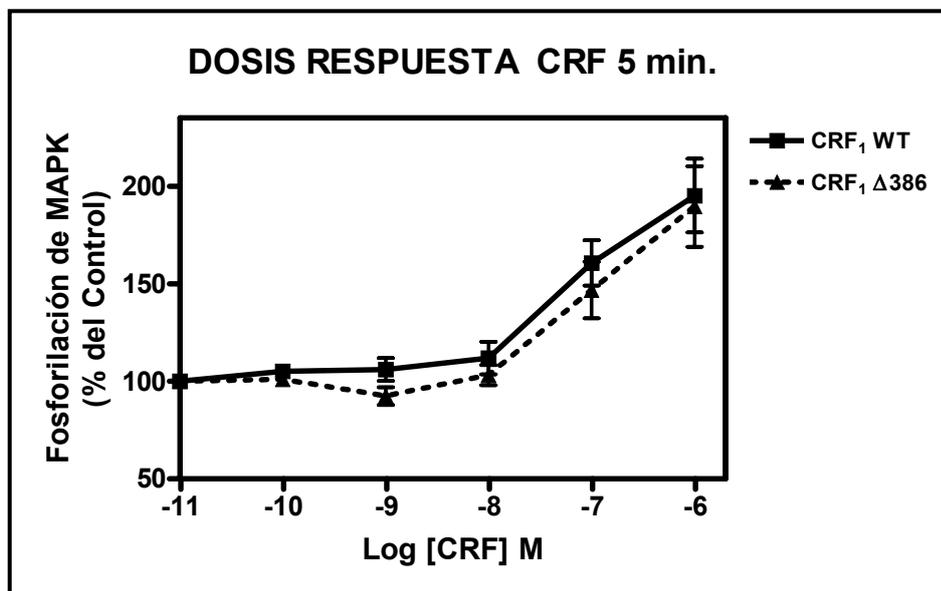
**Figura 19. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF<sub>1</sub> WT y receptores CRF<sub>1</sub> Δ412.** a) Estructura de la cola carboxilica del receptor en detalle, donde se especifica con una línea roja el sitio donde fue deletado el receptor. b) Curso temporal de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> WT, e independientemente, con el receptor CRF<sub>1</sub> Δ412. Las células se estimularon con CRF (100 nM) en los tiempos indicados, se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos α-pERK 1/2 y α-ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% el control de cada experimento (tiempo cero). No hubo diferencias significativas.



**Figura 20. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF<sub>1</sub> WT y receptores CRF<sub>1</sub> Δ412.** Ensayo dosis-dependiente de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 transfectadas de manera independiente con los receptores CRF<sub>1</sub> WT y CRF<sub>1</sub> Δ412. Las células se estimularon con CRF en las concentraciones indicadas, durante 5 minutos, se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). No hubo diferencias significativas.

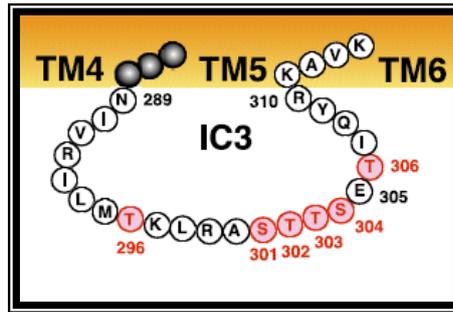


**Figura 21. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF<sub>1</sub> WT y receptores CRF<sub>1</sub> Δ386.** a) Estructura de la cola carboxilica del receptor en detalle, donde se especifica con una línea roja el sitio donde fue deletado el receptor. b) Curso temporal de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> WT, e independientemente, con el receptor CRF<sub>1</sub> Δ386. Las células se estimularon con CRF (100 nM) en los tiempos indicados, se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por inmunoblot con los anticuerpos α-pERK 1/2 y α-ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). No hubo diferencias significativas.

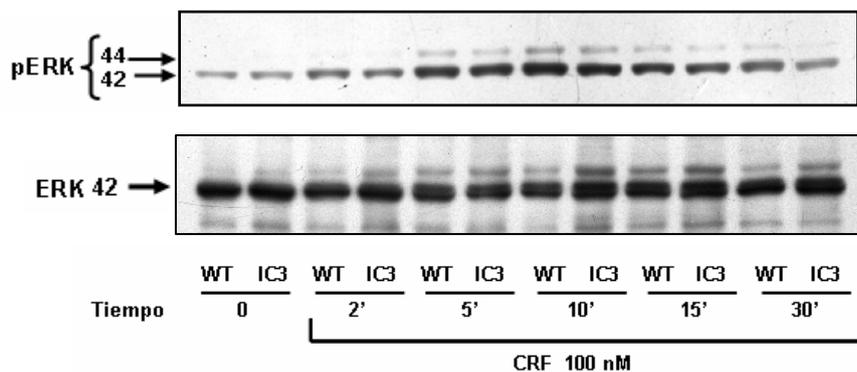
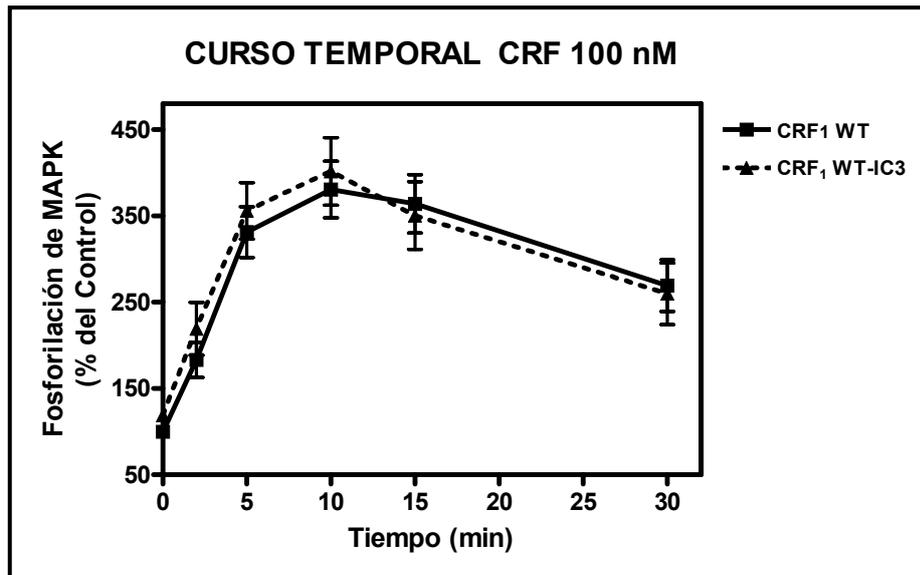


**Figura 22. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF<sub>1</sub> WT y receptores CRF<sub>1</sub> Δ386.** Ensayo dosis-dependiente de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 transfectadas de manera independiente con los receptores CRF<sub>1</sub> WT y CRF<sub>1</sub> Δ386. Las células se estimularon con CRF en las concentraciones indicadas, durante 5 minutos. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). No hubo diferencias significativas.

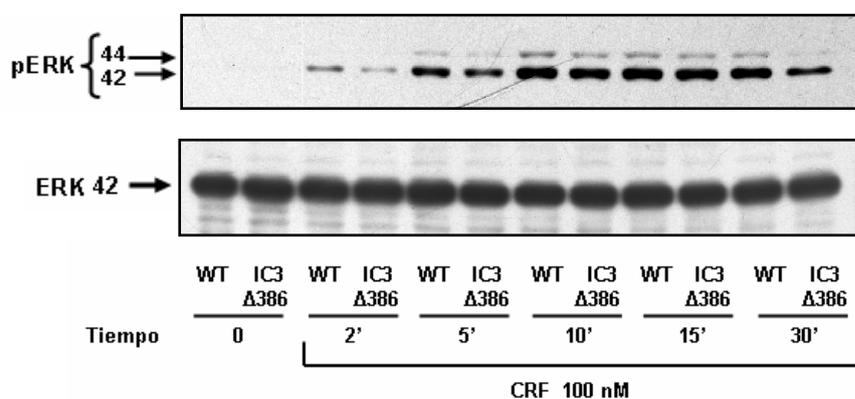
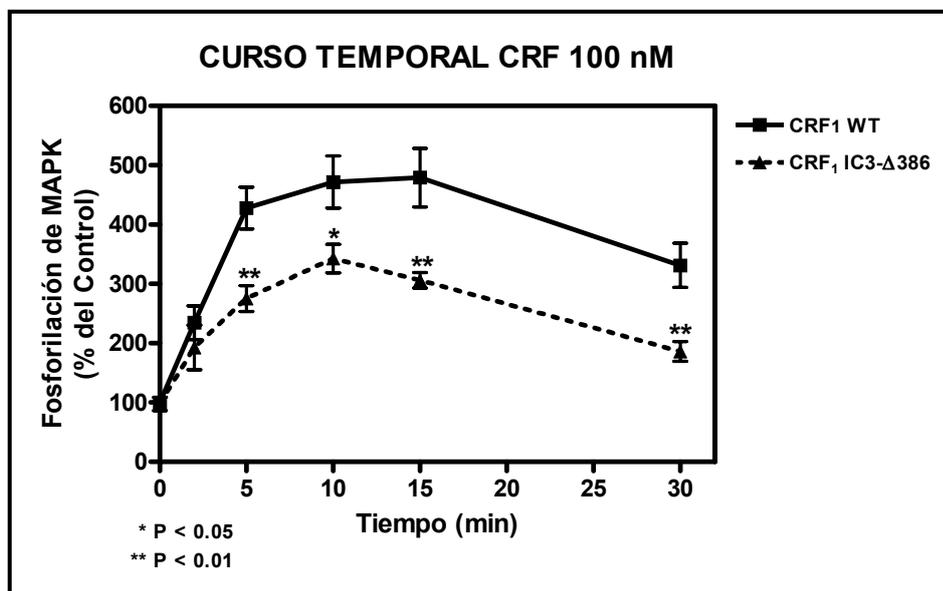
a)



b)



**Figura 23. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF<sub>1</sub> WT y CRF<sub>1</sub> WT-IC3.** a) Estructura de la tercer asa intracelular del receptor, donde se encuentran en círculos rojos los aminoácidos que fueron cambiados por Alanina. b) Curso temporal de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 transfectadas de manera independiente con los receptores CRF<sub>1</sub> WT y CRF<sub>1</sub> WT-IC3. Las células se estimularon con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). No hubo diferencias significativas.



**Figura 24. Fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de los receptores CRF<sub>1</sub> WT y CRF<sub>1</sub>R IC3-Δ386.** Curso temporal de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 transfectadas de manera independiente con los receptores CRF<sub>1</sub> WT y CRF<sub>1</sub> IC3-Δ386. Las células se estimularon con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por inmunoblot con los anticuerpos α-pERK 1/2 y α-ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \*P<0.05, \*\*P<0.01.

---

**b) La sobre-expresión de la  $\beta$ -arrestina2, pero no la  $\beta$ -arrestina1, aumenta la fosforilación de las ERK1/2.**

Los resultados obtenidos con el uso de las formas truncadas del receptor CRF<sub>1</sub>, interesantemente concuerdan con los datos que el grupo del Dr. Richard Hauger publicó con respecto a la interacción de las  $\beta$ -arrestinas con el receptor. De la misma manera que la eliminación de los residuos de fosforilación en IC3 y la cola carboxílica modifican la activación de las ERK 1/2 a través del estímulo con CRF, estas mismas mutaciones alteran la interacción de las  $\beta$ -arrestinas con el receptor (Oakley *et al.* 2007).

Estas similitudes, además de los datos publicados con otros receptores como el  $\beta_2$ AR, en donde las  $\beta$ -arrestinas participan en la transactivación del receptor de EGF, indican que hay la probabilidad de que estas proteínas tengan un papel importante en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF. En la figura 25a se comprobó que la expresión endógena de ambas isoformas de  $\beta$ -arrestina en las células COS-7 es muy baja (Menard *et al.* 1997). Así pues, para determinar el papel de estas proteínas se sobre-expresaron las  $\beta$ -arrestinas1 y 2 de manera independiente y se realizaron ensayos de cursos temporales con CRF 100 nM.

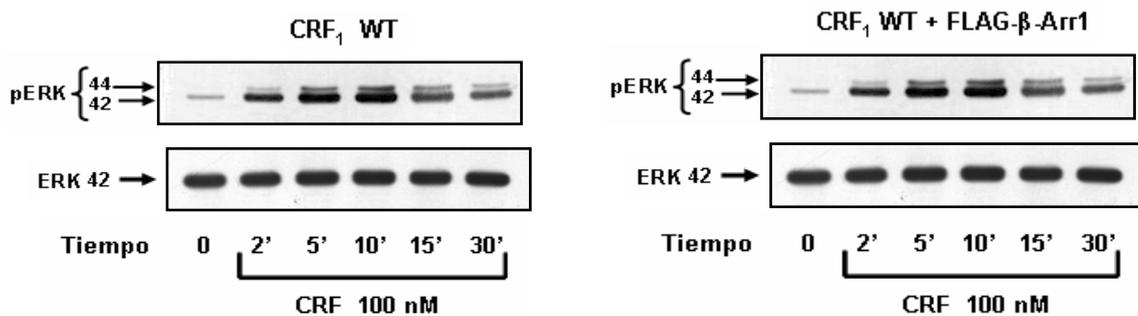
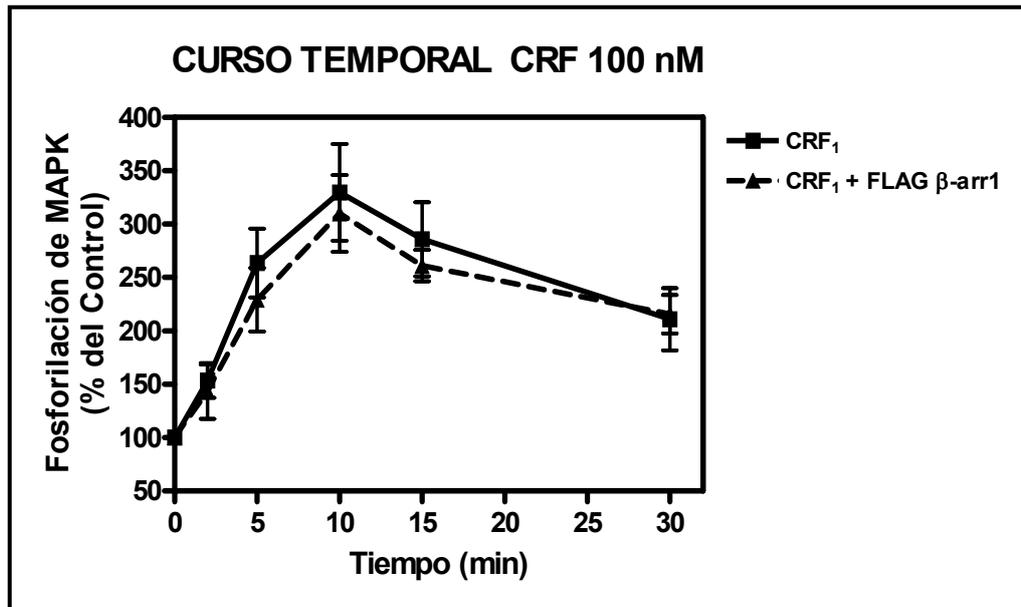
Los resultados que se muestran en la figura 25b indican que la sobre-expresión de la  $\beta$ -arrestina1 no modifica la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF, pues la fosforilación de estas cinasas en presencia de la  $\beta$ -arrestina1 es igual que en la condición normal. En cambio, si se sobre-expresa la  $\beta$ -arrestina2, la fosforilación de las ERK1/2 aumenta de manera significativa desde los 2 y hasta los 40 minutos de estímulo con CRF, en comparación con el control (sin  $\beta$ -arrestina2) (figura 26). De manera interesante, la activación de las ERK 1/2 en presencia de la  $\beta$ -arrestina2, a pesar de ser mayor, vuelve a los niveles basales a los 60 minutos al igual que en condiciones normales.

Estos datos demuestran que la  $\beta$ -arrestina2, pero no la  $\beta$ -arrestina1, participa en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF.

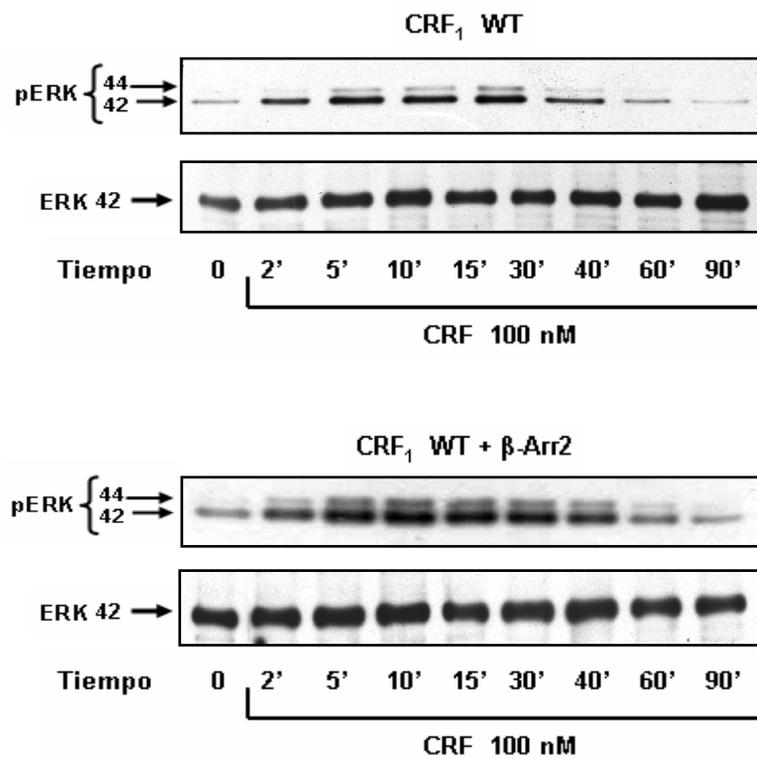
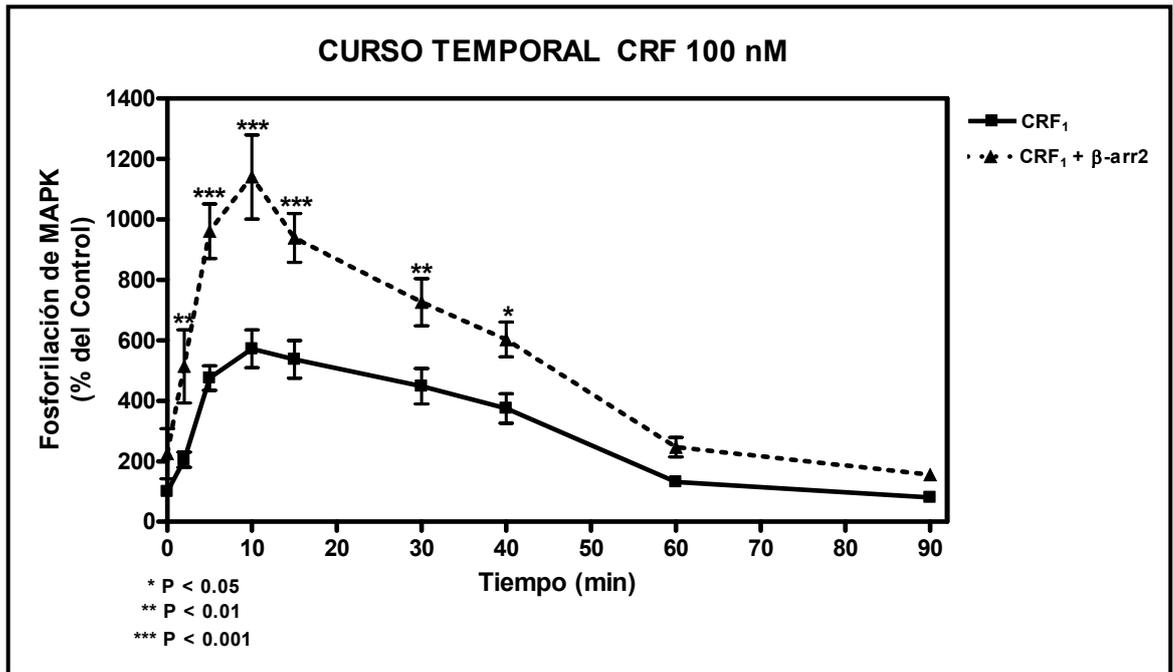
a)



b)



**Figura 25. Papel de la sobre-expresión de β-arrestina 1 en la activación de ERK 1/2 mediada por CRF.** a) Sobre-expresión de FLAG-β-arrestina1 y β-arrestina2 en células COS-7. Las células transfectadas de manera independiente con CRF<sub>1</sub> WT, CRF<sub>1</sub> WT/β-arrestina1, y CRF<sub>1</sub> WT/β-arrestina2, se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos α-OctA-Probe y α-βarr2. b) Curso temporal de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 cotransfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> WT y con la β-arrestina1. Las células se estimularon con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos α-pERK 1/2 y α-ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). No hubo diferencias significativas.



**Figura 26. Papel de la sobre-expresión de  $\beta$ -arrestina 2 en la activación de ERK 1/2 mediada por CRF.** Curso temporal de la activación de ERK 1/2 inducida por CRF en células COS-7 cotransfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> WT y con la  $\beta$ -arrestina2. Las células se estimularon con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis por inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

---

**c) La activación de las ERK 1/2 inducida por CRF es independiente de la sobre-expresión de GRKs 3 y 5.**

Ya se había estudiado anteriormente que la señalización del receptor CRF<sub>1</sub> se regula a través de su fosforilación, mediada principalmente por GRKs 3 y 6 (Holmes *et al.* 2006, Teli *et al.* 2005, Dautzenberg *et al.* 2002, Dautzenberg *et al.* 2001). Así mismo, también se ha visto que la sobre-expresión de las isoformas 5 y 6 de GRK pueden regular la activación de las ERK 1/2 mediada por algunos GPCRs como el AT<sub>1A</sub>, el V<sub>2</sub>R, el FSHR y el β<sub>2</sub>AR (Kim *et al.* 2004, Kara *et al.* 2006, Ren *et al.* 2005, Shenoy *et al.* 2005).

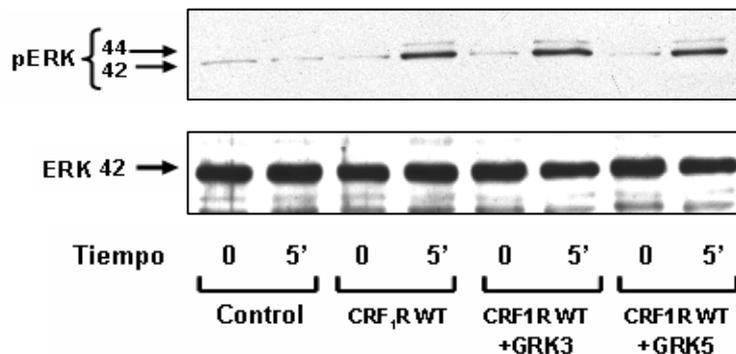
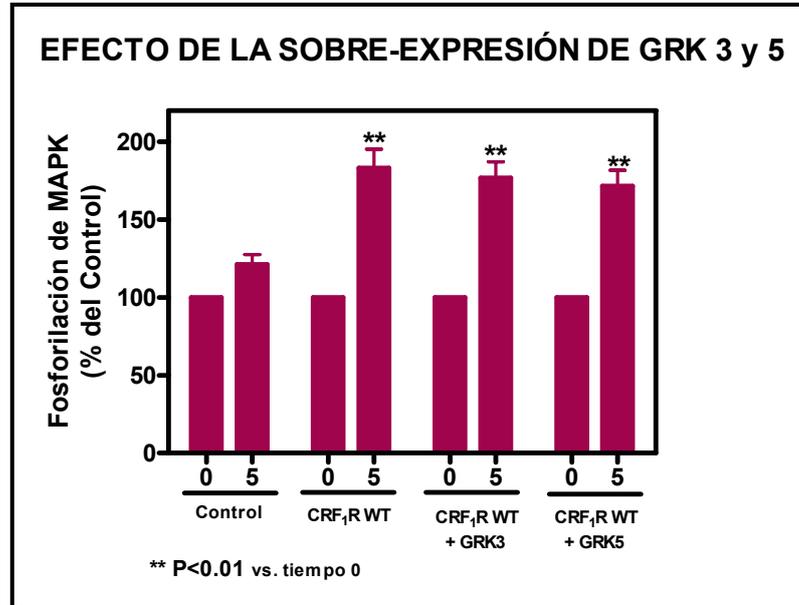
Para determinar el papel de las GRKs 3 y 5 en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF se sobre-expresaron estas isoformas de manera independiente en células COS-7. Primeramente se detectó la expresión de estas proteínas, como se observa en la figura 27a, esta línea celular expresa de manera endógena sólo la GRK 3.

Posteriormente, se utilizaron células sin transfectar, células transfectadas solamente con el receptor CRF<sub>1</sub> y células co-transfectadas con el receptor CRF<sub>1</sub> y con las GRKs 3 y 5 (individualmente), y se estimularon con CRF 100 nM por 5 minutos. Como se muestra en la figura 27b, en ausencia del receptor CRF<sub>1</sub>, el CRF no induce la fosforilación de las ERK 1/2; en cambio, cuando el receptor se encuentra presente, el CRF es capaz de activar a estas cinasas y este efecto es independiente de GRKs 3 y 5, puesto que la sobre-expresión de ambas isoformas de GRK no modifican de manera significativa la activación de las ERK 1/2 inducida por CRF.

a)



b)



**Figura 27. Papel de la sobre-expresión de GRKs 3 y 5 en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF.** a) Sobre-expresión de las GRKs 3 y 5 en células COS-7. Las células transfectadas de manera independiente con CRF<sub>1</sub> WT, CRF<sub>1</sub> WT/GRK3, y CRF<sub>1</sub> WT/GRK5, se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -GRK3 y  $\alpha$ -GRK5. b) Efecto de la sobre-expresión de GRKs en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por CRF. Células COS-7 se cotransfectaron con el receptor CRF<sub>1</sub> WT y con las GRKs 3 y 5 individualmente, para posteriormente realizar los estímulos indicados con CRF (100 nM). Finalmente se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 tota (ERK 42). Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de una vía, comparando todas las condiciones contra el tiempo cero del control (100%). Significancia: \*\*P<0.01.

---

**d) La activación de las ERK1/2 mediada por CRF es dependiente de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub>.**

Las  $\beta$ -arrestinas son proteínas que participan en la regulación de la formación de complejos proteicos que se asocian al receptor de CRF<sub>1</sub> para su internalización por vesículas de clatrina. Algunos estudios reportan que el mecanismo de transactivación del receptor de EGF a través de un GPCR como el PTHR, requiere de la internalización del receptor (Sneddon y Friedman 2007). Para estudiar el papel de la internalización en la activación de la vía de MAP cinasas se utilizaron varios inhibidores de internalización.

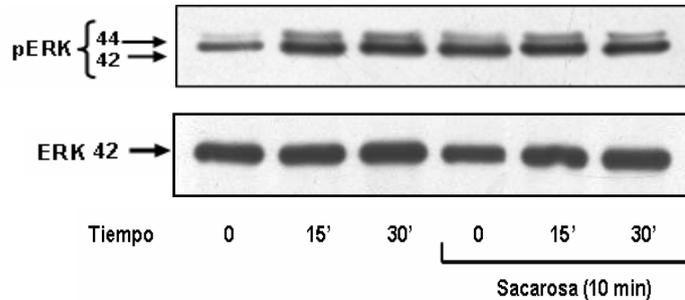
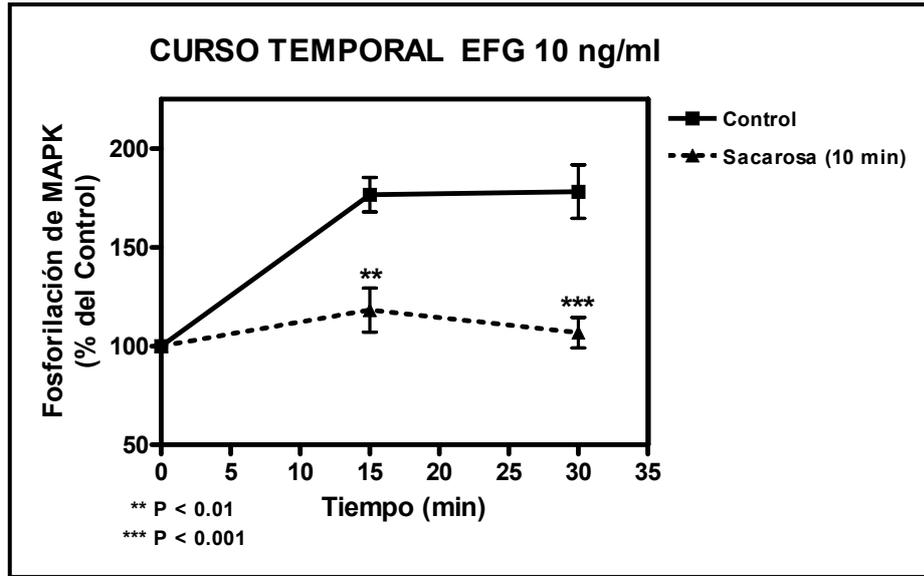
La sacarosa y la oxofenilarsina (PAO), ya se habían probado anteriormente, demostrando su efectividad al reducir en aproximadamente el 80% la internalización del receptor tipo 1 para angiotensina II (AT<sub>1</sub>R) y del receptor para EGF (Shah *et al.* 2002). Razón por lo cuál, nosotros consideramos conveniente utilizar estos inhibidores de internalización.

La sacarosa, según un estudio publicado en 1989 por Heuser y Anderson, tiene un efecto osmótico en la célula que modifica la polimerización de las clatrininas, por lo que, los recubrimientos de clatrina, en presencia de sacarosa se reducen, al igual que la internalización de los receptores (Heuser y Anderson 1989).

El PAO, por su parte, es un inhibidor de fosfatasa de tirosina. Su efecto no es muy específico porque afecta algunos mecanismos de señalización involucrados en el influjo de calcio y en la polimerización de actina, principalmente. Sin embargo, se ha utilizado para ver el papel de la internalización mediada por vesículas recubiertas de clatrina en receptores como el de EGF (Shah *et al.* 2002).

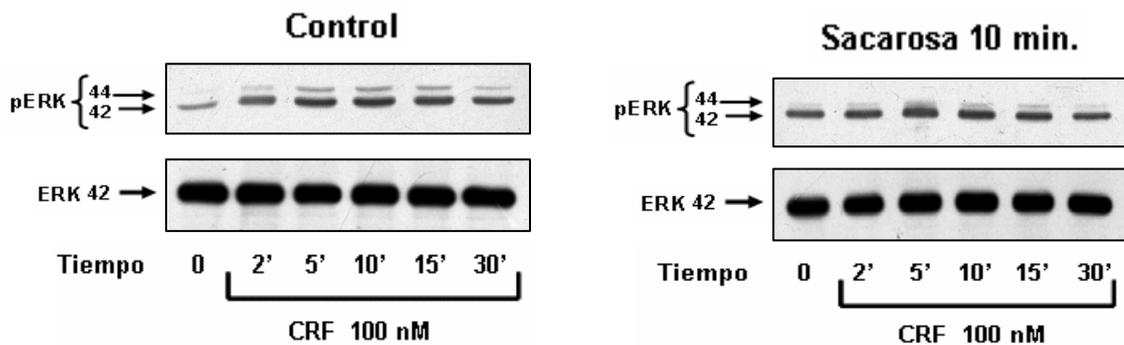
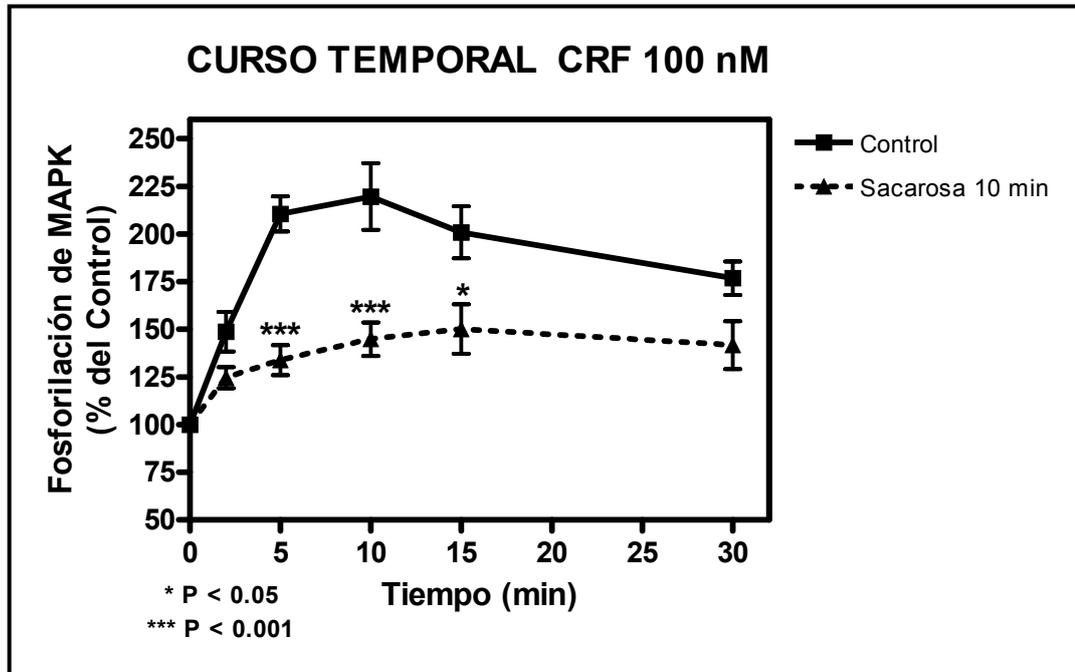
Primeramente, como control positivo, se evaluó el efecto de la sacarosa 0.45 M en la activación de las ERK 1/2 mediada por el receptor EGF, para lo cual se realizaron ensayos estimulando a las células con EGF 10 ng/ml, en presencia y ausencia de sacarosa. Los resultados que se muestran en la figura 28 indican que la activación de las ERK 1/2 requiere de la internalización del receptor EGF, pues al utilizar sacarosa, la fosforilación de estas cinasas disminuye de manera significativa a los 15 y 30 minutos de estímulo con EGF, como ya lo había demostrado Shah *et al.*, en el 2002 utilizando este y otros inhibidores de internalización como dansilcadaverina (MDC), concanavalina A (ConA) y oxofenilarsina (PAO) (Shah *et al.* 2002).

Lo siguiente fue estudiar si la internalización mediada por clatrininas se requería o no para la activación de las ERK 1/2 inducida por CRF. Se realizaron ensayos de curso temporales con CRF 100 nM en células preincubadas con este mismo inhibidor de la internalización (sacarosa 0.45 M) y con PAO (2.5  $\mu$ M), que ya se había utilizado anteriormente para inhibir la internalización mediada por clatrininas en el receptor para EGF y en otros GPCRs como el receptor AT<sub>1</sub> (Hunyady *et al.* 2000).

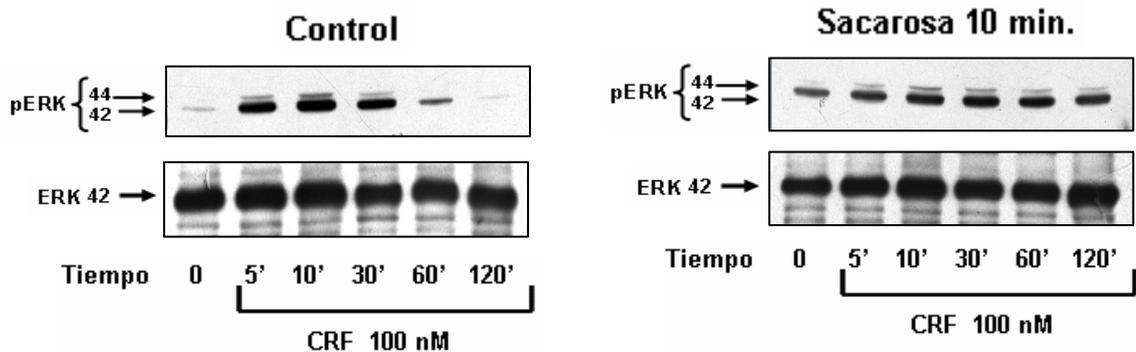
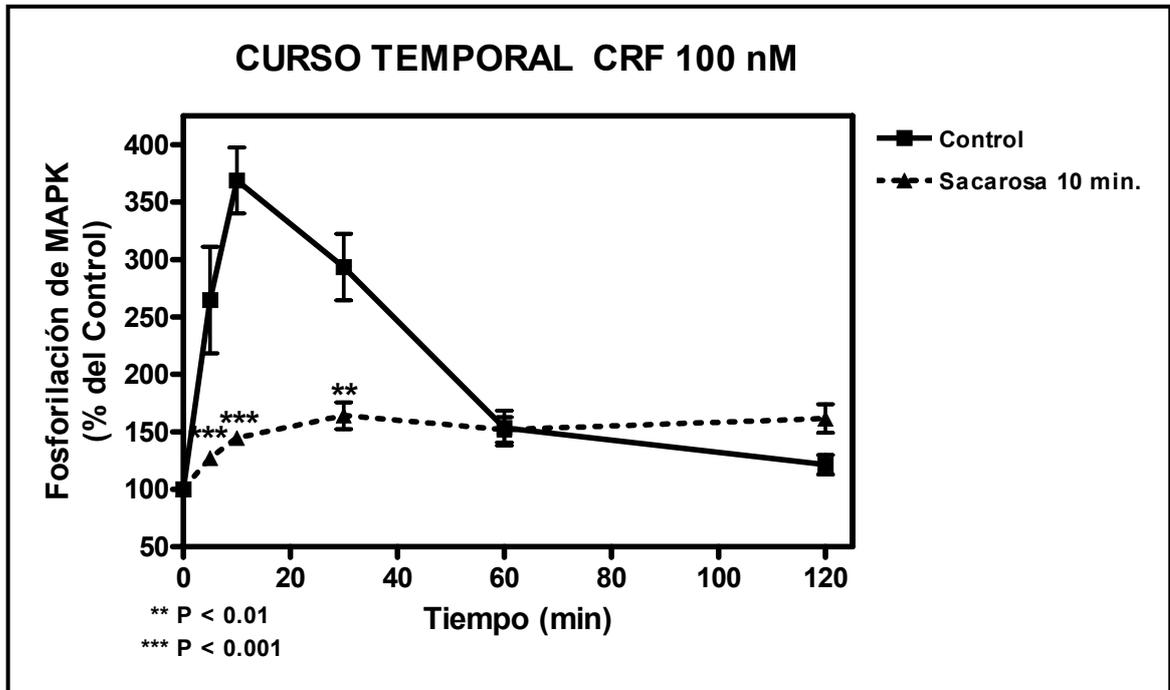


**Figura 28. Papel de la internalización del receptor EGF mediada por clatrina en la activación de ERK 1/2 por EGF.** Efecto de la sacarosa 0.45 M (inhibidor de internalización mediada por vesículas de clatrina) en la fosforilación de ERK 1/2 a través de EGF. Células COS-7 se transfectoron con el receptor  $CRF_1$  WT y se sembraron en cajas de 6 pozos. A las 48 horas después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas, posteriormente se preincubaron durante 10 minutos con medio sin suero que contenía sacarosa 0.45 M y así mismo se trataron con EGF (10 ng/ml) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Como se puede observar en la figura 29, la activación de las ERK 1/2 en presencia de sacarosa disminuye de manera significativa a los 5 y 10 minutos principalmente, y este nivel de activación es aparentemente constante hasta los 30 minutos. Dado este cambio en la cinética de activación de las ERK 1/2, se probaron tiempos más largos de estímulo con CRF, y como se puede ver en la figura 30, la activación de las ERK 1/2 en presencia de la sacarosa, aunque es mínima, se mantiene constante después de los 30 minutos e incluso hasta los 120 minutos, mientras que en condiciones normales, a los 120 minutos la fosforilación de las ERK 1/2 se abate por completo.



**Figura 29. Papel de la internalización del receptor  $CRF_1$  WT mediada por clatrina en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF.** Efecto de la sacarosa 0.45 M (inhibidor de internalización mediada por vesículas de clatrina) en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF, en los tiempos: 2, 5, 10, 15 y 30 min.). Células COS-7 se transfectoraron con el receptor  $CRF_1$  WT y al tiempo del experimento, se preincubaron durante 10 minutos con medio sin suero que contenía sacarosa 0.45 M y así mismo se trataron con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figura 30. Papel de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> WT mediada por clatrin en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF.** Efecto de la sacarosa 0.45 M en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por CRF, en los tiempos: 5, 10, 30, 60 y 120 min. Células COS-7 se transfectaron con el receptor CRF<sub>1</sub> WT y en el tiempo de experimento se preincubaron durante 10 minutos con medio sin suero que contenía sacarosa 0.45 M y así mismo se trataron con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

---

Los datos anteriores sugieren que la internalización mediada por clatrina es requerida para la activación de las MAP cinasas por acción del CRF.

Es importante mencionar que en estos experimentos, la sacarosa permanece actuando en las células por más de 20 minutos debido al diseño experimental. Posterior a este tiempo, parece ser que la sacarosa tiene un efecto osmótico en las células ya que induce a la activación de las ERK 1/2 en condiciones de no estímulo, por lo que en las gráficas representativas se resta este efecto que puede verse en los blots al estar incrementados los niveles basales con sacarosa.

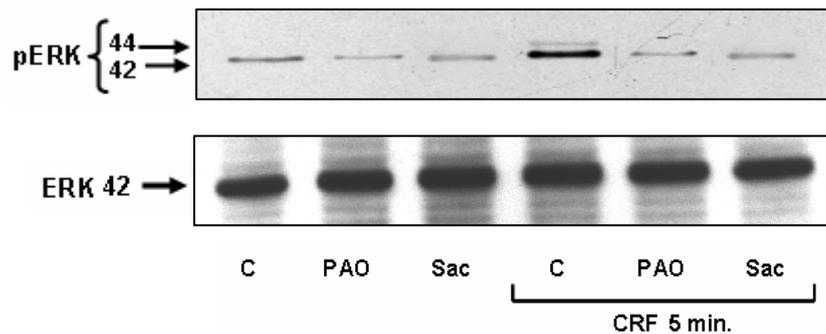
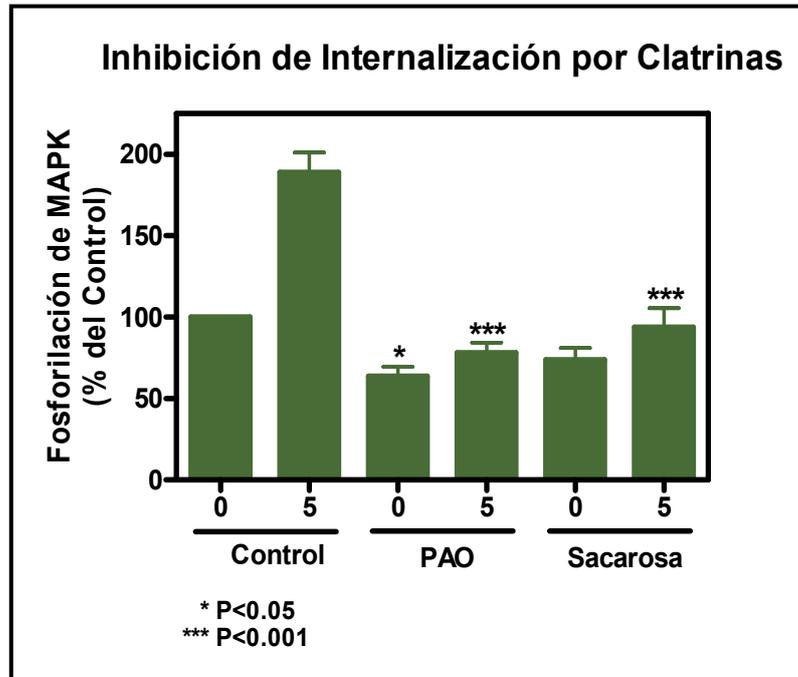
Sin embargo, para corroborar que la internalización es requerida, se utilizó nuevamente sacarosa, pero en menor tiempo (15 minutos tiempo total), además de PAO. Los resultados que se muestran en la figura 31, demuestran claramente que al inhibirse este tipo de internalización, la activación de las ERK 1/2 se elimina por completo, indicando que la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> por vesículas de clatrina es requerida para que el CRF pueda inducir a la activación de las MAP cinasas.

También se probó la sobre-expresión de una dominante negativa de la dinamina-I (DN-Dyn-I). Se trata de una mutante que carece de dominio PH (del inglés *Plextrin Homology*), y que por lo tanto, no puede unirse a los fosfolípidos de membrana para cerrar las vesículas de internalización (Hunyady *et al.* 2000).

Para ello se cotransfectaron células COS-7 con el receptor CRF<sub>1</sub> y con la DN-Dyn-I y se realizaron estímulos con CRF 100 nM. Como control, en la figura 32a se analiza la expresión de la DN-Dyn-I en el modelo celular, tanto la proteína endógena como la dominante negativa sobre-expresada, y en el panel b de la misma figura se muestra el efecto de la sobre-expresión de DN-Dyn-I en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF.

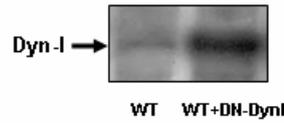
Estos datos confirman que la internalización es requerida para la activación de las MAP cinasas, pues en presencia de la DN-Dyn-I, la fosforilación de las ERK 1/2 se elimina por completo en todos los tiempos.

Por otra parte, bajo las mismas condiciones de cotransfección se determinó el requerimiento de la internalización en la activación de las ERK 1/2, pero esta vez mediada por UCN-I (Urocortina-I, péptido análogo de CRF). Los resultados se muestran en la figura 33 y de manera interesante, la presencia de la DN-Dyn-I disminuyó la activación de las ERK 1/2 de manera significativa, pero en comparación con el efecto causado por CRF, esta activación no se elimina por completo, lo cual indica que UCN-I puede activar la vía de MAPKs de una manera dependiente y otra independiente de la internalización del receptor.

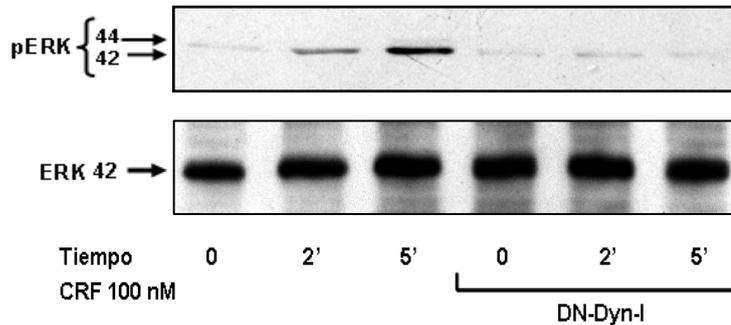
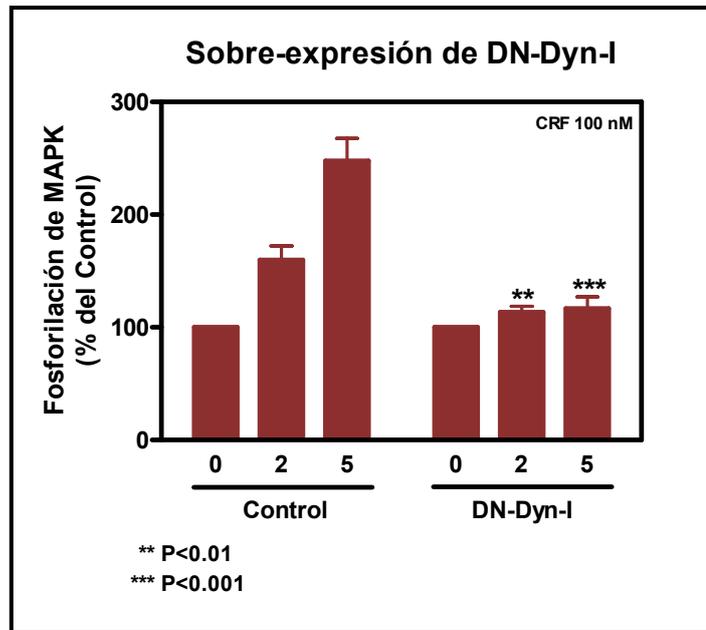


**Figura 31. Papel de la internalización del receptor  $CRF_1$  WT mediada por clatras en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF.** Efecto de la sacarosa 0.45 M y la oxofenilarsina (PAO) 2.5  $\mu$ M en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por CRF. Células COS-7 se transfectaron con el receptor  $CRF_1$  WT y al tiempo del experimento se preincubaron durante 10 minutos con medio sin suero que contenía, de manera independiente, a los inhibidores de internalización en las concentraciones indicadas, y así mismo se trataron con CRF (100 nM) durante 5 minutos (estímulo máximo). Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de una vía, tomando dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, comparando todas las condiciones contra el tiempo cero del control (100%). Significancia: \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

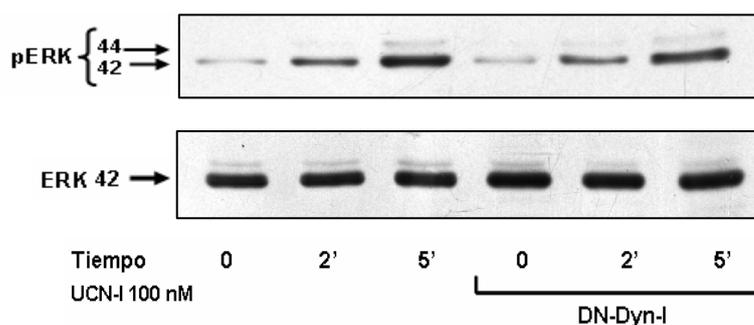
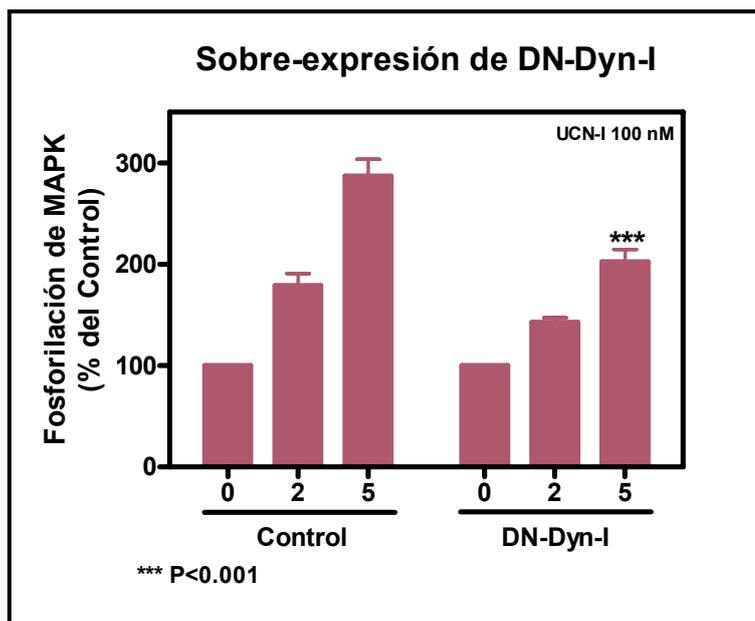
a)



b)



**Figura 32. Papel de la internalización del receptor  $CRF_1$  en la activación de ERK 1/2 mediada por CRF.** a) Sobre-expresión de la dominante negativa de Dinamina I (DN-Dyn-I) en células COS-7. Las células transfectadas de manera independiente con  $CRF_1$  WT,  $CRF_1$  WT/DN-Dyn-I, se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -Dyn-I. b) Efecto de la inhibición de internalización en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por CRF. Células COS-7 se cotransfectaron con el receptor  $CRF_1$  WT y con la DN-Dyn-I, y se sembraron en cajas de 6 pozos. A las 48 horas después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas, para posteriormente tratarlas con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



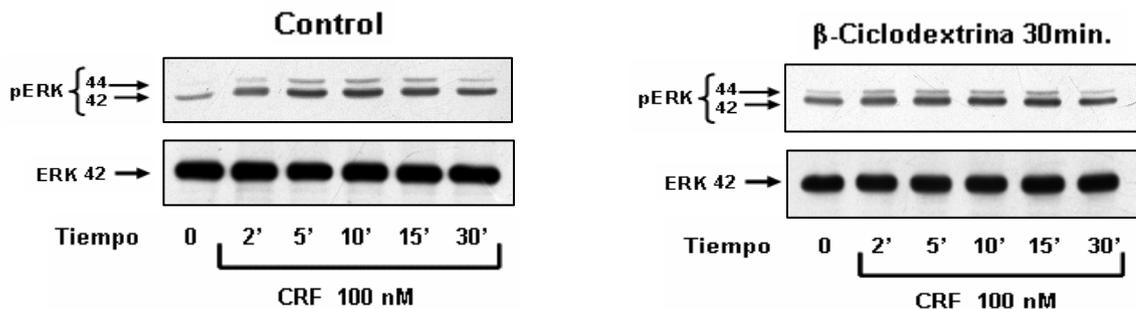
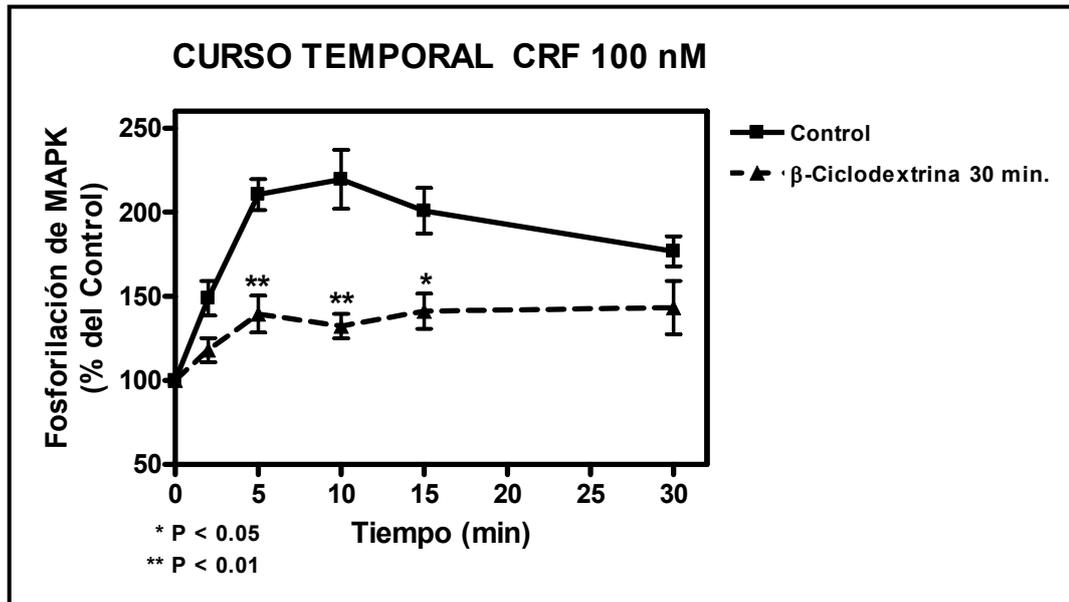
**Figura 33. Papel de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub> en la activación de ERK 1/2 mediada por UCN-I.** Efecto de la inhibición de internalización en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por UCN-I. Células COS-7 se cotransfectaron con el receptor CRF<sub>1</sub> WT y con la DN-Dyn-I, y se sembraron en cajas de 6 pozos. A las 48 horas después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas, para posteriormente tratarlas con UCN-I (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \*\*\*P<0.001.

Por último se probó el efecto de la  $\beta$ -ciclodextrina 10 mM, un inhibidor de la internalización mediada por caveolas (que al parecer forma complejos con el colesterol), en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF.

Se transfectó al receptor CRF<sub>1</sub> y posteriormente se estimularon las células con 100 nM de CRF por diferentes tiempos en presencia y ausencia del inhibidor. La  $\beta$ -ciclodextrina también tiene efecto inespecífico sobre la activación de la vía de MAPKs; sin embargo, el análisis de resultados se realizó con respecto al control (100%) de cada experimento.

Como se puede observar en la figura 34 en presencia del inhibidor, la fosforilación de las ERK 1/2 disminuye de manera significativa en comparación con la condición normal (sin inhibidor) pero tiene un mínimo efecto que aparece después de los 5 minutos de estímulo con CRF y que se mantiene en los tiempos posteriores a éste, de la misma manera que con el uso sacarosa.

Estos datos sugieren que la internalización mediada por caveolas también tiene un papel importante en la activación de las ERK 1/2 mediada por este tipo de internalización.



**Figura 34. Papel de la internalización del receptor  $CRF_1$  WT mediada por caveolas en la activación de ERK 1/2 inducida por CRF.** Efecto de la  $\beta$ -Ciclodextrina 10 mM (inhibidor de internalización mediada por caveolas) en la fosforilación de ERK 1/2 a través de CRF. Células COS-7 se transfectaron con el receptor  $CRF_1$  WT y se sembraron en cajas de 6 pozos. 48 horas después de la transfección, las células se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas, posteriormente se preincubaron durante 30 minutos con medio sin suero que contenía  $\beta$ -Ciclodextrina 10 mM, y así mismo se trataron con CRF (100 nM) en los tiempos indicados. Se lavaron con PBS frío, y se colectaron en buffer Laemmli para su análisis de inmunoblot con los anticuerpos  $\alpha$ -pERK 1/2 y  $\alpha$ -ERK 2 total. Con los datos obtenidos se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías para hacer la comparación entre ambas condiciones, tomando como 100% e control de cada experimento (tiempo cero). Significancia: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

---

## VIII. DISCUSIÓN

En la estructura de los GPCRs existen residuos específicos de fosforilación importantes para la regulación de su señalización. El papel fundamental de estos sitios radica en que, dada su composición, pueden inducir el reclutamiento de proteínas. Este efecto se provoca, tanto por la fosforilación del receptor, como por los consecuentes cambios conformacionales que provocan la exposición de dominios de unión a estas proteínas.

En nuestro grupo de trabajo, recientemente se demostró que la vía de MAP cinasas puede ser activada a través del estímulo con CRF mediante la transactivación del receptor para EGF. El CRF, a una concentración de 100 nM, induce una rápida fosforilación de las ERK 1/2, y además, la activación de estas cinasas es dependiente de la dosis del agonista (Fuentes-González 2007).

Estos datos los confirmamos en este trabajo, sin embargo, en el ensayo dosis-dependiente, la fosforilación de las ERK 1/2 llega cerca del efecto máximo a una concentración de CRF 1  $\mu$ M pero no se satura. Lo cual, puede ser debido al origen del ligando. Aguilera *et al.* en 1982 encontraron que el CRF de humano y ovino tienen una respuesta semejante en la producción de AMPc, pero la curva del ligando de ovino no tiene una saturación clara (Aguilera *et al.* 1982). El péptido que nosotros utilizamos fue de origen ovino, mientras que los receptores transfectados fueron de origen humano. Esto podría explicar la variabilidad que se tuvo en la respuesta.

Si bien ya se conocían algunos de los mecanismos para transactivar al receptor para EGF a través de CRF, todavía no se habían estudiado los componentes estructurales del receptor CRF<sub>1</sub> involucrados en este mecanismo de señalización. Por esta razón nosotros nos interesamos en estos determinantes estructurales que podían participar de alguna manera.

En la región intracelular del receptor CRF<sub>1</sub>, existen varios sitios potenciales de fosforilación, no solamente por GRKs, sino también por otras proteínas como PKC. El grupo del Dr. Richard Hauger identificó estos residuos de manera específica y crearon varias mutantes del receptor en las cuales se eliminaban estos sitios sin modificar su capacidad de activar la vía de AMPc (Oakley *et al.* 2007). De esta manera, pudieron estudiar el papel que tienen estos residuos en la fosforilación e interacción con las  $\beta$ -arrestinas 1 y 2. Estos mismos receptores los utilizamos en este trabajo, en esta ocasión para determinar su papel en la activación de las ERK 1/2, y de manera interesante, los datos obtenidos de interacción con  $\beta$ -arrestinas concuerdan con los datos actuales obtenidos en este trabajo.

---

Oakley *et al.* encontraron que en el receptor deletado en la Ser412, la fosforilación se disminuye solamente en aproximadamente el 35% en comparación con el receptor CRF<sub>1</sub> WT, y que esto no afecta el reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina2 (Oakley *et al.* 2007). Nosotros vimos que la eliminación de los cuatro últimos aminoácidos en este receptor, que incluyen a la Ser412 y a la Thr413 (residuos importantes de fosforilación), no modifican la activación de las ERK 1/2, indicando que estos sitios no participan en la regulación de la actividad del receptor.

Por otra parte, en el receptor CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ -386, la fosforilación disminuye de 80-90% y la interacción del receptor con  $\beta$ -arrestina2, a diferencia de los receptores WT y  $\Delta$ -412, disminuye solo parcialmente (Oakley *et al.* 2007), a pesar de que en esta región se localiza el motivo TSPT, el cual puede actuar como un posible sitio de unión a arrestinas (Oakley *et al.* 2001).

Cuando nosotros evaluamos la ausencia parcial de la cola carboxílica, empleando la truncante  $\Delta$ 386, en la activación de las ERK por acción del CRF, encontramos que la activación de estas cinasas no se modifica de manera significativa, indicando que la cola carboxílica del receptor no participa por sí misma en la regulación de este mecanismo.

Esto podría ser debido a que esta truncante activa a las proteínas G de la misma manera que lo hace el receptor WT, y consecuentemente, libera a la subunidad G <sub>$\beta\gamma$</sub> , involucrada en la vía de transactivación del receptor EGF (Fuentes-González 2007). Pero además, si la  $\beta$ -arrestina 2 se sigue uniendo al receptor, esta interacción podría también ser suficiente para continuar activando a la vía de ERK. Para comprobar esto, necesitarían realizarse estudios de interacción de  $\beta$ -arrestina2 con los receptores truncados, ya sea por inmunoprecipitación o por microscopía confocal.

Del mismo modo, la evaluación de la mutante del motivo STTSET en IC3, demostró que la fosforilación de este receptor es menor en comparación con el receptor WT, pero que esta mutación altera solo parcialmente su interacción con la  $\beta$ -arrestina2 (Oakley *et al.* 2007).

Nosotros observamos que la mutación de los sitios de fosforilación en IC3, no modifican de manera significativa la activación de las ERK 1/2 en comparación con el receptor CRF<sub>1</sub> WT. En cambio, en la mutante CRF<sub>1</sub> IC3- $\Delta$ 386, donde la fosforilación es perceptiblemente alterada, al igual que su interacción con  $\beta$ -arrestina2, la activación de las ERK 1/2 disminuye considerablemente (Oakley *et al.* 2007). Esto indica, que se requiere tanto de la cola carboxílica del receptor como de los sitios de fosforilación presentes en IC3 para regular la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF.

---

Varios estudios recientes demuestran que algunos GPCRs pueden activar vías de señalización alternas como la de MAP cinasas, a través de su interacción con  $\beta$ -arrestinas (De Wire *et al.* 2007, Lefkowitz *et al.* 2006, Rey *et al.* 2006, Brar *et al.* 2004, Waters *et al.* 2004, Tohgo *et al.* 2003, Tohgo *et al.* 2002, Miller y Lefkowitz 2001, Rossant *et al.* 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos con las truncantes del receptor CRF<sub>1</sub>, es probable que exista un mecanismo similar en este receptor, que sea dependiente de su interacción con las  $\beta$ -arrestinas. Para demostrar esto se sobre-expresaron las isoformas 1 y 2, y de manera interesante, la  $\beta$ -arrestina2, pero no la  $\beta$ -arrestina1, aumenta de manera significativa la activación de las ERK 1/2 a través de CRF. Estos datos concuerdan con nuestra hipótesis de que las  $\beta$ -arrestinas están involucradas en el mecanismo de transactivación del receptor EGF. Sin embargo, la  $\beta$ -arrestina1 no participa, probablemente porque ésta proteína tiene menor afinidad por el receptor que la  $\beta$ -arrestina2 (Oakley *et al.* 2007).

Por otra parte, la actividad de varios GPCRs puede ser regulada por fosforilación mediada por GRKs. Como ya habíamos visto, los sitios que se encuentran en la tercera asa intracelular y en la cola carboxílica del receptor CRF<sub>1</sub> son importantes para llevar a cabo la activación de las ERK 1/2 a través de CRF.

Al modificar o truncar estos motivos, la fosforilación se encuentra perceptiblemente alterada, principalmente en la truncante IC3- $\Delta$ 386, al igual que su interacción con  $\beta$ -arrestina2, por tal motivo, nosotros consideramos la posibilidad de que la fosforilación del receptor CRF<sub>1</sub> también tenga un papel importante en la activación de la vía de MAPKs.

En el caso del receptor CRF<sub>1</sub>, su regulación se lleva a cabo principalmente por acción de las GRKs 3 y 6 (Holmes *et al.* 2006, Teli *et al.* 2005, Dautzenberg *et al.* 2002, Dautzenberg *et al.* 2001). Dautzenberg *et al.* en el 2001 demostraron que el uso de secuencias antisentido para GRK3 en células de retinoblastoma, ocasiona la inhibición de la desensibilización del receptor de CRF<sub>1</sub> en aproximadamente el 65% de su señalización (Dautzenberg *et al.* 2001).

Más tarde en el 2005, Teli *et al.*, describieron que las GRKs 3 y 6 son las principales isoformas que se unen al receptor CRF<sub>1</sub> y que dicho reclutamiento requiere de las subunidades G <sub>$\beta$</sub>  y de la participación de la  $\beta$ -arrestina (Teli *et al.* 2005). Pero fue hasta el 2006 cuando Holmes *et al.*, demostraron que en células HEK-293, la sobre-expresión de las GRKs 3 y 6 promueve la interacción de  $\beta$ -arrestina2 con el receptor CRF<sub>1</sub>, mientras que las GRKs 2 y 5 la disminuyen (Holmes *et al.* 2006).

---

Así mismo, algunas isoformas de GRKs promueven la activación de la vía de las ERK 1/2 mediada por GPCRs, mientras que otras la disminuyen. Kim *et al.*, en el 2004 vieron que si se inhibía la expresión de las isoformas 2 y 3 de GRK, la activación de las ERK 1/2 mediada por Angiotensina-II a través del receptor AT<sub>1A</sub> aumentaba, mientras que la inhibición de las isoformas 5 y 6 la disminuían; y que el efecto era opuesto, con la sobre-expresión de cada una de las isoformas de GRK (Kim *et al.* 2004). En el 2006, Kara *et al.*, observaron un efecto similar con el receptor para la hormona foliculo-estimulante (FSHR), donde la vía de activación de las ERK 1/2 dependiente de  $\beta$ -arrestina, requiere de la participación de las GRKs 5 y 6 (Kara *et al.* 2006), al igual que el receptor para vasopresina V2 (Ren *et al.* 2005) y el  $\beta_2$ AR (Shenoy *et al.* 2005).

La GRK3 tiene un papel importante en la regulación del receptor CRF<sub>1</sub>, al aumentar la interacción de  $\beta$ -arrestina2 con el receptor, mientras que la GRK5 tiene el efecto contrario (Holmes *et al.* 2006, Teli *et al.* 2005, Dautzenberg *et al.* 2002, Dautzenberg *et al.* 2001). Sin embargo, debido a que la isoforma 5 se ha visto involucrada en la activación de las ERK 1/2 mediada por GPCRs a través de  $\beta$ -arrestina (Kara *et al.* 2006, Ren *et al.* 2005, Shenoy *et al.* 2005, Kim *et al.* 2004).

Nosotros determinamos el papel de las isoformas 3 y 5 de GRKs en la activación de las ERK 1/2 y al contrario de lo esperado, los resultados fueron que la sobre-expresión de estas cinasas no modifican la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF.

El mecanismo descrito hasta ahora indica que la activación de la vía de ERK es dependiente de ambos sitios de regulación (IC3 y C-terminal) y de  $\beta$ -arrestina2, pero independiente de las isoformas 3 y 5 de GRKs (figura 35). Esto puede ser debido a que el receptor CRF<sub>1</sub>, al ser activado por su ligando, podría estar generando un cambio conformacional que no depende de fosforilación pero que permite la exposición de residuos de unión a proteínas efectoras como la  $\beta$ -arrestina que pueden llevar a la activación de las ERK 1/2.

Aunque es cierto que al modificar las dos regiones del receptor, su fosforilación se elimina por completo y disminuye notablemente su asociación con  $\beta$ -arrestina2, la ausencia de estas regiones de manera independiente, no reducen su fosforilación, ni su asociación con  $\beta$ -arrestina2 de la misma manera (Oakley *et al.* 2007). Este argumento justifica en parte, el hecho de que las mutantes CRF<sub>1</sub> IC3-WT y CRF<sub>1</sub> 386 no afectan la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF. Sin embargo, también podría considerarse el efecto de otras proteínas como la GRK 6, que también se encuentra involucrada en la regulación de la actividad del receptor (Holmes *et al.* 2006, Teli *et al.* 2005), u otras proteínas como PKC, que recientemente se ha visto que pueden fosforilar al receptor CRF<sub>1</sub> (Oakley *et al.* 2007, Hillhouse *et al.* 2006, Hauger *et al.* 2003).

---

También las  $\beta$ -arrestinas son proteínas que normalmente se encargan de la regulación de los GPCRs, ya que inducen su desacoplamiento a las proteínas G y la internalización de los receptores mediada por vesículas de clatrina. De acuerdo a la afinidad de los receptores por la  $\beta$ -arrestina, algunos de los que pertenecen a la clase B (los que se internalizan con la  $\beta$ -arrestina) como el AT<sub>1A</sub>R, requieren de internalización para activar a la vía de MAP cinasas.

Nosotros evaluamos el papel de la internalización en la activación de las ERK 1/2, primeramente mediante el estímulo con EGF, y el uso de sacarosa nos dio evidencia de que este mecanismo es dependiente de la internalización mediada por clatrininas.

Esto ya había sido demostrado anteriormente por el grupo de Shah *et al.* en el 2002 cuando observaron el efecto de la internalización en la activación de la vía de ERK 1/2 mediada por angiotensina II. En sus experimentos, la sacarosa induce la internalización del receptor de EGF en aproximadamente el 80% en células C9, pero además, elimina la fosforilación de las ERK 1/2, indicando de la activación de estas cinasas es un efecto dependiente de la internalización del receptor de EGF (Shah *et al.* 2002).

Así mismo, probamos el efecto de este mismo inhibidor en la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF y los resultados fueron que en presencia de la sacarosa, la fosforilación de las MAP cinasas disminuye de manera significativa y prácticamente queda abatida, desde los 2 y hasta los 120 minutos de estímulo con CRF. Esto indicaría que la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF es dependiente también de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub>.

Los experimentos con  $\beta$ -arrestina-GFP, realizados por el grupo del Dr. Richard Hauger, indican que la  $\beta$ -arrestina2 no se internaliza con el receptor CRF<sub>1</sub>, es decir, que pertenece a la clase A de GPCRs (Oakley *et al.* 2007). Tomando en cuenta esto, y los datos con los inhibidores de internalización obtenidos en este trabajo, podemos inferir que el mecanismo de activación de ERK 1/2 a través de CRF depende en algún momento de la formación del complejo receptor/ $\beta$ -arrestina2/proteínas efectoras (posiblemente cinasas de la familia de Src) en la membrana plasmática (figura 35).

Pero además, también requiere de la disociación del complejo para poder participar en la transactivación del receptor de EGF (figura 35). Esto quizá podría ocurrir de una manera similar a la que se sugiere en un estudio reciente con el receptor PTH en el que c-Src podría trasladarse por la membrana plasmática para activar al receptor de EGF, de una manera dependiente de  $\beta$ -arrestina (Buchanan *et al.* 2006).

---

Por otra parte, las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  tienen un papel importante en la transactivación del receptor de EGF (Fuentes González 2007). Si la  $\beta$ -arrestina compete por el sitio de unión a las proteínas G, impidiendo que se disocien las subunidades  $G_{\beta\gamma}$ , la  $\beta$ -arrestina, al permanecer más tiempo unida al receptor CRF<sub>1</sub> en presencia del inhibidor de internalización, podría tener un efecto inhibitorio sobre la vía de ERK. De ser así, se confirmaría el hecho de que la  $\beta$ -arrestina2 requiere disociarse del receptor para activar la vía de MAP cinasas.

Aún faltan evidencias de esto, sin embargo, podría probarse mediante ensayos de inmunoprecipitación del receptor CRF<sub>1</sub> en el que se detecte la presencia, ya sea de  $\beta$ -arrestina 2 y/o de c-Src en distintos tiempos; o detectarse la asociación del receptor de EGF con c-Src principalmente, pues estudios recientes han demostrado que algunos GPCRs, como el receptor activado por proteasas tipo 2 (PAR-2) al unirse a su ligando, induce a la asociación de c-Src con el receptor de EGF (Caruso *et al.* 2006).

De la misma manera, Wang *et al.* en el 2006 estudiando al receptor  $\alpha_2$ AR, que al igual que el receptor CRF<sub>1</sub>, pertenece a la clase A de GPCRs (se internaliza sin la  $\beta$ -arrestina), demostraron que se requiere de  $\beta$ -arrestina para activar la vía de Ras-Raf-MEK a través de este receptor.

En presencia de su agonista, la  $\beta$ -arrestina se relata en la membrana para unirse al receptor y a Src, pero además, esta interacción induce la fosforilación de Src y la activación de esta vía de MAPKs, con lo cual se demuestra que la  $\beta$ -arrestina se encuentra involucrada en la activación de las MAPKs a través de Src (Wang *et al.* 2006).

Puesto que la sacarosa al parecer tiene un efecto osmótico sobre las células que induce por sí misma a la activación de la vía de MAP cinasas, también se utilizó este compuesto en tiempos reducidos (15 minutos de tiempo total) y un inhibidor más de internalización mediada por vesículas de clatrina (PAO). Los resultados de estos experimentos corroboran que la activación de las ERK 1/2 mediada por CRF es un mecanismo dependiente de internalización.

Estos mismos resultados se obtuvieron con el uso de la dominante negativa de Dyn-I, que también elimina por completo la fosforilación de las ERK 1/2 mediada por CRF. De manera interesante, el efecto inducido por UCN-I en presencia de la DN-Dyn-I no abate por completo la fosforilación de las MAP cinasas, lo cual podría estar indicando que UCN-I activa a las ERK 1/2 mediante un mecanismo dependiente y otro independiente de la internalización del receptor. Esto difiere del efecto de CRF, probablemente por la afinidad diferencial de los agonistas por el receptor CRF<sub>1</sub>.

---

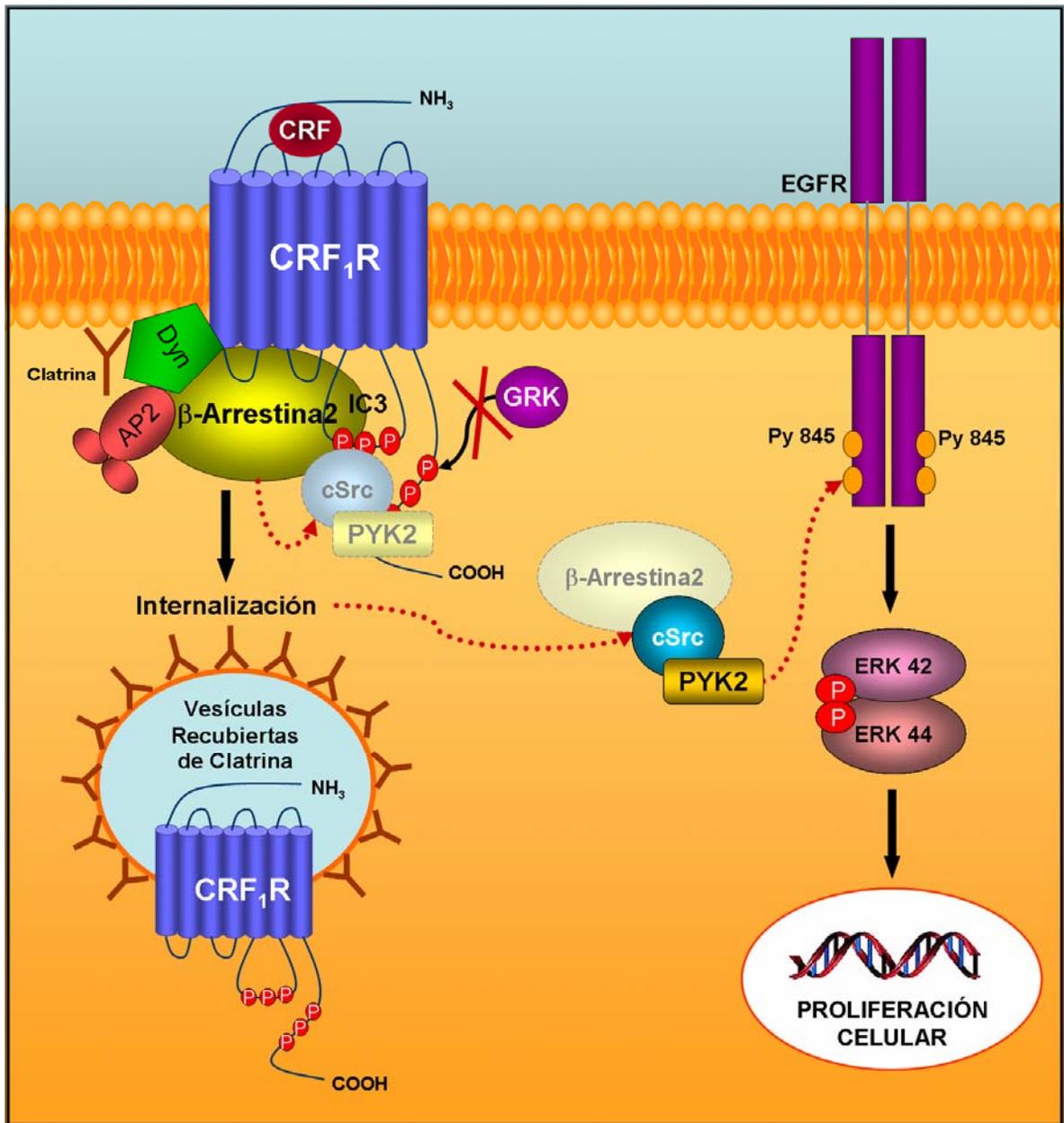
Por último se probó un inhibidor más de internalización mediada por caveolas ( $\beta$ -Ciclodextrina) y los resultados indican que la activación de las ERK 1/2 depende también de este tipo de internalización. Por estos resultados, podríamos decir que el receptor CRF<sub>1</sub> se internaliza no solo por vesículas de clatrina, sino por otros mecanismos como a través de las caveolas o bien, mediante la participación de otros factores como Ras, Rab4 y Rab5 (Holmes *et al.* 2006).

Aunque esto todavía no se encuentra bien demostrado, podría explicar también por qué la truncante CRF<sub>1</sub>  $\Delta$ 386 no modifica la activación de las ERK 1/2, pues a pesar de que su fosforilación es baja, al parecer esta fosforilación es suficiente para que el receptor continúe reclutando a la  $\beta$ -arrestina2, y así mismo, se internalizándose (Oakley *et al.* 2007).

Otros factores que podrían estar involucrados en la transactivación del receptor de EGF a través de CRF, podrían ser cinasas de la familia de Src, por lo que, lo siguiente sería probar el papel de estas proteínas en la activación de la vía de las ERK 1/2 en la vía que involucra la participación de las  $\beta$ -arrestinas, pues al parecer, éstas últimas poseen dominios de unión a Src e incluso a las mismas proteínas de la cascada de MAP cinasas (De Wire *et al.* 2007, Shenoy y Lefkowitz 2005).

Además de esto, el uso de otros modelos celulares que expresen endógenamente tanto al receptor CRF<sub>1</sub>, como al receptor EGF, o bien, a la  $\beta$ -arrestina2 en mayor proporción para el uso de siRNA, podrían confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Un buen modelo para esto serían las células MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) que no expresan  $\beta$ -arrestina y que han sido utilizadas para estudiar el papel de estas proteínas en diversos mecanismos de regulación de GPCRs (Vines *et al.* 2003, Kohout *et al.* 2000).

En un principio mencionamos que CRF es la hormona que inicia la respuesta ante estrés en el eje HPA, razón por la cual, su actividad se asocia a la aparición de enfermedades, principalmente cardiovasculares. La Federación Mundial del Corazón, a través de la Organización Mundial de la Salud, afirma que las enfermedades cardiovasculares son la primer causa de muerte a nivel mundial. Si entendemos los mecanismos moleculares por los cuales el CRF puede modular la respuesta ante estrés a través de sus receptores CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub>, es probable que nos acerquemos a un blanco terapéutico que nos permita controlar la aparición de los desórdenes generados por el estrés.



**Figura 35. Modelo de activación de la vía de las ERK 1/2 a través de CRF: Mecanismo mediado por  $\beta$ -arrestina2.** Cuando el receptor  $CRF_1$  es activado por su ligando, tiene un cambio conformacional que permite la exposición de sitios importantes (en IC3 y C-terminal) para su interacción con  $\beta$ -arrestina2. Esta última proteína promueve la internalización del receptor mediada por vesículas recubiertas de clatrina, pero además, forma complejos proteicos con proteínas de señalización (posiblemente c-Src). Cuando el receptor se internaliza, el complejo formado se libera para activar la vía de las ERK 1/2 a través de la transactivación del receptor para EGF.

---

## IX. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

1. Los sitios de fosforilación tanto de la cola carboxílica del receptor, como de IC3 son importantes para regular la activación de la vía de las MAP cinasas inducida por CRF.
2. La  $\beta$ -arrestina2, pero no la  $\beta$ -arrestina1, participa en la transactivación del receptor de EGF mediante el estímulo con CRF.
3. La activación de las ERK 1/2 mediada por CRF, es un mecanismo independiente de GRKs 3 y 5.
4. La transactivación del receptor de EGF requiere de la internalización del receptor CRF<sub>1</sub>, la cual ocurre mediante un proceso sensible a sacarosa, oxofenilarsina y  $\beta$ -cilodextrina, por lo que podría ser mediante vesículas de clatrina o por caveolas.

---

## X. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera G, Harwood JP, Wilson JX, Morell J, Brown JH, Catt KJ. Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J Biol Chem.* 1983 Jul 10;258(13):8039-45.

Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20;279(34):35518-25. Epub 2004 Jun 17.

Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, Cotecchia S. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. Dec 15;88(24):11354-8.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM y Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J. Endocrinol.* 1999. Jan;160(1):1-12. Review.

Askari MD, Tsao MS, Schuller HM. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 Oct;131(10):639-48. Epub 2005 Oct 20.

Brar BK, Chen A, Perrin MH, Vale W. Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation through corticotrophin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2beta by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology.* 2004. Apr;145(4):1718-29. Epub 2003 Dec 11.

Braun L, Christophe T, Boulay F. Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a  $\beta$ -arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem* 278: 4277-4285, 2003.

Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1492-7. Epub 2006 Jan 23.

Calabrese JR, Kling MA, Gold PW. Alterations in immunocompetence during stress, bereavement, and depression: focus on neuroendocrine regulation. *Am J Psychiatry.* 1987. Sep;144(9):1123-34. Review.

Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ, Collins S. Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38131-4.

Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol.* 2006 Jul;169(1):268-78.

Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci.* 1995. Oct;15(10):6340-50.

---

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001. Mar 1;410(6824):37-40. Review.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:259-84. Review

Chen AM, Perrin MH, Digruccio MR, Vaughan JM, Brar BK, Arias CM, Lewis KA, Rivier JE, Sawchenko PE, Vale WW. A soluble mouse brain splice variant of type 2alpha corticotrophin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. Feb 15;102(7):2620-5. Epub. 2005. Feb 8.

Chen C, Farooqui M, Gupta K. Morphine stimulates vascular endothelial growth factor-like signalling in mouse retinal endothelial cells. *Curr Neurovasc Res*. 2006. Aug;3(3):171-80.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *JAMA*. 1992 Mar 4;267(9):1244-52. Review. Erratum in: *JAMA* 1992 Jul 8;268(2):200.

Cibelli G, Corsi P, Diana G, Vitiello F, Thiel G. Corticotropin-releasing factor triggers neurite outgrowth of a catecholaminergic immortalized neuron via cAMP and MAP kinase signalling pathways. *Eur J Neurosci*. 2001 Apr;13(7):1339-48.

Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotrophin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):403-9.

Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994. Jun 17;77(6):841-52.

Cussac D, Schaak S, Denis C, Paris H. alpha 2B-adrenergic receptor activates MAPK via a pathway involving arachidonic acid metabolism, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem*. 2002 May 31;277(22):19882-8. Epub 2002 Mar 12.

Daub H, weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 1996. Feb 8;379(6565):557-60.

Dautzenberg FM, Braun S, Hauger RL. GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation. *Am J Physiol* 280: R935-R946, 2001.

Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trnds Pharmacol Sci*. 2002. Feb;23(2):71-7. Review.

Dautzenberg FM, Wille S, Braun S, Hauger RL. GRK3 regulation during CRF- and urocortin-induced CRF1 receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Nov 1;298(3):303-8.

DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:483-510. Review.

Dhanasekaran N, Tsim ST, Dermott JM, Onesime D. Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene*. 1998. Sep 17;17(11 Reviews):1383-94. Review.

---

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007. May 14;26(22):3279-90. Review.

Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*. 1996. Oct 10;383(6600):547-50.

Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, Vale WW. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 1996. Sept;137(9):3896.

Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem*. 1994. Mar 18;269(11):7851-4.

Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signalling. *Pharmacol Rev*. 2001. Mar;53(1):1-24.

Ferguson SS. Receptor tyrosine kinase transactivation: fine-tuning synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 2003 Mar;26(3):119-22. Review.

Fuentes-González AM. Mecanismos de activación de la vía de ERK 1/2 por el factor liberador de corticotropinas. 2007. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, Eckhardt AE, Cowan CL, Spurney RF, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem*. 2006 Apr 21;281(16):10856-64. Epub 2006 Feb 21.

Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007. Jun;10(2):109-20.

Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Role of corticotrophin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet*. 1999. Oct 30;354(9189):1546-9.

Graziani G, Tentori L, Muzi A, Vergati M, Tringali G, Pozzoli G, Navarra P. Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Jan 29;264(1-2):44-9. Epub 2006 Nov 9.

Grigoriadis DE, Lovenberg TW, Chalmers DT, Liaw C, De Souza EB. Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. *Ann NY Acad Sci*. 1996. Mar 22;780:60-80. Review.

Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM. Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003. Aug;306(2):794-803.

Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signalling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006. Aug; 5(4):453-79. Review.

Hawes BE, van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Distinct pathways of Gi- and Gq- mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 1995. Jul 21;270(29):17148-53.

---

Heuser JE, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol.* 1989. Feb; 108(2):389-4000.

Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* 2006. May;27(3):260-86. Epub 2006 Feb 16. Review.

Hillhouse EW, Randeve H, Ladds G, Grammatopoulos D. Corticotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Soc Trans.* 2002 Aug;30(4):428-32. Review.

Holliday ND, Lam C-W, Tough IR, Cox HM. Role of the C terminus in neuropeptide Y Y1 receptor desensitization and internalization. *Mol Pharm* 67: 655-664, 2005.

Holmes KD, Babwah AV, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SS. Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem.* 2006 Feb;96(4):934-49. Epub 2006 Jan 12.

Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept.* 2000 Jul 28;91(1-3):29-44. Review.

Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 1991. May;12(2):118-34. Review.

Jafri F, El-Shewy HM, Lee MH, Kelly M, Luttrell DK, Luttrell LM. Constitutive ERK1/2 activation by a chimeric neurokinin 1 receptor-beta-arrestin1 fusion protein. Probing the composition and function of the G protein-coupled receptor "signalsome". *J Biol Chem.* 2006. Jul 14;281(28):19346-57. Epub 2006 May 2.

Kageyama K, Hanada K, Moriyama T, Imaizumi T, Satoh K, Suda T. Differential regulation of CREB and ERK phosphorylation through corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in AtT-20 and A7r5 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jan 15;263(1-2):90-102. Epub 2006 Oct 5.

Kara E, Crepieux P, Gauthier C, Martinat N, Piketty V, Guillou F, Reiter E. A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):3014-26. Epub 2006 Aug 3.

Karkoulis G, Mastrogianni O, Lympelopoulou A, Paris H, Flordellis C. alpha(2)-Adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR. *Cell Signal.* 2006 May;18(5):729-39. Epub 2005 Aug 10.

Kehne JH. The CRF1 receptor, a novel target for the treatment of depression, anxiety, and stress-related disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007 Jun;6(3):163-82. Review.

Kim O-J, Gardner BR, Williams DB, Marinec PS, Cabrera DM, Peters JD, Mak CC, Kim K-M, Sibley DR. The role of phosphorylation in D1 dopamine receptor desensitization. *J Biol Chem* 279: 7999-8010, 2004.

Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotrophin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):415-9.

---

Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol*. 2003. Jan;63(1)\_9-18. Review.

Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1601-6. Epub 2001 Feb 6.

Krasel C, Vilardaga JP, Bunemann M, Lohse MJ. Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization. *Biochem Soc Trans*. 2004. Dec;32(Pt 6):1029-31.

Lederer ED, Sohi SS, McLeish KR. Parathyroid hormone stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity through two independent signal transduction pathways: role of ERK in sodium-phosphate cotransport. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Feb;11(2):222-31.

Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol Cell*. 2006 Dec 8;24(5):643-52. Review.

Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007. May;190(1):9-19.

Leroy D, Missotten M, Waltzinger C, Martin T, Scheer A. G protein-coupled receptor-mediated ERK 1/2 phosphorylation: towards a generic sensor of GPCR activation. *J Recept Signal Transduct Res*. 2007;27(1):83-97.

Leroy D, Missotten M, Waltzinger C, Martin T, Scheer A. G protein-coupled receptor-mediated ERK 1/2 phosphorylation: towards a generic sensor of GPCR activation. *J Recept Signal Transduct Res*. 2007;27(1):83-97.

Liebmann C, Bohmer FD. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Curr Med Chem*. 2000 Sep;7(9):911-43. Review.

Linton EA, Woodman JR, Asboth G, Glynn BP, Plested CP, Bernal AL. Corticotropin releasing hormone: its potential for a role in human myometrium. *Exp Physiol*. 2001. Mar;86(2):273-81. Review.

Luttrell DK, Luttrell LM. Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev Technol*. 2003. Apr;1(2):327-38. Review.

Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4637-44.

Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 1996. Aug 9;271(32):19443-50.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 2002. Feb 1;115(Pt 3):455-65. Review.

Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002 May;80(5):375-82.

---

Luttrell LM. Transmembrane signalling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol.* 2006; 332:3-49. Review.

Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science.* 1990. Aug 10;249(4969):655-9.

Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, Miller WE, Ahn S, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2000 Mar 31;275(13):9572-80.

Menard J, Campbell DJ, Azizi M, Gonzales MF. Synergistic effects of ACE inhibition and Ang II antagonism on blood pressure, cardiac weight, and renin in spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 1997 Nov 4;96(9):3072-8.

Meyer AH, Ullmer C, Schmuck K, Morel C, Wishart W, Lubbert H, Engels P. Localization of the human CRF2 receptor to 7p21-p15 by radiation hybrid mapping and FISH analysis.

Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14;275(15):11312-9.

Myers DA, Trinh JV, Myers TR. Structure and function of the ovine type 1 corticotropin releasing factor receptor (CRF1) and a carboxyl-terminal variant. *Mol Cell Endocrinol.* 1998. Sep 25;144(1-2):21-35.

Nabhan C, Xiong Y, Xie LY, Abou-Samra AB. The alternatively spliced type II corticotropin-releasing factor receptor, stably expressed in LLCPK-1 cells, is not well coupled to the G protein(s). *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jul 26;212(3):1015-21.

Natarajan K, Berk BC. Crosstalk coregulation mechanisms of G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Methods Mol Biol.* 2006;332:51-77. Review.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of  $\beta$ -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274: 32248-32257, 1999.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled- $\beta$ -arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276: 19452-19460, 2001.

Oakley RH, Olivares-Reyes JA, Hudson CC, Flores-Vega F, Dautzenberg FM, Hauger RL. Carboxyl terminal and intracellular loop sites for CRF1 receptor phosphorylation and  $\beta$  arrestin2 recruitment: a mechanism regulating stress and anxiety responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007. Mar 15.

Olivares-Reyes JA, Shah BH, Hernández-Aranda J, García-Caballero A, Farshori MP, García-Sáinz JA, Catt KJ. Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors. *Mol Pharmacol.* 2005 Aug;68(2):356-64. Epub 2005 May 19.

Orozco-Cabal L, Pollandt S, Liu J, Shinnick-Gallagher P, Gallagher JP. Regulation of synaptic transmission by CRF receptors. *Rev Neurosci.* 2006;17(3):279-307. Review.

---

Oshida Y, Ikeda Y, Chaki S, Okuyama S. Monkey corticotropin-releasing factor1 receptor: Complementary DNA cloning and pharmacological characterization. *Life Sci.* 2004. Feb 27;74(15):1911-24.

Palchadhuri MR, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg FM. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*-cloning, functional expression and tissue distribution. *Eur J Biochem.* 1998. Nov 15;258(1):78-84.

Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature.* 1993. Oct 14;365(6447):649-51.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xy BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001. Apr;22(2):153-83. Review.

Pedersen WA, Wan R, Zhang P, Mattson MP. Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci.* 2002 Jan 15;22(2):404-12.

Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999. Oct 20;885:312-28. Review.

Perry SJ, Junger S, Kohout TA, Hoare SR, Struthers RS, Grigoriadis DE, Maki RA. Distinct conformations of the corticotrophin releasing factor type 1 receptor adopted following agonist binding are differentially regulated. *J Biol Chem.* 2005. Mar 25;280(12):11560-8. Epub 2005 Jan 14.

Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001. Oct;2(10):727-33. Review.

Piiper A, Zeuzem S. Receptor tyrosine kinases are signalling intermediates of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 2004;10(28):3539-45. Review.

Pisarchik A., Slominski A. Corticotropin releasing factor receptor type 1: molecular cloning and investigation of alternative splicing in the hamster skin. *J. Invest Dermatol.* 2002. Jun;118(6):1065-72.

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 1999 Dec 23-30;402(6764):884-8.

Punn A, Levine MA, Grammatopoulos DK. Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1alpha-mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: the critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation. *Mol Endocrinol.* 2006 Dec;20(12):3179-95. Epub 2006 Sep 7.

Pyne NJ, Waters C, Moughal NA, Sambhi B, Connell M, Pyne S. Experimental systems for studying the role of G-protein-coupled receptors in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Methods Enzymol.* 2004;390:451-75.

Rasmussen TN, Novak I, Nielsen SM. Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment. *Eur J Biochem.* 2004. Nov;271(22):4366-74.

---

Raux-Demay MC, Girard G. The physiology of corticotropin-releasing factor (CRF). *Reprod Nutr Dev*. 1985;25(5):931-43.

Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signalling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006. May-Jun;17(4):159-65. Epub 2006 Apr 3. Review.

Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, Lefkowitz RJ. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1448-53. Epub 2005 Jan 25.

Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2002 Feb;2(1):23-33. Review.

Rey A, Manen D, Rizzoli R, Caverzasio J, Ferrari SL. Proline-rich motifs in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor C terminus mediate scaffolding of c-Src with beta-arrestin 2 for ERK 1/2 activation. *J Biochem*. 2006. Dec 15;281(50):38181-8. Epub 2006 Oct 12.

Rivier J, Spiess J, Vale W. Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983. Aug;80(15):4851-5.

Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007. May 14;26(22):3291-310. Review.

Romeo RD, Karatsoreos IN, Jasnow AM, McEwen BS. Age- and stress-induced changes in corticotrophin-releasing hormone mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 2007. May 15; [Epub ahead of print]

Rossant CJ, Pinnock RD, Hughes J, Hall MD, McNulty S. Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 1999. Apr;140(4):1525-36.

Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Jan;33(1):3-7. Review.

Schafer B, Gschwind A, Ullrich A. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*. 2004 Jan 29;23(4):991-9.

Shah BH, Olivares-Reyes JA, Yesilkaya A, Catt KJ. Independence of angiotensin II-induced MAP kinase activation from angiotensin type 1 receptor internalization in clone 9 hepatocytes. *Mol Endocrinol*. 2002 Mar;16(3):610-20.

Shah BH, Shah FB, Catt KJ. Role of metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in alpha-adrenoceptor-stimulated MAP kinase phosphorylation in GT1-7 neurons. *J Neurochem*. 2006 Jan;96(2):520-32. Epub 2005 Dec 8.

Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptor signalling through beta-arrestin. *Scu STKE*. 2005. Nov 1;2005(308):cm10. Review.

Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y, Notake M, Takahashi H, Shimizu S, Horikawa S, Numa S. Isolation and sequence analysis of the human corticotrophin-releasing factor precursor gene. *EMBO J*. 1983;2(5):775-9.

---

Slomiany BL, Slomiany A. Src-kinase-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in salivary mucin secretion in response to beta-adrenergic G-protein-coupled receptor activation. *Inflammopharmacology*. 2004;12(3):233-45.

Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET. Cutaneous expression of corticotrophin-releasing hormone (CRH), urocortin and CRH receptors. *FASEB J*. 2001. Aug;15(10):1678-93. Review.

Slominski A, Zbytek B, Zmijewski M, Slominski RM, Kauser S, Wortsman J, Tobin DJ. Corticotropin releasing hormone and the skin. *Front Biosci*. 2006. Sep 1;11:2230-48. Review.

Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383-95. Review.

Sneddon WB, Friedman PA.  $\beta$ -Arrestin-Dependent Parathyroid Hormone-Stimulated ERK Activation and PTH1R Internalization. *Endocrinology*. 2007 Aug;148(8):4073-9. Epub 2007 May 24.

Sneddon WB, Yang Y, Ba J, Harinstein LM, Friedman PA. Extracellular signal-regulated kinase activation by parathyroid hormone in distal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Mar;292(3):F1028-34. Epub 2006 Nov 14.

Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981. Oct;78(10):6517-21.

Sugden PH, Clerck A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*. 1997. Aug;9(5):337-51. Review.

Tache Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J. Clin. Invest*. 2007. Jan;117(1):33-40. Review

Teli T, Markovic D, Levine MA, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1 $\alpha$  signalling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. *Mol Endocrinol*. 2005. Feb;19(2):474-90. Epub 2004 Oct 21.

Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*. 2003. Feb 21;278(8):6258-67. Epub 2002 Dec 6.

Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. Beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem*. 2002. Mar 15;277(11):9429-36. Epub 2002 Jan 2.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 2002 Oct;53(4):865-71. Review.

Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K, Sato N, Mori M. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes*. 1998. Jun;47(6):890-3.

- 
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981. Sep 18;213(4514):1394-7.
- Vamvakopoulos NC, Sioutopoulou TO. Human corticotropin-releasing hormone receptor gene (CRHR) is located on the long arm of chromosome 17 (17q12-qter). *Chromosome Res*. 1994 Nov;2(6):471-3.
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotrophin-releasing factor. *Nature*. 1995. Nov 16;378(6554):287-92.
- Vines CM, Revankar CM, Maestas DC, LaRusch LL, Cimino DF, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Prossnitz ER. N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):41581-4. Epub 2003 Aug 28.
- Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Lelias JM, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotropin releasing factor receptors. *FEBS Lett*. 1993. Nov 29;335(1):1-5.
- Wang W, Ji P, Dow KE. Corticotropin-releasing hormone induces proliferation and TNF-alpha release in cultured rat microglia via MAP kinase signalling pathways. *J Neurochem*. 2003 Jan;84(1):189-95.
- Wang Q, Lu R, Zhao J, Limbird LE. Arrestin serves as a molecular switch, linking endogenous alpha2-adrenergic receptor to SRC-dependent, but not SRC-independent, ERK activation. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):25948-55. Epub 2006 Jun 29.
- Waters C, Pyne S, Pyne NJ. The role of G-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol*. 2004. Jun;15(3):309-23. Review.
- Werry TD, Sexton PM, Christopoulos A. "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol Metab*. 2005. Jan-Feb;16(1):26-33. Review.
- Xu N, Voyno-Yasenetskaya T, Gutkind JS. Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994. Jun 15;201(2):603-9.
- Yu J, Xie LY, Abou-Samra AB. Molecular cloning of type A chicken corticotropin-releasing factor receptor with high affinity for urotensin I. *Endocrinology*. 1996. Jan;137(1):192-7.
- Zbytek B, Pikula M, Slominski RM, Mysliwski A, Wei E, Wortsman J, Slominski AT. Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2005 Mar;152(3):474-80.
- Zbytek B, Slominski AT. Corticotropin-releasing hormone induces keratinocyte differentiation in the adult human epidermis. *J Cell Physiol*. 2005 Apr;203(1):118-26.
- Zhong H, Minneman KP. Activation of tyrosine kinases by alpha1A-adrenergic and growth factor receptors in transfected PC12 cells. *Biochem J*. 1999 Dec 15;344 Pt 3:889-94.