



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EFECTO DE LA AGREGACION DEL RECEPTOR DE
LA HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA
DE RATA SOBRE SU PROPIA ACTIVACION Y EN
LA SEÑAL DE TRANSDUCCION”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA
M. en C. GUADALUPE MAYA NUÑEZ

TUTOR: **DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO**
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2011



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.

**EFECTO DE LA AGREGACIÓN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA
LIBERADORA DE CORTICOTROPINA DE RATA SOBRE SU PROPIA
ACTIVACIÓN Y EN LA SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN**

**JURADO ASIGNADO PARA EXAMEN DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

PRESIDENTE: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
SECRETARIO: DR. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO
VOCAL: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
VOCAL: DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOZA
VOCAL: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
SUPLENTE: DRA. CARMEN CLAPP JIMENEZ
SUPLENTE: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Lugar donde se realizó la tesis:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN BIOLOGÍA DEL DESARROLLO,
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, I.M.S.S.

TUTOR DE TESIS

DR. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Méndez Blanco por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Alfredo Ulloa Aguirre y el Dr. Adolfo García Sainz por todos sus comentarios durante la realización de este proyecto.

A los miembros del Comité de examen de grado por la revisión de la tesis,

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

Dra. Claudia González Espinoza

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dra. Carmen Clapp Jiménez

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

A la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo para la realización de todo el trabajo experimental.

Al Fondo para la Investigación en Salud y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber brindado el apoyo económico para el proyecto.

A los doctores Cecilia Castro Fernández, Ana María Pasapera Limón y Euclides Avila Chávez por toda su gran ayuda y amistad de siempre.

A mi esposo David y mis pequeños David y Julián, muchas gracias

Dedicado con un gran cariño para mi mamá, mi hermana y mis sobrinas

A la memoria de mi Papá y mi hermano Julián

INDICE GENERAL

Agradecimientos	3
Indice de figuras y tablas	5
Resumen	6
Abstract	7
Antecedentes	
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	8
Receptores de la CRH	10
Transducción de señales mediadas por los receptores de la CRH	13
Dimerización de los receptores acoplados a proteínas G	18
Planteamiento del problema	22
Hipótesis	23
Objetivos	23
Metodología	
Modelo de estudio	24
Clonación de los genes de los receptores de la CRH	24
Transfecciones transitorias de los receptores de la CRH	25
Inmunoprecipitación y Western blot	26
Yodación de la CRH	27
Ensayo de unión al receptor	28
Yodación de cAMP	29
Determinación de la acumulación de cAMP	29
Medida de la producción de los fosfatos de inositol	29
Análisis de datos	30
Resultados	31
Discusión	35
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Referencias	45
Anexo 1	
Ensayos de unión a receptores	55
Anexo 2	
Artículo	

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Respuestas integradas al estrés

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la familia de neuropéptidos de la CRH

Figura 3. Representación esquemática de los receptores de la CRH

Figura 4. Regulación de la expresión del gen de la proopiomelanocortina (POMC) en células AtT-20

Figura 5. Amplificación del cDNA del CRH-R1

Figura 6. Amplificación del cDNA del CRH-R2 α

Figura 7. Vectores de clonación

Figura 8. Amplificación del cDNA de los receptores de la CRH en la línea celular HEK-293

Figura 9. Presencia de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α en células HEK-293

Figura 10. La coexpresión de CRH-R1 y CRH-R2 α disminuye la producción de cAMP

Figura 11. La unión del CRH a sus receptores no se ve modificada cuando se coexpresan CRH-R1 y CRH-R2 α

Figura 12. El porcentaje de receptores internalizados y la velocidad de internalización en experimentos de coexpresión a los receptores de la CRH

Figura 13. La expresión de los receptores de la CRH no induce la producción de fosfatos de inositol en células HEK-293

Tabla 1. Características de los péptidos de la familia de la CRH presentes en mamíferos

Tabla 2. Número de receptores por célula y constantes de afinidad de los receptores de la CRH

RESUMEN

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es una de las principales proteínas responsables de la regulación del estrés mediante la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales. Se han identificado dos receptores de la CRH, el tipo 1 (CRH-R1) y el tipo 2 α (CRH-R2 α), ambos miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y con afinidades diferentes para los diversos miembros de la familia de los péptidos de la CRH. En el presente estudio se investigaron las propiedades de unión, de internalización y de señalización intracelular, de los receptores de la CRH cuando ambos subtipos de receptores son co-expresados en la línea celular HEK-293. La co-expresión de estos receptores en las células HEK-293 provocó una disminución en la producción de AMPc, lo que sugiere que la presencia de ambos receptores, en la misma célula, modifica la transducción de la señal mediada por este importante segundo mensajero; sin embargo, ni la cinética de unión ni la velocidad de internalización de ambos receptores se modificaron. Además, nuestros resultados demostraron que estos receptores se internalizan de manera diferente, el CRHR1 se internaliza en menor porcentaje y en menor tiempo que el CRHR2 α y cuando se cotransfectan ambos receptores la internalización de estos receptores semeja al comportamiento del CRHR2 α . Estudios de localización de los receptores de la CRH en el cerebro han demostrado que en regiones tales como amígdala, hipocampo y núcleo paraventricular, los ARN mensajeros tanto del CRH-R1 como del CRH-R2 α se colocalizan, por lo que estos receptores pueden estar expresándose de manera conjunta las regiones antes mencionadas. De este modo la co-expresión de ambos receptores podría influenciar de manera importante los efectos provocados por la CRH, contribuyendo de este modo a la complejidad del acoplamiento diferencial de los receptores de la CRH a diferentes agentes estresantes o a cambios endocrinos.

ABSTRACT

Corticotropin-releasing hormone (CRH) has a major role in stress regulation in the organism. Two CRH receptors have been identified to date; type 1 receptor (CRH-R1) and type 2 receptor (CRH-R2 α), both members of the superfamily of G-protein coupled receptors. Both receptors have different affinities to the several members of the CRH-like peptide family. In the present study we investigated the regulation of CRH receptors when both receptors were co-expressed in HEK-293 cell line. Co-expression of CRH-R1 and CRH-R2 α in HEK-293 cells resulted in a partially inhibited cAMP production; indicating that in the presence of both receptors the signal transduction mediated by cAMP is impaired; however, neither binding kinetics properties nor internalization rate were modified in both receptors. In addition, our results demonstrated that these receptors differ in their internalization properties, CRHR1 internalized in a lower percent and also in a shorter period of time than CRHR2 α , while in cells where both receptors were cotransfected, the internalization rate behaved as the same as for CRHR2 α . Previous studies have demonstrated that mRNA for both CRH-R1 and CRH-R2 α receptors are co-localized in cerebral regions such as amygdala, hippocampus, and paraventricular nucleus, suggesting that both receptors can be coexpressed in these regions. Interaction between receptors can influence in an important way the effects evoked by CRH, contributing to the complexity of differential coupling of the CRH receptors to different stress agents or endocrine environment.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los defectos en la transducción de señales de los GPCR están relacionados con patologías como el cáncer, retinitis pigmentosa, hipercalcemia y enanismo entre otros. La presencia ubicua de los GPCR, su importancia en las señales celulares, así como su participación en enfermedades en el humano demuestran la necesidad de conocer los mecanismos intracelulares de esta familia de receptores.

La CRH y los ligandos de la CRH participan en una amplia variedad de eventos fisiológicos, principalmente en la adaptación de un organismo a un determinado agente estresante. Por ejemplo, existe una clara participación de la CRH y sus receptores durante los últimos meses del embarazo y en estados de preclampsia. También en patologías tales como depresión y ansiedad. Además, en pacientes con enfermedad de Alzheimer los niveles de la CRH se encuentran disminuidos en tanto que los niveles del CRH-R1 se encuentran elevados. La gran diversidad de efectos que la CRH ejerce es debida principalmente a dos características: primero, los receptores de la CRH tienen diferentes afinidades por los ligandos de la CRH, lo que determina la transducción de señal que se activará corriente abajo una vez que el ligando se ha unido al receptor y segundo, a la distribución tejido específica que los receptores de la CRH. Sin embargo, el conocimiento de las propiedades estructurales que determinan la activación y regulación de los receptores de la CRH es incompleta.

En algunas regiones del cerebro tales como la amígdala, el hipocampo y el núcleo paraventricular del hipotálamo se expresan ambos tipos de receptores de la CRH. Con base en lo anterior consideramos relevante estudiar la posible heterodimerización de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α de la rata en un sistema celular heterólogo que no expresa constitutivamente ninguno de los receptores de la CRH. Los resultados de este estudio pudiesen sentar las bases para explicar algunas alteraciones neuroendócrinas donde participa la CRH.

ANTECEDENTES

HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA (CRH)

El estrés es una respuesta no específica del organismo debido a una alteración del proceso homeostático, que desencadena una serie de estímulos para mantener un equilibrio fisiológico. La supervivencia es dependiente de una respuesta adecuada a un estímulo estresante. En este proceso se activan un gran número de respuestas fisiológicas integradas que incluyen a los sistemas autonómicos, endocrino, inmune, cardiovascular y reproductivo, los cuales inducen un amplio espectro de cambios homeostáticos y de comportamiento (Dieterich et al., 1997, Aguilera et al., 2004). La hormona liberadora de corticotropina (CRH) funciona como un mediador clave de la respuesta al estrés al activar el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HHA), al inducir una secreción rápida de la hormona adenocorticotrópica por el corticotropo hipofisario provocando un aumento en la concentración de glucocorticoides circulantes, los cuales son esenciales para los procesos de adaptación al estrés [Figura 1; (Aguilera, 1998)]. La hormona adenocorticotrópica (ACTH) es producto de un precursor mayor llamado proopiomelanocortina (POMC), producido no solo en la hipófisis sino también en el sistema nervioso. El procesamiento de la proopiomelanocortina genera varios péptidos los cuales incluyen: a la hormona adenocorticotrópica, las formas α , β y γ del receptor estimulante del melanocito, las formas α , β y γ de la endorfina y el péptido del lóbulo intermedio ligado a la hormona liberadora de corticotropina. En mamíferos, la síntesis de la CRH se realiza en un grupo de neuronas hipotalámicas, las cuales están situadas en la división parvicelular del núcleo paraventricular. Posterior a la síntesis, la CRH es secretada en el sistema de circulación porta hipofisario hasta los receptores de la CRH en la hipófisis anterior (Aguilera et al., 2004). Aunque su estructura tridimensional no está completamente establecida se ha realizado una extensiva caracterización de la relación estructura-actividad de los péptidos de la familia de la CRH, revelando la existencia de tres dominios funcionales principales. El primer dominio (residuos 1-16) es responsable tanto de la unión como de la activación del

agonista. El segundo dominio (residuos 17-31) se considera una región de unión entre los dominios 1 y 3, además de que contiene el sitio de reconocimiento para la proteína de unión a la CRH. Finalmente, el tercer dominio (residuos 32-41) es importante para la unión al receptor (Yang et al., 2010). El primer péptido de la CRH de mamífero fue aislado de extractos hipotalámicos de ovejas en 1981 (Vale et al., 1981). Posteriormente, fueron descubiertos nuevos miembros de la familia de ligandos relacionados a la CRH, de los cuales a la fecha se han descrito tres: UCN-I, UCN-II (o péptido relacionado a la estrescopina) y UCN-III (o estrescopina) (Figura 2). Estos últimos parecen provenir de un precursor ancestral (Denver, 1999). La CRH (un péptido de 41 aa) es el principal regulador de la secreción de glucocorticoides y andrógenos adrenales por el eje HHS tanto en condiciones basales como posteriores al estrés (Rivier et al., 1982, Pavlov et al., 1986). La CRH ha sido relacionada en la fisiopatología de varios trastornos; en particular, existe amplia evidencia en trastornos de ansiedad crónica, depresión atípica y melancólica, estados de fatiga y de dolor crónico, trastornos del sueño, comportamiento adictivo, neurodegeneración, desordenes alérgicos y autoinmunes inflamatorios, el síndrome metabólico y enfermedades gastrointestinales (Jones, 1990, Heinrichs and De Souza, 1999, Sarnyai et al., 2001, Gold and Chrousos, 2002, Wahle et al., 2002). Las UCNs tienen diferentes grados de homología en la secuencia de aminoácidos con la CRH: la UCN-II tiene una moderada identidad con la CRH de humano/rata (34%), con la UCN-I de humano (43%) y la UCN-III (37-40%). Mientras que la UCN-III tiene una homología menor con los otros miembros de la familia de la CRH (18-32% de identidad; Tabla 1) (Skelton et al., 2000). Estos péptidos están distribuidos ampliamente en muchas estructuras centrales sensibles al estrés y en numerosos tejidos periféricos como la hipófisis, testículos, tracto gastrointestinal, timo, bazo, riñón, corazón, glándulas suprarrenales, células sanguíneas, músculo y piel (Hsu and Hsueh, 2001, Kageyama et al., 1999, Lewis et al., 2001, Reyes et al., 2001). La expresión de estos péptidos coincide con la distribución central y periférica de la proopiomelanocortina, de los péptidos que la constituyen y de los receptores de la melanocortina (Smith and Funder, 1988; Starowicz and Przewlocka, 2003), lo que sugiere

que esta familia de péptidos funcionalmente relacionados tiene un papel importante en coordinar las respuestas al estrés del organismo (Aguilera et al., 2004).

En mamíferos, el papel fundamental de la CRH es integrar respuestas centrales y periféricas a estímulos de estrés a través de sus receptores localizados en una amplia variedad de tejidos (Yang et al., 2010). El receptor CRHR1 es crucial para la activación del eje HHS, mientras que el receptor tipo 2 parece ser importante en el control de los mecanismos homeostáticos que controlan el balance de energía, la cardioprotección, la angiogénesis tisular y los efectos de regulación gastrointestinales en la periferia (Markovic et al., 2008).

RECEPTORES DE LA CRH

La CRH y los péptidos relacionados a la CRH ejercen sus acciones en las células blanco mediante la activación de dos familias de receptores de alta afinidad de la CRH denominados R1 y R2 los cuales son codificados por diferentes genes (Chen et al., 1993, Lovenberg et al., 1995). En humanos, CRH-R1 y CRH-R2 son localizados en los cromosomas 17 (17q12-q22) y 7(7p21-p15) respectivamente, mientras que en el ratón estos receptores están localizados en los cromosomas 11 y 6 respectivamente (Vamvakopoulos and Sioutopoulou, 1994, Lesh et al., 1997, Meyer et al., 1997). Ambos receptores de la CRH pertenecen a la subfamilia de la Secretina/B de los receptores acoplados a proteínas G (Figura 3) que incluye a los receptores para la hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, glucagon, al péptido 1 ligado al glucagon (GLP1) y otros péptidos de importancia clínica (Pal et al., 2010). Estos receptores constituyen una familia pequeña que incluye 15 miembros, los cuales tienen un dominio de unión extracelular para hormonas peptídicas de aproximadamente 100-150 aminoácidos (Lagerstrom and Schioth, 2008). El extremo carboxilo del péptido se une con el dominio extracelular del receptor con una alta afinidad, mientras del la porción N-terminal del péptido se une al dominio transmembranal del receptor para activarlo (Pal et al., 2010).

En el humano el gen del CRHR1, incluye 50 kb en el genoma, contiene 14 exones y el producto completo es un receptor de 444 aminoácidos, denominado CRHR1 β , el cual presenta propiedades de unión y de señalización defectuosos (Hillhouse and Grammatopoulos, 2006). El ADN del CRHR1 está sujeto a múltiples modificaciones por corte y empalme alternativo y un número creciente de ARNm han sido descritos en humanos y en otras especies. Estas variantes son generadas a partir de la delección parcial o total de ciertos exones, algunos de los cuales están asociados con cambios en el marco de lectura (Chen et al., 1993, Ross et al., 1994). A la fecha se han descrito nueve variantes de este receptor (α , β , c, d, e, f, g, h y β/d) (Perrin et al., 1993, Vita et al., 1993, Dautzenberg et al., 1997, Myers et al., 1998, Palchaudhuri et al., 1998, Karteris et al., 2010). En la mayoría de estas variantes su papel fisiológico es muy cuestionable; sin embargo, su análisis ha sido muy útil en el estudio de determinantes estructurales y de sus características funcionales en estudios de comparación con otros miembros de la familia B de los GPCRs. La eliminación del exón 6 del pre-ARNm resulta en el transcrito que codifica para el CRHR1 α (415 aminoácidos), el cual aparentemente es la única forma activa de todas estas variantes (Grammatopoulos and Chrousos, 2002). Evidencias recientes en estudios de estos receptores variantes han demostrado que éstos pueden alterar las respuestas celulares de la CRH, ya que la co-expresión del CRHR1 α con las formas truncadas CRHR1 e y h pueden tanto atenuar como amplificar la señal del receptor CRHR1 α (Markovic et al., 2008). Esto llevó a proponer que estos receptores truncados actuarían como receptores señuelos capaces de competir con los receptores activos por la unión de los agonistas. Por otro lado estos receptores también podrían funcionar como reguladores dominante-negativos cuando se co-expresan con los receptores activos para inhibir la señal de activación (Karteris et al., 2010).

Otra característica importante de estos receptores variantes es que su complejo patrón de corte y empalme del ADN es tejido específico y particular para ciertos procesos fisiológicos [por ejemplo la expresión del CRH-R1d en el miometrio al término del embarazo

en el humano (Karteris et al., 2010)]. Además es afectado por los estímulos del medio ambiente [por ejemplo la expresión del CRH-R1g después de la irradiación con UV (Ross et al., 1994)], lo que sugiere un papel funcional en la modificación de las acciones de la CRH de manera tejido específicas.

El receptor de la CRH tipo 2 existe en tres formas diferentes denominadas CRH-R2 α (411-413 aminoácidos), CRH-R2 β (431-438 aminoácidos) y CRH-R2 γ (397 aminoácidos) (Kostich et al., 1998) (Ullrich and Schlessinger, 1990), (Vamvakopoulos and Sioutopoulou, 1994). La comparación estructural de estos subtipos demostró que los mismos difieren en el extremo amino-terminal (Ross et al., 1994). Los receptores tipo 1 y tipo 2 presentan una homología en su secuencia del 70% en muchas regiones, por ejemplo en el asa intracelular 3, la cual es importante para su interacción con las proteínas G. La mayoría de las diferencias en la secuencia entre ambos tipo de receptores ocurren en los dominios extracelulares, principalmente el dominio extracelular 1, el cual sirve como el principal dominio de unión del ligando (Perrin et al., 2006). Los dos tipos de receptores de la CRH exhiben características farmacológicas distintas, reflejando su variada expresión tejido-específica. El CRH-R1 une CRH así como UCN-I pero no UCN-II y UCN-III con la misma afinidad. Sin embargo, CRH-R2 une todas las UCNs con una afinidad significativamente mas grande que para la CRH, sugiriendo que los primeros péptidos sean sus ligandos naturales. El orden de afinidad de unión del CRH-R1 es: UCN-I > h/rCRH > α -helical CRH 9-41 (un antagonista); sin embargo, los receptores CRH-R2 unen en el siguiente orden: hUCN-I = hUCN-II > astresina = astresina₂B = antisauvagina-30 > hUCN-III > α -helical CRH (9-41) > h/rCRH >> oCRH (Behan et al., 1996, Eckart et al., 2001).

Estudios llevados a cabo por hibridación *in situ* demostraron que los ARNm de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α tienen expresión distinta pero también sobrelapada en el cerebro. El CRHR1 es abundante en el sistema nervioso central (SNC) y también es encontrado en el sistema nervioso periférico. Este es el receptor que se expresa predominantemente en la hipófisis (Potter et al., 1994, Bale and Vale, 2004), en el

hipocampo, la corteza, el cerebelo, la amígdala y el bulbo olfatorio (Palchadhuri et al., 1998, Yang et al., 2010). Además, este receptor está presente en bajos niveles en la piel, los ovarios, los testículos y en la glándula suprarrenal, también se encuentra pero en niveles menores en los ventrículos humanos (Yang et al., 2010). En el humano el CRHR2 α se expresa en órganos periféricos y en el SNC, mientras que el receptor CRHR2 β se encuentra principalmente en el SNC (Yang et al., 2010). En el corazón el CRHR2 α está presente en las cuatro cámaras, mientras que el CRHR2 β se detecta principalmente en la aurícula izquierda (Yang et al., 2010). El receptor CRHR2 γ se ha detectado solamente en regiones límbicas del sistema nervioso central como en el hipocampo y con menor expresión en la amígdala (Kostich et al., 1998).

TRANSDUCCION DE SEÑALES MEDIADAS POR LOS RECEPTORES DE LA CRH

En la mayoría de células, la CRH y los agonistas de la CRH ejercen sus efectos fisiológicos mediante la transducción de señales mediada por la adenilato ciclasa-cAMP resultado de la activación de la proteína G α_s . Una vez que el cAMP es generado, este interactúa con varias proteínas celulares que incluyen a las fosfodiesterasas (PDEs) que se encargan de romper el cAMP a 5'AMP, así como a proteínas efectoras, principalmente a la proteína cinasa A (PKA) y a la proteína de intercambio activada por cAMP (EPAC), las cuales a su vez se encargan de realizar las acciones encaminadas a dar una respuesta fisiológica (Houslay, 2010). En las células del corticotropo estos eventos de señalización producen la secreción de la ACTH y por tanto la activación de la expresión del gen POMC.

En células AtT-20 (Figura 4) la CRH y el cAMP inician una cascada de señales que activan a la cinasa reguladora de las señales extracelulares (ERK), una de las cinasas de la vía de transducción de señales de la MAPK (Jenks, 2009). En estas células la fosforilación de ERK es independiente de PKA, de PKC (proteína cinasa C), de PI-3K (fosfatidil-inositol 3-cinasa) o de Ca²⁺. Recientemente, se ha demostrado que la fosforilación de ERK en estas células es resultado de la activación del EPAC2, por lo tanto es un mecanismo de activación

independiente de PKA pero dependiente de cAMP (Van Kolen et al., 2010). El cAMP en su turno activa a la proteína cinasa A (PKA) la cual actúa a su vez en los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC), provocando la entrada de calcio y la subsecuente activación de la cinasa de calcio calmodulina II (CaMKII). ERK directamente fosforila y activa a los factores Nur (Nur77, Nurr1 y NOR1) dando origen a la formación de monómeros o dímeros que funcionan como factores de transcripción y que tiene sitios de unión en el gen POMC. Cuando Nur77 actúa como monómero se une en el sitio NBRE localizado aproximadamente a 70 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción; por el contrario, cuando estos factores Nur forman dímeros se unen a otro elemento de respuesta Nur (NurRE) compuesto de dos secuencias NBRE separados por 6pb. También se ha demostrado que el uso de inhibidores de la MAPK bloquean la actividad transcripcional de Nur mediada por CRH y por cAMP (Jenks, 2009). El tratamiento con CRH también está asociado con el reclutamiento de co-activadores de los dímeros de Nur, en particular de la familia de co-activadores del receptor de esteroides (SRC). Estudios llevados a cabo por Kovalovsky y cols. (Kovalovsky et al., 2002) han demostrado que el cAMP y el Ca^{2+} , actuando a través de la CaMKII también pueden iniciar la cascada de señales de transducción que dan lugar a la inducción en la expresión de los factores Nur.

En células AtT-20 los factores de transcripción Tpit y Pitx1 se unen en sus respectivos elementos de respuesta en el gen POMC denominados colectivamente TpitRE/PitXRE (Jenks, 2009). Se ha demostrado que ambos factores de transcripción son esenciales en la regulación del gen POMC, en la expresión diferencial tardía, en el mantenimiento de los niveles basales de la transcripción de este gen, así como en la expresión inducida por hormonas. El tratamiento con inhibidores de la CaMKII o de canales de calcio tipo L atenúan la actividad transcripcional de Tpit/PitxRE inducida por CRH/cAMP, lo que establece una relación directa de estos factores de transcripción en la cascada de señales intracelulares mediadas por calcio.

Ensayos con genes reporteros han demostrado que la región comprendida entre -173 a -160 del gen POMC tiene elementos de respuesta a CRH por lo que esta región fue

designada como CRH-RE. La proteína que se une en este sitio se denominó proteína de unión al CRH-RE (CRHREB) y tiene siete sitios potenciales de fosforilación por PKA; sin embargo, no se conoce con mayor detalle su mecanismo de activación sobre la regulación transcripcional de POMC (Jin et al., 1994). Otro factor de transcripción implicado en esta regulación es el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B); sin embargo, no se tiene mucha información sobre su mecanismo de activación. Se conoce que la unión de este factor de transcripción es asociado con una inhibición en la expresión del gen y que el tratamiento con CRH bloquea, a través de un mecanismo desconocido, la unión a su elemento de respuesta (NF- κ BRE) y por tanto promueve un incremento en la expresión del gen POMC (Karalis et al., 2004).

Aunque en el promotor de POMC no parece tener elementos de respuesta para cAMP (CRE) las células del corticotropo expresan a la proteína de unión a CRE (CREB) la cual es fosforilada por PKA. La activación del gen POMC mediada por CREB aparentemente es debida a la inducción de un gen temprano inmediato, el c-Fos. La CRH induce una expresión transitoria de c-Fos en células AtT-20 y es dependiente de PKA. Este hallazgo es consistente con la observación de que el gen de c-Fos contiene dos sitios CRE (Boutillier et al., 1992). Posterior a la estimulación con CRH existe un incremento en la transcripción del gen POMC debido a la unión de Fos y Jun al sitio de unión AP-1 en el exón 1 del gen POMC. Adicionalmente es posible que CREB se una directamente al sitio AP-1 y de que se una e incremente la potencia de factores de transcripción en el sitio NurRE (Mynard et al., 2004).

El gen POMC tiene también un elemento de respuesta negativo a glucocorticoides (nGRE). Este elemento represivo, el cual se sobrelapa con el NBRE, tiene la propiedad de unir tres receptores de glucocorticoides (GR) (Drouin et al., 1993). Además de actuar directamente en el nGRE hay otras formas para los GR de reprimir la expresión del gen POMC. La dexametasona antagoniza a los factores Nur y por tanto la transcripción del POMC dependiente de NurRE a través de una interacción directa proteína-proteína entre el GR y los factores Nur. A través de esta interacción los GR presumiblemente secuestran a

los factores Nur y por lo tanto no están disponibles para la inducción de la transcripción (Martens et al., 2005). Por otro lado, la delección o mutación del sitio Tpit/PitxRE atenúa la represión inducida por dexametasona del gen POMC. Esta observación sugiere que la unión de GR al coactivador SRC pudiera ser la causa de la disociación del coactivador del sitio Tpit/PitxRE dando lugar a una disminución en la transcripción del POMC (Murakami et al., 2007). Por último en el gen POMC también existe un sitio para el factor de diferenciación neurogénico (Neuro D1); sin embargo, no ha sido establecido en mecanismo intracelular por el que NeuroD1 induce cambios en la expresión de éste gen (Poulin et al., 1997).

En otros tejidos la transducción de señales iniciada por la CRH esta mediada por diferentes proteínas, por ejemplo la activación de la transducción de señales cAMP/PKA también incluye la activación de la guanilato ciclasa unida a la membrana con el consecuente incremento en la producción de cGMP en células del músculo liso (Aggelidou et al., 2002), estimulación del factor nuclear K_B en timocitos de ratón (Zhao and Karalis, 2002), fosforilación de la glicógeno sintetasa cinasa-3 en neuronas del SNC (Facci et al., 2003), supresión de la actividad de la corriente de potasio activada por calcio en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo (Haug and Storm, 2000) y un incremento en la fosforilación de la tirosina hidroxilasa en células PC12 de rata (Nemoto et al., 2005). La mayoría de las funciones de la CRH en el SNC y en la periferia se deben al acoplamiento de los CRH-R a las proteínas $G\alpha_s$; sin embargo, otras proteínas G tienen un papel importante en algunas funciones (Kuryshv et al., 1995). De hecho en algunos tejidos como la placenta y los testículos los efectos de la CRH parecen ser independientes de la $G\alpha_s$ a pesar de existir niveles adecuados está de manera endógena (Ulisse et al., 1990, Karteris et al., 2000). Se ha demostrado que los CRH-R pueden activar diferentes subunidades de la proteína $G\alpha$, con el siguiente orden de potencia: $G\alpha_s \geq G\alpha_o > G\alpha_{q/11} > G\alpha_{i1/2} > G\alpha_z$. Esto no es sorprendente ya que muchos de los GPCR interactúan con más de una familia de proteínas $G\alpha$, incluso algunos receptores interactúan con las cuatro familias de proteínas

G_{α} (Bourne, 1997, Wess, 1998). La movilización del Ca^{2+} mediada por G_q y G_i es a través de la señal de la fosfolipasa C (PLC) β , mientras que la movilización de pozas intracelulares de Ca^{2+} mediada por G_s es a través de la proteína EPAC que activa a la PLC ϵ mediante la activación de una proteína GTPasa pequeña, la Rap-1, de tal modo que en la movilización del Ca^{2+} mediada por la proteína G_s la PKA no participa (Gutknecht et al., 2009). En células de Leydig y en células de placenta el receptor tipo 1 estimula a la fosfolipasa C y la formación de inositol (1,4,5) trifosfato (IP) mediante el acoplamiento exclusivamente a la proteína G_q (Grammatopoulos et al., 2000). Los receptores de la CRH tipo 2β expresados de manera endógena en las células A431 (una línea celular de carcinoma epidérmico de humano) también estimula la formación de IP (Kiang et al., 1998). La CRH también incrementa las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en astrocitos y en células de melanoma (Takuma et al., 1994, Fazal et al., 1998). Además, los receptores de la CRH tipo 1 de la corteza cerebral y transfectados en células LLCRK-1 (línea celular de riñón de conejo) pueden acoplarse a las proteínas G_s y G_q activando las señales mediadas por el cAMP y la fosfolipasa C (Dieterich et al., 1996). Otras señales intracelulares que se activan por acción de la CRH incluyen a las cinasas PKB/Akt, ERK y p38 MAPK así como otros segundos mensajeros importantes como la oxido nítrico sintetasa (NOS), la guanilil ciclasa, las prostaglandinas, la cinasa RhoA/Rho y los ligandos de Fas y Fas (Grammatopoulos and Hillhouse, 1999, Malagoli et al., 2000, Cantarella et al., 2001, Kostic et al., 2001, Makrigiannakis et al., 2001, Dermitzaki et al., 2002, Karteris et al., 2004). Un gran número de moléculas que median las funciones biológicas de los CRH-Rs en el SNC y en la periferia han llamado particularmente la atención, especialmente la familia de las MAPK cinasas, en particular ERK y p38 MAPK. Ambas enzimas son estimuladas por la unión del agonista a los receptores tipo 1 o tipo 2 en células que expresan ambos receptores de manera endógena o recombinante (Grammatopoulos et al., 2000, Malagoli et al., 2000, Kostic et al., 2001, Dermitzaki et al., 2002, Brar et al., 2004a, Brar et al., 2004b, Karteris et al., 2004, Nemoto et al., 2005). Estas señales participan en funciones importantes de la CRH tales

como cardioprotección contra daño por isquemia de repercusión (Brar et al., 2004b), la adaptación de la memoria y del comportamiento al estrés (Sananbenesi et al., 2003), neuroprotección (Elliott-Hunt et al., 2002, Pedersen et al., 2002), vasodilatación (Kageyama et al., 2003) y contracción del músculo liso (Karteris et al., 2004). Los requerimientos tejido específicos para la activación de una proteína G capaz de estimular la actividad de ERK está determinada por la capacidad individual de los agonistas de la CRH de activar a las proteínas G necesarias. Se ha demostrado que en células miometriales la UCN-I, pero no la CRH, puede activar a ERK debido a que solo la UCN-I induce el acoplamiento CRH-R-G α_q con la subsecuente translocación de PKC con suficiente potencia para activar esta vía (Grammatopoulos et al., 2000). En contraste, en tejido cerebral la fosforilación y activación de ERK son dependientes principalmente de la activación de la proteína G α_s -PKA y tanto la CRH como la UCN-I son capaces de activar esta cascada de señales (Elliott-Hunt et al., 2002).

Una exposición sostenida de la hipófisis anterior a altas concentraciones (1 μ M) de CRH produce una disminución en la acumulación de cAMP, así como en la liberación de hormona adenocorticotrópica en las células del corticotropo (Hauger et al., 2000, Aguilera et al., 2001). La desensibilización homóloga de los receptores de la CRH tipo 1 está mediada por la fosforilación de estos receptores por la cinasa de los receptores acoplados a proteínas G tipo 3.

DIMERIZACION DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

Para diferentes clases de receptores de superficie la dimerización constitutiva o promovida por el ligando es necesaria para que exista una transducción de señales. El modelo de dimerización de muchos receptores contrasta con el modelo clásico propuesto para los receptores acoplados a proteínas G. Era generalmente aceptado que los receptores acoplados a proteínas G funcionaban como unidades monoméricas que se acoplaban a una proteína G con una estequiometría 1:1 (Heldin, 1995). Aunque la

formación de dímeros no ha sido demostrada para cada receptor acoplado a proteínas G y para algunos su importancia no es clara, para otros la importancia de la dimerización en la función del receptor ha sido bien establecida, algunos ejemplos se mencionan posteriormente (Salahpour et al., 2000). Algunas evidencias experimentales sugieren que los receptores acoplados a proteínas G pueden formar heterodímeros ya sea entre subtipos de la misma familia de receptores o entre receptores de diferentes familias (Bouvier, 2001); (Marshall, 2001). La formación de heterodímeros representa un mecanismo por el cual la unión de un ligando a su receptor puede afectar la afinidad y eficacia de los ligandos que actúan en el segundo receptor. Una explicación de cómo la afinidad de un segundo receptor se ve afectada es que la unión del ligando en el primer receptor puede causar una redistribución de las proteínas G dentro de la célula, de tal modo que el acoplamiento a la proteína G del segundo receptor se ve modificado (Cordeaux and Hill, 2002). Por ejemplo, la formación del heterodímero entre el receptor tipo 1 de la angiotensina II y los receptores de la bradikinina B2 induce un incremento en la activación de las proteínas G_q y G_i . Por otro lado, la dimerización de los receptores de adenosina A2A y dopamina D3 produce una disminución en la señal de los receptores D3 (Mikhailova et al., 2007).

En algunos tipos de receptores acoplados a proteínas G la presencia de agonistas pueden estabilizar la formación de dímeros, un ejemplo es el del receptor β_2 -adrenérgico. Angers y colaboradores (Angers et al., 2000) demostraron que el receptor β_2 -adrenérgico humano forma homodímeros que son expresados en la superficie de células de mamífero *in vivo* posteriores a la activación con un agonista específico. Por otro lado, estudios de mutagénesis dirigida en dos cisteínas (que se presume son esenciales para el proceso de dimerización) del receptor extracelular sensible a calcio dio lugar a un receptor con baja afinidad para su ligando, el calcio (Pace et al., 1999). En el caso del receptor δ -opioide la estimulación con un agonista específico disminuye los niveles de dimerización del receptor (Cvejic and Devi, 1997). Estos hallazgos sugieren que la homodimerización puede tener una participación directa en el mecanismo de activación de los receptores acoplados a

proteínas G o de manera alternativa puede participar en los procesos de desensibilización e internalización dependientes de agonistas.

La heterodimerización entre diferentes subtipos de receptores relacionados entre sí ha cobrado gran importancia. El mejor ejemplo lo encontramos en el receptor de GABA. El subtipo del receptor GABA_BR1 (GBR1), acoplado a proteínas G, cuando es expresado en células de mamífero se localiza como una proteína inmadura en el retículo endoplásmico. Por otro lado el subtipo GABA_BR2 (GBR2) es un receptor que se expresa en la membrana celular; sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que este receptor es incapaz de unir a su ligando. Al coexpresarse los receptores GBR1 y GBR2 en el mismo sistema celular se obtiene un receptor completamente funcional y glicosilado en la superficie celular. Probablemente *in vivo*, el receptor a GABA_B es un heterodímero de GBR1-GBR2 (White et al., 1998), (Jones et al., 1998), (Kaupmann et al., 1998), (Kuner et al., 1999). Otro ejemplo de heterodimerización lo constituyen los receptores tipo δ y κ opioides que al dimerizar forman un nuevo receptor con propiedades funcionales y de unión distintas de los de cada receptor independiente (Jordan and Devi, 1999).

Actualmente ha sido demostrada la homodimerización del receptor tipo 1 de la CRH (Kraetke et al., 2005) en células HEK-293. En este estudio el CRH-R1 fue fusionado ya sea a la proteína azul fluorescente (CRH-R1-CFP) o a la proteína amarilla fluorescente (CRH-R1-YFP). Los receptores recombinantes fueron co-expresados transitoriamente en esta línea celular y se observó la presencia de dímeros del receptor mediante la técnica de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). La formación de homodímeros no fue dependiente de agonistas o antagonistas con diferentes grados de afinidad al receptor, por lo que se propuso que la dimerización del CRH-R1 es constitutiva. Sin embargo, no se determinó el efecto fisiológico de la dimerización del receptor de la CRH. Mediante el uso de la misma metodología de FRET se demostró que ambos receptores de la CRH forman no solo dímeros sino también oligómeros en la membrana celular y que la formación de estos dímeros es constitutiva y no depende de la presencia del agonista (Milan-Lobo et al., 2009). El receptor CRHR1 no solo forma oligómeros, también se ha

demostrado que forma heterodímeros con el receptor de la vasopresina V1b (Young et al., 2007).

HIPOTESIS

La capacidad de unión a su ligando y/o la activación de los receptores tipo 1 y tipo 2 de la CRH de la rata serán diferentes cuando se expresan de forma individual o sean co-expresados en las células HEK-293.

OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer los efectos producidos por la co-expresión de los receptores tipo 1 y tipo 2 de la CRH sobre la unión del ligando y la transducción de la señal en un sistema de expresión de células de mamífero.

Objetivos Particulares

1. Clonar los ADNs complementarios de los receptores tipo 1 y tipo 2 de tejido de rata en un vector de expresión.
2. Expresar los ADNs complementarios de ambos receptores en la línea celular HEK-293.
3. Demostrar la expresión de los receptores en la línea celular mediante ensayos de Western blot.
4. Identificar por ensayos de inmunoprecipitación la formación de agregados de los receptores tipo 1 y tipo 2 de la CRH.
5. Determinar las características de unión e internalización de ambos receptores.
6. Identificar la existencia del acoplamiento de los receptores a las proteínas G_s y G_q .
7. Evaluar mediante experimentos de co-transfección de los receptores tipo 1 y tipo 2 de la CRH si existe alguna modificación en la unión del ligando o en la activación del receptor.

METODOLOGIA

1. Modelo de estudio

Las células que se utilizaron en este estudio fueron las HEK-293, esta línea celular proveniente de riñón de embrión humano ha sido ampliamente utilizada para ensayos de actividad de los receptores de la CRH. Las células HEK-293 no expresan de manera constitutiva al CRH-R1 ni al CRH-R2 α , lo que las hace de gran utilidad para la evaluación de ensayos funcionales. En este modelo celular los diferentes receptores fueron transfectados temporalmente y su actividad se evaluó mediante el uso de agonistas de estos receptores.

2. Clonación de los genes de los receptores de la CRH

El tejido fue obtenido de ratas macho Sprague-Dawley de 28 días de nacidas. El ARN total fue extraído de cerebro y de corazón utilizando el reactivo de Trizol (Gibco BRL), basado en el método de extracción tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo. Para la clonación del receptor tipo 1 se utilizó la técnica de RT-PCR. El ADN complementario (ADNc) de 3 μ g de ARN total de cerebro de rata fue sintetizado utilizando el sistema de SuperScript Preamplification System (Gibco BRL). Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron dos oligonucleótidos, el R1-1 [5'GACCGCAGCCGCCCGCCCTCCG3'] y el R1-4 [5'GACTGGCTCGTCAGTGAGCTTGC3'], los cuales corresponden a las regiones amino terminal (de la base 1 a la 21) y carboxilo terminal (de la base 1375 a la 1397) respectivamente, del ADNc del CRH-R1. La amplificación del CRH-R1 se realizó utilizando la técnica de touchdown-PCR. Se realizaron dos ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C durante 30 s, un alineamiento a 70°C por 30 s y una extensión a 72°C por 3 min; posteriormente, se realizaron otros dos ciclos de amplificación en las mismas condiciones pero la temperatura de alineamiento disminuyó a 67°C. Se continuaron con dos ciclos de amplificación disminuyendo la temperatura de alineamiento 3°C hasta obtener una temperatura de 55°C. Finalmente, se realizaron 35 ciclos de PCR con las condiciones antes mencionadas con una temperatura de alineamiento de 55°C y una extensión final de 8 min a 72°C después del último ciclo.

El ADNc del receptor CRH-R2 α fue obtenido a partir de cerebro y de corazón de rata. Las condiciones del RT-PCR y del touchdown PCR fueron similares a las utilizadas para la clonación del receptor CRH-R1. Los oligonucleótidos utilizados fueron: R2A1 [5'GTGGGC GGGGAGGCACCTGGACGCTG3'] y R2A2 [5'CGCGCACTCCCACTCCCAACGCGCG3'] que corresponden a las regiones 100/125 y 176/200, respectivamente. Los oligonucleótidos en antisentido fueron: R2A3 [5'GGCTGTGAAGAATGAGGAAGCCGC C3'] y R2A4 [5'GCACCCAAGGGTCAGTGTAGCAAG3'] correspondientes a las regiones 1489/1512 y 1529/1551, respectivamente.

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1% y las bandas del peso molecular deseado fueron extraídas y purificadas. Los fragmentos de ADN fueron clonados en el vector pGEM-T easy (Promega). Cinco clonas con el inserto de ADNc del tamaño deseado, para cada receptor, fueron secuenciadas en un secuenciador automático PE Applied Biosystem (373A). La secuenciación fue llevada a cabo en ambas cadenas utilizando los oligonucleótidos PUC/M13-F y PUC/M13-R.

Los ADNc de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α en pGEM-T easy fueron subclonados en pcDNA3.1 (Invitrogen) en los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI*. La identidad de las construcciones así como la correcta orientación fue verificada mediante secuenciación. Para estudios de transfección, el ADN del plásmido en gran escala fue preparado utilizando el sistema de Endofree maxiprep kit (Qiagen). La pureza e identidad de los plásmidos amplificados fueron verificadas por análisis con enzimas de restricción.

3. Transfecciones transitorias de los receptores de la CRH

Las células HEK-293 se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/10% suero fetal de ternera (FCS)/20 μ g/ml de gentamicina en una atmósfera del 5% CO₂ a 37°C. Se sembraron 500,000 células por pozo en 2 ml de DMEM/FCS/gentamicina en placas de 6 pozos. Veinticuatro horas después, las células

fueron lavadas con OPTI-MEM para eliminar los restos de medio con suero. Las células fueron transfectadas con 2 μg de ADNc de los receptores de la CRH utilizando 5 μl de lipofectamina en 1 ml de OPTI-MEM por pozo y se incubaron a 37°C. Cinco horas después se agregó a cada pozo 1 ml de DMEM/20% FCS. Veinticuatro horas después de iniciada la transfección el medio fue reemplazado por DMEM/FCS/gentamicina fresco y las células se dejaron crecer por otras 24 h antes del tratamiento.

4. Inmunoprecipitación y Western blot

Las células transfectadas fueron lavadas dos veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) posteriormente se homogenizaron en 500 μl de amortiguador RIPA (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, igepal 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, EDTA 1 mM, MgCl_2 2.5 mM) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (pronasa 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, termolisina 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quimiotripsina 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tripsina 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y papaína 1 mg/ml). El homogenizado fue centrifugado por 10 min a 12,000xg a 4°C. Los extractos celulares fueron purificados con 100 μl de proteína A-sefarosa 6MB acoplada a IgG de suero normal de conejo o de suero normal de cabra durante 30 min a 4°C. Posteriormente, el extracto celular fue transferido a tubos nuevos con 100 μl de proteína A-sefarosa pre-acoplados a los anticuerpos anti CRH-R1 y anti CRH-R2 α (2 μg de cada uno) y fueron incubados toda la noche a 4°C. Doce horas después se descartó el sobrenadante, la sefarosa fue lavada tres veces con amortiguador RIPA y el complejo anticuerpo-receptor fue resuspendido en 50 μl de amortiguador SDS-PAGE [10 ml glicerol, 5 ml 2-mercaptoetanol, 30 ml de SDS 10% y 12.5 ml amortiguador tris 4X (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4 %) a un volumen de 100 ml de agua] calentándose por 2 min a 95°C.

Las muestras fueron separadas en geles de tris-glicina/SDS/poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. La unión del anticuerpo fue detectada utilizando segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa.

5. Yodación de la CRH

El marcaje de la hormona se realizó a temperatura ambiente utilizando [¹²⁵I] mediante el método de IODO-GEN. En breve, 2.5 µg de hormona se disolvieron en 50 µl de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4, este volumen se depositó en un vial que contenía 1.5 µg de agente oxidante (1,3,4,6-tetracloro-3α-6α-diphenilglucoril, IODO-GEN) y la reacción se inició cuando se añadieron cantidades conocidas de [¹²⁵I] que en el día de marcaje tuvieran una actividad cercana a 0.5 mCi. Una vez añadido el [¹²⁵I] se realizó una agitación suave durante 8 min y la reacción se detuvo con 200 µl de una disolución de metabisulfito de sodio 30 µg/ml y 200 µl de yoduro de potasio 100 µg/ml ambos disueltos en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4. La mezcla de reacción se separó en una columna (1x27 cm) de filtración en gel (Sephadex G-75) previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4 con un flujo de 30 ml/hora y saturada con 60 mg de albúmina sérica bovina. Se colectaron 30 fracciones de 1 ml en tubos a los que previamente se le colocó 1 ml de albúmina sérica bovina al 1%.

Con el fin de conocer el patrón de elución de la hormona marcada se tomaron 3 µl de cada fracción y se contaron durante 1min en un contador gamma Wallac de 10 canales. La eficiencia de incorporación del isótopo [¹²⁵I] se obtuvo por medio de la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético al 30 %. Se tomaron 3 µl de cada fracción a las cuales se les añadieron 150 µl de una disolución de albúmina sérica bovina al 1% en amortiguador de fosfatos 0.05 M y 150 µl de ácido tricloroacético al 30%. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1,500xg a 4°C durante 30 min. El sobrenadante obtenido se decantó y la radiactividad presente en el precipitado se contó en un contador gamma Wallac de 10 canales durante 1 min. El pico de hormona marcada se encontró entre las fracciones 3 y 7.

6. Ensayo de unión al receptor

Los ensayos de unión del receptor de la CRH, en células intactas, se realizó utilizando un rango de hormona marcada [¹²⁵I]CRH (desde 62,000 a 1,000,000 cpm) en amortiguador de unión de Tris (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 5 mM, suero de caballo 5% y suero fetal de ternera 0.5%). Setenta y dos horas después del inicio de la transfección las células fueron lavadas dos veces con el amortiguador de unión de Tris. La radiactividad fue agregada a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Después del tiempo de incubación las células se lavaron con el amortiguador de unión de Tris y fueron lisadas con NaOH 1 N. Los lisados celulares fueron colectados y la radiactividad fue determinada utilizando un contador gamma Wallac de 10 canales.

Para ensayos de internalización, las células HEK-293 fueron transfectadas transitoriamente utilizando el método descrito anteriormente, excepto que se sembraron 200,000 células en placas de 12 pozos. Aproximadamente 72 h después de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con amortiguador de unión de Tris. Las células fueron incubadas con [¹²⁵I]CRH (200,000 cpm) durante 5, 15, 30 y 60 min a 37°C. En el tiempo indicado, la hormona marcada fue removida y la placa fue colocada en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se agregaron 500 µl de una solución ácida (ácido acético 50 mM, NaCl 150 mM pH 2.8) y se incubaron por 12 min en hielo. Para determinar el ligando marcado unido en la superficie celular, la solución ácida fue colectada y la radiactividad fue determinada en un contador gamma Wallac de 10 canales. Para determinar el complejo radioligando/receptor internalizado las células fueron solubilizadas en 500 µl de Tritón X-100 0.1%/PBS, colectadas y cuantificadas en el contador gamma. La uniones inespecíficas para cada tiempo y para cada receptor fueron determinadas utilizando el mismo procedimiento pero en presencia de 10 µM de CRH no marcada. Las uniones inespecíficas fueron restadas tanto de la unión en la superficie celular como del ligando

internalizado. La internalización fue expresada como el porcentaje de internalización del total unido para cada punto.

7. Yodación de cAMP

El marcaje del cAMP se realizó a temperatura ambiente utilizando [¹²⁵I] mediante la técnica de cloramina T. A 0.2 µg/µl de cAMP grado yodación, se agregaron 40 µl de amortiguador de fosfatos 0.5 M y [¹²⁵I] a una actividad aproximada de 1 mCi. Posteriormente, se agregaron 50 µl de cloramina T (3.5 g/ml en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.5) y se dejó que la reacción se llevara a cabo durante 45 segundos con agitación suave. Finalmente, se agregaron 100 µl de metabisulfito de sodio (2.4 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.5) para detener la reacción. La mezcla de reacción se separó en una columna de intercambio aniónico previamente equilibrada con 10 ml de ácido fórmico 0.1 M. La elución de las fracciones se realizó con las siguientes soluciones: 15 ml de ácido fórmico 0.1 M, 15 ml de ácido fórmico 2 M, 15 ml de ácido fórmico 4 M, 15 ml de ácido fórmico 8 M/formato de amonio 20 mM y 15 ml de ácido fórmico 8 M/formato de amonio 200 mM. Se colocaron fracciones de 3 ml cada una y el pico de cAMP iodado se obtuvo al correr la columna con la solución de ácido fórmico 4 M.

8. Determinación de la acumulación de cAMP

Se sembraron 100,000 células por pozo en cajas de 24 pozos. Cuarenta y ocho horas posteriores a la transfección, las células fueron lavadas dos veces con DMEM/0.1% albúmina sérica bovina/gentamicina y posteriormente estimuladas con las concentraciones indicadas de CRH en 0.5 ml de DMEM/albúmina sérica bovina/gentamicina/0.2 mM 3-isobutil-1-metilxantina durante 2 h a 37°C. El medio de cultivo de cada pozo fue colectado en tubos con 50 µl de teofilina 10 mM. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y la cantidad de cAMP fue determinada mediante radioinmunoensayo (RIA, (Lin et al., 1998)).

9. Medida de la producción de inositol fosfato (IP)

Se sembraron 100,000 células por pozo en cajas de 24 pozos. Cincuenta y cuatro horas después de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con DMEM/albúmina sérica bovina/gentamicina, posteriormente se incubaron en 0.5 ml por pozo de DMEM libre de inositol con 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-inositol durante 18 h a 37°C. Las células se lavaron dos veces con DMEM libre de inositol/5 mM LiCl y se estimularon con las concentraciones indicadas de CRH en 0.5 ml del mismo medio durante 30 min a 37°C. Las soluciones fueron removidas y se añadió 1 ml de ácido fórmico 0.1 M a cada pozo. Las células se congelaron y descongelaron y la producción de IP totales fue determinada en el sobrenadante utilizando columnas de intercambio aniónico previamente lavadas con 3 ml de ácido fórmico 0.1 M. Los lisados celulares se colocaron en las columnas y se agregaron 2 ml de ácido fórmico 0.1 M a cada columna. Posteriormente se agregaron otros 3 ml de ácido fórmico 0.1 M y finalmente se agregaron 3 ml de ácido fórmico 0.1 M/formato de amonio 1 M a cada columna. Con esta última solución se recuperaron los IP totales. Se tomó un alícuota de 500 μl de cada tubo y se determinó la concentración de IP en un contador de centelleo (Huckle and Conn, 1987).

10. Análisis de datos

Los datos están presentados como la media \pm la desviación estándar del resultado por triplicado de cada experimento. Los resultados fueron repetidos por lo menos tres veces obteniendo resultados similares entre ellos. Los datos fueron analizados utilizando la prueba estadística de ANOVA de una, dos o tres vías, seguido por la prueba de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

El ARN total del cerebro y de corazón de rata se obtuvo a partir de 600 y 450 mg de tejido, respectivamente. La concentración de ARN total que se obtuvo fue de 5.8 g/ml y de 4 g/ml para el cerebro y el corazón respectivamente.

El análisis de los productos de PCR obtenidos demostró que para el CRH-R1 se obtuvo la banda de peso molecular esperado en cerebro, no así en corazón (Figura 5, control negativo) en donde no se obtuvo ningún producto de PCR. En el caso del CRH-R2 α se probaron cuatro combinaciones de oligonucleótidos: R2A1/R2A4, R2A2/R2A3, R2A1/R2A3 y R2A2/R2A4, obteniéndose la banda de peso molecular esperado en ambos tejidos para las combinaciones R2A2/R2A3 y R2A2/R2A4 de oligonucleótidos (Figura 6). Además, se obtuvieron múltiples bandas de peso molecular menor al esperado, debido a que en el "touchdown-PCR" se utilizan varias temperaturas de alineamiento dando origen a productos de PCR no específicos.

Una vez que se obtuvieron los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α se procedió a la clonación de los productos de PCR en el vector pGEM-T easy. Posteriormente se procedió a transformar bacterias XL1 blue (Stratagene) con los vectores recombinantes. El resultado de la secuenciación de las clonas analizadas demostró que en todas ellas fue posible obtener la secuencia codificante completa de ambos receptores sin presencia de cambios de bases comparadas con las reportadas en el GeneBank. Ambos receptores fueron subclonados en el vector de expresión pcDNA3.1(+), para obtener altos niveles de expresión en las células HEK-293 (Figura 7).

Los receptores de la CRH fueron expresados por separado o en forma conjunta en las células HEK-293. Para confirmar la presencia de los receptores en las células se realizó extracción de ARNm de las HEK-293 cotransfectadas transitoriamente con CRH-R1 y CRH-R2 α . En el ARNm obtenido de las células se realizó nuevamente la reacción de RT-PCR para ambos receptores y se obtuvo una banda de aproximadamente 1400 pares de bases

(pb) utilizando oligonucleótidos específicos para el CRH-R1; también se obtuvo una banda de aproximadamente 1441pb utilizando los oligonucleótidos R2A2-RA4 específicos para el receptor tipo 2α (Figura 8). No se observaron bandas adicionales.

La presencia de los receptores fue identificada mediante experimentos de inmunoprecipitación y Western blot (Figura 9). Los resultados de la inmunoprecipitación y western blot demuestran la existencia de una banda de 65kDa para cada receptor cuando se expresan independientemente (Figura 9A) o en forma conjunta (Figura 9B). En los ensayos de coimmunoprecipitación no se observó agregación de los receptores ya que no se obtuvieron bandas correspondientes a múltiplos del peso molecular de los receptores individuales. Sin embargo, las condiciones de solubilización astringentes pueden prevenir la detección de dímeros mediante la promoción de su disociación parcial o total (Bulenger et al., 2005).

La producción de cAMP en células que expresan a los receptores de la CRH en respuesta a diferentes concentraciones del agonista CRH se muestra en la figura 10. Dos horas de estimulación con CRH produjeron un aumento dependiente de la dosis en la producción de cAMP en la células HEK-293 que expresan CRH-R1, CRH-R2 α o CRH-R1+CRH-R2 α . En los experimentos de cotransfección del CRHR1 y CRHR2 α , en donde la concentración de un receptor se incrementó con respecto del otro pero manteniendo la concentración total de ADNc de 0.1 μ g/pozo se muestra en la figura 10A. Se observó una disminución en la producción de cAMP cuando los dos receptores se encontraron presentes en las células. Debido a que la mayor respuesta se obtuvo cuando la concentración de cada receptor fue de 0.1 μ g, se investigó el efecto de 0.1 μ g de ADNc de cada receptor en la misma transfección (Figura 10B). La existencia de CRH-R1 y CRH-R2 α a una concentración final de 0.2 μ g provocó una disminución del 70% en la producción de cAMP comparada con las respuestas obtenidas de los receptores expresados independientemente (Figura 10B). Para determinar si estos resultados no son un artefacto experimentos de complementación de ADN se realizaron con cada uno de los receptores y pcDNA3.1, no se

observó disminución en la producción de cAMP en ninguno de los experimentos de transfección.

Para el análisis de unión de los receptores de CRH un modelo de dos sitios de unión fue el mejor modelo compatible para los estudios de unión de ligando (Figura 11) ya que no se obtuvo una gráfica lineal en el análisis de Scatchard, que es la que se obtiene cuando un receptor tienen solo un sitio de unión al ligando, en su lugar lo que se observa es una parábola descendente. El análisis de las gráficas de Scatchard demostró las constantes de actividad de alta y baja afinidad, así como las uniones máximas para ambos sitios de unión (Tabla 2).

Las velocidades de internalización se muestran en la figura 12. El porcentaje de internalización de células que expresan al CRHR1 es menor (aproximadamente 9%) que el de las células que expresan al CRHR2 α , en donde se observa que aproximadamente el 17% de estas se internalizan. Las células que coexpresan a los dos receptores presentan un porcentaje de internalización de aproximadamente 14%, un dato que se asemeja más a lo obtenido con el CRHR2 α . Sin embargo, las velocidades de internalización antes de llegar a la meseta son similares entre los receptores de la CRH, encontrándose de 0.56 % de receptor internalizado/min, 0.48% de receptor internalizado/min y 0.46% de receptor internalizado/min para CRH-R1, CRH-R2 α o CRH-R1+CRH-R2 α respectivamente. Además del porcentaje de internalización otra diferencia importante es el tiempo en el que se logra la internalización, mientras que para las células que expresan el CRHR1 a los 15 min ya se encontraba el máximo de internalización, en las células que expresan al CRHR2 α y CRH-R1+CRH-R2 α su máximo de internalización se logró hasta los 30 min. Igual que para el porcentaje de internalización, la coexpresión de ambos receptores presenta un tiempo de internalización igual al que se obtiene solo con el CRHR2 α .

Además de la acumulación de cAMP se midió la producción de IP en células HEK-293. En este sistema no se observó aumento significativo en la producción de IP en ninguna de las combinaciones de expresión de los receptores de la CRH (Figura 13). Como

control interno para verificar la eficacia del sistema se midió la producción de IP del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHR) que se observa en el recuadro superior de la figura, en presencia de su ligando el GnRHR incrementa la producción de IP de manera dependiente de la dosis.

DISCUSION

Hace veintiocho años fue publicada la estructura primaria del primer receptor acoplado a proteínas G, la rodopsina. Se demostró que esta proteína tiene la capacidad de transferir la energía de la luz en cascadas de señales intracelulares, que permiten que un individuo pueda ver. Los avances tecnológicos han hecho posible el desarrollo de metodologías para medir la unión, la solubilización y la purificación de diferentes GPCR; lo que contribuyó al concepto de la superfamilia de GPCR. El número de receptores de esta superfamilia ha crecido rápidamente y ha sido evidente que éstas proteínas pueden unir una gran cantidad de ligandos (Lagerstrom and Schioth, 2008). Estos ligandos van desde partículas subatómicas (un fotón), iones (H^+ y Ca^{2+}), moléculas orgánicas pequeñas, péptidos y proteínas (Kobilka, 2007). El reciente y detallado análisis del genoma humano demostró la presencia de alrededor de 900 GPCR, de los cuales aproximadamente 460 son receptores olfatorios (Fredriksson et al., 2003 Jalink, 2010). Las funciones de una gran proporción de estos 900 GPCR se desconocen y por tanto se denominan receptores huérfanos. Sin embargo, cada vez menos GPCR no olfatorios son huérfanos y son un grupo de gran importancia para la industria farmacéutica.

La familia de la secretina es pequeña dentro de la familia de los GPCR, todos tienen un dominio de unión a la hormona extracelular y unen hormonas peptídicas. Los 15 miembros de esta familia son los receptores para la calcitonina y ligados a la calcitonina, para la CRH, para el glucagón, para el polipéptido inhibitorio gástrico, para la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, para el polipéptido activador de la adenilato ciclasa, para la hormona paratiroidea, para la secretina y para el péptido intestinal vasoactivo (Lagerstrom and Schioth, 2008).

Para obtener mayor información sobre los mecanismos de regulación de los receptores de la CRH, estuvimos interesados en observar los efectos de la co-expresión de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α en la unión del ligando y en la transducción de señales. Después de clonar los receptores, éstos fueron co-transfectados transitoriamente en las

células HEK-293. Estudios de unión de ligando fueron realizados para determinar la afinidad de los receptores; en tanto que los ensayos de producción de cAMP fueron realizados para determinar algún cambio en la transducción de señales. Los estudios de producción de cAMP demuestran, que la co-expresión de CRH-R1 y CRH-R2 α disminuye significativamente la producción de este segundo mensajero posterior a la estimulación con CRH en células HEK-293. Posteriormente, los análisis de saturación de unión del ligando y de Scatchard demostraron que para ambos receptores de la CRH la unión del agonista no se ve afectada por la presencia de ambos receptores ya que los valores de las K_D y las de B_{max} son similares en todos los casos. Además, después del tratamiento con CRH, los receptores fueron internalizados al cabo de 15 y 30 min de incubación y con velocidades de internalización similares.

En el modelo de activación de los GPCR los agonistas cambian la forma del receptor de un estado inactivo (denominado R) a un estado conformacionalmente activo (denominado R*), capaz de activar a las proteínas G. Esta activación se ve terminada cuando el ligando se despega de su receptor y entonces este último se internaliza y/o degrada (Villardaga et al., 2009). Los resultados obtenidos en las células HEK-293, transfectadas con los receptores de la CRH, en las cuales se observó un incremento de la acumulación de cAMP son similares a los efectos descritos para la CRH en el hipocampo en donde la activación de receptores específicos induce el acoplamiento a la G_s y a la adenilato ciclasa con el consecuente incremento en los niveles celulares de cAMP cuando se lleva a cabo una estimulación con la CRH (Chen et al., 1986), (Battaglia et al., 1987), (Pihoker et al., 1992), (Haug and Storm, 2000). Ha sido propuesto que el acoplamiento de los receptores de la CRH a proteínas G específicas depende del ambiente celular; además, la sobreexpresión de los receptores puede inducir el acoplamiento a diferentes proteínas G. Sin embargo, en la línea celular que se utilizó no se observó incremento en la producción de fosfatos de inositol, lo cual podría indicar la activación de la fosfolipasa C debida al acoplamiento a una proteína G_q .

La co-expresión de CRH-R1 y CRH-R2 α inhibe parcialmente la producción de cAMP regulando negativamente la señalización de los receptores de la CRH, mientras que la co-expresión de CRH-R1 o CRH-R2 α con pcDNA3.1 no tiene efecto en la transducción de la señal. Cuando los receptores fueron co-transfectados a una concentración total de 0.2 μ g/pozo la inhibición en la producción de cAMP fue más evidente. Estos resultados sugieren que la presencia de ambos receptores co-transfectados en una relación 1:1, inhibe la producción de cAMP. Una posible explicación para este resultado sería la interacción directa de ambos receptores; de este modo al formar un dímero CRH-R1-CRH-R2 α se formaría un complejo con propiedades distintas a los receptores originales. Otra posibilidad serían interacciones proteína-proteína que pudieran ser activadas cuando los receptores son co-expresados y que por tanto sean responsables de la disminución en la producción de cAMP. Una disminución en la producción de cAMP como consecuencia de la expresión de dos tipos de receptores de la CRH fue demostrada posterior a la publicación de nuestros resultados. En ese estudio se realizó la co-transfección del CRHR1d (una isoforma truncada del receptor tipo 1) con el CRHR2 β y se demostró que la distribución intracelular de la isoforma truncada es rescatada cuanto se expresa con el receptor tipo 2; además, se observó una atenuación significativa en la producción de cAMP y en las cascadas de señalización de ERK1/2 y p38MAPK (Markovic et al., 2008). Aún cuando en el artículo de Markovic tampoco se demuestra experimentalmente la formación de heterodímeros es una de las posibles explicaciones para los resultados encontrados. La activación de los receptores de la CRH, particularmente el CRHR1, provoca la fosforilación y activación de las cinasas ERK1/2 en estructuras limbicas relacionadas directamente con el aprendizaje y la memoria, con el procesamiento de la información ambiental y aspectos de comportamiento ante algún tipo de estrés. Sin embargo, esta activación no se observa en otras estructuras como el hipotálamo o la amígdala, que también regulan procesos de adaptación al estrés (Refojo and Holsboer, 2009). En el corticotropo la activación de ERK1/2 está directamente implicada en la secreción de la ACTH, regulando así la expresión del gen del POMC (Figura

5). Una disminución del cAMP puede alterar la transducción de señales de los CRHRs y provocar una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y afectar las respuestas a estrés en las regiones del SNC en donde se co-expresan ambos subtipos de receptores. Se conoce que posterior a la activación de un GPCR se forman nubes discretas de cAMP y que la célula tiene un sistema complejo de compartimentalización que permite que existan gradientes de este segundo mensajero y que son muy importantes para evitar la activación de proteínas inespecíficas (Houslay, 2010). Se ha reportado que en pacientes con depresión la formación de cAMP y la actividad de la adenilato ciclasa se encuentran disminuidas, en tanto que en pacientes con trastorno bipolar ambas proteínas se encuentran aumentadas (Dwivedi and Pandey, 2008). Un hallazgo como el nuestro en donde la co-expresión de ambos receptores produce una disminución tan importante de la producción del cAMP pudiera tener implicaciones clínicas muy importantes considerando que los receptores de la CRH son los principales responsables de las respuestas de un organismo ante el estrés.

Cuando en las células se expresaron CRH-R1 y/o CRH-R2 α la afinidad del ligando por el receptor no cambió, sugiriendo que la presencia de ambos receptores no interfiere con la unión o expresión. Al hacer la gráfica de hormona unida/libre vs. hormona unida para las transfecciones CRH-R1, CRH-R2 α y CRH-R1-CRH-R2 α , se obtiene una gráfica de Scatchard curva lo que indica dos sitios de unión del ligando. Estos resultados obtenidos en la línea celular HEK-293 concuerdan con lo reportado para los receptores de la CRH en la misma línea celular transfectadas tanto establemente como transitoriamente (Ruhmann et al., 1996), (Rominger et al., 1998), en células Y-93 (Olianas et al., 1995) y en hipófisis y cerebro de rata (Chen et al., 1986). Estudios previos realizados con un análogo no hidrolizable del GTP, el GTP γ S, demostró que los sitios de alta y baja afinidad pueden indicar diferentes grados de unión en el acoplamiento del receptor a las proteínas G (Olianas et al., 1995). También es interesante hacer notar que la K_{D1}, en células que expresan ambos receptores, para el sitio de alta afinidad es similar a la K_{D1} observada para el CRH-

R1, mientras que la K_{D2} del complejo para el sitio de baja afinidad es parecida a la de baja afinidad del CRH-R2 α . Lo anterior sugeriría que cuando ambos receptores están presentes la unión al sitio de alta afinidad sería de manera predominante en el receptor tipo 1, mientras que el sitio de unión de baja afinidad sería el resultado de la unión al receptor tipo 2. Estos resultados no dependerían de la formación de un dímero entre los receptores ya que formando agregado o permaneciendo separados la unión en sitios de alta o baja afinidad no resultaría alterada.

La estimulación con CRH indujo la internalización de los receptores de la CRH; sin embargo, se observan algunas diferencias entre ellos. El CRHR1 se internaliza en menor proporción que el CRHR2 α con valores de 9% y 17% respectivamente; además, las velocidades a las cuales se obtiene el máximo de internalización varía entre ambos receptores. Mientras que el CRHR1 alcanza su máximo al cabo de 15 min de estimulación con CRH, el CRHR2 α alcanza su internalización hasta los 30 min de estímulo; sin embargo, las velocidades de internalización son similares entre los receptores. La presencia de ambos receptores en el sistema tiene propiedades de internalización muy similares al del CRHR2 α . Diferencias en internalización entre los dos subtipos de receptores de la CRH han sido demostradas, utilizando la estrategia de microscopía confocal, en dicho estudio se encontró que el CRHR1 se internaliza posterior al estímulo con CRH, mientras que el CRHR2 no se internaliza en un período de estimulación de hasta 40 min (Milan-Lobo et al., 2009). Estos resultados si bien demuestran diferencias en las propiedades de internalización entre los receptores tipo 1 y tipo 2 difieren de los resultados que nosotros obtuvimos. Las discrepancias encontradas entre ambos estudios tienen diferencias experimentales que pueden explicar los diferentes resultados. Los experimentos de microscopía confocal fueron llevados a cabo en células HEK-293 establemente transfectadas con los receptores de ratón CRH-R1 y CRH-R2 acoplados a la proteína amarilla fluorescente (YFP). Las diferencias en la concentración de receptores en superficie modifican la regulación de los CRHRs en donde se ha demostrado que un receptor puede

incluso acoplarse a diferentes proteínas G. Otra diferencia importante es que los receptores del estudio de fluorescencia son receptores de ratón mientras que los nuestros son de rata. Por otro lado la inclusión de genes reporteros dentro de la secuencia de cualquier proteína se ha convertido en una herramienta muy útil para poder seguir y analizar la función de éstas mediante el uso de anticuerpos o como en este caso particular mediante microscopía de fluorescencia. Aún cuando es una estrategia ampliamente utilizada se ha demostrado que para el GnRHR la inclusión de la hemaglutinina y la proteína verde fluorescente inducen una mejor expresión en la membrana celular comparadas con sus contrapartes sin esas modificaciones, lo que en pudiera conducir a una interpretación errónea de los resultados (Brothers et al., 2003). Sin embargo, lo que sí es claro es que los receptores de la CRH se internalizan de manera diferente entre ellos.

La terminación de la señal iniciada por un GPCR comienza con la fosforilación del extremo carboxilo terminal del receptor seguido por la unión de la arrestina. Se produce entonces una disminución en la señal debido a la internalización del receptor, en este punto se consideraba que el receptor se separaba de la proteína G y de sus proteínas efectoras. Los receptores entonces son transportados a los lisosomas para su degradación o son reciclados nuevamente a la membrana. Por lo tanto, la internalización del receptor controla la densidad de los receptores en la superficie celular y sirve como un mecanismo para atenuar la duración y la fuerza de la transducción de la señal (Jalink and Moolenaar, 2010). Sin embargo, ya se ha demostrado que la internalización de un receptor no necesariamente conduce a la terminación de la señal. Estudios en el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) han demostrado que a pesar de la rápida internalización de estos receptores no se observa disminución en los niveles de cAMP. Los receptores de la TSH se internalizan en asociación con la proteína $G_{s\alpha}$ y la adenilato ciclasa en un compartimento vesicular pre-golgi. Después de ser internalizado, el receptor unido a la TSH continua estimulando la producción de cAMP durante 30 min (Calebiro et al., 2010). El hallazgo de los receptores de la TSH y nuestras observaciones sobre la internalización diferencial de los receptores de la CRH nos abre un nuevo campo de investigación sobre la posibilidad de que

el CRHR1 y el CRHR2 pudieran seguir activando la producción de cAMP aun siendo internalizados. Además, nuestros resultados contribuyen a establecer que la regulación de estos receptores está altamente controlada y es diferencial.

Si bien las propiedades de unión no se ven afectadas por la co-expresión de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α , la disminución en la producción de cAMP pudiera ser debida a dos probables mecanismos: que la desensibilización de los receptores se aumente haciendo que la transducción de señales se vea interrumpida más rápidamente, lo que provocaría que la producción de cAMP se vea disminuida. Otra posibilidad sería que la existencia de ambos receptores modificara la afinidad por la proteína G; la sobreexpresión de los receptores de la CRH en la línea celular puede favorecer el acoplamiento a diferentes proteínas G. Si la co-expresión de estos receptores reduce la afinidad por la proteína G_s, estos pueden fácilmente acoplarse a otras proteínas G tales como la proteína G_i (inhibidora) la cual inhibe la producción de cAMP. Será necesario realizar experimentos posteriores para poder determinar si alguno de estos mecanismos es responsable de la inhibición parcial de la producción de cAMP en nuestros resultados.

Nuestros experimentos muestran que la expresión de ambos receptores disminuye de manera sustancial la producción de cAMP cuando se estimula con el agonista CRH, pero no se afectan las propiedades de unión y de internalización de estos receptores. Resultados previamente obtenidos que demuestran que el CRHR1 puede formar homodímeros nos permite especular que la formación de un heterodímero CRH-R1-CRH-R2 α es factible y que los resultados que nosotros obtuvimos pudieran ser debidos a la formación de agregados; sin embargo, será necesario ampliar estos estudios con el fin de poder confirmar esta hipótesis. Lo que si se ha demostrado es el efecto dominante negativo que ejerce uno de los receptores truncados del receptor tipo 1 (CRHR1d) sobre del CRHR2 β en células HEK293, demostrando que existe un mecanismo de cross-talk entre ambos subtipos de receptores. Debido a que el ARNm del CRH-R1 y el ARNm del CRH-R2 α se expresan juntos en algunas regiones del cerebro, estos receptores pudieran estar co-expresándose

en el SNC, sugiriendo así que la interacción entre los receptores puede tener un papel importante en los efectos inducidos por la CRH, contribuyendo de esta manera a la complejidad del acoplamiento diferencial de los receptores de la CRH en respuesta a diferentes agentes estresantes o a cambios endocrinos.

CONCLUSIONES

La co-expresión de los receptores CRHR1 y CRH-R2 α no alteró los parámetros de unión del ligando, pero sí modificó la señalización intracelular determinada como la producción de AMPc. Lo que nos demuestra que la proporción de cada uno de estos receptores expresados en una línea celular particular modifica las respuestas específicas a la CRH.

Nuestra hipótesis inicial contemplaba, en un primer postulado, un posible cambio en los parámetros de unión e internalización del ligando de la CRH en ensayos de co-expresión de receptores. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que ambos parámetros no se ven modificados por la co-expresión de cada receptor comparadas con la expresión individual de cada uno de ellos, pero se comprueba que la internalización de los receptores de la CRH no son iguales. Estos resultados contribuyen a concluir que una de las diferencias regulatorias de ambos receptores es la internalización de éstos posteriores al estímulo con su ligando. El segundo postulado de nuestra hipótesis era determinar la existencia de un cambio en la transducción de la señal de estos receptores cuando ambos receptores, CRHR1 y CRHR2 α , se expresan de manera conjunta en las células HEK-293. Los resultados obtenidos demuestran de manera concluyente que existe una disminución muy importante en la acumulación de AMPc en presencia de ambos receptores.

Las señales mediadas a través del AMPc y de la adenilato ciclasa tienen una enorme importancia en algunos trastornos de la conducta como son depresión y trastorno bipolar. Si consideramos que el eje HHA es el principal regulador de las respuestas de estrés en el organismo y que alteraciones de la CRH han sido asociadas con trastornos de la conducta, una modificación tan importante en la producción de AMPc pudiera tener importancia fisiológica en aquellas regiones del SNC en donde ambos receptores se están co-expresando.

PERSPECTIVAS

Una de las hipótesis de la relación entre el estrés y el desarrollo de una psicopatología es que individuos vulnerables pueden sobreexpresar agonistas de la CRH y/o de sus receptores. Específicamente alteraciones en el sistema de la CRH del cerebro están asociadas con depresión y ansiedad: un aumento en los niveles de esta hormona han sido reportados en algunos pacientes deprimidos; en contraste una disminución de la misma se ha observado en suicidas. En pacientes con Alzheimer los niveles de CRH se encuentran disminuidos en tanto que los niveles de sus receptores se encuentran elevados en la corteza cerebral. El conocimiento de los factores que modulan la actividad de los receptores de la CRH puede tener un impacto significativo en el conocimiento más profundo sobre el funcionamiento de los sistemas de la CRH. Así, un mejor conocimiento de la regulación de los receptores de la CRH contribuirá al conocimiento de la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas.

REFERENCIAS

- Aguilera G (Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 9:329-336.1998).
- Aguilera G, Nikodemova M, Wynn PC, Catt KJ (Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 25:319-329.2004).
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C, Nikodemova M (Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides* 22:769-774.2001).
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M (Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3684-3689.2000).
- Bale TL, Vale WW (CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:525-557.2004).
- Battaglia G, Webster EL, De Souza EB (Characterization of corticotropin-releasing factor receptor-mediated adenylate cyclase activity in the rat central nervous system. *Synapse* 1:572-581.1987).
- Behan DP, Grigoriadis DE, Lovenberg T, Chalmers D, Heinrichs S, Liaw C, De Souza EB (Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol Psychiatry* 1:265-277.1996).
- Bourne HR (How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9:134-142.1997).
- Boutillier AL, Barthel F, Roberts JL, Loeffler JP (Beta-adrenergic stimulation of cFOS via protein kinase A is mediated by cAMP regulatory element binding protein (CREB)-dependent and tissue-specific CREB-independent mechanisms in corticotrope cells. *J Biol Chem* 267:23520-23526.1992).
- Bouvier M (Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2:274-286.2001).
- Brar BK, Chen A, Perrin MH, Vale W (Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2beta by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology* 145:1718-1729.2004a).
- Brar BK, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, Mjos OD, Latchman DS, Lee KF, Vale W (Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology* 145:24-35; discussion 21-23.2004b).

- Brothers SP, Janovick JA, Conn PM (Unexpected effects of epitope and chimeric tags on gonadotropin-releasing hormone receptors: implications for understanding the molecular etiology of hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 88:6107-6112.2003).
- Bulenger S, Marullo S, Bouvier M (Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26:131-137.2005).
- Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ (Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31:221-228.2010).
- Cantarella G, Lempereur L, Lombardo G, Chiarenza A, Pafumi C, Zappala G, Bernardini R (Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. *Br J Pharmacol* 134:837-844.2001).
- Chen FM, Bilezikjian LM, Perrin MH, Rivier J, Vale W (Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Res* 381:49-57.1986).
- Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW (Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8967-8971.1993).
- Cordeaux Y, Hill SJ (Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors. *Neurosignals* 11:45-57.2002).
- Cvejic S, Devi LA (Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272:26959-26964.1997).
- Dautzenberg FM, Dietrich K, Palchaudhuri MR, Spiess J (Identification of two corticotropin-releasing factor receptors from *Xenopus laevis* with high ligand selectivity: unusual pharmacology of the type 1 receptor. *J Neurochem* 69:1640-1649.1997).
- Denver RJ (Evolution of the corticotropin-releasing hormone signaling system and its role in stress-induced phenotypic plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 897:46-53.1999).
- Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN (Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:12280-12287.2002).
- Dieterich KD, Grigoriadis DE, De Souza EB (Homologous desensitization of human corticotropin-releasing factor1 receptor in stable transfected mouse fibroblast cells. *Brain Res* 710:287-292.1996).
- Dieterich KD, Lehnert H, De Souza EB (Corticotropin-releasing factor receptors: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105:65-82.1997).

- Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Lean A, Nemer M, Schmidt TJ (Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12:145-156.1993).
- Dwivedi Y, Pandey GN (Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4:161-176.2008).
- Eckart K, Jahn O, Radulovic J, Tezval H, van Werven L, Spiess J (A single amino acid serves as an affinity switch between the receptor and the binding protein of corticotropin-releasing factor: implications for the design of agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11142-11147.2001).
- Elliott-Hunt CR, Kazlauskaitė J, Wilde GJ, Grammatopoulos DK, Hillhouse EW (Potential signalling pathways underlying corticotrophin-releasing hormone-mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *J Neurochem* 80:416-425.2002).
- Facci L, Stevens DA, Pangallo M, Franceschini D, Skaper SD, Strijbos PJ (Corticotropin-releasing factor (CRF) and related peptides confer neuroprotection via type 1 CRF receptors. *Neuropharmacology* 45:623-636.2003).
- Fazal N, Slominski A, Choudhry MA, Wei ET, Sayeed MM (Effect of CRF and related peptides on calcium signaling in human and rodent melanoma cells. *FEBS Lett* 435:187-190.1998).
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272.2003).
- Gold PW, Chrousos GP (Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7:254-275.2002).
- Grammatopoulos DK, Chrousos GP (Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13:436-444.2002).
- Grammatopoulos DK, Hillhouse EW (Basal and interleukin-1 β -stimulated prostaglandin production from cultured human myometrial cells: differential regulation by corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2204-2211.1999).
- Grammatopoulos DK, Randevara HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW (Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1 α and R2 β CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol Endocrinol* 14:2076-2091.2000).

- Gutknecht E, Van der Linden I, Van Kolen K, Verhoeven KF, Vauquelin G, Dautzenberg FM (Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol Pharmacol* 75:648-657.2009).
- Haug T, Storm JF (Protein kinase A mediates the modulation of the slow Ca(2+)-dependent K(+) current, I(sAHP), by the neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83:2071-2079.2000).
- Hauger RL, Smith RD, Braun S, Dautzenberg FM, Catt KJ (Rapid agonist-induced phosphorylation of the human CRF receptor, type 1: a potential mechanism for homologous desensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 268:572-576.2000).
- Heinrichs SC, De Souza EB (Corticotropin-releasing factor antagonists, binding-protein and receptors: implications for central nervous system disorders. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13:541-554.1999).
- Heldin CH (Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223.1995).
- Hillhouse EW, Grammatopoulos DK (The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:260-286.2006).
- Houslay MD (Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci* 35:91-100.2010).
- Hsu SY, Hsueh AJ (Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 7:605-611.2001).
- Huckle WR, Conn PM (Use of lithium ion in measurement of stimulated pituitary inositol phospholipid turnover. *Methods Enzymol* 141:149-155.1987).
- Jalink K, Moolenaar WH (G protein-coupled receptors: the inside story. *Bioessays* 32:13-16.2010).
- Jenks BG (Regulation of proopiomelanocortin gene expression: an overview of the signaling cascades, transcription factors, and responsive elements involved. *Ann N Y Acad Sci* 1163:17-30.2009).
- Jin WD, Boutillier AL, Glucksman MJ, Salton SR, Loeffler JP, Roberts JL (Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein. *Mol Endocrinol* 8:1377-1388.1994).
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396:674-679.1998).

Jones KL (The Cushing syndromes. *Pediatr Clin North Am* 37:1313-1332.1990).

Jordan BA, Devi LA (G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399:697-700.1999).

Kageyama K, Bradbury MJ, Zhao L, Blount AL, Vale WW (Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Endocrinology* 140:5651-5658.1999).

Kageyama K, Furukawa K, Miki I, Terui K, Motomura S, Suda T (Vasodilative effects of urocortin II via protein kinase A and a mitogen-activated protein kinase in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:561-565.2003).

Karalis KP, Venihaki M, Zhao J, van Vlerken LE, Chandras C (NF-kappaB participates in the corticotropin-releasing, hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *J Biol Chem* 279:10837-10840.2004).

Karteris E, Grammatopoulos D, Randevara H, Hillhouse EW (Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the fetoplacental unit. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1989-1996.2000).

Karteris E, Hillhouse EW, Grammatopoulos D (Urocortin II is expressed in human pregnant myometrial cells and regulates myosin light chain phosphorylation: potential role of the type-2 corticotropin-releasing hormone receptor in the control of myometrial contractility. *Endocrinology* 145:890-900.2004).

Karteris E, Markovic D, Chen J, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK (Identification of a novel corticotropin-releasing hormone type 1beta-like receptor variant lacking Exon 13 in human pregnant myometrium regulated by estradiol-17beta and progesterone. *Endocrinology* 151:4959-4968.2010).

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B (GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396:683-687.1998).

Kiang JG, Ding XZ, Gist ID, Jones RR, Tsokos GC (Corticotropin-releasing factor induces phosphorylation of phospholipase C-gamma at tyrosine residues via its receptor 2beta in human epidermoid A-431 cells. *Eur J Pharmacol* 363:203-210.1998).

Kobilka BK (G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768:794-807.2007).

Kostic TS, Andric SA, Stojilkovic SS (Spontaneous and receptor-controlled soluble guanylyl cyclase activity in anterior pituitary cells. *Mol Endocrinol* 15:1010-1022.2001).

Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL (Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 12:1077-1085.1998).

- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16:1638-1651.2002).
- Kraetke O, Wiesner B, Eichhorst J, Furkert J, Bienert M, Beyermann M (Dimerization of corticotropin-releasing factor receptor type 1 is not coupled to ligand binding. *J Recept Signal Transduct Res* 25:251-276.2005).
- Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC (Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283:74-77.1999).
- Kuryshv YA, Childs GV, Ritchie AK (Corticotropin-releasing hormone stimulation of Ca²⁺ entry in corticotropes is partially dependent on protein kinase A. *Endocrinology* 136:3925-3935.1995).
- Lagerstrom MC, Schioth HB (Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7:339-357.2008).
- Lesh JS, Burrows HL, Seasholtz AF, Camper SA (Mapping of the mouse corticotropin-releasing hormone receptor 2 gene (*Crhr2*) to chromosome 6. *Mamm Genome* 8:944-945.1997).
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7570-7575.2001).
- Lin X, Janovick JA, Brothers S, Blomenrohr M, Bogerd J, Conn PM (Addition of catfish gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor intracellular carboxyl-terminal tail to rat GnRH receptor alters receptor expression and regulation. *Mol Endocrinol* 12:161-171.1998).
- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T (Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:836-840.1995).
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP (Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2:1018-1024.2001).
- Malagoli D, Franchini A, Ottaviani E (Synergistic role of cAMP and IP(3) in corticotropin-releasing hormone-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes. *Peptides* 21:175-182.2000).

- Markovic D, Lehnert H, Levine MA, Grammatopoulos DK (Structural determinants critical for localization and signaling within the seventh transmembrane domain of the type 1 corticotropin releasing hormone receptor: lessons from the receptor variant R1d. *Mol Endocrinol* 22:2505-2519.2008).
- Marshall FH (Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS. *Curr Opin Pharmacol* 1:40-44.2001).
- Martens C, Bilodeau S, Maira M, Gauthier Y, Drouin J (Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 19:885-897.2005).
- 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. *Genomics* 40:189-190.1997).
- Mikhailova MV, Mayeux PR, Jurkevich A, Kuenzel WJ, Madison F, Periasamy A, Chen Y, Cornett LE (Heterooligomerization between vasotocin and corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors augments CRH-stimulated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate production. *Mol Endocrinol* 21:2178-2188.2007).
- Milan-Lobo L, Gsandtner I, Gaubitzer E, Runzler D, Buchmayer F, Kohler G, Bonci A, Freissmuth M, Sitte HH (Subtype-specific differences in corticotropin-releasing factor receptor complexes detected by fluorescence spectroscopy. *Mol Pharmacol* 76:1196-1210.2009).
- Murakami I, Takeuchi S, Kudo T, Sutou S, Takahashi S (Corticotropin-releasing hormone or dexamethasone regulates rat proopiomelanocortin transcription through Tpit/Pitx-responsive element in its promoter. *J Endocrinol* 193:279-290.2007).
- 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* 144:21-35.1998).
- Mynard V, Latchoumanin O, Guignat L, Devin-Leclerc J, Bertagna X, Barre B, Fagart J, Coqueret O, Catelli MG (Synergistic signaling by corticotropin-releasing hormone and leukemia inhibitory factor bridged by phosphorylated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein at the Nur response element (NurRE)-signal transducers and activators of transcription (STAT) element of the proopiomelanocortin promoter. *Mol Endocrinol* 18:2997-3010.2004).
- Nemoto T, Mano-Otagiri A, Shibasaki T (Urocortin 2 induces tyrosine hydroxylase phosphorylation in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330:821-831.2005).
- Olianas MC, Lampis G, Onali P (Human Y-79 retinoblastoma cells exhibit specific corticotropin-releasing hormone binding sites. *J Neurochem* 64:402-407.1995).

- Pace AJ, Gama L, Breitwieser GE (Dimerization of the calcium-sensing receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys --> Ser mutations at Cys101 and Cys236. *J Biol Chem* 274:11629-11634.1999).
- Pal K, Swaminathan K, Xu HE, Pioszak AA (Structural basis for hormone recognition by the Human CRFR2{alpha} G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 285:40351-40361.2010).
- 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* 258:78-84.1998).
- Pavlov EP, Harman SM, Chrousos GP, Loriaux DL, Blackman MR (Responses of plasma adrenocorticotropin, cortisol, and dehydroepiandrosterone to ovine corticotropin-releasing hormone in healthy aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 62:767-772.1986).
- 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* 22:404-412.2002).
- Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW (Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 133:3058-3061.1993).
- Perrin MH, Grace CR, Riek R, Vale WW (The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1070:105-119.2006).
- Pihoker C, Cain ST, Nemeroff CB (Postnatal development of regional binding of corticotropin-releasing factor and adenylate cyclase activity in the rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16:581-586.1992).
- Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale W (Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8777-8781.1994).
- Poulin G, Turgeon B, Drouin J (NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682.1997).
- Refojo D, Holsboer F (CRH signaling. Molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Ann N Y Acad Sci* 1179:106-119.2009).
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE (Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2843-2848.2001).

- Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W (In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology* 110:272-278.1982).
- Rominger DH, Rominger CM, Fitzgerald LW, Grzanna R, Largent BL, Zaczek R (Characterization of [¹²⁵I]sauvagine binding to CRH2 receptors: membrane homogenate and autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 286:459-468.1998).
- Ross PC, Kostas CM, Ramabhadran TV (A variant of the human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: cloning, expression and pharmacology. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1836-1842.1994).
- Ruhmann A, Kopke AK, Dautzenberg FM, Spiess J (Synthesis and characterization of a photoactivatable analog of corticotropin-releasing factor for specific receptor labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10609-10613.1996).
- Salahpour A, Angers S, Bouvier M (Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11:163-168.2000).
- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (Mitogen-activated protein kinase signaling in the hippocampus and its modulation by corticotropin-releasing factor receptor 2: a possible link between stress and fear memory. *J Neurosci* 23:11436-11443.2003).
- Sarnyai Z, Shaham Y, Heinrichs SC (The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacol Rev* 53:209-243.2001).
- Skelton KH, Owens MJ, Nemeroff CB (The neurobiology of urocortin. *Regul Pept* 93:85-92.2000).
- Smith AI, Funder JW (Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 9:159-179.1988).
- Starowicz K, Przewlocka B (The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci* 73:823-847.2003).
- Takuma K, Matsuda T, Yoshikawa T, Kitanaka J, Gotoh M, Hayata K, Baba A (Corticotropin-releasing factor stimulates Ca²⁺ influx in cultured rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1103-1107.1994).
- Ulisse S, Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML (A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem* 265:1964-1971.1990).
- Ullrich A, Schlessinger J (Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212.1990).
- 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* 213:1394-1397.1981).

- Vamvakopoulos NC, Sioutopoulou TO (Human corticotropin-releasing hormone receptor gene (CRHR) is located on the long arm of chromosome 17 (17q12-qter). *Chromosome Res* 2:471-473.1994).
- Van Kolen K, Dautzenberg FM, Verstraeten K, Royaux I, De Hoogt R, Gutknecht E, Peeters PJ (Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology* 58:135-144.2010).
- Villardaga JP, Bunemann M, Feinstein TN, Lambert N, Nikolaev VO, Engelhardt S, Lohse MJ, Hoffmann C (GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells. *Mol Endocrinol* 23:590-599.2009).
- 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 corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett* 335:1-5.1993).
- Wahle M, Krause A, Pierer M, Hantzschel H, Baerwald CG (Immunopathogenesis of rheumatic diseases in the context of neuroendocrine interactions. *Ann N Y Acad Sci* 966:355-364.2002).
- Wess J (Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 80:231-264.1998).
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396:679-682.1998).
- Yang LZ, Tovote P, Rayner M, Kockskamper J, Pieske B, Spiess J (Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart. *Eur J Pharmacol* 632:1-6.2010).
- Young SF, Griffante C, Aguilera G (Dimerization between vasopressin V1b and corticotropin releasing hormone type 1 receptors. *Cell Mol Neurobiol* 27:439-461.2007).
- Zhao J, Karalis KP (Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropin-releasing hormone in mouse thymocytes. *Mol Endocrinol* 16:2561-2570.2002).

ANEXO I

ENSAYOS DE UNIÓN A RECEPTORES

En los ensayos de unión se mide la interacción de un ligando con su receptor biológico el cual media las acciones de la hormona. Para ensayos de unión *in vitro* la hormona es marcada radiactivamente (generalmente con [¹²⁵I] o con tritio [³H]) y es incubada con células completas aisladas o con membranas celulares que tienen el receptor, en presencia o ausencia de hormona no marcada hasta llegar a un equilibrio de unión. La hormona unida al receptor es separada de la hormona libre o no unida mediante centrifugación, precipitación o algún otro método. El porcentaje de hormona unida al receptor es determinada mediante el conteo del marcador radiactivo en contadores gamma o de centelleo, dependiendo del radioisótopo utilizado. La hormona marcada radiactivamente que permanece unida en presencia de un gran exceso de hormona no marcada es considerada no específica. En algunos casos es necesario utilizar análogos de la hormona para estudios de unión, particularmente si la hormona nativa es difícil de marcar radiactivamente, si tiene baja afinidad por el receptor o si se degrada fácilmente.

La interacción de la hormona con el receptor requiere de una especificidad biológica por lo que es crítico que la hormona sea marcada de manera que no se altere su integridad o bioactividad. Además, debido a que los receptores son parte de la membrana celular el receptor adquiere una forma particular diferente de la que tendría de estar en una solución acuosa, por lo que alternativamente los receptores pueden ser solubilizados en amortiguadores con detergentes, de esta manera las propiedades de interacción del complejo hormona-receptor pueden ser estudiadas en solución.

Las hormonas se unen a sus receptores con una alta afinidad y especificidad. La afinidad de una hormona por su receptor puede ser calculada de la cinética de asociación y disociación o de los datos de unión en el equilibrio. El método más común de análisis es la gráfica de Scatchard (Figura). En este método, la proporción de hormona unida vs hormona libre en el equilibrio es graficada contra la hormona total unida. Si la hormona es un monómero y si además tiene solo un sitio de unión la gráfica de Scatchard resulta en una

línea recta (Figura). La pendiente de la recta representa el valor negativo de la constante de unión en el equilibrio (K_D) y la ordenada al origen en el eje de las X corresponde a la concentración total de receptores (B_{max}). Muchos receptores presentan dos sitios de unión de diferentes afinidades y capacidades, es decir un sitio de alta afinidad y baja capacidad y otro sitio de baja afinidad y alta capacidad, lo que da como resultado en una gráfica de Scatchard curva (Figura).

Boeynaems JM, Dumont JE (The two-step model of ligand-receptor interaction. *Mol Cell Endocrinol* 7:33-47.1977).

Rovati GE, Rodbard D, Munson PJ (DESIGN: computerized optimization of experimental design for estimating K_d and B_{max} in ligand binding experiments. I. Homologous and heterologous binding to one or two classes of sites. *Anal Biochem* 174:636-649.1988).

Scatchard G (Physical chemistry of protein solutions; derivation of the equations for the osmotic pressure. *J Am Chem Soc* 68:2315-2319.1946).

CASE

CRH-Stimulation of Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Pathway Is Partially Inhibited by the Coexpression of CRH-R1 and CRH-R2 α

G. Maya-Núñez, C. Castro-Fernández, and J. P. Méndez

Research Unit in Developmental Biology, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico

Corticotropin-releasing hormone (CRH) is one of the major proteins responsible for brain stress regulation. Two well-known receptors have been described: type 1 and type 2 α , both members of the receptor superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR). We investigated receptor regulation when both CRH receptor subtypes are coexpressed in the same mammalian cell line. When both types of receptors are coexpressed, cAMP second messenger production is partially inhibited compared to when receptors are expressed separately. However, neither binding kinetics nor internalization rates are modified by coexpression of these receptors. To our knowledge this is the first demonstration of receptor interaction that results in the modification of CRH-mediated signal transduction pathway. Because CRH-R1 and CRH-R2 α have overlapping mRNA expression patterns in the brain, these receptors may be coexpressed in neurons, suggesting that receptor interaction may play an important role in the effect evoked by CRH, contributing to the complexity of differential coupling of the CRH receptors in different endocrine and stress behavior responses.

Key Words: CRH receptors; cAMP pathway; receptor dimerization.

Introduction

Corticotropin-releasing hormone (CRH) is a 41-amino acid peptide that stimulates the synthesis of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and other products of proopiomelanocortin (POMC) in the anterior pituitary (1). Human and rat CRH are identical to one another and differ only by seven amino acids from ovine CRH. Two non-mammalian peptides similar to CRH, sauvagine (40 amino acids) and urotensin I (41 amino acids), share 50% homology with

human/rat CRH (2). CRH and urocortin I (UCN) bind with high affinity to CRH receptor type 1 (CRH-R1). Because CRH receptor type 2 (CRH-R2) binds urocortin with a 100-fold affinity in relation to CRH-R1, it was proposed that UCN was the endogenous ligand for the type 2 receptor; however, the limited overlap between the UCN neurons and the CRH-R2-expressing neurons suggested the existence of additional endogenous CRH-like peptides (2). Two new members of the CRH family that bind exclusively to CRH-R2 have been described, stresscopin/urocortin III and stresscopin-related peptide/urocortin II (3,4). The CRH receptor is a member of the class II of the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR). The effects that CRH evoke are mediated through at least two receptors: CRH-R1 (5–7), and CRH-R2 (8–10). CRH-R1 shares 70% homology with CRH-R2. CRH-R1 is highly distributed in the central nervous system, being the predominant receptor found in the corticotrophs in the anterior pituitary (11,12). Distribution analysis of CRH-R2 showed that CRH-R2 α is mainly localized in the brain while CRH-R2 β is found in heart and skeletal muscles, brain, lung, and intestine (9). Binding of CRH receptors to its specific agonists changes the CRH-R conformation, increasing the affinity of the receptor for the G_s protein, leading to the synthesis of cyclic AMP (13). In addition, it has been demonstrated that CRH also activates the phospholipase C (PLC)-PKC signal transduction pathway in rat Leydig cells (14), astrocytes culture (15), and cerebellum (16). Recently, it has been shown that in HEK-293 cell line stably transfected with the CRH receptors, both CRH-R1 and CRH-R2 α are able to stimulate inositol phosphate (IP) production that accounts for the activation of Ca²⁺ transients by the direct activation of PLC in these cells (17).

Several studies have demonstrated that some GPCR can form dimers. Heterodimer formation has been shown for β 2-adrenergic (18), δ -opioid (19), and dopamine D₁, D₂, and D₃ receptors (20–22), among others. Results obtained with those receptors indicate that dimerization affects the activation mechanism, as well as agonist-dependent desensitization and internalization (18). Heterodimerization between receptors has also been described (23–26).

Received April 18, 2005; Revised May 18, 2005; Accepted June 2, 2005.
Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed:
J. P. Méndez, Av. Cuauhtémoc 330, Apartado Postal AP-047, Colonia Roma
C.P. 06703, México, D.F., México. E-mail: jpmb@servidor.unam.mx

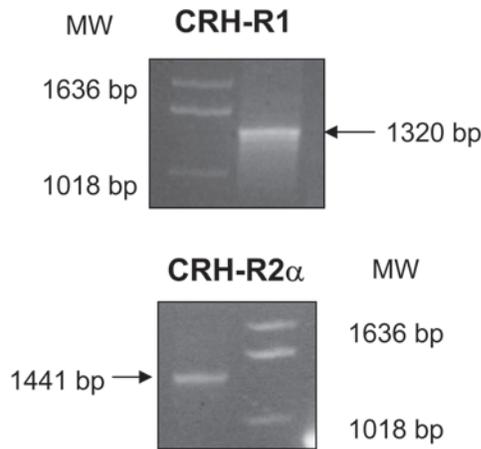


Fig. 1. RT-PCR of the cotransfected receptors in HEK-293 cells. In cells expressing both receptors, the RT-PCR experiment resulted in the amplification of two bands of 1320 bp and 1441 bp corresponding to CRH-R1 and CRH-R2 α , respectively.

Because CRH-R1 and CRH-R2 α have overlapping mRNA expression patterns in the brain, suggesting that both receptors may be coexpressed in neurons, the aim of this study was to determine whether coexpression of CRH receptors modifies agonist binding, signal transduction, or internalization of CRH receptors. We found that coexpression of both receptor subtypes causes a significant reduction in the cAMP production compared with results obtained with cells expressing the receptors individually.

Results

CRH receptors were expressed either separately or collectively in HEK-293 cells. To confirm the presence of both receptors in the cells, CRH-R1 and CRH-R2 α encoding mRNA was verified by RT-PCR. From total RNA obtained from these cells a band of 1320 bp was amplified using specific primers corresponding to CRH-R1 and a band of 1441 bp was amplified using specific primers for the CRH-R2 α , respectively, in cells expressing both receptors (Fig. 1). No additional bands were observed. The presence of mature receptors was identified by immunoprecipitation and Western blot (Fig. 2). The results of immunoprecipitation and Western blot analyses revealed the presence of a 65 kDa band for each receptor when expressed separately (Fig. 2A), or coexpressed (Fig. 2B). We were unable to demonstrate the dimerization of the receptors by immunoprecipitation, but we cannot rule out the formation of CRH receptor dimers. In several studies where dimerization is assessed by coimmunoprecipitation, stringent solubilization might prevent the detection of constitutive dimers by promoting their partial or total dissociation.

Dose-response of CRH-stimulated cAMP production is shown in Fig. 3. Two hours of stimulation with CRH resulted in dose-dependent cAMP production from HEK-293 cells expressing CRH-R1, CRH-R2 α , or CRH-R1 + CRH-R2 α .

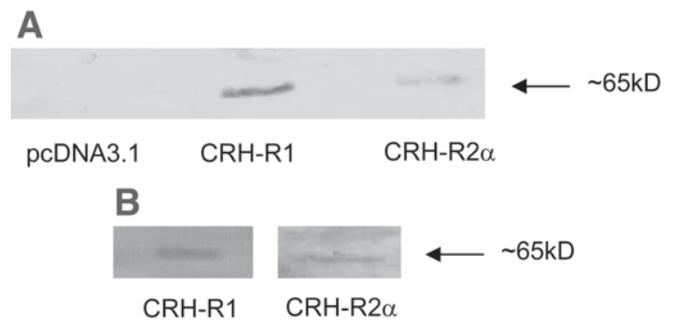


Fig. 2. Immunoprecipitation and Western blot analyses of CRH receptors. (A) HEK-293 cells transfected with CRH-R1 or CRH-R2 α , and (B) HEK-293 cells transfected with both CRH-R1 and CRH-R2 α . The receptors were immunoprecipitated from whole cells and identified by Western blot as described in Material and Methods.

Preliminary results in our laboratory (data not shown) determined that for cAMP production, the best amount of DNA transfected in HEK-293 cells was 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ of each receptor. A representative dose-response experiment of CRH-stimulated cAMP production is shown in Fig. 3. Experiments where concentration of one receptor was increased with respect to the other receptor to a final concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ are shown in Fig. 3A. A decrease in the cAMP production is observed when both receptors are present in the cells. Because the better response in terms of cAMP production was obtained when the concentration of each receptor was 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$, we decided to investigate the effect of 0.1 μg DNA of each receptor in the same transfection. When concentration of DNA is increased to a total of 0.2 μg , CRH-stimulated cAMP response with 10^{-7} M CRH showed a 70% decrease when compared with the response obtained by the CRH receptors separately (Fig. 3B). In order to determine direct interaction between receptors, the DNA complementation experiments were performed with the receptors and pcDNA3.1, and no decrease was observed in the cAMP response obtained in any transfection experiment (data not shown).

For the expression of CRH receptors, a two-binding-site model was the best fit for the binding results (Fig. 4). Scatchard analysis of the binding data showed that the dissociation constant (K_D) and B_{max} for the high affinity sites for CRH-R1, CRH-R2 α or CRH-R1 + CRH-R2 α were 1.6 nM (B_{max} 451,725 sites/cell); 0.5 nM (B_{max} 266,217 sites/cell); and 1.54 nM (B_{max} 458,350 sites/cell), respectively. The K_D and B_{max} for the low affinity sites are 4.6 nM (B_{max} 1,017,887 sites/cell), 8.5 nM (B_{max} 1,746,670 sites/cell), and 8.2 nM (B_{max} 1,638,256 sites/cell) for CRH-R1, CRH-R2 α , or CRH-R1 + CRH-R2 α , respectively.

Internalization rate data are shown in Fig. 5. Cells expressing CRH-R1 internalized a smaller percentage at steady state than the cells transfected with CRH-R2 α and CRH-R1 + CRH-R2 α . For all transfections the receptors are internalized at 30 min. The internalization rate before the cells

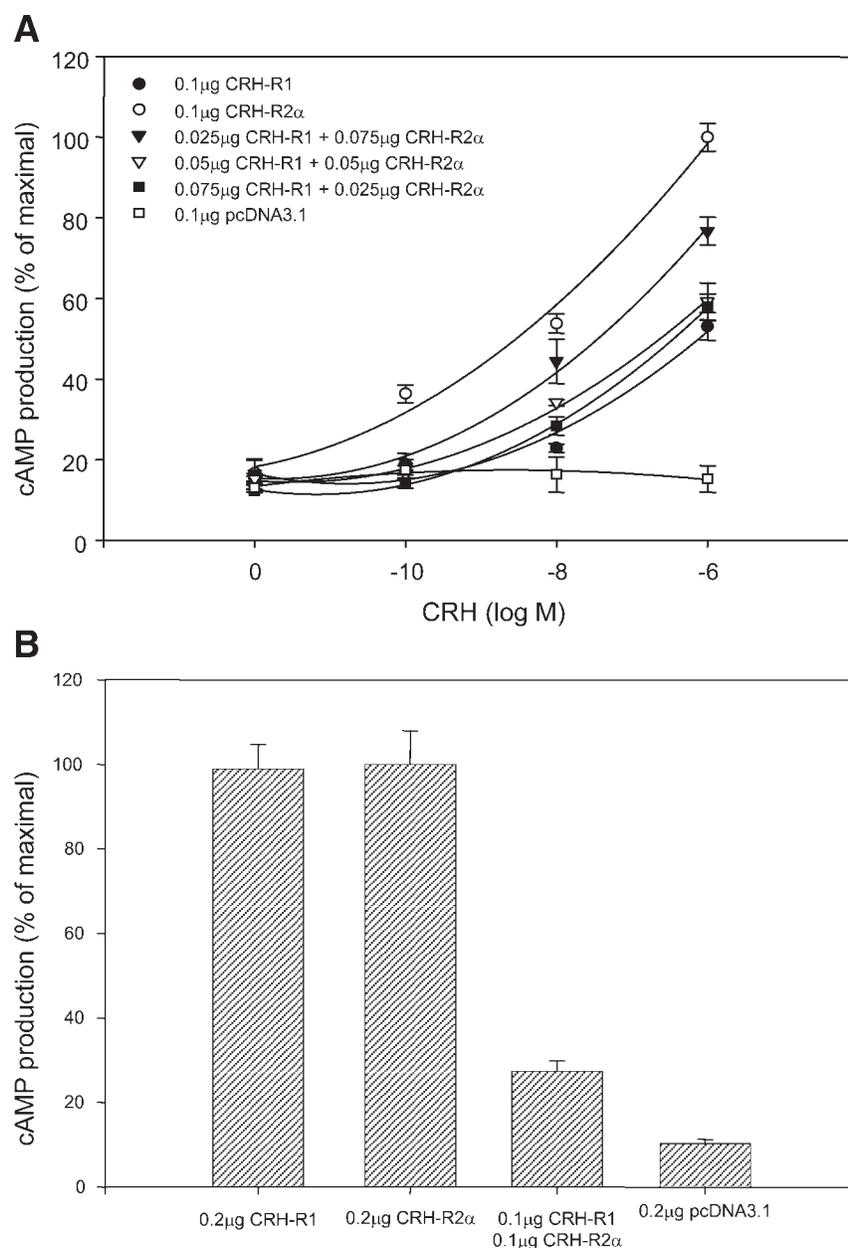


Fig. 3. cAMP production in cells cotransfected with the CRH receptors. **(A)** HEK-293 cells were transfected with the CRH receptors separately or cotransfected together at a final concentration of 0.1 μg of DNA, and the cAMP production was determined after the stimulation with different concentrations of CRH. **(B)** cAMP production was quantified after stimulation with 10^{-7} M CRH in cells transfected with CRH receptors at 0.2 μg final concentration of DNA. Each experiment was repeated at least three times with similar results.

reach a steady state are 0.56%, 0.48%, and 0.46% receptor internalized/min for CRH-R1, CRH-R2α, or CRH-R1 + CRH-R2α, respectively, indicating that the internalization rates are very similar between CRH receptors.

Discussion

This study shows for the first time that the coexpression of CRH-R1 and CRH-R2α significantly decreases the CRH-stimulated cAMP production in HEK-293 cells. Saturation bindings and Scatchard analysis showed that in all cases the agonist binding to its receptor fits in a two-binding-site

model, with similar K_D and B_{max} . After treatment with a CRH agonist, the receptors were internalized in a time-dependent manner and with similar internalization rates. The results obtained suggest that CRH-R1 and CRH-R2α may physically interact, modifying the functional characteristics of both receptors.

Our present results in the HEK-293 cells in which we observe an increased in the cAMP accumulation are similar to the well-known effects of CRH in the hippocampus, where the activation of specific receptors coupled to the G_s protein and to adenylate cyclase with a consequent increase in the cellular levels of cAMP (27–30). It has been proposed

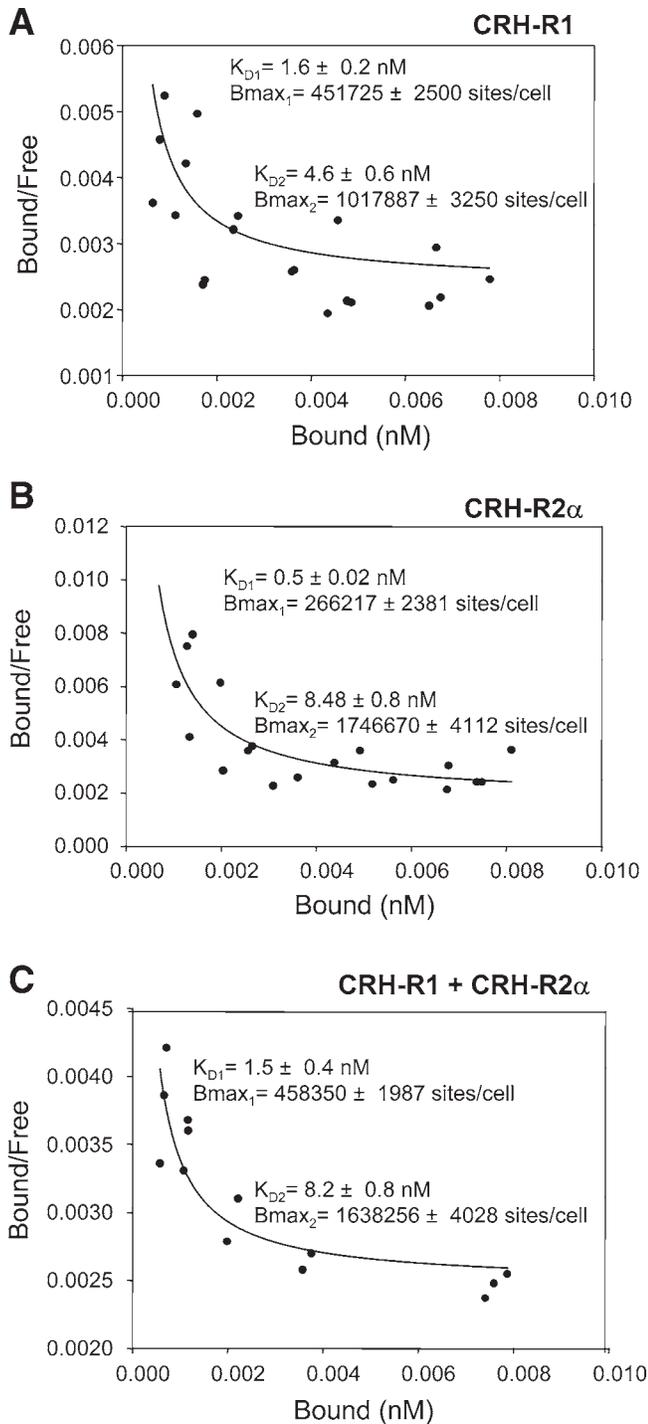


Fig. 4. Receptor binding of [125 I]CRH. Saturation binding of the HEK-293 cells expressing CRH-R1 (A), CRH-R2 α (B), and CRH-R1 + CRH-R2 α (C). Scatchard analysis demonstrated a two-binding-site model for CRH-Rs. The results are representative of three independent experiments.

that the coupling of CRH-R to a specific G protein depends on the cellular background, and the overexpression of the receptor can also induce the coupling to a different G protein; however, in the cell line we used we did not observe an increase in IP production (data not shown).

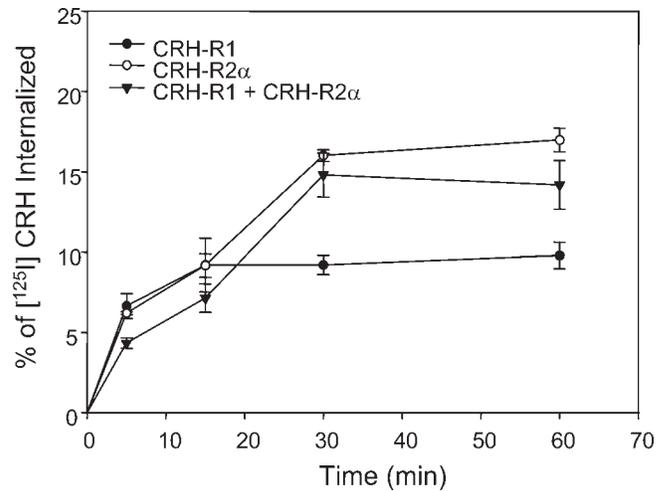


Fig. 5. Agonist induced CRH receptor internalization. HEK-293 cells were transiently transfected with CRH receptors and incubated with [125 I]CRH for the indicated times at 37°C. Cell-surface-bound and cytosolic-labeled ligand were determined as described in Materials and Methods. Each experiment was repeated at least three times with similar results.

The coexpression of several GPCR in a single cell may potentially lead to the formation of complex combinations of homo- or heterodimers. It is possible that dimer formation is influenced by receptor expression levels and/or relative affinities of particular receptor combinations (31). Evidence for the existence of GPCR dimerization has been widely reported, indicating that this is a general mechanism of regulation for this receptor family (31). The formation of dimers has been demonstrated for the somatostatin, opioid, angiotensin, GnRH, and β -adrenergic receptors, among others (32–37). The heterodimerization between A $_1$ adenosine receptor and D $_1$ dopamine receptor uncoupled D $_1$ from activating adenylyl cyclase when both receptors are simultaneously activated (38). Likewise, the coexpression of D $_2$ and D $_3$ dopamine receptors in a mammalian cell line displayed enhanced inhibition on adenylyl cyclase when stimulated with both receptor ligands (39,40). Coexpression of CRH-R1 and CRH-R2 α partially inhibited cAMP response regulating negatively CRH-R signaling, while coexpression of either CRH-R1 or CRH-R2 α with pcDNA 3.1 had no effect in signal transduction. When the receptors were cotransfected at 0.2 μ g/well, the inhibition in the cAMP production was more evident. At this concentration we found the highest response of both receptors regarding the cAMP production when transfected independently or coexpressed. These results suggest an interaction between both types of receptors that accounts for the inhibition of the cAMP production; however, we cannot rule out that it may involve other interacting proteins that could be activated once the receptors are coexpressed and that is responsible for the decrease in the CRH signal transduction pathway. Because UCNII and UCNIII bind exclusively to CRH-R2 α in further studies, it would be important to evaluate their

pharmacological effects in a CRH-R1/CRH-R2 α coexpression system.

When cells coexpressed either CRH-R1 or CRH-R2 α separately or together, receptor-ligand affinity does not change, suggesting that receptor interaction does not interfere with binding or expression of these receptors. Also, the Scatchard analysis indicated that in all expression combinations the [¹²⁵I]CRH was bound according to a two-site model of high- and low-affinity sites. Two affinity binding states for CRH-R1 and CRH-R2 α has been reported previously in Y-93 cells (41), in stably and transiently transfected HEK-293 cells (42–45), and in rat pituitary and brain (27). Previous studies performed with a non-hydrolyzable analog of GTP, GTP γ S, showed that the high- and low-affinity components may indicate different degrees of receptor coupling to G proteins (41). This result has been reported for TRHR1 and TRHR2, where the heterodimer displayed an altered internalization when compared to the individual receptors, although ligand binding was similar to when receptors expressed alone (42). Similar results were obtained for the D2R homodimer, in which no change was observed in the binding properties for either agonists or antagonists (43). It is also interesting that the K_D for the high-affinity site is similar to the K_D observed for the CRH-R1 alone, and that the K_D for the low-affinity site is similar to the K_D for the CRH-R2 α alone.

After treatment with CRH, receptors were internalized in a time-dependent manner, but cells expressing CRH-R1 internalized a smaller percentage receptor at steady state; however, in all receptors the internalization rate is very similar. However, a discrepancy of our results with others studies is that CRH seems to activate the CRH-R2 α receptor more. This may be explained because we used an heterologous system that does not naturally express either of the receptors.

The present results suggest that the coexpression of CRH-R1 and CRH-R2 α substantially diminish CRH-stimulated cAMP production, but does not affect binding and internalization properties of these receptors. To our knowledge this is the first demonstration of receptor interaction that results in the modification of CRH-mediated signal transduction pathway. Because CRH-R1 and CRH-R2 α have overlapping mRNA expression patterns in the brain, these receptors may be coexpressed in neurons, suggesting that receptor interaction may play an important role in the effect evoked by CRH, contributing to the complexity of differential coupling of the CRH receptors in different endocrine and stress behavior responses.

Material and Methods

Material

CRH and Tyr-CRH were purchased from Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St. Louis, MO). pcDNA3.1, cell culture media Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and

OPTI-MEM, lipofectamine, and PCR reagents and reagents for RNA extraction, TriZol and SuperScript Preamplification System were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Restriction enzymes, modified enzymes, competent cells, and the pGEM-T easy vector for subcloning were purchased from Promega (Madison, WI). Endofree Maxiprep kit was purchased from Qiagen (Valencia, CA). CRH-R1 (sc-1757) and CRH-R2 α (sc-1826) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The HEK-293 cell line was a kind gift from Dr. Ana María Pasapera-Limón, Research Unit in Reproductive Medicine, IMSS (Mexico, D.F.). cAMP antibody and protein A were kind gifts from Dr. P. Michael Conn, Oregon National Primate Research Center, OHSU (Beaverton, OR). All other reagents used were of the highest degree purity available from commercial sources.

CRH Receptor cDNA Cloning

Tissue was obtained from 28 d male Sprague–Dawley rats in accordance with the ethical committee of the Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI, IMSS. Total RNA was extracted from rat brain using TriZol reagent. Three micrograms of total RNA from rat brain was used to synthesize the cDNA using the SuperScript Preamplification System. Two primers were used in the PCR reaction: R1-1 [5'GACCGCAGCCGCCCGCCCTCCG3'] and R1-4 [5'GACTGGCTCGTCAGTGAGCTTG3'], corresponding to the amino terminal region (from 1 to 21 bases) and the carboxyl-terminus (from 1375 to 1397 bases), respectively, from the CRH-R1 cDNA. Amplification of the cDNA was performed using Touchdown-PCR as previously described (44).

The cDNA of the CRH-R2 α receptor was obtained from the same tissue. RT-PCR and Touchdown PCR conditions were similar to those used in the CRH-R1 cloning. The primers used were R2A2 [5'CGCGCACTCCCCTCCCAA CGCGCG3'] corresponding to the region region 176/200 and R2A4 [5'GCACCCAAGGGTCAGTGTAGCAAG3'] corresponding to the region 1529/1551 of the CRH-R2 α cDNA.

The PCR products were first subcloned into the pGEM-T easy vector. The wild-type cDNA for the CRH-R1 and CRH-R2 α were further subcloned into pcDNA3.1 in the *Hind*III and *Xho*I restriction sites. The identity and the orientation of the cDNA cloning were confirmed by sequencing in an automated sequencer PE Applied Biosystem 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA).

The identity of all constructs and the correctness of the PCR-derived sequences were verified by Dye Terminator Cycle Sequencing according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer, Foster City, CA). For transfection, large-scale plasmid DNAs were prepared using a Qiagen Endofree Maxi-prep kit (Qiagen). The purity and identity of the amplified plasmid DNAs were further verified by restriction enzyme analysis.

Transient Transfections in HEK-293 Cells

Wild-type CRH receptors and altered receptors were transiently expressed in HEK-293 cells. This is an adherent human epithelial kidney cell line that does not express either of the CRH receptors. Cells were maintained in growth medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and 20 µg/mL gentamicin in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Five thousand cells per well were seeded in six-well plates (Costar, Cambridge, MA). Twenty-four hours after plating, the cells were transfected with 2 µg DNA per well using 5 µL lipofectamine in 1 mL OPTI-MEM and 5 h later, 1 mL of DMEM containing 20% FCS calf serum was added to each well. Twenty-four hours after the start of transfection, the medium was replaced with fresh DMEM and the cells were allowed to grow for another 24 h before treatment.

Immunoprecipitation and Western Blot of the CRH Receptors

Transfected cells were washed with PBS prior to harvesting and homogenization in 500 µL of RIPA buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂) and protease inhibitor cocktail 1X (Pancreas-extract, pronase, thermolysin, chymotrypsin, trypsin, and papain; Roche, Germany). The homogenate was centrifuged for 10 min at 12,000g and 4°C. Cellular extracts were purified with 100 µL of protein A-Sepharose 6MB (Sigma-Aldrich Fine Chemicals) coupled to IgG from normal rabbit serum or normal goat serum for 30 min at 4°C. Furthermore, the remaining cellular extract was transferred to new tubes with 100 µL protein A-Sepharose pre-coupled to the CRH-R1 or CRH-R2α antibodies (2 mg of each antibody) and were incubated at 4°C overnight. Twelve hours later, the supernatant was discarded and the Sepharose were washed three times with RIPA buffer and the complex antibody-receptor was resuspended in 50 µL of SDS-PAGE buffer heating for 2 min at 95°C.

Samples were electrophoresed under reducing conditions on 10% polyacrilamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Hybond C+, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Bound antibody was detected using the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or mouse anti-goat immunoglobulin kit (BIO-RAD, Hercules, CA).

Quantification of cAMP Release

One hundred thousand HEK-293 cells were plated in a 24-well plate and transiently transfected with wild-type (WT) or altered receptor DNAs. Forty eight hours after transfection cells were washed twice with DMEM/0.1% BSA/20 µg/mL gentamicin and then stimulated with 0, 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, or 10⁻⁶ M CRH in 500 µL of medium plus 0.2 mM methylisobutylxanthine (to inhibit phosphodiesterase activity) and were incubated for 2 h at 37°C. After stimulation,

the medium from each well was collected in tubes containing 50 µL of 10 mM theophylline. The samples were heated at 95°C for 5 min and the amount of cAMP was determined by radioimmunoassay as described previously (45) in a gamma counter (PerkinElmer, Wellesley, MA).

Receptor Binding Assay

Intact cell CRH receptor binding was assessed over a range of 62,000–1,000,000 cpm of [¹²⁵I]CRH, prepared and purified as previously described (46), in Tris-based binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5% horse serum, and 0.5% fetal calf serum) DMEM/0.1% BSA. One hundred thousand cells were plated in a 24-well plate. Seventy-two hours after the start of transfection, cells were washed twice with Tris-based binding buffer. The radioactivity was added to each well and incubated at room temperature for 2 h. The cells were washed twice with Tris-based binding buffer and lysed with 1 N NaOH. The cell lysates were collected and the radioactivity was determined using a Wallac 10-channel gamma counter (Perkin Elmer).

For internalization studies, HEK-293 cells were transiently transfected using the same method as described above, except that 200,000 cells were plated per well in a 12-well plate. Approximately 72 h after transfection, the cells were washed twice with warm Tris-based binding buffer. The cells were incubated with [¹²⁵I]CRH (200,000 cpm) for the indicated times. At the appropriate time, the iodinated ligand was removed, and the plate was placed on ice. The cells were washed twice with ice-cold PBS and 500 µL of acid solution (50 mM acetic acid, 150 mM NaCl, pH 2.8) was added to each well and incubated for 12 min on ice. To determine the surface-bound iodinated ligand, the acid wash was collected and counted in a Wallac 10-channel gamma counter. To determine the internalized radioligand/receptor complex, cells were solubilized in 500 µL 0.1% Triton-X 100/PBS, collected, and counted. Nonspecific binding for all time points and cDNAs were determined using the same procedure but in the presence of 10 µM unlabeled CRH. Nonspecific binding was subtracted from the surface-bound and internalized radioligand and the internalized radioligand was expressed as the percentage internalized of the total bound at each time point.

The data shown represent the means ± SEM from triplicate incubations. In all experiments, the standard deviation was typically less than 10% of the corresponding mean. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test. *p* < 0.05 was considered statistically significant. Each experiment was repeated three or more times.

Acknowledgments

This study was supported by grants G29790M (to J.P.M.) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONA

CyT), and IMSS-2001/075 (G.M-N.), México. The authors thank Shaun P. Brothers for critical reading of the manuscript and advice. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the DSc degree for G.M-N., at Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981). *Science* **213**, 1394–1397.
- Dautzenberg, F. M. and Hauger, R. L. (2002). *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 71–77.
- Hsu, S. Y. and Hsueh, A. J. W. (2001). *Nat. Med.* **7**, 605–611.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., et al. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7570–7575.
- Chang, C. P., Pearse, R. V. 2nd, O'Connell, S., and Rosenfeld, M. G. (1993). *Neuron* **11**, 1187–1195.
- Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8967–8971.
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., et al. (1993). *FEBS Lett.* **335**, 1–5.
- Kishimoto, T., Pearse, R.V. 2nd, Lin, C. R., and Rosenfeld, M. G. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1108–1112.
- Lovenberg, T. W., Liaw, C. L., Grigoriadis, D. E., et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 836–840.
- Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2969–2973.
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., et al. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8777–8781.
- Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W., and De Souza, E. B. (1995). *J. Neurosci.* **15**, 6340–6350.
- Hauger, R. L. and Dautzenberg, F. M. (2000). In: *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Conn, P. M. and Freeman, M. E. (eds.). Human Press: Totowa, NJ.
- Ullisse, S., Fabbri, A., Tinajero, J. C., and Dufau, M. L. (1990). *J. Biol. Chem.* **268**, 9–12.
- Takuma, K., Matsuda, T., Yoshikawa, T., et al. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1103–1107.
- Miyata, M., Okada, D., Hashimoto, K., Kano, M., and Ito, M. (1999). *Neuron* **22**, 763–775.
- Dautzenberg, F. M., Gutknecht, E., Van der Linden, I., Olivares-Reyes, J. A., Dürrenberger, F., and Hauger, R. L. (2004). *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1833–1844.
- Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., et al. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 16384–16392.
- Cvejic, S. and Devi, L. A. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 26959–26964.
- Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., et al. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 200–204.
- Nimchinsky, E. A., Hof, P. R., Janssen, W. G., Morrison, J. H., and Schamauss, C. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 29229–29237.
- George, S. R., Lee, S. P., Varghese, G., et al. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 30244–30248.
- Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., et al. (1998). *Nature* **396**, 674–679.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., et al. (1998). *Nature* **396**, 683–687.
- White, J. H., Wise, A., Main, M. J., et al. (1998). *Nature* **396**, 679–682.
- Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., and Kornau, H. C. (1999). *Science* **283**, 74–77.
- Chen, F. M., Bilezikjian, L. M., Perrin, M. H., Rivier, J., and Vale, W. (1986). *Brain Res.* **381**, 49–57.
- Battaglia, G., Webster, E. L., and De Souza, E. B. (1987). *Synapse* **1**, 572–581.
- Pihoker, C., Cain, S. T., and Nemeroff, C. B. (1992). *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **16**, 581–586.
- Haug, T. and Storm, J. F. (2000). *J. Neurophysiol.* **83**, 2071–2079.
- Kroeger, K. M., Pflieger, K. D. G., and Eidne, K. A. (2004). *Front. Neuroendocrinol.* **24**, 254–278.
- Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V., and Devi, L. A. (2000). *J. Neurosci.* **20**, RC110.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, S. C., Patel, S. C., Patel, R. C., and Patel, Y. C. (2000). *Science* **288**, 154–157.
- AbdAlla, S., Lothar, H., el Massiery, A., and Qwitterer, U. (2001). *Nat. Med.* **7**, 1003–1009.
- Cornea, A., Janovick, J. A., Maya-Núñez, G., and Conn, P. M. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 2153–2158.
- Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., et al. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 14027–14036.
- Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., et al. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 35402–35410.
- Brady, A. E. and Limbird, L. E. (2002). *Cell. Signal* **14**, 297–309.
- Handel, M., Schulz, S., Stanrius, A., et al. (1999). *Neuroscience* **89**, 909–926.
- Millian, M. J., Dekeyne, A., Rivet, J. M., Dubuffet, T., Lavielle, G., and Brocco, M. (2000). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 1063–1073.
- Olianas, M. C., Lampis, G., and Onali, P. (1995). *J. Neurochem.* **64**, 402–407.
- Hanyaloglu, A. C., Seeber, R. M., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J., and Eidne, K. A. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 50422–50430.
- Guo, W., Shi, L., and Javitch, J. A. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 4385–4388.
- Castro-Fernández, C., Maya-Núñez, G., and Méndez, J. P. (2004). *Endocrine* **25**, 49–54.
- Andrews, W. V. and Conn, P. M. (1986). *Endocrinology* **118**, 1148–1158.
- Rosendale, B. E., Jarrett, D. B., and Robinson, A. G. (1987). *Endocrinology* **120**, 2357–2366.

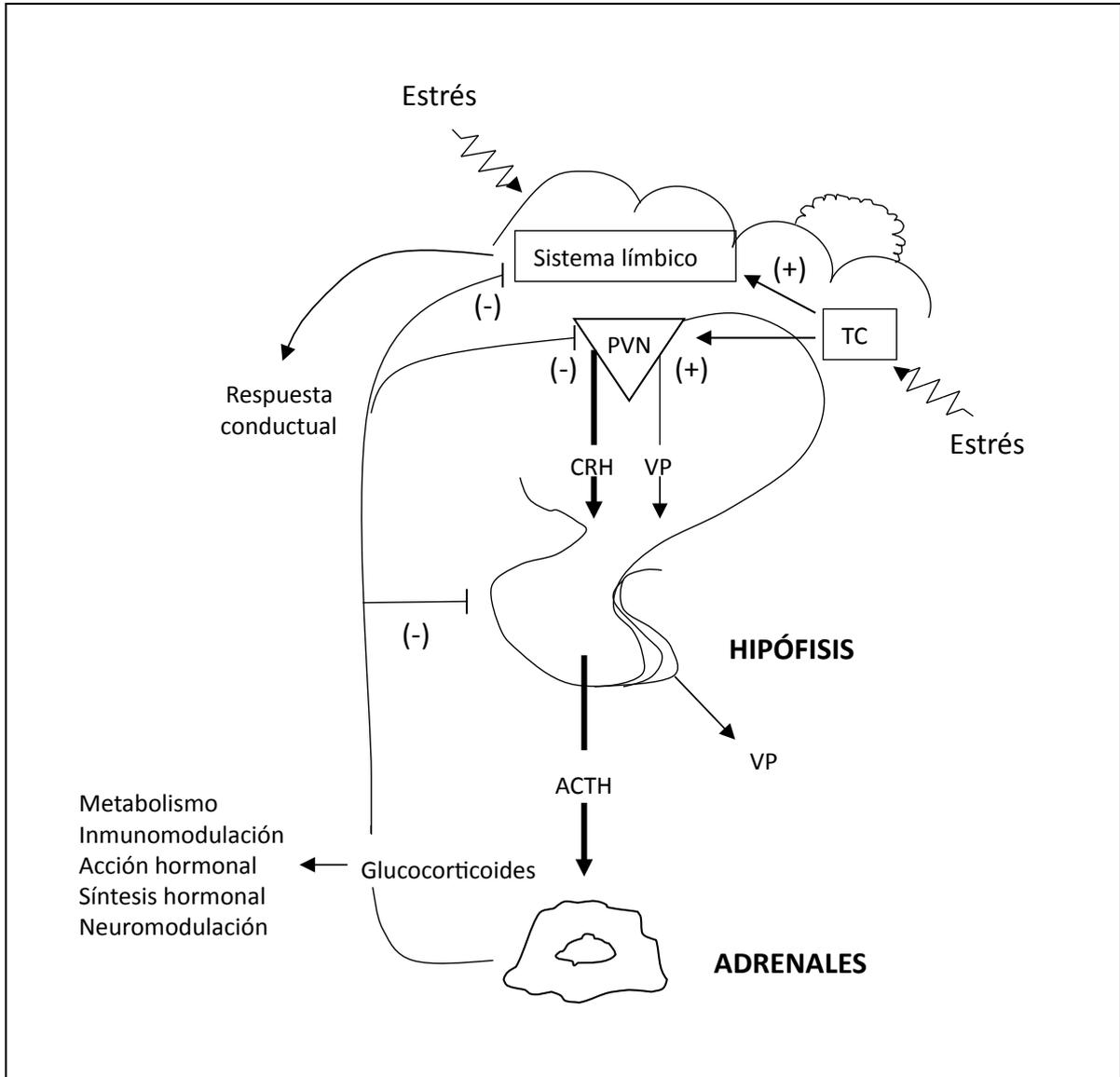
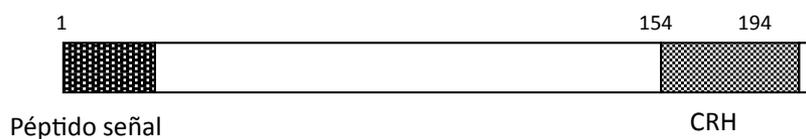


Figura 1. Diagrama ilustrando las respuestas integradas al estrés. Activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HHA) en respuesta al estrés; así como los efectos reguladores y de retroalimentación de los glucocorticoides. CRH, hormona liberadora de corticotropina; ACTH, hormona adenocorticotrópica; TC, tallo cerebral; PVN, núcleo paraventricular; VP, vasopresina. (+) Regulación positiva, (-) regulación negativa.



Péptido de la CRH	Secuencia de aminoácidos
hCRH	S E E P P I S L D L T F H L L R E V L E M A R A E Q L A Q Q A H S N R K L M E I I
oCRH	S Q E P P I S L D L T F H L L R E V L E M T K A D Q L A Q Q A H S N R K L L D I I
rSauvagina	E G P P I S I D L S L E L L R K M I E I K Q E K E K Q Q A A N N R L L L D T I
cUrotensina	N D D P P I S I D L T F H L L R N M I E M A R N E N Q R E Q A G L N R K Y L D E V
hUrocortina 1	D N P S L S I D L T F H L L R T L L E L A R T Q S Q R E R A E Q N R I I F D S V
hUrocortina 2	V I L S L D V P I G L L R I L L E Q A R Y K A A R N Q A A T N A Q I L A H V
hUrocortina 3	F T I S L D V P T N I M N L L F N I A K A K N L R A Q A A A N A H L M A Q I

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la familia de neuropéptidos de la CRH. En la parte superior se muestra la estructura de la pre-pro-hormona, la CRH es escindida en las posiciones 154 y 194 en la región C-terminal del precursor de 196 aminoácidos. En la parte inferior se muestra la secuencia de aminoácidos de algunos de los péptidos de la familia de la CRH. h, humano; o, oveja.

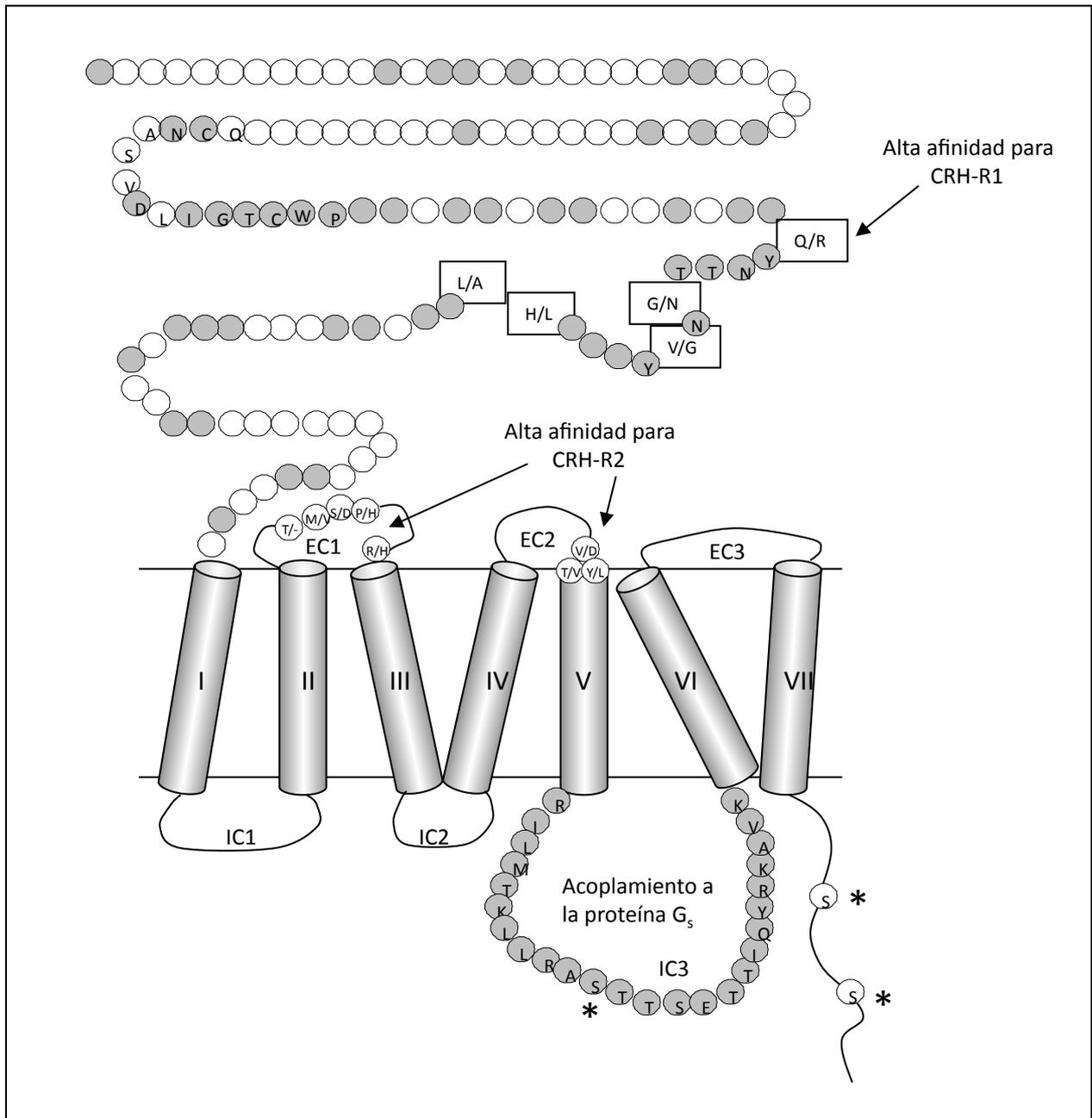


Figura 3. Representación esquemática de los receptores de la CRH. Los aminoácidos conservados se representan en los círculos grises, en tanto que los residuos divergentes se representan como círculos blancos. En los rectángulos de la región amino terminal se presentan a la derecha los residuos del CRH-R1 de humano y a la izquierda los residuos del CRH-R1 de *Xenopus*. Los residuos en las asas extracelulares 1 y 2 importantes para la unión al CRH-R2 están señalados en los círculos blancos con doble letra, las letras de la derecha muestran los aminoácidos del CRH-R2 y las letras de la izquierda los del CRH-R1. En números romanos se indican los dominios transmembranales; EC, asas extracelulares; IC, asas intracelulares. Hauger y Dautzenber, 2000.

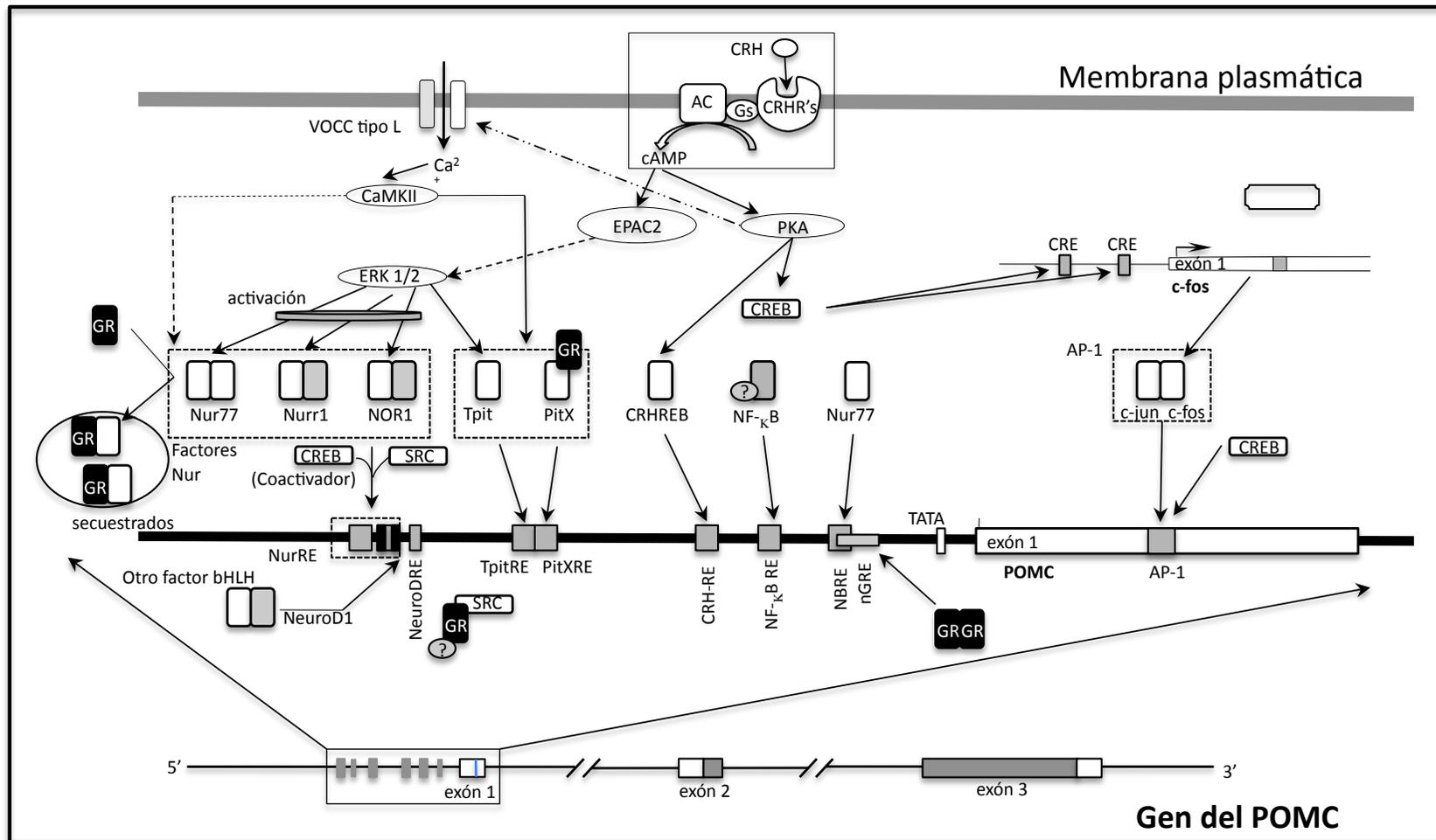


Figura 4. Regulación de la expresión del gen de la proopiomelanocortina (POMC) en células AtT-20. En la figura se observa la estructura del gen de la POMC en donde se muestran los elementos de respuesta y los factores de transcripción que regulan la expresión de este gen. Se señalan además, las posibles señales intracelulares que actúan sobre estos factores de transcripción. PKA, proteína cinasa K; VOCC tipo L, canales de calcio operados por calcio; CaMKII, calcio calmodulina cinasa II; EPAC2, proteína de intercambio activada directamente por cAMP; CRE, elemento de respuesta a cAMP; Nur77, receptor nuclear huérfano; NBRE, elemento de respuesta de la proteína inducida por el factor de crecimiento nervioso; Nurr1, factor nuclear relacionado a Nur-1; NOR-1, receptor huérfano derivado de la neurona 1; NurRE, elemento de respuesta a Nur; ERK, cinasa reguladora de la señal extracelular; SRC, familia de co-activadores de receptores de esteroides; Tpit, factor de transcripción de la familia T-box; Pitx1, gen homeótico de la hipófisis; TpitRE, PitXRE, elemento de respuesta a Tpit/PitX; NeuroD1, factor de diferenciación neurogénica 1; bHLH, factor de transcripción de la familia hélice-lazo-hélice; CRH-RE, elemento de respuesta a CRH; CRH-REB, proteína de unión al CRH-RE; NF-κB, factor nuclear de transcripción kappa B; NF-κBRE, elemento de respuesta a NF-κB; AP-1, proteína activadora 1; CREB, proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP; GR, receptor de glucocorticoides; nGRE, elemento de respuesta a glucocorticoides (Jenks, 2009; Refojo y Holsboer, 2009; Van Kolen et al., 2010).

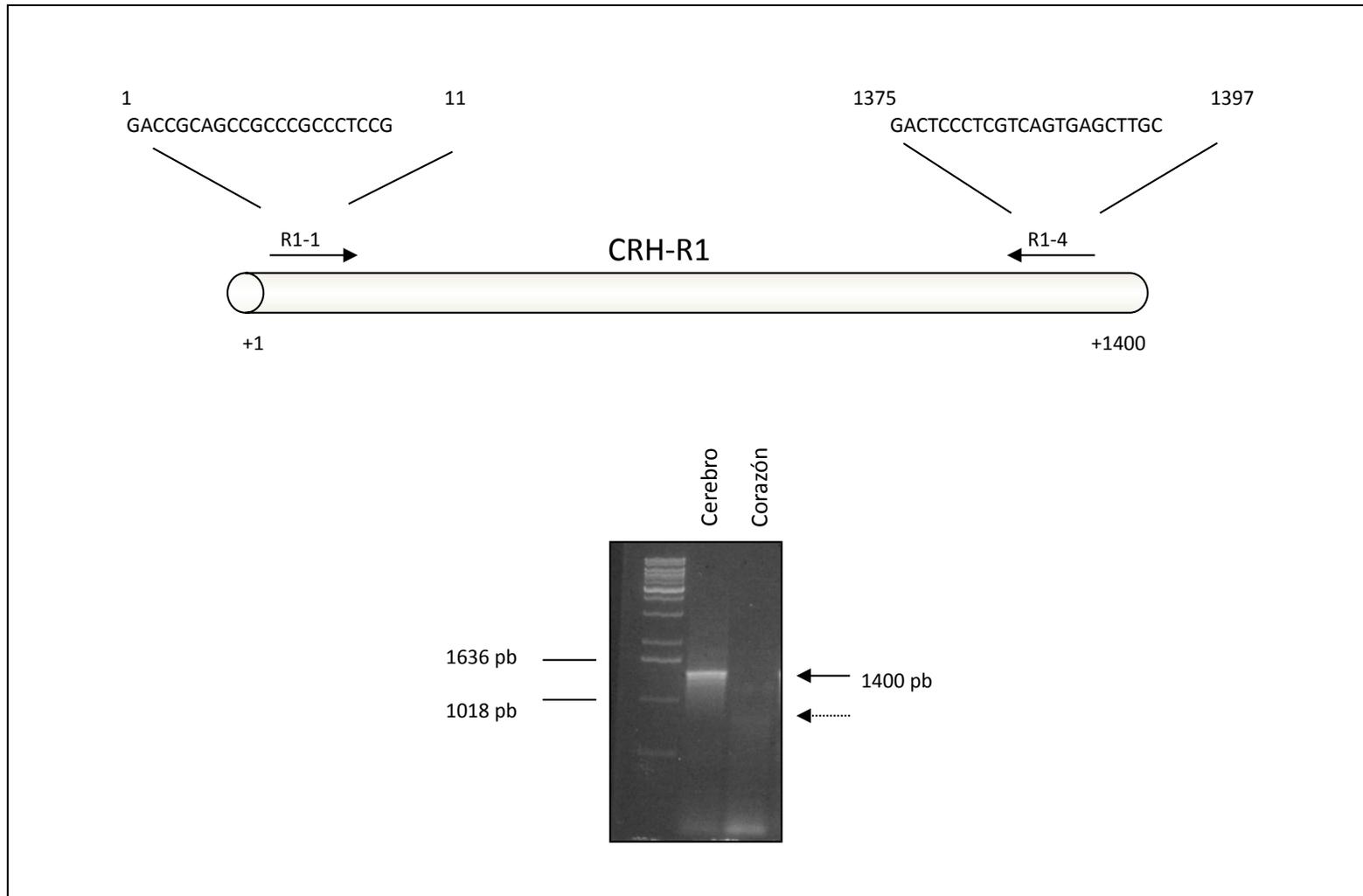


Figura 5. Amplificación del cDNA del CRH-R1. Se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos para el receptor tipo 1, el R1-1 y el R1-4. La amplificación utilizando estos oligonucleótidos generó un producto de PCR de aproximadamente 1400 pb el cual corresponde al peso molecular esperado. Solo se obtuvo amplificación en cerebro.

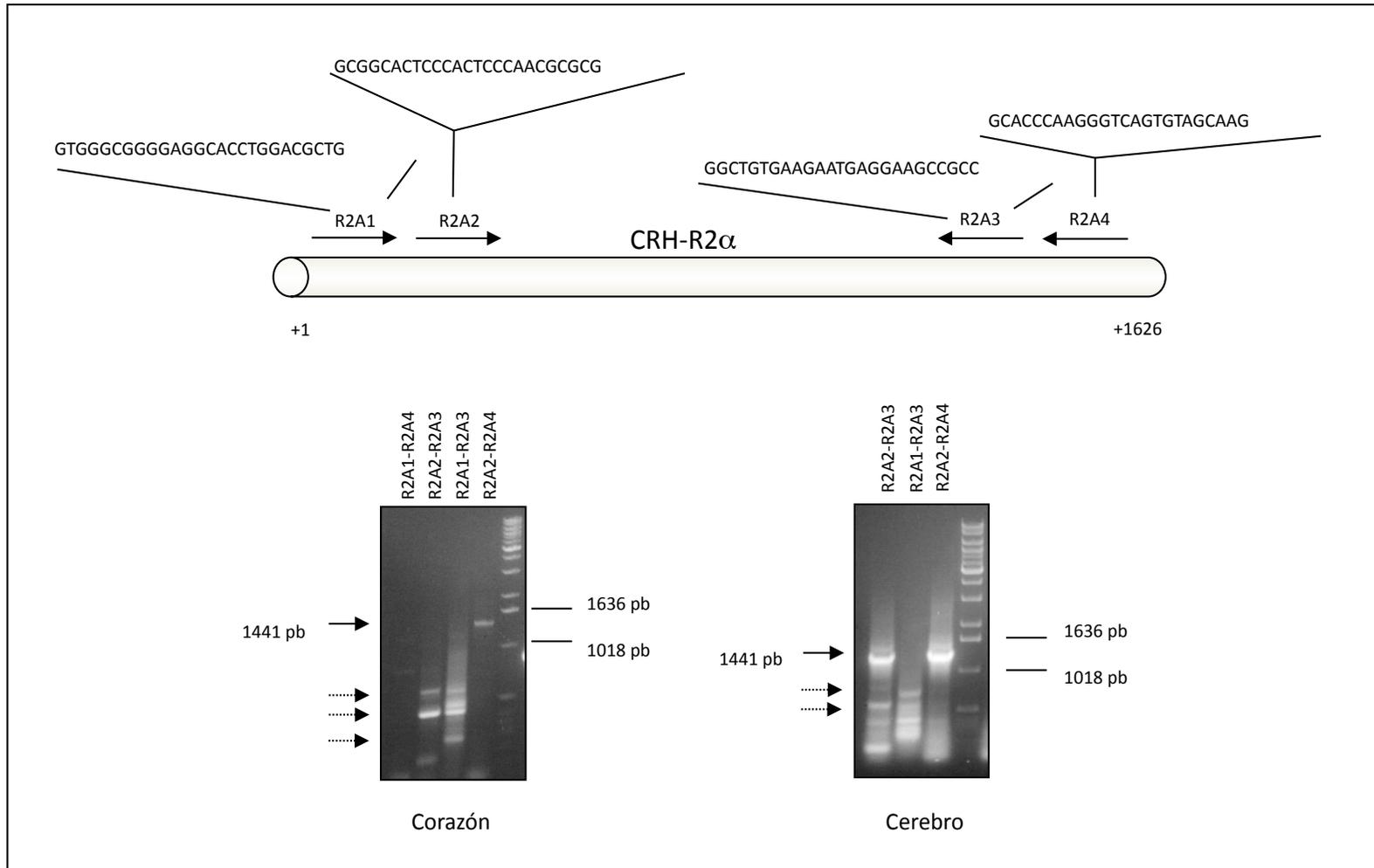


Figura 6. Amplificación del cDNA del CRH-R2 α . Se diseñaron cuatro oligonucleótidos específicos para el receptor tipo 2 α (R2A1, R2A2, R2A3 y R2A4). La combinación de R2A2-R2A4 resultó en la amplificación de un producto de PCR de aproximadamente 144 1pb el cual corresponde al peso molecular esperado tanto en corazón como en cerebro. La combinación R2A2-R2A3 dio banda positiva también en cerebro.

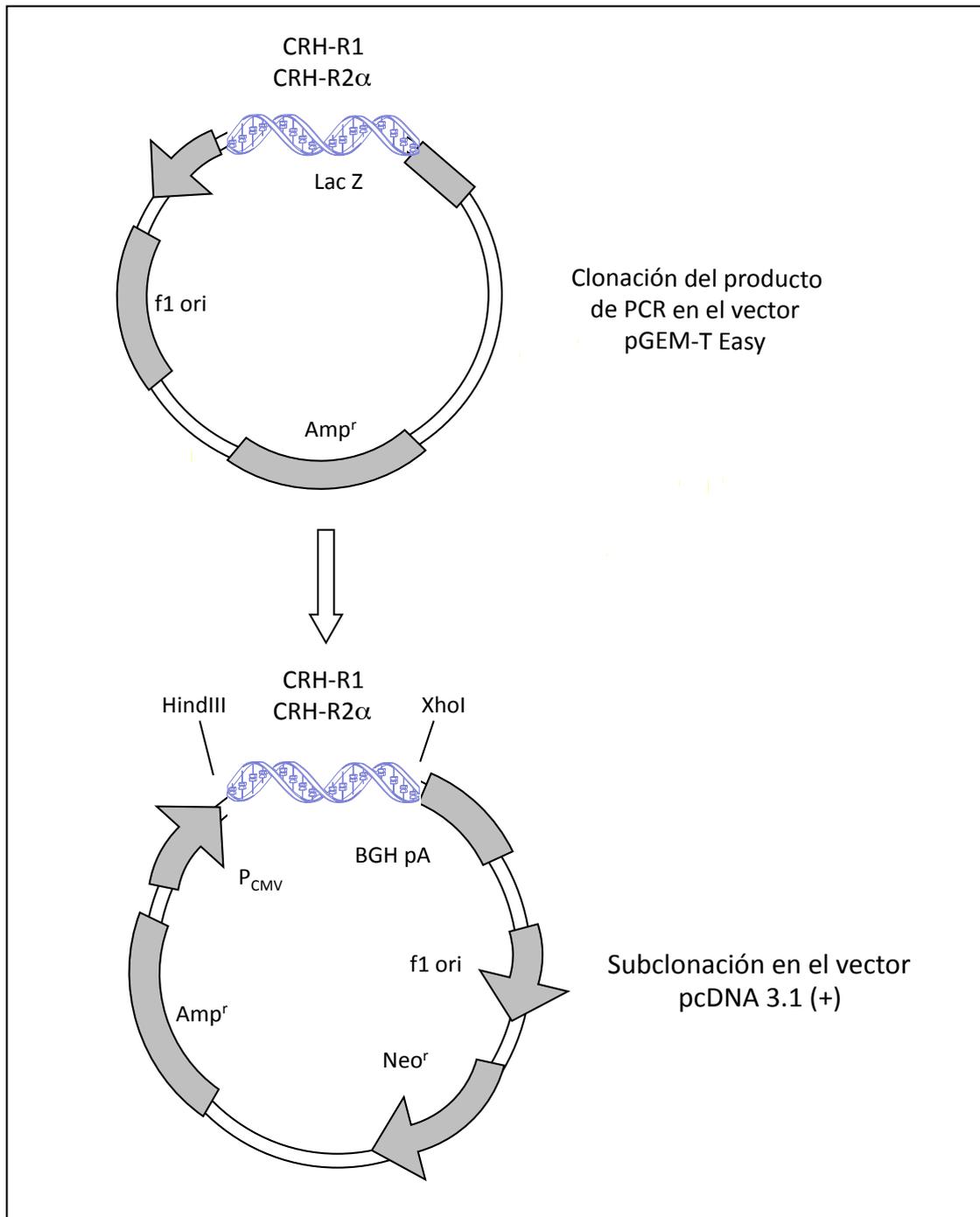


Figura 7. Vectores de clonación. Los cDNAs de los receptores de la CRH fueron clonados inicialmente en el vector pGEM-T easy y posteriormente fueron subclonados en los sitios de restricción HindIII/XhoI en el vector pcDNA3.1(+). Lac Z, región que codifica para el α -peptido de la β -galactosidasa que permite la identificación por color de colonias positivas; f1 ori, permite la replicación de DNA de cadena sencilla; Amp^r, marcador de selección para ampicilina; P_{CMV}, promotor-enhancer de citomegalovirus; BGH pA, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento de bovino y secuencia de terminación de la transcripción; Neo^r, marcador de selección para neomicina.

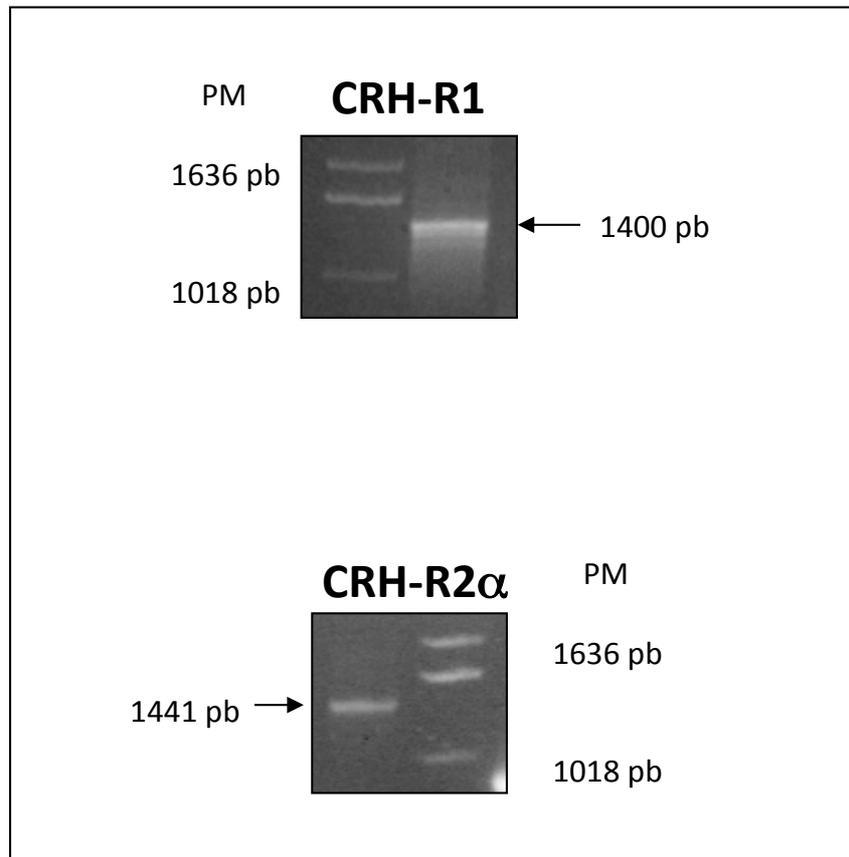


Figura 8. Amplificación del cDNA de los receptores de la CRH en la línea celular HEK-293. En la línea celular que expresan ambos receptores, la amplificación por RT-PCR resultó en la obtención de dos bandas de 1400 y 1441 pb correspondientes a los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α , respectivamente.

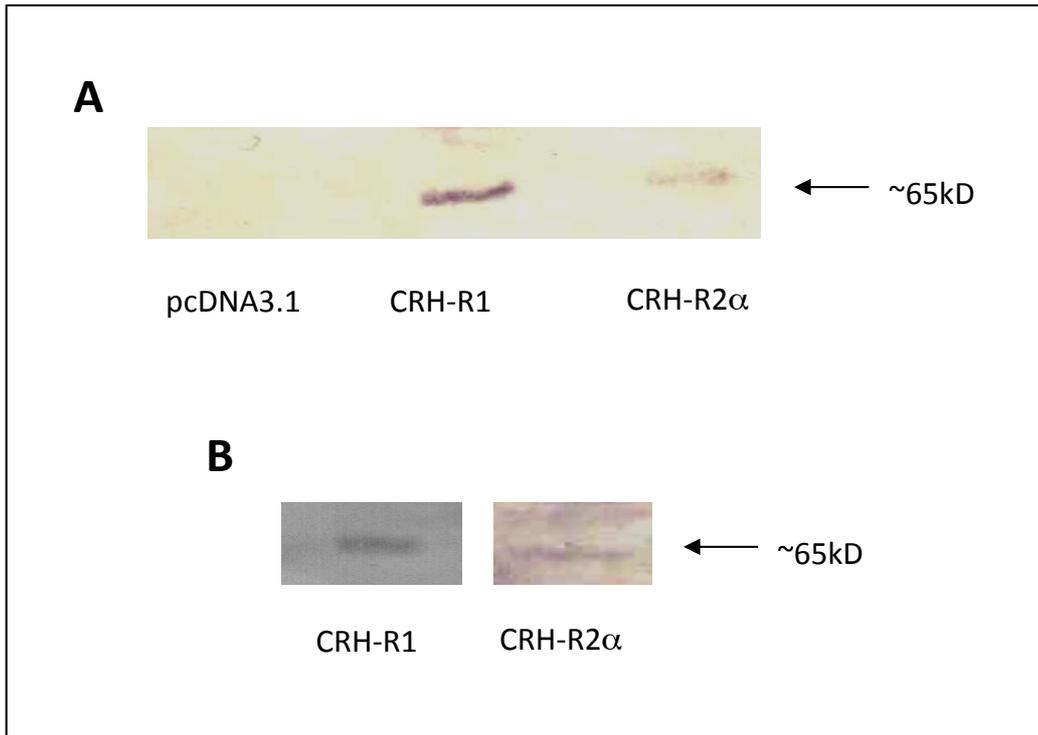


Figura 9. Presencia de los receptores CRH-R1 y CRH-R2 α en células HEK-293. (A) células HEK-293 fueron transfectadas con CRH-R1 o CRH-R2 α , y (B) células HEK-293 co-transfectadas con ambos receptores. Los receptores fueron inmunoprecipitados de células completas e identificadas por Western blot como se describe en Materiales y Métodos.

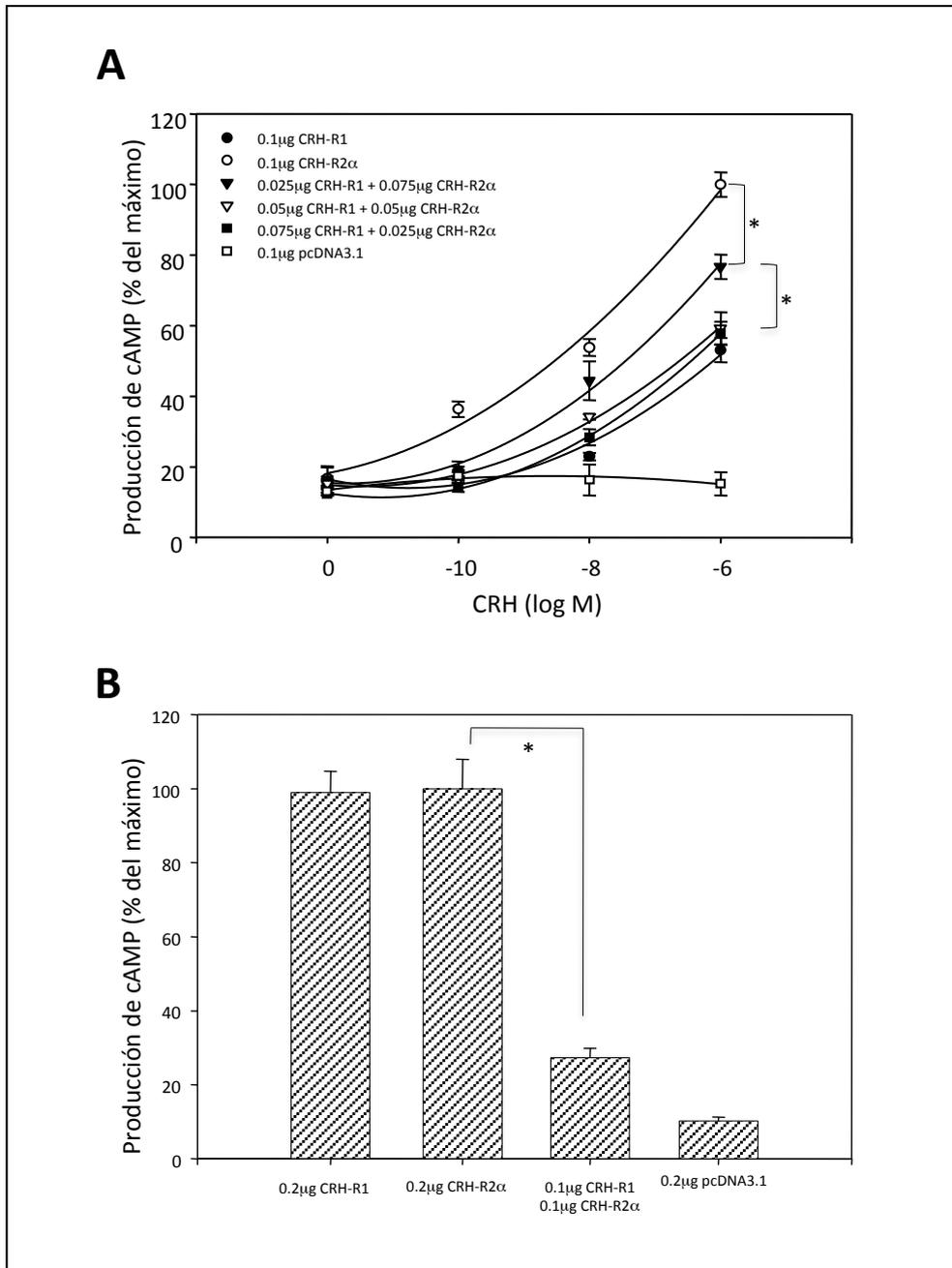


Figura 10. La coexpresión de CRH-R1 y CRH-R2 α disminuye la producción de cAMP. (A) células HEK-293 co-transfectadas con los receptores de la CRH a una concentración final de 0.1μg de DNA. La producción de cAMP fue determinada después de la estimulación con diferentes concentraciones de CRH. (B) la producción de cAMP fue cuantificada después de la estimulación con 10⁻⁷M de CRH en células co-transfectadas con los receptores de la CRH a una concentración final de 0.2μg. Cada experimento fue repetido al menos tres veces con resultados similares. p<0.001 vs. diferentes grupos

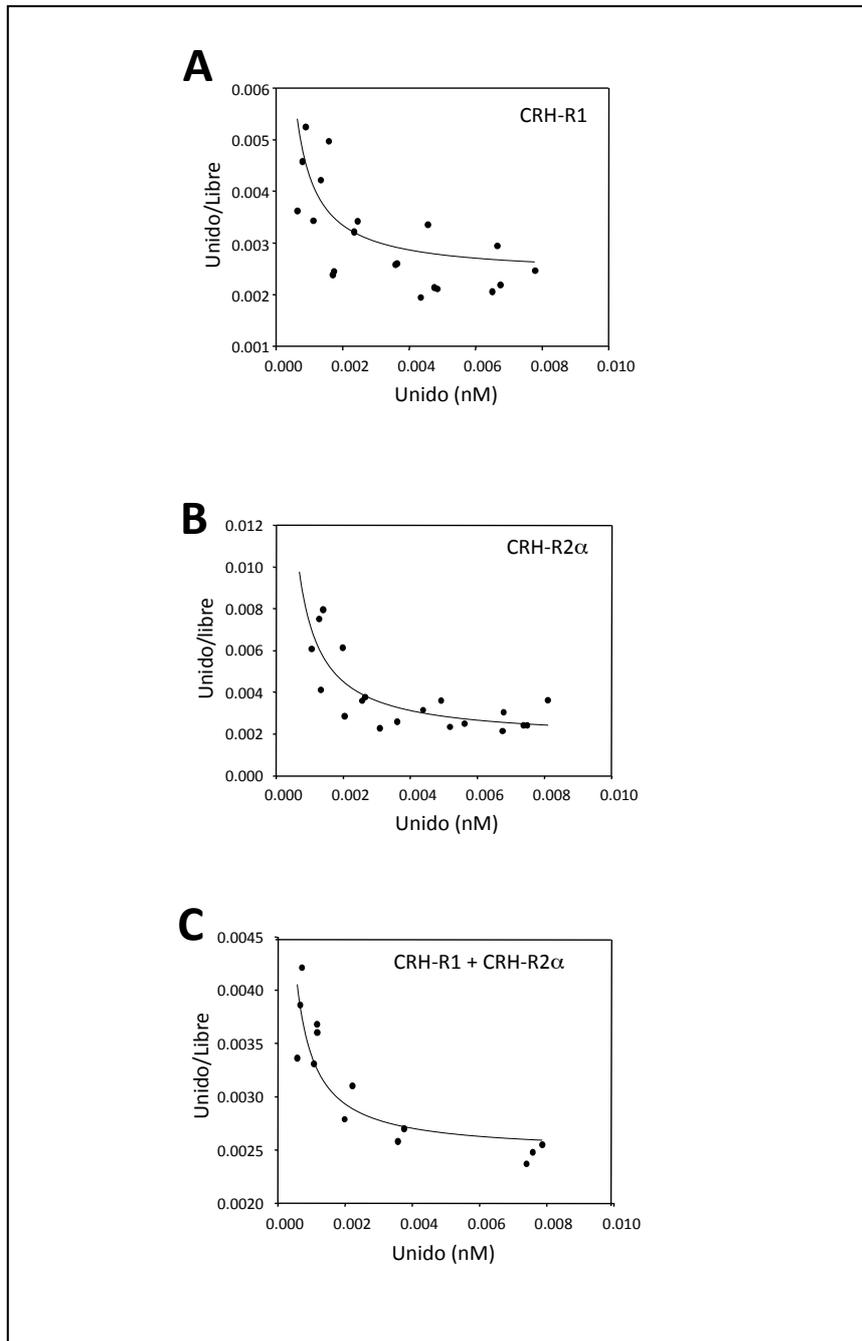


Figura 11. La unión del CRH a sus receptores no se ve modificada cuando se coexpresan CRH-R1 y CRH-R2 α . Los ensayos de saturación en células HEK-293 que expresan el CRH-R1 (A), CRH-R2 α (B) y CRH-R1+CRH-R2 α (C). El análisis de Scatchard demostró un modelo de dos sitios de unión para los receptores de la CRH. Cada experimento fue repetido al menos tres veces con resultados similares

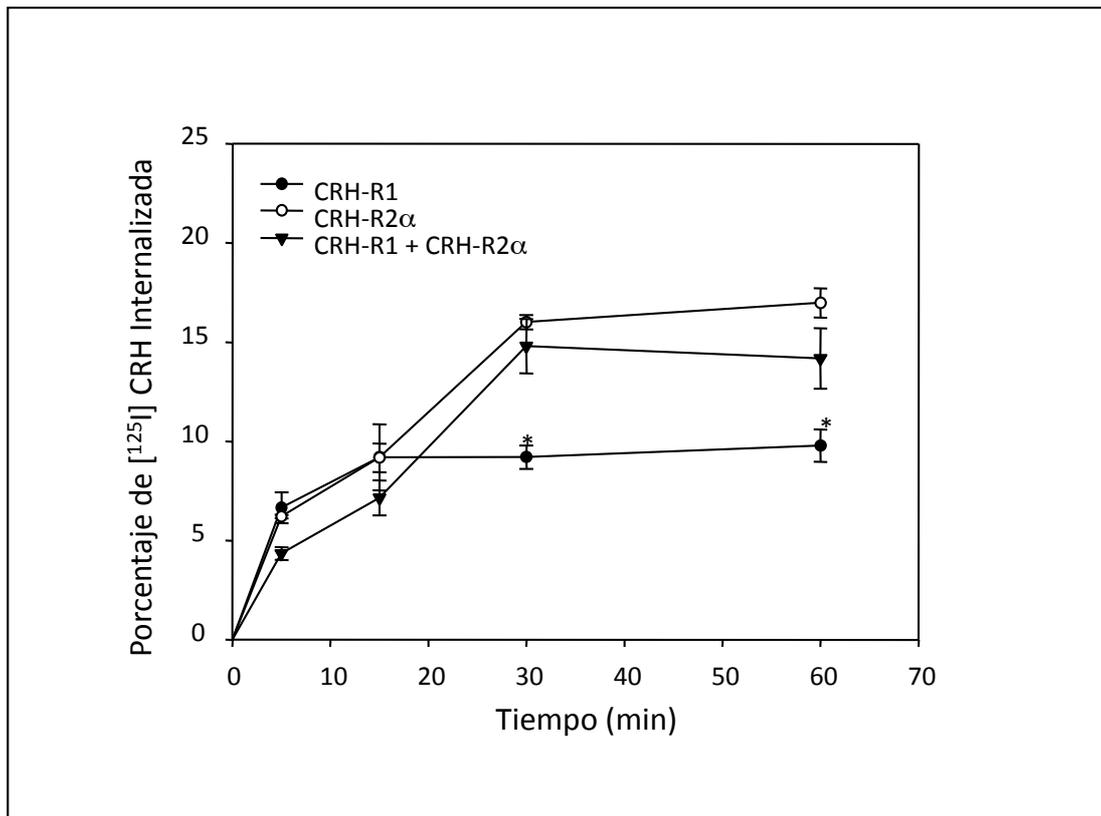


Figura 12. El porcentaje de receptores internalizados y la velocidad de internalización no se modifican al coexpresar a los receptores de la CRH. Células HEK-293 fueron transfectadas transitoriamente con los receptores de la CRH y fueron incubados por los tiempo indicados con $[^{125}\text{I}]\text{CRH}$ a 37°C . Tanto el ligando unido en la superficie como el citosólico fueron determinados como se describe en Materiales y Métodos. Cada experimento fue repetido al menos tres veces con resultados similares. $p < 0.001$ vs. datos en el tiempo similar.

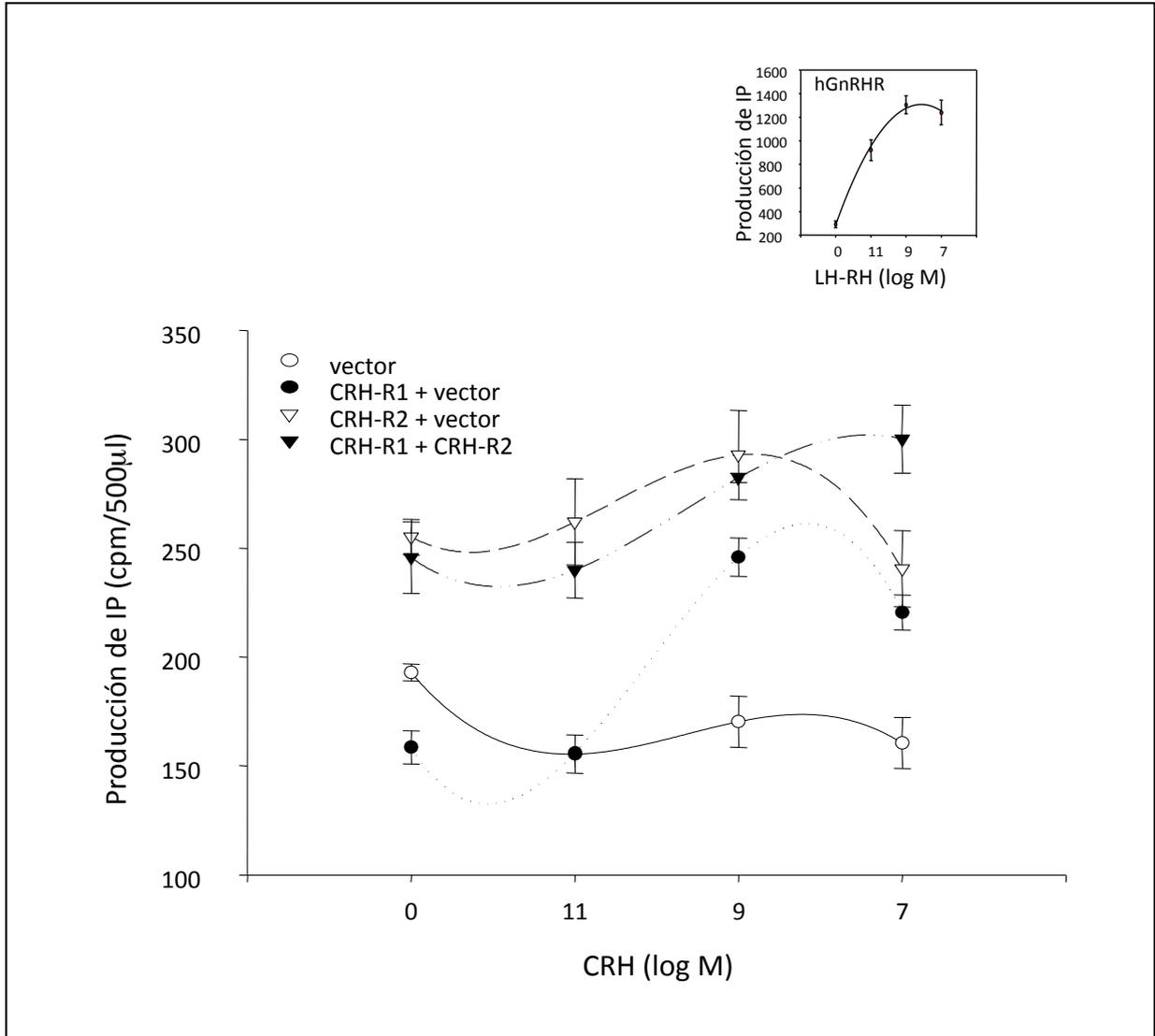


Figura 13. La expresión de los receptores de la CRH no inducen la producción de fosfatos de inositol en células HEK-293. Células cotransfectadas con los receptores de la CRH a una concentración final de 0.1µg de DNA. La producción de IP fue determinada después de la estimulación con diferentes concentraciones de CRH. En el recuadro superior se muestra la producción de IP para el receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) después de la estimulación con diferentes concentraciones su agonista LH-RH. Cada experimento fue repetido al menos tres veces con resultados similares.

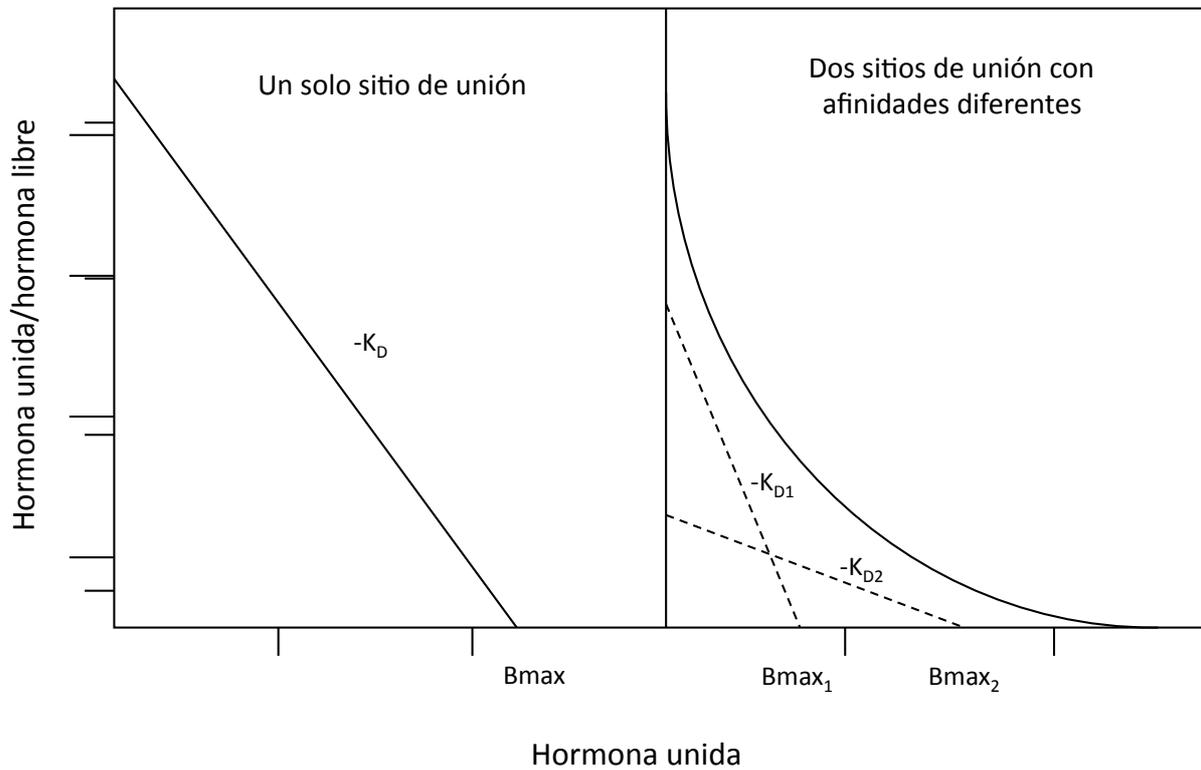


Figura. Análisis por Scatchard de la interacción hormona-receptor. Cuando la concentración de hormona unida/hormona libre es graficada en contra de la hormona unida para un modelo de un solo sitio de unión se obtiene una línea recta como se observa del lado izquierdo. La pendiente de la línea es el valor negativo de la constante de disociación (K_D) y la ordenada al origen en el eje de las abscisas es la concentración total de receptor (B_{max}). Los gráficos de Scatchard curvas son el resultado de la unión al receptor en dos sitios, en donde la curva es la suma de dos líneas rectas que representan un sitio de alta afinidad y baja capacidad (K_{D1} y B_{max1}) y otro sitio de baja afinidad y alta capacidad (K_{D2} y B_{max2}). Kahn et al., 1998.